

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

Danielle Aluska do Nascimento Pessoa Cabral

Técnicas para controle e prevenção da intoxicação em ruminantes por plantas
que contém monofluoroacetato de sódio

Patos/PB

2019

Danielle Aluska do Nascimento Pessoa Cabral

Técnicas para controle e prevenção da intoxicação em ruminantes por plantas que contém monofluoroacetato de sódio

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Saúde Animal da Universidade Federal de Campina Grande, como requisito parcial para obtenção do grau de Doutora em Ciência e Saúde Animal.

Prof. Dr. Franklin Riet-Correa Amaral

Orientador

Patos/PB

2019

C117t

Cabral, Danielle Aluska do Nascimento Pessoa.

Técnicas para controle e prevenção da intoxicação em ruminantes por plantas que contém monofluoroacetato de sódio / Danielle Aluska do Nascimento Pessoa Cabral. – Patos, 2019.

59 f.

Tese (Doutorado em Ciência e Saúde Animal) – Universidade Federal de Campina Grande, Centro de Saúde e Tecnologia Rural, 2019.

"Orientação: Prof. Dr. Franklin Riet-Correa Amaral".

Referências.

1. Saúde Animal. 2. Plantas Tóxicas. 3. Bactérias Degradadoras de MFA. 4. Ruminantes – Morte Súbita – Intoxicação. I. Amaral, Franklin Riet-Correa. II. Título.

CDU 591.13:632.52(043)

UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE
UNIDADE ACADÊMICA DE MEDICINA VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E SAÚDE ANIMAL

DANIELLE ALUSKA DO NASCIMENTO PESSOA CABRAL

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Saúde Animal da Universidade Federal de Campina Grande, como requisito parcial para obtenção do título de doutora em Ciência e Saúde Animal.

APROVADO EM 26.02.19.

EXAMINADORES:


Prof. Dra. Rosane Maria Trindade de Medeiros
Unidade Acadêmica de Medicina Veterinária/CSTR/UFCG
Presidente (Substituta) Representando o Orientador
Prof. Dr. Franklin Riet-Correa


Prof. Dr. Eliane Gomes de Miranda Neto
Unidade Acadêmica de Medicina Veterinária/CSTR/UFCG
Membro Interno


Prof. Dr. Glauco José Nogueira de Galiza
Unidade Acadêmica de Medicina Veterinária/CSTR/UFCG
Membro Interno


Prof. Dra. Layze Cilmara Alves da Silva Vieira
Unidade Federal do Oeste da Bahia Medicina Veterinária/UFOB
Membro Externo


Prof. Dr. Felício Galvão Júnior
Microbiólogo
Membro Externo

**A minha filha, Maria Vitória,
Ao meu marido, Fernando,
Aos meus pais, Jomar e Célia,
Por toda força, carinho e amor**

DEDICO.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a Deus, misericordioso e fiel, por ter me dado tanta força durante toda essa caminhada, por ter me segurado com sua mão em todos os momentos que caí, por ter me mostrado que nada acontece sem a sua permissão. Durante a execução desse trabalho, por tantas vezes pensei em desistir, mas Ele estava lá me mostrando que sempre após uma grande tempestade existe a bonança. Então, meu sentimento hoje com a finalização deste trabalho é de gratidão por todas as bênçãos alcançadas até aqui e as muitas que ainda estão por vir.

Ao meu marido, Fernando, por toda compreensão, companheirismo, apoio e incentivo, por todas as vezes que me acalmou e me ajudou a parar e pensar durante os momentos mais difíceis. Te amo demais!!

A minha filha, Maria Vitória, pelo carinho, apoio, palavras de incentivo e até ajuda durante a execução do trabalho no laboratório. Mamãe te ama e a sua existência alegria meus dias e me faz querer ser sempre melhor a cada dia.

Aos meus pais, Jomar e Célia, que foram e são minha fortaleza. Em todos os momentos, principalmente, nos mais difíceis sempre estavam lá com palavras de incentivo e me mostrando que o nosso Deus é fiel e nunca falha. Obrigada por tudo!

Aos meus irmãos, Raphael e Vanessa, que mesmo com a distância sempre tinham palavras de apoio, companheirismo e incentivo nas horas mais difíceis. A minha cunhada Ju, por cada palavra de apoio, que me fez refletir e não desistir. Muito obrigada!!

Aos meus avós, João e Marta, pelo incentivo e constante torcida pela minha vitória. Meu vô João que sempre diz: “O senhor é meu pastor e nada me faltará!”. Obrigada por ser esse exemplo de que nada é impossível para quem ter força de vontade e fé.

A minha vizinha Maria, pelas orações e bênçãos transmitidas.

Aos meus amigos, Radmácyo, Édipo, Gisele, Débora, Amanda e William, por me ajudarem na execução do trabalho, sem vocês não teria conseguido. Obrigada de verdade!!

Aos funcionários do laboratório de microbiologia do Hospital Veterinário da Universidade Federal de Campina Grande/ Patos - PB, que também considero como amigos,

Neide e Ednaldo, obrigada por toda colaboração e disposição na execução do trabalho, vocês são nota mil.

A todos os funcionários do Hospital Veterinário da UFCG/Patos, em especial ao motorista Werginton, que sempre estava disposto a me ajudar, obrigada por cada hora extra, por cada ida a Teixeira/PB nos horários mais impróprios, obrigada pela disposição. Obrigada também a Zé, pelo cuidado com os animais do experimento. Obrigada a “Seu Cuité” por cada conserto que precisei que fizesse, obrigada de verdade. A Jonas e a Adalgisa, funcionários do programa de pós-graduação em Ciência e Saúde Animal, por toda disposição e colaboração durante as burocracias do Doutorado.

Ao professor Franklin Riet-Correa, que mesmo à distância, me orientou com muita paciência e disposição. Obrigada por todo conhecimento a mim transmitido.

Ao professor Flávio e a professora Rosane, pelo apoio, orientação e disposição a mim concedidos.

Aos professores, Fábio Mendonça da Universidade Federal Rural de Pernambuco e Emanuel Souza da Universidade Federal do Paraná, pela parceria na execução do trabalho e por cada dúvida tirada. Obrigada por toda disposição.

Ao CNPq, que por meio do projeto Universal, financiou toda esta pesquisa.

À banca examinadora, pela disponibilidade de participar e pelas contribuições pessoais acerca da tese.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Saúde Animal, pela contribuição acadêmica e convívio harmonioso.

Aos que contribuíram direta e indiretamente para a conclusão deste trabalho.

A todos muito obrigada!

SUMÁRIO

	Página
RESUMO	8
ABSTRACT	9
LISTA DE TABELAS	10
LISTA DE FIGURAS	12
INTRODUÇÃO GERAL	12
REFERÊNCIAS	14
CAPITULO I: Técnicas para prevenção e controle da intoxicação em ruminantes por plantas que contém monofluoroacetato de sódio: Revisão de Literatura (Artigo será submetido à revista Pesquisa Veterinária Brasileira).....	15
ABSTRACT	16
RESUMO	17
INTRODUÇÃO	17
Administração de doses não tóxicas de plantas que contém MFA e do próprio MFA	19
Uso da transfaunação para transferência de resistência a intoxicação por plantas que contém MFA	20
Administração oral de bactérias degradadoras de MFA	21
Uso da técnica de aversão alimentar condicionada para evitar a ingestão de plantas que contém MFA	24
Uso de compostos no tratamento e controle da intoxicação por plantas que contém MFA	25
CONCLUSÕES	26
REFERÊNCIAS	26
CAPITULO II: Evaluation of resistance to natural poisoning by <i>Amorimia septentrionalis</i> in goats which had received sodium monofluoroacetate degrading bacteria (Artigo publicado na revista Pesquisa Veterinária Brasileira).....	31
ABSTRACT	32
RESUMO	33
INTRODUCTION	33

MATERIALS AND METHODS	34
RESULTS	35
DISCUSSION	36
CONCLUSIONS	36
REFERENCES.....	36
CAPÍTULO III: <i>Herbaspirillum seropedicae</i> como bactéria degradadora de monofluoroacetato de sódio: efeitos de sua inoculação em caprinos ingerindo <i>Amorimia septentrionalis</i> e nas concentrações deste composto em plantas pulverizadas com a bactéria (Artigo submetido para publicação na revista Pesquisa Veterinária Brasileira).....	41
ABSTRACT.....	42
RESUMO.....	43
INTRODUÇÃO.....	43
MATERIAL E MÉTODOS	44
RESULTADOS	46
DISCUSSÃO.....	46
CONCLUSÃO	47
REFERÊNCIAS.....	47
CONCLUSÃO GERAL.....	53
ANEXO	54

RESUMO

As plantas que contém monofluoroacetato de sódio (MFA) causam insuficiência cardíaca aguda em ruminantes, que geralmente está associada ao exercício físico. O controle desse tipo de intoxicação baseado na colocação de cercas em áreas infestadas por essas plantas, no uso de herbicidas e na remoção das mesmas, na maioria das vezes apresenta sucesso limitado. Com o objetivo de estudar e desenvolver novas técnicas de controle e prevenção das intoxicações em ruminantes por plantas que contém MFA, esta tese é composta por três capítulos. No capítulo I, foi realizada uma revisão bibliográfica com as novas técnicas que podem ser utilizadas para ajudar no controle e prevenção das intoxicações em ruminantes por plantas que contém MFA. No capítulo II, foi avaliada se a resistência à intoxicação por *Amorimia septentrionalis* em caprinos, obtida pela administração de bactérias degradadoras de MFA (*Ralstonia* sp., *Burkholderia* sp., *Paenibacillus* sp. e *Cupriavidus* sp.), persistia em condições de campo. Observou-se que os caprinos que receberam as bactérias foram capazes de ingerir a planta, a campo, por até 55 dias consecutivos sem apresentar sinais clínicos de intoxicação ou morte, já os caprinos controles ingeriram a planta por um período de 25 dias até o desenvolvimento de sinais clínicos de intoxicação ou morte. Esses resultados sugerem a necessidade de que para manter a proteção contra a intoxicação por plantas que contem MFA é necessário administrar as bactérias que hidrolisam esse composto de modo contínuo, provavelmente na forma de probióticos. No capítulo III, avaliou-se a capacidade de *Herbaspirillum seropedicae*, bactéria capaz de degradar diversos compostos tóxicos, induzir resistência à intoxicação por *A. septentrionalis* em caprinos e de degradar o MFA presente em *A. septentrionalis*. Constatou-se que os caprinos que receberam a bactéria foram capazes de ingerir uma quantidade maior de planta e conseqüentemente de MFA, e demoraram mais dias para desenvolver sinais clínicos de intoxicação, quando comparados com os caprinos que não receberam a bactéria. Pode-se constatar também que quando *H. seropedicae* é colocada na superfície de *A. septentrionalis* é capaz de reduzir significativamente os índices de MFA na planta. Tanto que oito dias após a pulverização com a bactéria a quantidade de MFA nas plantas reduziu de $1,21 \pm 0,53$ $\mu\text{g}/\text{mg}$ para $0,24 \pm 0,05$ $\mu\text{g}/\text{mg}$. Pode-se concluir que existem novas técnicas que experimentalmente foram eficientes no controle e prevenção das intoxicações em ruminantes por plantas que contém MFA, no entanto, a maioria delas apresentam limitações para aplicação em propriedades comerciais, principalmente em propriedades com um grande número de animais. E novos experimentos devem ser realizados para estudar a possibilidade da utilização de bactérias endofíticas, que degradam MFA, na diminuição da toxicidade de plantas que contém esse composto.

PALAVRAS-CHAVE: Plantas tóxicas; bactérias degradadoras de MFA; morte súbita; *Herbaspirillum seropedicae*; *Amorimia septentrionalis*.

ABSTRACT

Plants containing sodium monofluoroacetate (MFA) cause acute heart failure in ruminants, which is usually associated with exercise. The control of this type of poisoning based on the placement of fences in areas infested by these plants, the use of herbicides and the removal of them, most of the time has limited success. With the objective of studying and developing new techniques for the control and prevention of intoxications in ruminants by plants containing MFA, this thesis is composed of three chapters. In Chapter I, a bibliographic review was carried out with the new techniques that can be used to help in the control and prevention of intoxications in ruminants by plants containing MFA. In Chapter II, it was evaluated whether the resistance to intoxication by *Amorimia septentrionalis* in goats, obtained by the administration of MFA degrading bacteria (*Ralstonia* sp., *Burkholderia* sp., *Paenibacillus* sp. and *Cupriavidus* sp.), persisted under field conditions. It was observed that the goats that received the bacteria were able to ingest the plant in the field for up to 55 consecutive days without clinical signs of intoxication or death, whereas the control goats ingested the plant for a period of 25 days until the development clinical signs of intoxication or death. These results suggest the need to maintain the protection against plant poisoning containing MFA it is necessary to administer the bacteria that hydrolyze this compound continuously, probably in the form of probiotics. In Chapter III, the ability of *Herbaspirillum seropedicae*, a bacterium capable of degrading various toxic compounds, inducing resistance to *A. septentrionalis* intoxication in goats and degrading the MFA present in *A. septentrionalis* was evaluated. It was found that the goats that received the bacteria were able to ingest a larger amount of plant and consequently of MFA, and took more days to develop clinical signs of intoxication, when compared with the goats that did not receive the bacterium. It can also be observed that when *H. seropedicae* is placed on the surface of *A. septentrionalis* it is able to significantly reduce the MFA indices in the plant. So much so that eight days after spraying with the bacteria the amount of MFA in the plants reduced from $1.21 \pm 0.53 \mu\text{g} / \text{mg}$ to $0.24 \pm 0.05 \mu\text{g} / \text{mg}$. It can be concluded that there are new techniques that were experimentally efficient in the control and prevention of intoxications in ruminants by plants that contain MFA, however, most of them have limitations for application in commercial properties, mainly in properties with a large number of animals. And new experiments should be conducted to study the possibility of using endophytic bacteria, which degrade MFA, in reducing the toxicity of plants containing that compound.

KEY WORDS: Toxic plants; MFA degrading bacteria; sudden death; *Herbaspirillum seropedicae*; *Amorimia septentrionalis*.

LISTA DE TABELAS

	Páginas
CAPÍTULO I - Técnicas para prevenção e controle da intoxicação em ruminantes por plantas que contém monofluoroacetato de sódio: Revisão de Literatura	
QUADRO 1 - Principais plantas que causam morte súbita, associada ao exercício, em ruminantes no Brasil.....	30
CAPITULO II - Evaluation of resistance to natural poisoning by <i>Amorimia septentrionalis</i> in goats which had received sodium monofluoroacetate degrading bacteria	
TABLE 1 - Period from the beginning of exposure to natural poisoning by <i>Amorimia septentrionalis</i> in goats inoculated with sodium monofluoroacetate degrading bacteria (Group 1 and 2) and control goats (Group 3) until clinical signs of poisoning or death.....	39
TABLE 2 - Mean and standard deviation of the period from beginning of the exposure to natural poisoning by <i>Amorimia septentrionalis</i> in goats inoculated with sodium monofluoroacetate degrading bacteria (Group 1 and 2) and control goats (Group 3) until death of the animals.....	39
CAPÍTULO III - <i>Herbaspirillum seropedicae</i> como bactéria degradadora de monofluoroacetato de sódio: efeitos de sua inoculação em caprinos ingerindo <i>Amorimia septentrionalis</i> e nas concentrações deste composto em plantas pulverizadas com a bactéria	
QUADRO 1 - Dia de observação de sinais clínicos na intoxicação por <i>Amorimia septentrionalis</i>, quantidade de planta ingerida e quantidade de MFA ingerida até o aparecimento dos sinais clínicos nos caprinos do Grupo 1, que ingeriram <i>Herbaspirillum seropedicae</i> e <i>Amorimia septentrionalis</i> e do Grupo 2, que ingeriram somente a planta.....	51
QUADRO 2 - Quantidade de MFA mensurada antes e oito dias após a pulverização de <i>Amorimia septentrionalis</i> com a bactéria <i>Herbaspirillum seropedicae</i>.....	51

LISTA DE FIGURAS

Páginas

CAPÍTULO II - Evaluation of resistance to natural poisoning by *Amorimia septentrionalis* in goats which had received sodium monofluoroacetate degrading bacteria

FIGURE 1 - (A) Area with large amount of *Amorimia septentrionalis* in the location where the experiment was carried out (Limoeiro/PE). (B) Caprine spontaneously ingesting the leaves of *A. septentrionalis* 16 days after the start of the experiment. (C) Predominance of *A. septentrionalis* in comparison with other plants. (D) Caprine from Group 3 presenting distended neck and engorged jugular after natural ingestion of *A. septentrionalis*. (E) Goat from Group 2 showing clinical signs of intoxication, which evolved to death 57 days after the natural ingestion of *A. septentrionalis*..... 40

FIGURE 2 - Graphic representing the rainfall in the city of Limoeiro/PE during the entire year of 2014 until January 2015..... 40

CAPÍTULO III - *Herbaspirillum seropedicae* como bactéria degradadora de monofluoroacetato de sódio: efeitos de sua inoculação em caprinos ingerindo *Amorimia septentrionalis* e nas concentrações deste composto em plantas pulverizadas com a bactéria

FIGURA 1 - (A) Caprino do grupo controle apresentando severa depressão e decúbito esternal após a ingestão de *Amorimia septentrionalis*. (B) Mesmo animal apresentando ingurgitamento da veia jugular..... 52

INTRODUÇÃO GERAL

As intoxicações em ruminantes por plantas que contém monofluoroacetato de sódio (MFA) causam insuficiência cardíaca aguda associada ao exercício físico, geralmente ocasionando a morte súbita do animal. No Brasil, estas intoxicações são responsáveis por aproximadamente 500.000 mortes de bovinos anualmente. Dentre as plantas que contém MFA, *Palicourea marcgravii* é a mais importante do Brasil, uma vez que pode ser encontrada em quase todo território brasileiro, já *Amorimia septentrionalis* é a mais importante do semiárido nordestino (TOKARNIA et al., 2012; PESSOA et al., 2013).

Não existe tratamento efetivo para as intoxicações por plantas que contém MFA, já que a evolução da doença é superaguda. O controle dessas intoxicações pela utilização de métodos tradicionais como o uso de herbicidas, cercar as áreas infestadas pelas plantas ou arrancar e queimar as mesmas apresenta sucesso limitado (BARBOSA et al., 2003). Contudo, existem estudos que sugerem métodos de controle eficazes contra essa intoxicação, a maioria desses métodos baseia-se na ocorrência de bactérias que hidrolisam o MFA, no rúmen dos animais, tornando-os resistentes a intoxicação (PESSOA et al., 2013). É importante a realização de estudos que demonstrem a eficiência e aplicabilidade dos novos métodos de controle eficazes contra a intoxicação em ruminantes por plantas que contém MFA

A utilização de bactérias degradadoras de MFA é um dos métodos que tem demonstrado resultados satisfatórios, visto que foi observado que a resistência obtida por meio da administração dessas bactérias (*Burkholderia* sp. e *Ralstonia* sp.) pode durar até 30 dias, se a administração for contínua e simultânea a da planta (SILVA et al., 2016). Considerando esses resultados é notável a importância da execução de estudos que avaliem se essa resistência pode persistir em condições de campo (ingestão natural da planta), bem como se pode ser induzida pela utilização de outras bactérias capazes de hidrolisar o MFA.

Herbaspirillum seropedicae é uma bactéria endofítica, capaz de colonizar diversas espécies de plantas (BALDANI & BALDANI, 2004) e também de degradar vários compostos tóxicos, como o MFA, por meio da ação de enzimas, chamadas de dehalogenases (FETZNER & LINGERS, 1994; PEDROSA et al., 2011). A utilização dessa bactéria para o controle das intoxicações por plantas que contém MFA é uma alternativa sugerida no presente estudo. Foram testadas duas hipóteses: 1) no rúmen de caprinos a bactéria degrada o MFA conferindo

maior resistência aos animais; e 2) *H. seropedicae* coloniza *Amorimia septentrionalis* diminuindo a concentração de MFA da planta.

Esta tese é composta por três Capítulos. O Capítulo I é uma revisão bibliográfica que será enviada para publicação na revista Pesquisa Veterinária Brasileira. Apresenta uma revisão atualizada sobre as técnicas de controle e prevenção da intoxicação de ruminantes por plantas que contêm MFA. O Capítulo II é um artigo científico publicado na revista Pesquisa Veterinária Brasileira, e avalia se a resistência a *A. septentrionalis* em caprinos, adquirida pela administração oral de bactérias degradadoras de MFA (*Paenibacillus* sp., *Cupriavidus* sp., *Burkholderia* sp. e *Ralstonia* sp.), persiste quando os animais são expostos a condições de campo (intoxicação natural pela planta). O Capítulo III é também um artigo científico, submetido para publicação na revista Pesquisa Veterinária Brasileira. Avalia a eficácia da utilização de *H. seropedicae* na degradação do MFA presente em *A. septentrionalis* e se a inoculação dessa bactéria, em caprinos, confere proteção contra a intoxicação por *A. septentrionalis*.

REFERÊNCIAS

BALDANI, J.I.; BALDANI, V.L.D. History on the biological nitrogen fixation research in graminaceous plants: special emphasis on the Brazilian experience. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*. 77(3): 549-579, 2004.

BARBOSA, J. D.; OLIVEIRA, C.M.C.; TOKARNIA, C.H.; RIET-CORREA, F. Comparação da sensibilidade de bovinos e búfalos à intoxicação por *Palicourea marcgravii* (Rubiaceae). **Pesq. Vet. Bras.**, v. 23, n. 4, p. 167-172, 2003.

FETZNER, S.; LINGERS, F. Bacterial dehalogenases: biochemistry, genetics, and Biotechnological applications. **Microbiol. Revs.**, 58(4):641- 685, 1994.

PEDROSA, F.O.; MONTEIRO, R.A.; WASSEM, R.; CRUZ, L.M.; AYUB, R.A. et al. Genome of *Herbaspirillum seropedicae* strain SmR1, a specialized diazotrophic endophyte of tropical grasses. **PLoS Genet**. 7(5): e1002064, 2011.

PESSOA, C.R.M.; MEDEIROS, R.M.T.; RIET-CORREA, F. Importância econômica, epidemiologia e controle das intoxicações por plantas no Brasil. **Pesq. Vet. Bras.**, v. 33, n.6, p.752-758, 2013.

TOKARNIA, C.H.; BRITO, M.F.; BARBOSA, J.D.; PEIXOTO, P.V.; DOBEREINER, J. **Plantas tóxicas do Brasil**. 2ª ed. Rio de Janeiro: Helianthus, 2012, 586p.

SILVA L.C.A.; PESSOA D.A.N.; LOPES, J. R.G.; ALBUQUERQUE, L.G.; SILVA, L.S.A.; GARINO, F.JR; RIET-CORREA, F. Protection against *Amorimia septentrionalis* poisoning in goats by the continuous administration of sodium monofluoroacetate-degrading bacteria. **Toxicon**, v. 111, p. 65-68, 2016.

CAPITULO I

Técnicas para prevenção e controle da intoxicação em ruminantes por plantas que contém monofluoroacetato de sódio: Revisão de Literatura

(Artigo será submetido à revista Pesquisa Veterinária Brasileira, Qualis A2)

Técnicas para prevenção e controle da intoxicação em ruminantes por plantas que contém monofluoroacetato de sódio: Revisão de Literatura¹

Danielle A. N. Pessoa², Rosane M.T. Medeiros³ & Franklin Riet-Correa⁴

ABSTRACT.- Pessoa D.A.N, Medeiros R.M.T. & Riet-Correa F. [Techniques for prevention and control of intoxication in ruminants by plants containing sodium monofluoroacetate: Literature Review]. Técnicas para prevenção e controle da intoxicação em ruminantes por plantas que contém monofluoroacetato de sódio: Revisão de Literatura. 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: danipessoavet14@gmail.com

Plants that cause sudden death associated with exercise in ruminants and contain monofluoroacetate (MFA) are responsible for large losses in Brazilian cattle raising, since in cattle an estimated 500,000 deaths annually. The control and treatment of this type of poisoning is often ineffective, since the evolution of the disease is super-acute, and most often causes the death of the animal. Due to the difficulty in controlling this intoxication, several studies suggest alternatives to prevent it, making the animals resistant to MFA present in these plants. The objective of the present work is to make a literature review of the techniques used experimentally to control the intoxication of ruminants by MFA containing plants, including: the administration of non-toxic doses of plants containing MFA and of the MFA itself; use of transfaunation to transfer resistance to intoxication; oral administration of MFA degrading bacteria; use of the conditioned food aversion technique to avoid the ingestion of plants containing MFA; and use of acetamide as an antidote against plant poisoning containing MFA. By conducting this survey it can be concluded that none of these techniques are commercially available and that the use of MFA-degrading bacteria may be the most viable alternative, since a probiotic containing bacteria that hydrolyze MFA may be created to be administered to animals in areas where the plants containing the compound are endemic. Another alternative tested was the spraying of *Amorimia septentrionalis* with the endophytic bacterium *Herbaspirillum seropedicae*, which resulted in a decrease in the concentration of MFA in the plant. New experiments should be performed to prove this fact and the viability of the technique for the control of intoxication.

INDEX TERMS: toxic plants, plants containing MFA, sudden death, poison control.

¹Recebido em.....

Aceito para publicação em.....

² Programa de Pós-Graduação em Ciência e Saúde Animal (PPCS), Unidade Acadêmica de Medicina Veterinária (UAMV), Centro de Saúde e Tecnologia Rural (CSTR), Universidade Federal de Campina Grande (UFCG), Avenida Universitária s/n, Bairro Santa Cecília, Patos, PB 58700- 970, Brazil. *Corresponding author: danipessoavet14@gmail.com

³Unidade Acadêmica de Medicina Veterinária (UAMV), Centro de Saúde e Tecnologia Rural (CSTR), Universidade Federal de Campina Grande (UFCG), Avenida Universitária s/n, Bairro Santa Cecília, Patos, PB 58700- 970, Brazil.

⁴Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria (INIA), Plataforma de Salud Animal, Estación Experimental INIA La Estanzuela, Ruta 50 Km 11, 39173, Colonia, Uruguay.

RESUMO.- As plantas que causam morte súbita associada ao exercício em ruminantes, e contém monofluoroacetato (MFA) são responsáveis por grandes perdas na pecuária brasileira, uma vez que em bovinos são estimadas 500.000 mortes anualmente. O controle e tratamento desse tipo de intoxicação, na maioria das vezes, não apresenta eficiência, visto que a evolução da doença é superaguda, e geralmente ocasiona a morte do animal. Devido à dificuldade no controle dessa intoxicação, diversos estudos sugerem alternativas para preveni-la, tornando os animais resistentes ao MFA presentes nessas plantas. O objetivo do presente trabalho é fazer uma revisão bibliográfica das técnicas utilizadas experimentalmente para controlar a intoxicação de ruminantes por plantas que contém MFA, incluindo: administração de doses não tóxicas de plantas que contém MFA ou do próprio MFA; uso da transfaunação para transferência de resistência à intoxicação; administração oral de bactérias degradadoras de MFA em ruminantes; uso da técnica de aversão alimentar condicionada para evitar a ingestão de plantas que contém MFA; e uso de acetamida como antídoto contra a intoxicação por plantas que contém MFA. Com a realização desse levantamento pode-se concluir que nenhuma dessas técnicas está disponível comercialmente, e que a utilização de bactérias degradadoras de MFA pode ser a alternativa mais viável, uma vez que se pode criar um probiótico, contendo bactérias que hidrolisam MFA, para ser administrado na alimentação de animais em áreas onde as plantas que contém esse composto são endêmicas. Outra alternativa testada foi a pulverização de *Amorimia septentrionalis* com a bactéria endofítica *Herbaspirillum seropedicae* o que resultou na diminuição da concentração de MFA na planta. Novos experimentos deverão ser realizados para comprovar este fato e a viabilidade da técnica para o controle da intoxicação.

TERMOS DE INDEXAÇÃO: plantas tóxicas, plantas que contém MFA, morte súbita, controle de intoxicações.

INTRODUÇÃO

No Brasil, existem atualmente 131 espécies de plantas tóxicas, divididas em 79 gêneros. Dentre essas, o grupo de plantas tóxicas que causam morte súbita associada ao exercício é representado por 22 espécies pertencentes a três famílias: Rubiaceae, Malpighiaceae e Bignoniaceae (Nascimento et al. 2018). As espécies nas quais já foi confirmada a presença do monofluoroacetato de sódio (MFA) como princípio tóxico são: *Palicourea marcgravii*, *Palicourea aeneofusca* (Lee et al. 2012), *Palicourea grandiflora*, *Palicourea aff. juruana*, *Palicourea amapaensis*, *Palicourea macarthurorum*, *Palicourea nigricans*, *Palicourea vacillans*, *Palicourea barraensis* (anteriormente classificada como *Palicourea aff. longiflora*), *Palicourea longiflora* (Cook et al. 2014, Carvalho et al. 2016), *Amorimia amazonica*, *Amorimia exotropa*, *Amorimia pubiflora*, *Amorimia rigida*, *Amorimia septentrionalis* (Lee et al. 2012), *Niedenzuella stannea* (Arruda et al. 2017) e *Tanaecium bilabiatum* (anteriormente identificada como *Arrabidaea bilabiata*) erroneamente identificada como *Fridericia japurensis* (*Arrabidaea japurensis*) no estado de Roraima, Brasil (Lima et al. 2016).

As plantas que causam morte súbita em ruminantes são importantes em todo país, uma vez que a intoxicação, geralmente, desencadeia a morte dos animais causando perdas irreparáveis no rebanho. Os bovinos são mais sensíveis a essas plantas, do que os caprinos e ovinos, tanto que aproximadamente dos 500.000 bovinos que morrem anualmente em decorrência de intoxicações por plantas tóxicas são por plantas que causam morte súbita associada ao exercício (Pessoa et al. 2013).

Dentre as plantas que causam morte súbita e contém MFA, as mais importantes e responsáveis por surtos de intoxicação em ruminantes no Brasil são: *P. marcgravii*, encontrada em praticamente todo território brasileiro, com exceção dos estados da região Sul, do semiárido do Nordeste e do Mato Grosso do Sul (Tokarnia et al. 2012); *P. aeneofusca*, que

está presente nos estados da Paraíba, Pernambuco, Alagoas e Bahia (Brito et al. 2016); *A. septentrionalis*, anteriormente classificada como *Mascagnia rígida* (Davis e Anderson 2010), pode ser encontrada principalmente na vegetação de caatinga, sobre afloramentos rochosos nos estados de Pernambuco, Alagoas, Rio Grande do Norte, Paraíba e Ceará. É considerada a planta tóxica mais importante para região do semiárido nordestino (Duarte et al. 2013). No Norte do Brasil as espécies mais importantes são *P. grandiflora*, encontrada no Acre, Amazonas, Pará e Rondônia; *P. barraensis*, presente nos estados de Amazonas, Roraima e Rondônia; *P. longiflora*, encontrada no Amazonas, Pará e Rondônia; *Amorimia amazonica* presente no Acre, Amazonas e Rondônia (Duarte et al. 2013, Cook et al. 2014, Carvalho et al. 2016) e *T. bilabiatum*, que pode ser encontrada em todo território brasileiro, no entanto, na região Amazônica é a planta tóxica mais importante para bovinos depois da *Palicourea marcgravii* (Tokarnia et al. 2012) (Quadro 1).

Existem marcadas variações na quantidade de MFA tanto entre as partes da planta como entre as plantas que pertencem ao mesmo gênero, mesma espécie e conseqüentemente entre as plantas de gêneros diferentes (Lee et al 2012). As plantas do gênero *Palicourea* apresentam maiores quantidades do composto do que as dos demais gêneros, elas podem conter de 50 a 100 vezes mais MFA do que as do gênero *Amorimia* (Lee et al. 2012). Em *P. marcgravii* a quantidade de MFA encontrada foi de 0,88% em folhas no início do seu desenvolvimento e 0,24% nas folhas maduras, já em *P. aeneofusca* a concentração foi de 0,09% nas folhas (Lee et al. 2012). Podem ocorrer variações na quantidade de MFA até mesmo entre plantas da mesma espécie, por exemplo, a concentração de MFA em plantas *P. marcgravii* variou de 0,03% a 0,58% e em plantas *P. aeneofusca* de 0,03 a 0,18% (Cook et al. 2014). Em *P. longiflora* a concentração nas folhas variou entre 0,006% até 0,16% e nas folhas de *P. barraensis* a concentração foi de 0,01% (Carvalho et al. 2016) (Quadro 1).

Em *A. amazonica*, *A. exotropa*, *A. pubiflora* e *A. rigida* foram encontrados nas folhas respectivamente 0,0007%, 0,02%, 0,06%, e 0,002% de MFA (Lee et al 2012). Já em *A. septentrionalis*, coletadas na Paraíba, as concentrações encontradas variaram de acordo com as partes da planta aproximadamente: 0,002% nas folhas maduras, 0,001% nas hastes, 0,008% nas flores e 0,006% nas sementes (Lee et al. 2012). Nas amostras coletadas em Pernambuco, a concentração foi praticamente a mesma, 0,0021% de MFA nas folhas da planta adulta (Albuquerque et al. 2014). No entanto, Lopes et al. (2019, no prelo) encontraram 0,00074 % de MFA nas folhas de *A. septentrionalis* e Pessoa et al. (2019, dados não publicados) encontraram 0,16% de MFA também em folhas de *A. septentrionalis*, as duas plantas coletadas no mesmo local, na Paraíba (Quadro 1). Esta variação reforça as afirmações de que a toxicidade da planta varia de acordo com as fases de desenvolvimento da mesma (Lee et al. 2012, Tokarnia et al. 2012), uma vez que plantas coletadas da mesma região apresentaram variações na toxicidade. Nos trabalhos não se menciona, mas provavelmente essas plantas foram coletadas em épocas diferentes.

Em *N. stannea* as concentrações de MFA nas folhas foram menores (0,0003%), quando comparadas com as das sementes (0,06%), frutos (0,0008 a 0,02%) e flores (0,0003 a 0,006%) (Arruda et al. 2017). E em *T. bilabiatum* as concentrações de MFA nas folhas variaram de 0,0001% a 0,041% de acordo com o local que a planta foi coletada (Lima et al. 2016).

O MFA é um composto altamente tóxico para todas as espécies animais, inclusive para o homem. Age no clico dos ácidos tricarbóxicos (Ciclo de Krebs), por meio da denominada "síntese letal", na qual o metabólicó ativo (fluorocitrato) vai bloquear a ação de coenzimas, percussoras para a formação de ATP, conseqüentemente ocorre o bloqueio dos processos

metabólicos dependentes de energia e o acúmulo de citrato nos tecidos, acarretando na morte do animal (Nogueira et al. 2011).

Os principais sinais clínicos, geralmente associados ao exercício físico, observados na intoxicação por plantas que contém MFA em ruminantes são: apatia, anorexia, taquicardia, taquipneia, relutância ao movimento, mugidos, diarreia, tremores musculares, ingurgitamento da jugular com pulso venoso, incoordenação motora, decúbito esternal que evolui para decúbito lateral, movimentos de pedalagem, opistótono e queda (Vasconcelos et al. 2008, Pessoa et al. 2015, Oliveira et al. 2013).

O tratamento e controle desse tipo de intoxicação é um grande desafio para os médicos veterinários, uma vez que a evolução é superaguda, na maioria das vezes resultando na morte dos animais. Algumas medidas convencionais como uso de herbicidas, isolamento de áreas infestadas e remoção manual das plantas, não apresentam eficiência, principalmente em propriedades com grandes extensões de terra e com criação extensiva (Riet-Correa & Medeiros 2001, Pessoa et al. 2013). Uma medida sugerida por Tokarnia et al. (2012), é evitar a movimentação dos animais por 7 a 15 dias, acredita-se que este é o tempo necessário em média para que o MFA seja desintoxicado do organismo. Devido a essa dificuldade no tratamento e prevenção deste tipo de intoxicação vários estudos foram desenvolvidos com intuito de tornar os animais resistentes à intoxicação, e posteriormente desenvolver técnicas que possam ser utilizadas em áreas onde é comum a ocorrência de plantas que contém MFA. O objetivo do presente estudo é fazer uma revisão bibliográfica atualizada dos novos métodos de controle para intoxicação de ruminantes por plantas que contém MFA.

Administração de doses não tóxicas de plantas que contém MFA ou do próprio MFA

No Brasil, existem relatos populares, de que animais provenientes de áreas com a ocorrência de plantas que contém MFA são mais resistentes à intoxicação por plantas que contém esse composto do que animais que vivem em pastagens livres dessas plantas (Silva et al. 2008). Acredita-se que isso ocorre devido ao tempo de exposição evolucionária a essas pastagens, por preferências dietéticas, níveis de especialização dietética e preferências de habitat (Twigg & King 2000). Também porque, possivelmente, esses animais apresentam no rúmen bactérias capazes de degradar o MFA, por meio da produção da enzima fluoroacetato dehalogenase (Becker et al. 2016).

Para se comprovar que a administração diária de doses não tóxicas de plantas que contém MFA causa resistência à intoxicação por plantas que contém esse composto em ruminantes, diversos estudos foram realizados.

Oliveira et al. (2013) ofereceram inicialmente a seis caprinos (Grupo 1), doses não tóxicas sucessivas de *P. aeneofusca* também por períodos alternados (0,02g/kg durante cinco dias, 0,02g/kg por cinco dias, 0,03g/kg por cinco dias e 0,03g/kg durante mais cinco dias, com intervalo de 10 dias sem ingerir a planta entre o primeiro e o segundo período, e de 15 dias entre o terceiro e o quarto período). Quinze dias após o último período de administração, esses caprinos, juntamente com outros seis caprinos (Grupo 2), que não receberam doses prévias da planta, foram desafiados com 0,03g/kg da planta por 19 dias, e a partir do 20º dia, a dose foi aumentada para 0,04g/kg e foi administrada por mais 12 dias. Após esses 31 dias de administração, 5 caprinos do grupo 1 e três caprinos do grupo 2 permaneceram sem apresentar sinais clínicos de intoxicação, então para testar se a resistência desses animais permanecia, foram adicionados mais três caprinos (Grupo 3) ao experimento. A partir do 32º dia do experimento, esses oito animais que restaram, juntamente com os três adicionados recentemente, foram desafiados com a dose de 0,06g/kg da planta até o 40º dia. Pode-se observar que do grupo 1, cinco animais permaneceram resistentes, sem apresentar sinais

clínicos de intoxicação durante todo o experimento (40 dias de desafio). Do grupo 2, três animais não apresentaram sinais clínicos de intoxicação após ingerir a planta durante 12 dias na dose diária de 0,03g/kg e outros 20 dias na dose de 0,04g/kg, e do grupo 3, todos os animais adoeceram três dias após a ingestão da dose de 0,06g/kg sem administração prévia de doses anteriores. Esses resultados demonstraram que a administração de doses não tóxicas de *P. aeneofusca* induz resistência a intoxicação por essa planta em caprinos.

Duarte et al. (2014) administraram em seis caprinos, doses não tóxicas crescentes de *A. septentrionalis* em períodos alternados (1g/kg durante 10 dias, 2g/kg durante cinco dias, 2g/kg por mais cinco dias, 3g/kg por cinco dias e 3g/kg por mais cinco dias, sempre com intervalos de 15 dias sem ingerir a planta, entre um período e outro de administração). Após o último período de administração receberam 3g/kg da planta durante sete dias, para testar a resistência à intoxicação. Como controle, outros seis caprinos receberam a mesma dose de 3g/kg diariamente, sem a administração de doses anteriores, e foram considerados caprinos não tratados. Os autores constataram que os animais que receberam as doses não tóxicas previamente (considerados tratados) não apresentaram sinais clínicos de intoxicação durante todo o período de administração da planta (desafio), já os animais não tratados apresentaram sinais clínicos a partir do 4º dia de administração com registro de óbito em dois desses animais.

Santos et al. (2014) forneceram a ovinos, doses não tóxicas crescentes de MFA, com objetivo de avaliar se a exposição ao composto deixaria os animais resistentes ao mesmo. Os ovinos foram divididos em dois grupos. No grupo 1 os animais receberam doses não tóxicas e crescentes de MFA durante seis períodos: 0,05mg/kg por cinco dias; 0,08mg/kg por quatro dias; 0,08mg/kg por quatro dias; 0,1mg/kg por três dias; 0,1mg/kg por três dias e 0,25mg/kg por três dias. Entre os três primeiros períodos de administração os animais não receberam o MFA por 10 dias consecutivos; entre os demais períodos de administração, os ovinos permaneceram 15 dias sem ingerir o MFA. Os ovinos do grupo 2 não receberam as doses prévias de MFA e serviram como controle. Após esse período de indução de resistência todos os ovinos foram desafiados com uma dose única de 1mg/kg de MFA. Constataram que a administração de doses não tóxicas de MFA não induz resistência ao composto, uma vez que os animais experimentais apresentaram sinais clínicos da intoxicação e alguns até morreram. Isso ocorreu, provavelmente, porque a absorção do composto puro seria mais rápida pelo organismo do que quando o composto está presente nas plantas, o que facilita a degradação do mesmo.

Becker et al. (2016) administraram doses não tóxicas por períodos alternados (0,5g/kg durante 20 dias e após 15 dias de intervalo, 1g/kg durante três dias) de *A. pubiflora* a quatro ovinos. Outros quatro serviram de controle e receberam somente 1g/kg durante três dias. Os ovinos que receberam as doses não tóxicas demoraram $89h27min \pm 15h32min$ para desenvolver sinais clínicos de intoxicação, enquanto que os ovinos controles desenvolveram sinais em $23h15min \pm 00h37min$ e em todos os sinais evoluíram para morte. Os animais que receberam as doses não tóxicas previamente demoraram mais tempo para desenvolver sinais clínicos de intoxicação e não morreram, comprovando a indução da resistência após o consumo dessas doses.

Uso da transfaunação para transferência da resistência a intoxicação por plantas que contém MFA

A transfaunação consiste na transferência de fluído ruminal de um ruminante sadio para outro doente, com objetivo de reestabelecer a flora ruminal do animal doente. É um procedimento muito executado na clínica de ruminantes e geralmente é indicado nos casos de indigestões ou sempre que a microbiota ruminal estiver comprometida ou com atividade

reduzida (Radostits et al. 2007, Lira et al. 2013). Alguns estudos constataram que era possível conseguir a transferência da resistência à intoxicação por plantas que contém MFA realizando a transfaunação de animais resistentes para animais sensíveis. Possivelmente isso acontece porque com a transfaunação ocorrem mudanças na flora ruminal, provavelmente devido a proliferação de micro-organismos capazes de degradar o MFA.

Duarte et al. (2014) realizaram a transfaunação em caprinos considerados resistentes à intoxicação por *A. septentrionalis* (após a administração de doses não tóxicas da planta) para caprinos susceptíveis, livres de áreas com a ocorrência de plantas que contém MFA. Após a transferência a planta foi oferecida aos animais para observar se a resistência era transferida. Constataram que os caprinos que receberam o fluido ruminal demoraram $19 \pm 7,5$ dias para desenvolver sinais clínicos de intoxicação por *A. septentrionalis*, já os caprinos que não receberam demoraram $7,8 \pm 1,9$ dias. Então os caprinos transfaunados foram considerados mais resistentes à intoxicação do que os controles.

Silva et al. (2015) realizaram a transferência de fluido ruminal de caprinos considerados resistentes à intoxicação por *A. septentrionalis* (após administração oral das bactérias *Ancyllobacter dichloromethanicus* e *Pigmentiphaga kullae*) para caprinos sensíveis à intoxicação, ou seja, animais que nunca tiveram contato com plantas que contém MFA. Após a transferência de fluido ruminal, *A. septentrionalis* foi administrada na dose de 5g/kg e outros caprinos receberam somente a planta, servindo de controle. Os autores comprovaram que os animais que receberam o fluido ruminal não desenvolveram sinais clínicos da intoxicação e nem morreram após a administração da *A. septentrionalis* por oito dias. No entanto, todos os que não receberam o fluido ruminal desenvolveram sinais clínicos graves a partir do 2º dia de ingestão da planta e em um animal estes sinais evoluíram para morte.

Em 2016, um grupo de pesquisadores transferiu fluido ruminal de ovinos que foram resistentes à intoxicação por *A. pubiflora* (após a administração de doses não tóxicas sucessivas da planta) para ovinos sensíveis, com objetivo de avaliar se a resistência à intoxicação também era transferida. Constataram que os ovinos que receberam o fluido ruminal foram resistentes à intoxicação, sendo capazes de ingerir maior quantidade da planta e demorando um período maior para desenvolver sinais clínicos de intoxicação (Becker et al. 2016).

Os experimentos mencionados anteriormente comprovam que tanto a administração de doses não tóxicas de plantas, como a transfaunação de fluido ruminal de animais resistentes para animais sensíveis, são eficientes na indução de resistência à intoxicação por plantas que contém MFA. Provavelmente porque as duas técnicas favorecem a presença e multiplicação de bactérias que degradam esse composto no rúmen dos animais (Oliveira et al. 2013, Duarte et al. 2014, Becker et al. 2016). No entanto, não é possível utilizar essas técnicas em criações comerciais, principalmente por causa da dificuldade de padronização da dose de planta utilizada, uma vez que existem marcadas variações na toxicidade dessas plantas. É necessário avançar na pesquisa da identificação de bactérias responsáveis pela hidrólise do MFA e realizar pesquisas para utilizar essas bactérias no controle da intoxicação.

Administração oral de bactérias degradadoras de MFA

A utilização de bactérias degradadoras de MFA no controle das intoxicações de ruminantes por plantas que contém MFA tem sido pesquisada em diversos estudos, uma vez que são bactérias capazes de utilizar o MFA como fonte de carbono e poderiam se adaptar em ambientes como o rúmen. Acredita-se que as bactérias capazes de quebrar a ligação forte existente entre o carbono e o flúor no MFA, degradam esse composto porque produzem enzimas, denominadas de dehalogenases, que podem catalisar a reação, fazendo com que essas bactérias utilizem esse composto como fonte de carbono e energia (Fetzner & Lingers 1994, Firsova et al. 2009).

Gregg et al. (1998) ofereceram oralmente a ovinos a bactéria ruminal *Butyrivibrio fibrisolvens*, modificada geneticamente a partir de um plasmídeo (pBHf) de uma espécie de *Moraxella*. Em seguida, desafiaram esses animais com diferentes doses de fluoroacetato, e constataram que os ovinos que receberam a bactéria foram resistentes a doses maiores de fluoroacetato, comprovando o efeito protetor da bactéria.

Padmanabha et al. (2004) utilizaram a mesma bactéria que Gregg et al. (1998) em bovinos, com objetivo de testar a sua capacidade de proteção contra a intoxicação por MFA. Após o desafio com o composto puderam constatar que os bovinos que receberam a bactéria apresentaram uma redução dos efeitos tóxicos do MFA em seus organismos e foram resistentes a doses maiores do mesmo.

A utilização de bactérias modificadas geneticamente, em países como a Austrália, por exemplo, não foi aprovada devido à existência de leis governamentais estritas que impedem a utilização de organismos transgênicos em diversas áreas (Leong et al. 2017). Também surgiu a preocupação da utilização dessas bactérias porque na Austrália e Nova Zelândia o MFA é muito utilizado no controle de animais vertebrados (coelhos, raposas, gambás, dingos, entre outros) que são considerados pragas para a produção agrícola. Além do receio dessas bactérias serem eliminadas no ambiente e colonizarem os organismos desses animais tornando-os também resistentes ao MFA, dificultando o controle dos mesmos (Twiggg & King 2000).

Pimentel (2011) isolou *Enterococcus faecalis* e *Bacillus* sp. de conteúdo ruminal de bovinos e constatou que essas bactérias eram capazes de degradar MFA, sugerindo sua utilização no controle das intoxicações tanto por plantas que contém MFA como pelo próprio composto.

Em 2012, Davis e colaboradores isolaram uma bactéria anaeróbica, pertencente ao filo *Synergistetes* (cepa MFA1). Detectaram que essa bactéria era capaz de degradar fluoroacetato, sugerindo o uso da mesma no controle de intoxicações por esse composto e por plantas que o tem como princípio tóxico. Neste mesmo ano, foram isoladas bactérias aeróbicas do solo e de plantas que contém MFA, estas foram identificadas como *Paenibacillus* sp. (ECPB01), *Burkholderia* sp. (ECPB02), *Cupriavidus* sp. (ECPB03), *Staphylococcus* sp. (ECPB04), *Ancylobacter* sp. (ECPB05), *Ralstonia* sp. (ECPB06) e *Stenotrophomonas* sp. (ECPB07). Também foram isoladas do rúmen de caprinos as bactérias *Pigmentiphaga kullae* (ECPB08) e *Ancylobacter dichloromethanicus* (ECPB09). Todas essas bactérias foram capazes de degradar o MFA, sugerindo sua utilização na proteção contra intoxicações pelo mesmo e por plantas que o contém como princípio tóxico (Camboim et al. 2012a, Camboim et al. 2012b).

Dias (2015) testou a capacidade de *Enterococcus faecalis* induzir resistência a intoxicação por MFA em ovinos. A bactéria foi inoculada no rúmen de ovinos por meio de sonda ruminal, na dose de 10 ml, durante 3 dias. Outros ovinos receberam água ao invés da bactéria e foram considerados controles. Após 48 horas da última inoculação, 1,5mg/kg de MFA foi fornecido a todos os animais, oralmente e em dose única. O autor concluiu que *Enterococcus faecalis* não induz resistência a intoxicação por MFA, visto que todos os animais inoculados desenvolveram sinais clínicos da intoxicação que evoluíram para morte, o mesmo aconteceu com os ovinos que não receberam a bactéria.

As bactérias *P. kullae* e *A. dichloromethanicus*, isoladas de rúmen de caprino, foram administradas em associação, oralmente, em caprinos, durante 10 dias. Após a administração das bactérias iniciou-se a administração de 5g/kg de *A. septentrionalis*, com objetivo de avaliar a eficiência dessas bactérias na proteção da intoxicação pela planta. Os pesquisadores constataram que os animais que receberam as bactérias foram resistentes a doses maiores da

planta e demoraram um período maior para desencadear sinais clínicos da intoxicação quando comparados com os caprinos que não receberam as bactérias, demonstrando sua capacidade de indução de resistência à intoxicação por *A. septentrionalis* (Pessoa et al. 2015).

Silva et al. (2016) também utilizaram em sua pesquisa bactérias isoladas de solo e de plantas que contém MFA. *Paenibacillus* sp. e *Cupriavidus* sp., foram administradas em associação a um grupo de caprinos (Grupo 1); e *Burkholderia* sp. e *Ralstonia* sp., foram administradas também em associação a outro grupo de caprinos (Grupo 2). Um terceiro grupo de caprinos serviu de controle e não recebeu nenhuma bactéria (Grupo 3). A administração das bactérias foi realizada diariamente, durante 10 dias. A partir do décimo dia, administrou-se, simultaneamente as bactérias, 5g/kg de *A. septentrionalis* diariamente. Os animais do Grupo 2 ingeriram *A. septentrionalis* durante 30 dias e não desenvolveram sinais clínicos de intoxicação, comprovando a indução de resistência a intoxicação por parte das bactérias *Burkholderia* sp. e *Ralstonia* sp. Já *Paenibacillus* sp. e *Cupriavidus* sp. induziram resistência parcial, visto que todos os caprinos apresentaram sinais clínicos da intoxicação, no entanto, esses foram mais leves e iniciaram tardiamente quando comparados com os dos caprinos do Grupo 3. Todos os caprinos do Grupo 3 apresentaram sinais clínicos graves de intoxicação a partir do 3º dia de administração da planta, em dois desses animais os sinais evoluíram para morte. Também foi possível constatar que os caprinos do Grupo 2 foram capazes de ingerir maior quantidade da planta sem desenvolver sinais clínicos de intoxicação, quando comparados com os caprinos do Grupo 3. Os autores concluíram que as bactérias devem ser administradas de forma contínua, sem interrupções, e sugeriram o uso dessas bactérias como probióticos adicionados na alimentação dos animais onde as plantas que contém MFA são endêmicas.

Após a indução de resistência experimentalmente, por meio da inoculação de *Paenibacillus* sp., *Cupriavidus* sp., *Burkholderia* sp. e *Ralstonia* sp., pesquisadores testaram a capacidade dos caprinos em manter essa resistência para ingestão de *A. septentrionalis* de forma natural, em condições de campo. O estudo foi realizado em Pernambuco, entre os anos de 2014 e 2015. Os caprinos, que foram resistentes à intoxicação experimental mediante a administração das bactérias mencionadas acima (Silva et al. 2016), foram soltos para pastar em uma área infestada pela planta. Todos os animais ingeriram a planta diariamente e consequentemente apresentaram sinais clínicos da intoxicação e morreram; no entanto, os animais que receberam as bactérias demoraram até 55 dias para desenvolver sinais clínicos da intoxicação e morrer; enquanto que os animais que não receberam as bactérias desenvolveram sinais clínicos e morreram em até 27 dias de ingestão da planta (Pessoa et al. 2018).

Outra bactéria recentemente empregada no controle de intoxicações por plantas que contém MFA, *Herbaspirillum seropedicae*, é comumente utilizada na agricultura para melhorar o crescimento de culturas como milho e soja, e tem um gene capaz de codificar a produção da enzima dehalogenase, o que a torna capaz de degradar o MFA (Pedrosa et al. 2011). Esta bactéria foi administrada, oralmente, diariamente, em seis caprinos (Grupo 1), e a partir do 10º dia de administração eles receberam simultaneamente a bactéria e a planta *A. septentrionalis*, até a observação de sinais clínicos de intoxicação. Outros seis caprinos serviram de controle e receberam somente a planta (Grupo 2). Os caprinos do Grupo 1 demoraram $16,16 \pm 2,56$ dias para desenvolver sinais clínicos de intoxicação e foram capazes de ingerir $80,83 \pm 12,81$ g/kg da planta no total. Já os do Grupo 2 apresentaram sinais em $7,83 \pm 3,81$ dias e ingeriram $39,16 \pm 19,08$ g/kg de planta no total. Por se tratar de uma bactéria endofítica, ou seja, capaz de colonizar plantas, *H. seropedicae* foi cultivada e posteriormente utilizada para pulverizar algumas plantas da espécie *A. septentrionalis*, com objetivo de avaliar

se após a pulverização havia uma redução na quantidade de MFA presente nelas. Antes da pulverização a concentração de MFA encontrada nas plantas foi de $1,21 \pm 0,53 \mu\text{g}/\text{mg}$ e oito dias após a pulverização houve uma redução significativa na quantidade de MFA ($0,24 \pm 0,05 \mu\text{g}/\text{mg}$), o que sugere a utilização de bactérias endofíticas, que hidrolisam MFA, como forma de reduzir o conteúdo desse composto nas plantas (Pessoa et al. 2019, dados não publicados). Novos trabalhos deverão ser realizados para comprovar esses resultados e para demonstrar a permanência de *H. seropedicae* em plantas de *A. septentrionalis* ou em outras espécies que contém MFA.

A utilização de micro-organismos que degradam MFA, tanto por meio da administração desses em animais como por meio da sua utilização diretamente nas plantas que contém MFA, é uma alternativa eficiente no controle de intoxicações em ruminantes por plantas que contém esse composto.

Uso da técnica de aversão alimentar condicionada para evitar a ingestão de plantas que contém MFA

A técnica de aversão alimentar condicionada é comumente utilizada em ruminantes para induzir o não consumo de plantas tóxicas. Ela consiste na administração de uma substância, na maioria das vezes o cloreto de lítio (LiCl), por sonda gástrica ou fístula ruminal, logo após a ingestão da planta tóxica. O LiCl é o emético mais utilizado tanto em animais como em humanos e causa náuseas sem efeitos colaterais mais graves. O animal associa o distúrbio causado pelo LiCl ao sabor do alimento, e conseqüentemente vai evitar esse sabor, evitando então a ingestão da planta (Provenza et al. 1994, Ralphs et al. 2001). No entanto, um fator importante que atrapalha a indução da aversão à ingestão de determinada planta é a facilitação social, ou seja, se os animais que foram submetidos a condicionamento aversivo observarem outros animais comendo a planta, eles podem voltar a ingerir a mesma (Ralphs & Provenza, 1999). Devido algumas plantas que contém MFA serem altamente palatáveis para os ruminantes, como as plantas do gênero *Palicourea*, essa técnica foi utilizada em alguns experimentos com objetivo de promover o controle das intoxicações por plantas que contém este composto.

Barbosa et al. (2008) realizaram em caprinos o teste de condicionamento aversivo a ingestão de *Mascagnia rigida* (atualmente classificada como *Amorimia septentrionalis*). Para isso os caprinos, que não eram familiarizados com a planta, receberam $100 \text{ mg}/\text{kg}$ de LiCl, por via oral, diariamente, 15 minutos após a ingestão das folhas da planta, até que deixassem de comer a mesma. O grupo controle recebeu apenas água, também por via oral. Nos dias 10, 17 e 24 após a indução da aversão, foi oferecida novamente a planta aos caprinos com objetivo de avaliar se a aversão persistia. No primeiro dia de teste não houve diferença entre os grupos, no entanto, no segundo dia de teste cinco caprinos que receberam o LiCl não ingeriram a planta e a partir do terceiro dia após a indução da aversão todos os caprinos tratados com LiCl não ingeriram a planta. Já os caprinos que não receberam o LiCl ingeriram quantidades crescentes da planta durante todo o experimento, o que indica que o LiCl induziu aversão a ingestão da planta, pelo menos temporariamente.

Da Silva et al. (2010) desenvolveram o teste de condicionamento aversivo a ingestão de *Mascagnia rigida* (atualmente classificada como *A. septentrionalis*), em ovinos que nunca tiveram contato com a mesma. Para tanto, os ovinos foram divididos em 2 grupos, grupo lítio e grupo controle. No grupo lítio os ovinos receberam, oralmente, $150 \text{ mg}/\text{kg}$ de LiCl, 15 minutos após o oferecimento das folhas da planta. Os ovinos controle ao invés do lítio receberam água, seguindo a mesma metodologia. Os autores observaram que os ovinos que

receberam o lítio já não ingeriram a planta a partir do terceiro dia de teste e a aversão persistiu por até 70 dias após a indução.

A aversão condicionada a *P. aeneofusca* foi testada em caprinos. Os autores dividiram os animais em dois grupos (grupo tratado e grupo controle). No grupo tratado, 10 minutos após a ingestão da planta, os animais receberam 175 mg/kg de LiCl, por sonda ruminal, e os caprinos do grupo controle receberam apenas água seguindo a mesma metodologia. Os autores concluíram que aversão a *P. aeneofusca* teve início cinco dias após o tratamento e persistiu por até 90 dias após o condicionamento com o LiCl (Oliveira et al., 2014).

Brito et al. (2016) testaram a técnica da aversão condicionada a *P. aeneofusca* em bovinos, para isso os animais foram divididos em 2 grupos, cada um com 6 bovinos, sendo um grupo o dos animais tratados com LiCl na dose de 175 mg/kg, logo após o consumo das folhas de *P. aeneofusca* e o outro grupo o dos animais que receberam 1 mL/kg de água, seguindo a mesma metodologia do outro grupo. Após essa indução os animais dos dois grupos, foram soltos para pastar em áreas separadas (para evitar a facilitação social) infestadas pela planta, uma vez a cada 30 dias, onde permaneceram por no máximo 15 dias, ou até desenvolverem sinal clínico de intoxicação. Após esse período os animais foram colocados para pastar em áreas livres da planta, e este procedimento foi repetido durante 12 meses, sempre alternando a pastagem dos animais em áreas livres e áreas com a presença da planta. Os bovinos que receberam o LiCl não ingeriram a planta a campo em nenhum momento e a aversão persistiu durante todo o experimento. Pelo contrário, os animais controles ingeriram a planta continuamente, sendo necessária a retirada dos mesmos da pastagem. Os autores concluíram que a aversão condicionada com LiCl em bovinos é eficiente para evitar o consumo de *P. aeneofusca* por pelo menos 12 meses.

Esses estudos demonstraram que a aversão alimentar condicionada é uma técnica eficiente para evitar a ingestão de algumas plantas que contem MFA. No entanto, é de difícil aplicação em estabelecimentos comerciais, principalmente com grande número de animais.

Uso de compostos no tratamento e controle da intoxicação por plantas que contém MFA

Devido à dificuldade no controle e tratamento das intoxicações em ruminantes por plantas que contém MFA, foi estudada a utilização de alguns compostos para tratamento dessa intoxicação. Esses compostos são capazes de atuar contra a ação do MFA no organismo dos animais e consequentemente reduzir sua toxicidade.

A acetamida é a amida derivada do ácido acético, representada pela fórmula CH_3CONH_2 . Esse composto pode ser utilizado para prevenção da intoxicação por plantas que contém MFA em ruminantes, uma vez que apresenta um efeito protetor contra a ação do MFA, ou seja, ele funciona como “doador de acetato” impedindo a “síntese letal” do MFA no organismo. No entanto, sua eficiência depende de vários fatores como a dose utilizada, o intervalo entre o aparecimento dos sinais clínicos e a administração da dose de acetamida e a toxicidade da planta que está causando a intoxicação (Egyed & Schultz 1986, Peixoto et al. 2011a).

Peixoto e colaboradores (2011b) administraram a bovinos 0,5 mg/kg de MFA e logo após, dividiram os animais em dois grupos, um grupo recebeu 0,38g/kg de acetamida e o outro 2,0g/kg de acetamida. A outros bovinos ofereceram 1,0g/kg das folhas de *Palicourea marcgravii*, seguidas de 1,0g/kg de acetamida. A acetamida foi capaz de proteger os animais do desenvolvimento de sinais clínicos de intoxicação em quase todas as doses. Somente a dose de 0,38g/kg de acetamida, não foi eficiente e um bovino apresentou sinais clínicos que evoluíram para a morte. No entanto, quando o experimento foi repetido, 8 dias após, sem uso da acetamida, todos os bovinos desenvolveram sinais clínicos e morreram, o que comprova o efeito protetor da acetamida, mas também reforça que a proteção não é duradoura.

O uso desse composto como antídoto nas intoxicações de ruminantes por plantas que contém MFA deve ser aplicado com cuidado, uma vez que, para que se tenha eficiência no

tratamento é necessária a administração do mesmo logo após ou poucas horas antes da ingestão da planta, o que se torna inviável visto que a evolução da intoxicação é aguda, além do que a disponibilidade e o custo da acetamida limitam sua utilização (Peixoto et al. 2011b).

O trifluoroacetato é um composto químico formado pela quebra de vários hidrofluorocarbonetos e hidroclorofluorocarbonos (Cahill et al. 2001), sua utilização no tratamento e controle das intoxicações em ruminantes por plantas que contém MFA foi estudada.

Costa et al. (2019) administraram a um grupo de bovinos 0,1mg/kg de trifluoroacetato de sódio dissolvidos em 5 mL de água, outro grupo de bezerros recebeu apenas água. Essa administração foi feita de forma oral, com auxílio de seringa, colocada na base da língua, diariamente, durante 28 dias. Após esse período de administração, os bovinos dos dois grupos receberam 2g/kg das folhas frescas de *P. Marcgravii* através de sonda orogástrica, e em seguida os bovinos foram estimulados a se movimentar, com intuito de causar a intoxicação. Os autores observaram, por meio da realização de exames clínicos e sanguíneos, que o composto não causou nenhum efeito tóxico nos animais durante todo o período de administração. E também constataram que os animais que receberam o trifluoroacetato de sódio não apresentaram nenhum sinal clínico de intoxicação após a administração da planta, já os animais que não receberam o composto apresentaram sinais clínicos de intoxicação 7 horas após a administração da planta. Então os autores concluíram que o trifluoroacetato de sódio pode ser utilizado em bovinos para induzir resistência contra a intoxicação por plantas que contém MFA e também sugeriram, devido a fácil manipulação do composto e o seu baixo custo, a utilização do mesmo misturado a comida ou a água dos animais.

CONCLUSÕES

Em conclusão, a utilização de algumas medidas convencionais como a retirada dos animais da pastagem infestada pela planta que contém MFA e evitar o esforço físico nesses animais, ainda são medidas eficientes para controle dessas intoxicações. No entanto, existem diversas técnicas que experimentalmente foram eficientes no controle das intoxicações por plantas que contém MFA, mas, nenhuma delas pode ser utilizada sem restrições em estabelecimentos comerciais. Uma das medidas mais eficiente foi à utilização de bactérias degradadoras de MFA, porém, essas bactérias devem ser administradas constantemente. Para isso é necessário desenvolver produtos comerciais contendo cepas que possam ser administrados aos animais continuamente, provavelmente como probióticos. Parece promissora, também a possibilidade de infectar as plantas que contém MFA com bactérias que degradem o mesmo e desta forma reduzir sua toxicidade. Novos estudos são necessários com o intuito de aprimorar as técnicas já existentes para que as mesmas se tornem acessíveis para os produtores.

REFERÊNCIAS

- Arruda F.P.D., Caldeira F.H.B., Ducatti K.R., Bezerra K.S., Marcolongo-Pereira C., Lee S.T., Cook D., Riet-Correa F. & Colodel E.M. 2017. Experimental poisoning by *Niederzuehlla stannea* in cattle and corresponding detection of monofluoroacetate. *Ciência Rural* 47(3):1-6. <http://dx.doi.org/10.1590/0103-8478cr20160761>
- Barbosa R.R., Silva I.P. & Soto-Blanco B. 2008. Development of conditioned taste aversion to *Mascagnia rigida* in goats. *Pesq. Vet. Bras.* 28(12):571-574.
- Becker M., Carneiro, F.M., Oliveira L.P., Silva M.I.V., Riet-Correa F., Lee S.T., Pescador C.A., Nakazato L. & Colodel, E.M. 2016. Induction and transfer of resistance to poisoning by *Amorimia pubiflora* in sheep with non-toxic dosis of the plant and ruminal content. *Ciência Rural*, Santa Maria, v.46, n.4, p.674-680.
- Brito L.B., Albuquerque R.F., Rocha B.P., Albuquerque S.S., Lee S.T., Medeiros R.M.T., Riet-Correa F. & Mendonça F.S. 2016. Spontaneous and experimental poisoning of cattle by

- Palicourea aeneofusca* in the region of Pernambuco and induction of conditioned food aversion. *Cienc. Rural*. 46:138-143.
- Cahill T.M., Thomas C.M., Schwarzbach S.E., Seiber J.N. 2001. Accumulation of trifluoroacetate in seasonal wetlands in California. *Environ. Sci. Technol.* 35:820–825.
- Camboim E.K.A., Tadra-Sfeir M.Z., Souza E.M., Pedrosa F.O., Andrade P.P., McSweeney C.S., Riet-Correa F. & Melo M.A. 2012a. Defluorination of sodium fluoroacetate by bacteria from soil and plants in Brazil. *Scient. World J.* 2012:149893.
- Camboim E.K.A., Almeida A.P., Tadra-Sfeir M.Z., Junior F.G., Andrade P.P., McSweeney C.S., Melo M.A. & Riet-Correa F. 2012b. Isolation and identification of sodium fluoroacetate degrading bacteria from caprine rumen in Brazil. *Scient. World J.* 2012:178254.
- Carvalho F.K.L., Cook D., Lee S.T., Taylor C.M., Soares Oliveira J.B. & Riet-Correa F. 2016. Determination of toxicity in rabbits and corresponding detection of monofluoroacetate in four *Palicourea* (Rubiaceae) species from the Amazonas state, Brazil. *Toxicon* 109:42-44. <http://dx.doi.org/10.1016/j.toxicon.2015.11.009>
- Cook D., Lee S.T., Taylor C.M., Bassüner B., Riet-Correa F., Pfister J.A. & Gardner D.R. 2014. Detection of toxic monofluoroacetate in *Palicourea* species. *Toxicon* 80(15):9-16. <http://dx.doi.org/10.1016/j.toxicon.2013.12.003>
- Costa A.G., Carvalho A.U., Melo M.M., Soto-Blanco B. 2019. Sequential administrations of trifluoroacetate induce tolerance to *Palicourea maccgravii*, a monofluoroacetate-containing plant, in calves. *Toxicon*. 160: 8-11.
- Davis C.C. & Anderson W.R. 2010. A complete generic phylogeny of Malpighiaceae inferred from nucleotide sequence data and morphology. *Amer. J. Bot.* 97, 2031–2048.
- Davis C.K., Webb R.I., Sly L.I., Denman S.E. & McSweeney C.S. 2012. Isolation and survey of novel fluoroacetate-degrading bacteria belonging to the phylum Synergistetes. *FEMS Microbiol. Ecol.* 80(3):671-684.
- Dias, G.B.G. A inoculação ruminal de *Enterococcus faecalis* é eficiente no controle da intoxicação por monofluoroacetato de sódio em ovinos? 2015. 52f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) - Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias. Universidade Federal de Mato Grosso, MT.
- Duarte A.L.L., Medeiros R.M.T. & Riet-correa F. 2013. Intoxicação por *Amorimia* spp. em ruminantes. *Ciência Rural*, Santa Maria. 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.
- Egyed M.N. & Schultz R.A. 1986. The efficacy of acetamide for the treatment of experimental *Dichapetalum cymosum* (gifblaar) poisoning in sheep. *Onderstepoort J. Vet. Res.* 53(4):231-234.
- Fetzner S. & Lingers F. 1994. Bacterial dehalogenases: biochemistry, gene-tics, and biotechnological applications. *Microbiol. Rev.* 58(4):641-685.
- Firsova J., Doronina N., Lang E., Spröer C., Vuilleumier S. & Trotsenko Y. 2009. *Ancylobacter dichloromethanicus* sp. nov.- a new aerobic facultatively methylotrophic bacterium utilizing dichloromethane. *Syst. Appl. Microbiol.* 32(4):227-232.
- Gregg K., Hamdorf B., Henderson K., Kopency J. & Wong C. 1998. Genetically modified ruminal bacteria protect sheep from fluoracetate poisoning. *Appl. Environ. Microbiol.* 64(9):3496-3498.
- Lima E.F., Medeiros R.M., Cook D., Lee S.T., Kaehler M., Santos-Barbosa J.M. & Riet-Correa F. 2016. Studies in regard to the classification and putative toxicity of *Fridericia japurensis* (*Arrabidaea japurensis*) in Brazil. *Toxicon* 115(1):22-27.
- Lira M.A.A., Simões S.V.D., Riet-Correa F., Pessoa C.M.R., Dantas A.F.M. & Miranda Neto E.G. 2013. Doenças do sistema digestório de caprinos e ovinos no semiárido do Brasil. *Pesq. Vet. Bras.* 33(2):193-198.

- Leong L.E.X, Khan S., Davis C.K., Denman S.E. & McSweeney C.S. 2017. Fluoroacetate in plants - a review of its distribution, toxicity to livestock and microbial detoxification. *Journal of Animal Science and Biotechnology* 8:55.
- Nogueira V.A., Peixoto T.C., França T.N., Caldas S.A. & Peixoto P.V. 2011. Intoxicação por monofluoroacetato em animais. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 31(10):823-838.
- Nascimento N.C.F., Aires L.D.A., Pfister J.A., Medeiros R.M.T., Riet-Correa F. & Mendonça F.S. 2018. Cardiotoxic plants affecting ruminants in Brazil. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 38(7):1239-1249.
- Pedrosa F.O., Monteiro R.A., Wassem R., Cruz L.M., Ayub R.A. et al. 2011. Genome of *Herbaspirillum seropedicae* Strain SmR1, a Specialized Diazotrophic Endophyte of Tropical Grasses. *PLoS Genet* 7(5): e1002064.
- Peixoto T.C., Oliveira L.I., Caldas S.A., Catunda Junior F.E.A., Carvalho M.G., França T.N. & Peixoto P.V. 2011a. Efeito protetor da acetamida sobre as intoxicações experimentais em ratos por monofluoroacetato de sódio e por algumas plantas brasileiras que causam morte súbita. *Pesq. Vet. Bras.* 31(11):938-952.
- Peixoto T.C., Nogueira V.A., Caldas S.A., França T.N. & Peixoto P.V. 2011b. Efeito protetor da acetamida em bovinos indica ácido monofluoroacético como princípio tóxico de *Palicourea marcgravii*. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 32(4):219-328.
- Pessoa C.R.M., Medeiros R.M.T. & Riet-Correa F. 2013. Importância econômica, epidemiologia e controle das intoxicações por plantas no Brasil. *Pesq. Vet. Bras.* 33(6):752-758.
- Pessoa D.A.N., Silva L.C.A., Lopes J.R.G., Macêdo M.M.S., Garino Jr F., Azevedo S.S. & Riet-Correa F. 2015. Resistência à intoxicação por *Amorimia septentrionalis* em caprinos, induzida pela inoculação ruminal das bactérias *Pigmentiphaga kullae* e *Ancylobacter dichloromethanicus*. *Pesq. Vet. Bras.* 35(2):125-128.
- Pessoa D.A.N., Silva L.C.A., Mendonça F.S., Almeida V.M., Lopes J.R.G, Albuquerque L.G., Silva A.A. & Riet-Correa F. Evaluation of resistance to natural poisoning by *Amorimia septentrionalis* in goats. *Pesq. Vet. Bras.* 38(10):1913-1917.
- Pimentel, M.F.A. Isolamento e identificação de microrganismo resistente ao fluoroacetato de sódio. 2011. 42f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias, Universidade Federal de Mato Grosso, MT.
- Provenza FD, Ortega-Reyes L, Scott CB, Lynch JJ & Burritt EA. 1994. Antiemetic drugs attenuate food aversions in sheep. *Journal of Animal Science* 72, 1989–1994.
- Oliveira M.D., Riet-Correa F., Carvalho F.K.L., Silva G.B., Pereira W.S. & Medeiros R.M.T. 2013. Indução de resistência à intoxicação por *Palicourea aeneofusca* (Rubiaceae) mediante administração de doses sucessivas não tóxicas. *Pesq. Vet. Bras.* 33(6):731-734.
- Oliveira, M.D.; Riet-Correa, F.; Pereira, W.S.; Freire, L.F.S.; Silva, G.B.; Medeiros, R.M.T. 2014. Conditioned food aversion to control *Palicourea aeneofusca* poisoning. *Ciência Rural*, v.44, n.7, p.1246-1248.
- Radostits O.M., Gay C.C., Hinchcliff K.W. & Constable P.D. 2007. Diseases of the alimentary tract II, p.293-382. In: *Ibid.* (Eds), *Veterinary Medicine: a textbook of the diseases of cattle, horses, sheep, pigs and goats*. 10th ed. Saunders Elsevier, Philadelphia.
- Ralphs M.H. & Provenza F.D. 1999. Conditioned food aversions: principles and practices, with special reference to social facilitation. *Proc. Nutr. Soc.* 58:813-820.
- Ralphs M.H., Provenza F.D., Pfister J.A., Graham D., Duff G.C. & Greathouse G. 2001. Conditioned food aversion: from theory to practice. *Rangelands*, v.23, n.2, p.14-18.
- Riet-Correa, F. & Medeiros, R.M.T. Intoxicações por plantas em ruminantes no Brasil e no Uruguai. *Pesq. Vet. Bras.* 21(1):38-42, jan./mar. 2001.
- Santos A.C., Riet-Correa F., Heckler R.F., Lima S.C., Silva M.L., Rezende R., Carvalho N.M. & Lemos R.A.A. 2014. Falha na administração repetida de doses não tóxicas de monofluoroacetato de sódio na prevenção da intoxicação por esta substância em ovinos. *Pesq. Vet. Bras.* 34(7):649-654.

- Silva I.P., Lira R.A., Barbosa R.R., Batista J.S. & Soto-Blanco B. 2008. Intoxicação natural pelas folhas de *Mascagnia rigida* (Malpighiaceae) em ovinos. *Arq. Inst. Biol.* 75: 229–233.
- Silva I.P. & Soto-Blanco B. 2010. Conditioning taste aversion to *Mascagnia rigida* (Malpighiaceae) in sheep. *Research in Veterinary Science*, v.88, n.2, p.239-241.
- Silva L.C.A., Pessoa D.A.N., Lopes J.R.G., Silva L.S.A., Albuquerque L.G., Medeiros R.M.T., Garino Junior F. & Riet-Correa F. 2015. Transferência da resistência à intoxicação por *Amorimia septentrionalis* em caprinos mediante transfaunação de conteúdo ruminal proveniente de caprinos inoculados com bactérias degradadoras de monofluoroacetato de sódio. *Ciência Rural* 45(12):2218-2222.
- Silva L.C.A., Pessoa D.A.N., Lopes J.R.G., Albuquerque L.G., Silva L.S.A., Garino F.JR & Riet-Correa F. 2016. Protection against *Amorimia septentrionalis* poisoning in goats by the continuous administration of sodium monofluoroacetate-degrading bacteria. *Toxicon* 111: 65-68.
- 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.
- Twigg, L.E.; King, D.R. 2000. Artificially enhanced tolerance to fluoroacetate and its implications for wildlife conservation. *Pacific Conservation Biology*, 6(1), 9-

QUADRO

Quadro 1. Principais plantas que causam morte súbita, associada ao exercício, em ruminantes no Brasil

Planta que causa morte súbita	Região onde pode ser encontrada	Quantidade de MFA (µg/mg)
<i>Palicourea</i>		
<i>Palicourea marCGravii</i>	Quase todo território brasileiro, exceto na região Sul, no semiárido do Nordeste e no Mato Grosso do Sul	0,03% a 0,58%
<i>Palicourea aeneofusca</i>	Paraíba, Pernambuco, Alagoas e Bahia	0,03 a 0,18%
<i>Palicourea grandiflora</i>	Acre, Amazonas, Pará e Rondônia	ND*
<i>Palicourea barraensis</i>	Amazonas, Roraima e Rondônia	0,01%
<i>Palicourea longiflora</i>	Amazonas, Pará e Rondônia	0,006% a 0,16%
<i>Amorimia</i>		
<i>Amorimia amazonica</i>	Acre, Amazonas e Rondônia	0,0007%
<i>Amorimia exotropa</i>	São Paulo, Paraná, Rio Grande do Sul e Santa Catarina	0,02%
<i>Amorimia pubiflora</i>	Goiás, Mato Grosso do Sul, Mato Grosso, Minas Gerais e São Paulo	0,06%
<i>Amorimia rigida</i>	Bahia, Espírito Santo, Minas Gerais e Rio de Janeiro	0,002%
<i>Amorimia septentrionalis</i>	Pernambuco, Alagoas, Rio Grande do Norte, Paraíba e Ceará	0,001% a 0,008% 0,00074 % 0,16%
<i>Niedenzuella</i>		
<i>Niedenzuella stannea</i>	Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Acre, Amazonas, Amapá, Pará, Rondônia e Tocantins	0,0003% a 0,02%
<i>Tanaecium</i>		
<i>Tanaecium bilabiatum</i>	Todo território brasileiro	0,0001% a 0,041%

* ND= não determinada.

CAPITULO II

Evaluation of resistance to natural poisoning by *Amorimia septentrionalis* in goats which had received sodium monofluoroacetate degrading bacteria

(Artigo publicado na revista Pesquisa Veterinária Brasileira, Qualis A2)

Evaluation of resistance to natural poisoning by *Amorimia septentrionalis* in goats which had received sodium monofluoroacetate degrading bacteria¹

Danielle A.N. Pessoa^{2*}, Layze C.A. Silva³, Fábio S. Mendonça⁴, Valdir M. Almeida⁴, José R.G. Lopes², Laio G. Albuquerque², Amanda A. Silva² and Franklin Riet-Correa^{2,5}

ABSTRACT.- Pessoa D.A.N., Silva L.C.A., Mendonça F.S., Almeida V.M., Lopes J.R.G., Albuquerque L.G., Silva A.A. & Riet-Correa F. **Evaluation of resistance to natural poisoning by *Amorimia septentrionalis* in goats which had received with sodium monofluoroacetate degrading bacteria.** *Pesquisa Veterinária Brasileira* 38(10):00-00. Unidade Acadêmica de Medicina Veterinária, Centro de Saúde e Tecnologia Rural, Universidade Federal de Campina Grande, Avenida Universitária s/n, Bairro Santa Cecília, Patos, PB 58700-970, Brazil. E-mail: danipessoavet14@gmail.com

Amorimia septentrionalis sodium monofluoroacetate (MFA) containing plant that causes sudden death in ruminants in northeastern Brazil. MFA degrading bacteria are being used in the prevention against poisoning by this plant. The aim of this study was to evaluate if goats which had *per os* received MFA degrading bacteria remained resistant when exposed to natural poisoning by *A. septentrionalis*. Eighteen goats were randomly distributed into three groups: the goats of Group 1 previously received, during 40 days, a solution containing the bacteria *Ralstonia* sp. and *Burkholderia* sp., those goats in the Group 2 received the bacteria *Paenibacillus* sp. and *Cupriavidus* sp. and goats from Group 3 did not receive any bacteria. After the administration period, during 60 days, the animals of all groups were released to graze on a paddock one hectare, with significant amount of *A. septentrionalis*. They were observed daily if spontaneously consumed *A. septentrionalis* leaves and presented of clinical signs of poisoning or sudden death. Goats from all groups consumed significant amounts of *A. septentrionalis* during the experimental period. Goats that did not receive MFA-degrading bacteria (Group 3) became sick and died between the 25th and 27th day of the experiment, whereas the goats of the groups that received MFA-degrading bacteria showed only clinical signs when *A. septentrionalis* regrowth after the 55th day of the experiment. The days elapsed from field observation to death of Group 3 goats (25.5 ± 0.9 days) were significantly lower ($p < 0.05$) than Group 1 (58.6 ± 1.3 days) and Group 2 (57.8 ± 1.5 days). Thus, it can be concluded that administration of MFA degrading bacteria increases the resistance to natural poisoning by *A. septentrionalis*.

INDEX TERMS: Natural poisoning, *Amorimia septentrionalis*, goats, sodium monofluoroacetate, degrading bacteria, resistance, MFA, goats, toxicoses.

¹ Received on June 5, 2018.

Accepted for publication on June 13, 2018.

² Unidade Acadêmica de Medicina Veterinária (UAMV), Centro de Saúde e Tecnologia Rural (CSTR), Universidade Federal de Campina Grande (UFCG), Avenida Universitária s/n, Bairro Santa Cecília, Patos, PB 58700-970, Brazil. *Corresponding author: danipessoavet14@gmail.com

³ Universidade Federal do Oeste da Bahia (UFOB), Avenida 23 de Agosto s/n, Bairro Assunção, Barra, Bahia, 471000-00, Brazil.

⁴ Laboratório de Diagnóstico Animal, Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal, Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), Dois Irmãos, Recife, PE 52171-900, Brazil.

⁵ Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria (INIA), Plataforma de Salud Animal, Estación Experimental INIA La Estanzuela, Ruta 50 Km 11, 39173, Colonia, Uruguay.

RESUMO.- [Avaliação da resistência à intoxicação natural por *Amorimia septentrionalis* em caprinos que receberam via oral bactérias degradadoras de monofluoroacetato de sódio.] *Amorimia septentrionalis* que contém monofluoroacetato de sódio (MFA) e responsável pela ocorrência de mortes súbitas em ruminantes no nordeste do Brasil. Bactérias degradadoras desse composto estão sendo utilizadas na prevenção contra a intoxicação por essa planta. O objetivo deste estudo foi avaliar se caprinos que receberam via oral bactérias degradadoras de MFA permaneciam resistentes quando expostos a intoxicação natural por *A. septentrionalis*. Dezoito caprinos foram divididos em três grupos, os caprinos do Grupo 1 receberam anteriormente, durante 40 dias, uma solução contendo as bactérias *Ralstonia* sp. e *Burkholderia* sp., os do Grupo 2 receberam, também por 40 dias as bactérias *Paenibacillus* sp. e *Cupriavidus* sp. e os do Grupo 3 não receberam nenhuma bactéria. Após o período de administração, durante 60 dias, os animais de todos os grupos foram soltos para pastar em um piquete medindo um hectare, que apresentava uma quantidade significativa da planta. Diariamente eles foram observados quanto ao consumo espontâneo das folhas de *A. septentrionalis* e quanto à presença de sinais clínicos de intoxicação ou morte. Os caprinos de todos os grupos consumiram quantidades significantes da planta durante o período experimental. Os caprinos que não receberam as bactérias degradantes de MFA (Grupo 3) adoeceram e morreram entre o 25º e o 27º dia de experimento, enquanto que os que receberam as bactérias degradantes de MFA (Grupo 1 e 2) só apresentaram sinais clínicos no 55º dia de experimento, o que coincidiu com a rebrota da planta. Os dias transcorridos desde a observação a campo até a morte dos caprinos do Grupo 3 (25.5 ± 0.9 dias) foram significativamente menores ($p < 0,05$) que os do Grupo 1 (58.6 ± 1.3 dias) e do Grupo 2 (57.8 ± 1.5 dias). Com isso pode-se concluir que a administração de bactérias degradadoras de MFA aumenta à resistência a intoxicação natural por *A. septentrionalis*.

TERMOS DE INDEXAÇÃO: *Amorimia septentrionalis*, resistência, monofluoroacetato de sódio, bactérias degradadoras de MFA, caprinos, bacterioses, toxicoses.

INTRODUCTION

The intoxication of production animals by toxic plants cause a negative impact in the Brazilian livestock. It is estimated that annually 50% of the bovine death caused by toxic plants are from plants that cause sudden death associated to the exercise, being the plants of the *Amorimia* spp. genus the most important in the Northeast region (Pessoa et al. 2013).

Amorimia septentrionalis, previously identified as *Amorimia (Mascagnia) rigida*, popularly known as tingui (Duarte et al. 2014), has as toxic principle sodium monofluoroacetate (MFA) (Lee et al. 2012). This compound acts on the tricarboxylic acid cycle, causing accumulation of citrate and lactate, decrease in the blood pH and depletion of cellular energy. The circulating citrate accumulates in all tissues, mainly in the myocardium, where it blocks the metabolic processes dependent on energy, causing the death of the animal (Nogueira et al. 2010).

The control and prophylaxis of this intoxication by traditional methods such as fencing infested areas or using herbicides is not efficient (Barbosa et al. 2003). Therefore, some studies have already used several alternatives to render ruminants resistant to plant

poisoning containing MFA, including: 1) the repeated administration of non-toxic doses of the plant containing MFA for alternate periods (Duarte et al. 2014); 2) the transfer of ruminal fluid from ruminants inoculated with MFA-degrading bacteria, which became resistant to intoxication, to susceptible ruminants (Silva et al. 2015); 3) the administration of MFA-degrading bacteria isolated from the rumen of animals, soil and plants containing MFA (Pessoa et al. 2015, Silva et al. 2016); 4) use of the conditioned aversion technique through the use of lithium chloride (Brito et al. 2016).

MFA degrading bacteria, identified as: *Paenibacillus* sp. (ECPB01), *Burkholderia* sp. (ECPB02), *Cupriavidus* sp. (ECPB03) and *Ralstonia* sp. (ECPB06), were isolated from soil and plants containing this compound (Camboim et al., 2012). These bacteria produce dehalogenase enzymes, which catalyze the cleavage of the strong carbon-fluorine bond present in the MFA, degrading and deactivating this compound (Fetzner & Lingers 1994).

In an earlier study it was shown that animals that received MFA-hydrolyzing bacteria are resistant to intoxication, but after the animals fail to receive the bacteria they gradually lose resistance (Pessoa et al. 2015). On the other hand, if some of these bacteria (*Ralstonia* sp. and *Burkholderia* sp.) are continuously administered together with the plant there is no loss of resistance (Silva et al. 2016). The aim of this study was to evaluate whether the resistance to intoxication induced by bacteria that hydrolyze MFA remains when experimentally resistant animals are exposed to natural intoxication by the plant on an ongoing basis. Thus, caprine that had been induced resistance to MFA by oral administration of bacteria that hydrolyze this substance (Silva et al. 2016).

MATERIALS AND METHODS

The field resistance test was carried out in the municipality of Limoeiro (7°54'01.8"S - 35°28'38.2"W), in the state of Pernambuco, during the dry season. For this, three groups were used, with six crossbred goats each, with age ranging from one to three years, weighing 20-40kg. The bacteria used in the present study were isolated from soil and from plants containing sodium monofluoroacetate (MFA) and identified as degrading this substance (Camboim et al. 2012). These were diluted in 0.9% sodium chloride solution at concentration 1 of the MacFarland scale and the dose used for oral administration in goats was 60mL (Silva et al., 2016). The caprine from Group 1 had previously received daily, for 40 days, the solution containing the bacteria *Ralstonia* sp. and *Burkholderia* sp., and since the 10th day until the 40th day, they also received 5g/kg of *Amorimia septentrionalis* leaves. Caprine from Group 2 received for 40 days the solution containing the bacteria *Paenibacillus* sp. and *Cupriavidus* sp., and since the 10th day until the 40th day, they also received 5g/kg of *A. septentrionalis* leaves (Silva et al. 2016). Group 3 was composed of goats from areas without the occurrence of *A. septentrionalis*. These animals did not receive the leaves of the plant or solutions containing the bacteria.

From the first day after the end of the oral administration of the bacteria (day 41) to the 101st day of experiment, the goats of the three groups were released to graze on a one-hectare paddock whose vegetation was characteristic of the of caatinga biome, with a large amount of *A. septentrionalis* (Figure 1A). During these 60 days of field resistance evaluation, each goat received the equivalent of 200g of corn kernels, and water and mineral salt *ad libitum*. For 40 minutes, twice a day, using a binocular, the goats were observed for spontaneous consumption of *A. septentrionalis* leaves and the presence of clinical signs of MFA intoxication.

Goats that died spontaneously were necropsied and samples of organs from the abdominal and thoracic cavities and central nervous system were collected, fixed in 10%

formaldehyde, processed according to routine methods, stained with hematoxylin-eosin (HE) and evaluated histopathologically.

For the statistical analysis the data were expressed as mean and standard deviation and submitted to analysis of distribution of values (normality) using the Shapiro-Wilk test. The comparison between the values obtained in the groups was performed by analysis of variance (Test F) and Tukey test for day of death of the animals (Sampaio 1998). The program IBM SPSS *Statistics* 23.0 was used for execution of the statistical calculations and the level of significance was 5%.

RESULTS

The weather in the region where the experiment was carried out is tropical, with rain in the fall and winter. The rainy season begins in February/March and may extend through August. Temperatures vary following the rainy season, and the annual average is around 24°C. Although the weather is tropical, the vegetation is formed mainly by hypoxerophilic caatinga, but with areas of deciduous and semi-deciduous forest, this is because the municipality of Limoeiro is in the transition region between the semi-arid and tropical weather.

In the first 15 days of observation of the field resistance test, it was verified that the goats from the three groups only tasted the green leaves of *Amorimia septentrionalis*, not having predilection for the consumption of this plant. The main species consumed by goats from all groups were mainly *Cnidoscolus phyllacanthus* (favela), *Poincianella pyramidalis* (catingueira), *Hypolytrum pungens* (capim navalha), *Ipomoea bahiensis* (jetirana), *Mimosa tenuiflora* (jurema preta), *Croton heliotropiifolius* (velame), *Melochia tomentosa* L (capa bode), vagens de *Prosopis juliflora* (algaroba), *Aspidosperma pyriformium* Mart. (pereiro) and *Bromelia laciniosa* (macambira).

Between the 16th and 22nd day of the experiment, it was observed that goats from all groups began to ingest more frequently both green leaves and dry leaves fallen onto the ground of *A. septentrionalis* (Figure 1B), but still in small amounts (between two and five mouthfuls) per animal. However, no clinical signs of intoxication were observed in the goats. Between the 25th and 27th days of the experiment, there was already a scarcity of vegetation, but there were still *A. septentrionalis* (Figure 1C). During this period all goats from the three groups were seen ingesting *A. septentrionalis*. Four goats from Group 3 were found dead (Table 1) and two presented clinical signs of MFA intoxication that consisted mainly of extended head and neck, engorged jugular vein and inability to stand up, being withdrawn from the experiment due to the risk of death (Figure 1D). At necropsy and microscopic examination, no significant changes were observed.

There were no clinical signs of intoxication in Group 1 and Group 2 until the 40th day of the experiment and during that period it was observed that there was consumption of *A. septentrionalis* leaves. Between the 41st and 60th days of observation, in December 2014 and January 2015, there were still rainfall in the Municipality (Figure 2). By the 52nd day it was possible to identify several specimens of *A. septentrionalis* in bud stage and it was noted that many had been consumed by caprine from Group 1 and Group 2. Between the 55th and 60th days of observation (Table 1), all goats in Group 2 presented severe clinical signs of intoxication consisting of constant bleating, inability to stand up, jugular engorgement and extend neck, evolving to death (Figure 1E). During this same period, more discrete clinical signs were observed in two goats from Group 1, however, they also died. The other four animals of Group 1 were found dead between the 56th and 60th day of observation (Table 1) without showing any clinical signs of intoxication, In only one goat can be observed macroscopic lesions that consisted mainly of consolidation of cranial lung lobes with presence

of whitish coalescing areas interspersed with areas of congestion. Histologically, in the pulmonary parenchyma, there was congestion, edema and severe inflammatory infiltrate of mono and polymorphonuclear cells. In the kidneys, there was no hydropic degeneration of the epithelium of the contorted renal tubules.

The goat from Group 3 died on average 25.5 ± 0.9 days after the start of the experiment, a significantly lower result ($p < 0.05$) than Group 1 (58.6 ± 1.3 days) and Group 2 (57.8 ± 1.5 days) (Table 2).

DISCUSSION

The results of the present study demonstrate that goats that received oral MFA-degrading bacteria isolated from the soil and plants containing MFA, when exposed to the ingestion of the plant naturally, take longer to develop clinical signs of intoxication or to die when compared to animals who did not receive these bacteria. Similar results were obtained by Pessoa et al. (2015) and Silva et al. (2015) in experiments where the plant was administered experimentally in known amounts and after the final period of ingestion of the bacteria. In another experiment, Silva et al. (2016) continued to administer MFA-degrading bacteria daily at the same time as they performed administration of *A. septentrionalis* and demonstrated that the continuous and simultaneous administration of the bacteria and *A. septentrionalis* conferred resistance to intoxication. These results also reinforce the hypothesis that the administration of the bacterium should be continuous and simultaneous to the administration of the plant (Silva et al. 2016), which was not performed in the present study.

Another factor to be considered is that the goats that received the bacteria only got intoxicated when they ate the plant in the budding phase, soon after scarce rains (Fig. 2). In this phase the plant is considered more toxic, i.e., it has a higher MFA concentration (Tokarnia et al. 2012, Lee et al. 2012), which possibly facilitated intoxication, since the bacteria that could still be in the rumen of the animals were not able to degrade larger amounts of MFA.

Further studies should be performed with the aim of quantifying and determining how long these bacteria stay viable in the animals' rumen, since it can be observed that when the administration of it is interrupted, the resistance is not permanent.

CONCLUSIONS

Goats that simultaneously received, orally, degrading bacteria of sodium monofluoroacetate (*Ralstonia* sp. and *Burkholderia* sp.; *Paenibacillus* sp. and *Cupriavidus* sp.) presented higher resistance to the natural intoxication by *Amorimia septentrionalis*.

Acknowledgments.- This work was funded by the National Institute of Science and Technology (INCT) for the Control of Plant Intoxications (Proc. CNPq 573534 / 2008-0).

REFERENCES

- Barbosa J.D., Oliveira C.M.C., Tokarnia C.H. & Riet-correa F. 2003. Comparação da sensibilidade de bovinos e búfalos à intoxicação por *Palicourea marcgravii* (Rubiaceae). *Pesq. Vet. Bras.* 23(4):167-172.
- Brito L.B., Albuquerque R.F., Rocha B.P., Albuquerque S.S., Lee S.T., Medeiros R.M.T., Riet-Correa F. & Mendonça F.S. 2016. Spontaneous and experimental poisoning of cattle by *Palicourea aeneofusca* in the region of Pernambuco and induction of conditioned food aversion. *Ciência Rural* 46:138-143.

- Camboim E.K.A., Tadra-Sfeir M.Z., Souza E.M., Pedrosa F.O., Andrade P.P., McSweeney C.S., Riet-Correa F. & Melo M.A. 2012. Defluorination of sodium fluoroacetate by bacteria from soil and plants in Brazil. *Scient. World J.* DOI: 10.1100/2012/149893
- 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.
- Fetzner S. & Lingens F. 1994. Bacterial dehalogenases: biochemistry, genetics, and biotechnological applications. *Microbiol. Revs* 58(4):641-685.
- 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.
- Nogueira V.A., França T.N., Peixoto T.C., Caldas S.A., Armien A.G. & Peixoto P.V. 2010. Intoxicação experimental por monofluoroacetato de sódio em bovinos: aspectos clínicos e patológicos. *Pesq. Vet. Bras.* 30(7):533-540.
- Pessoa C.R.M., Medeiros R.M.T. & Riet-Correa F. 2013. Importância econômica, epidemiologia e controle das intoxicações por plantas no Brasil. *Pesq. Vet. Bras.* 33(6):752-758.
- Pessoa D.A.N., Silva L.C.A., Lopes J.R.G., Macêdo M.M.S., Garino Jr F., Azevedo S.S. & Riet-Correa F. 2015. Resistência à intoxicação por *Amorimia septentrionalis* em caprinos, induzida pela inoculação ruminal das bactérias *Pigmentiphaga kullae* e *Ancylobacter dichloromethanicus*. *Pesq. Vet. Bras.* 35(2):125-128.
- Sampaio I.B.M. 1998. Estatística Aplicada à Experimentação Animal. Fundação de Ensino e Pesquisa em Medicina Veterinária e Zootecnia, Belo Horizonte. 221p.
- Silva L.C.A., Riet-Correa F., Pessoa D.A.N., Lopes J.R.G., Silva L.S.A., Albuquerque L.G., Medeiros R.M.T. & Garino F.J.R. 2015. Transferência da resistência à intoxicação por *Amorimia septentrionalis* em caprinos mediante transfaunação de conteúdo ruminal proveniente de caprinos inoculados com bactérias degradadoras de monofluoroacetato de sódio. *Ciência Rural* 45(12):2218-2222.
- Silva L.C.A., Pessoa D.A.N., Lopes J.R.G., Albuquerque L.G., Silva L.S.A, Garino F.JR & Riet-Correa F. 2016. Protection against *Amorimia septentrionalis* poisoning in goats by the continuous administration of sodium monofluoroacetate-degrading bacteria. *Toxicon* 111: 65-68.
- 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.55-90.

PICTURE'S DESCRIPTION

Fig. 1 (A) Area with large amount of *Amorimia septentrionalis* in the location where the experiment was carried out (Limoeiro/PE). (B) Caprine spontaneously ingesting the leaves of *A. septentrionalis* 16 days after the start of the experiment. (C) Predominance of *A. septentrionalis* in comparison with other plants. (D) Caprine from Group 3 presenting distended neck and engorged jugular after natural ingestion of *A. septentrionalis*. (E) Caprine from Group 2 showing clinical signs of intoxication, which evolved to death 57 days after the natural ingestion of *A. septentrionalis*.

Fig. 2 Graphic representing the rainfall in the city of Limoeiro/PE during the entire year of 2014 until January 2015.

FRAMES

Table 1. Period from the beginning of exposure to natural poisoning by *Amorimia septentrionalis* in goats inoculated with sodium monofluoroacetate degrading bacteria (Group 1 and 2) and control goats (Group 3) until clinical signs of poisoning or death

Group/Goat	Clinical signs (day)	Day of death
Group 1		
Goat 1	55 ^e	57 ^e
Goat 2	57 ^e	59 ^e
Goat 3	-	56 ^e
Goat 4	-	57 ^e
Goat 5	-	60 ^e
Goat 6	-	60 ^e
Group 2		
Goat 7	55 ^e	57 ^e
Goat 8	56 ^e	56 ^e
Goat 9	57 ^e	57 ^e
Goat 10	56 ^e	58 ^e
Goat 11	58 ^e	59 ^e
Goat 12	59 ^e	60 ^e
Group 3		
Goat 13	-	25 ^e
Goat 14	-	25 ^e
Goat 15	-	26 ^e
Goat 16	-	27 ^e
Goat 17 ^a	25 ^e	-
Goat 18 ^a	26 ^e	-

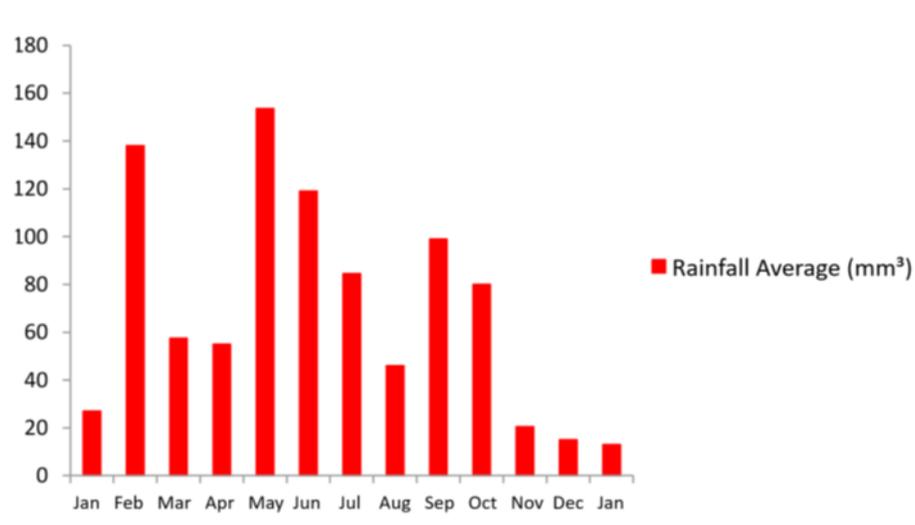
^a Goat 17 and 18 was withdrawn on the 25th and 26th day respectively from the experiment due to the risk of death.

Table 2. Mean and standard deviation of the period from beginning of the exposure to natural poisoning by *Amorimia septentrionalis* in goats inoculated with sodium monofluoroacetate degrading bacteria (Group 1 and 2) and control goats (Group 3) until death of the animals

Groups	Day of death*
1 (n=6)	58.6±1.3 ^a
2 (n=6)	57.8±1.5 ^a
3 (n=4)	25.5±0.9 ^b

n = Number of goats; * Tukey's test; different letters in the same column indicate statistical difference (p<0.05) between groups.

PICTURES



CAPÍTULO III

***Herbaspirillum seropedicae* como bactéria degradadora de monofluoroacetato de sódio: efeitos de sua inoculação em caprinos ingerindo *Amorimia septentrionalis* e nas concentrações deste composto em plantas pulverizadas com a bactéria**

(Artigo submetido à revista Pesquisa Veterinária Brasileira, Qualis A2)

***Herbaspirillum seropedicae* como bactéria degradadora de monofluoroacetato de sódio: efeitos de sua inoculação em caprinos ingerindo *Amorimia septentrionalis* e nas concentrações deste composto em plantas pulverizadas com a bactéria¹**

Danielle Aluska do N. Pessoa^{2*}, José Radmacyo G. Lopes², Emanuel M. de Souza³, Édipo M. Campos², Rosane Maria T. Medeiros², Daniel Cook⁴, Stephen Lee⁴ e Franklin Riet-Correa^{2,5}

ABSTRACT.- Pessoa D.A.N., Lopes J.R.G., Souza E.M., Campos E.M., Medeiros R.M.T., Cook D., Lee S. and Riet-Correa F. [***Herbaspirillum seropedicae* as a degrading bacterium of sodium monofluoroacetate: effects of its inoculation in goats by ingesting *Amorimia septentrionalis* and the concentrations of this compound in plants sprayed with the bacterium.**] *Herbaspirillum seropedicae* como bactéria degradadora de monofluoroacetato de sódio: efeitos de sua inoculação em caprinos ingerindo *Amorimia septentrionalis* e nas concentrações deste composto em plantas pulverizadas com a bactéria. Unidade Acadêmica de Medicina Veterinária, Centro de Saúde e Tecnologia Rural, Universidade Federal de Campina Grande, Avenida Universitária s/n, Bairro Santa Cecília, Patos, PB 58700-970, Brazil. E-mail: danipessoavet14@gmail.com

Herbaspirillum seropedicae is a nitrogen-fixing bacterium capable of using toxic compounds as a source of carbon. Bacteria of this capacity can be used to make animals resistant to plant poisoning containing monofluoroacetate (MFA), such as *A. septentrionalis*. The objective of the present study is to evaluate if *H. seropedicae* is efficient in the degradation of MFA present in *A. septentrionalis* and if the inoculation of this bacterium in goats confers protection to *A. septentrionalis* intoxication. Two experiments were performed: in the first experiment 12 goats were used, divided into 2 groups. Group 1 goats received orally a solution containing the *H. seropedicae* bacterium for 10 days. From day 10 onwards, they received a daily dose of 5 g / kg of *A. septentrionalis* bacteria until a clinical sign of intoxication was observed. The group 2 goats received only the plant at the same dose, also until the observation of clinical signs of intoxication. The amount of MFA found in *A. septentrionalis* used in the experiment with goats was 1.6 ± 0.058 $\mu\text{g} / \text{mg}$ of plant on average. The total plant dose ingested by all goats in Group 1 was 80.83 ± 12.81 g / kg (129.33 ± 20.50 mg / kg MFA), significantly higher values ($p < 0.05$) of than those of group 2 goats (39.16 ± 19.08 g / kg plant and 62.66 ± 30.53 mg / kg MFA). Group 1 goats took an average of 16.16 ± 2.56 days to develop clinical signs of intoxication by the plant, significantly longer ($p = 0.0012$) than group 2 goats (7.83 ± 3.81 days average). Two Group 2 goats died on the same day that they developed clinical signs of intoxication. At necropsy of these two animals, no significant changes were observed. In the second experiment, samples of *A. septentrionalis* were sprayed with a solution containing *H. seropedicae* bacteria. Before and eight days after spraying, the samples were pressed and dried for further quantification of the MFA. The amount of MFA present in samples of *A. septentrionalis* 8 days after spraying with *H. seropedicae* was significantly lower ($p = 0.017$) than that found prior to spraying. It can be concluded that administration of *H. seropedicae* in goats is capable of causing greater resistance to *A. septentrionalis* intoxication, and spraying the plant with this bacterium significantly reduces the amount of MFA present in the plant.

INDEX TERMS: *Amorimia septentrionalis*, *Herbaspirillum seropedicae*, goats, sodium monofluoroacetate, MFA degrading bacteria.

1 Recebido em
Aceito para publicação em

2 Programa de Pós-Graduação em Ciência e Saúde Animal (PPCS), Unidade Acadêmica de Medicina Veterinária (UAMV), Centro de Saúde e Tecnologia Rural (CSTR), Universidade Federal de Campina Grande (UFCG), Avenida Universitária s/n, Bairro Santa Cecília, Patos, PB 58700- 970, Brazil. *Corresponding author: danipessoavet14@gmail.com

3 Setor de Ciências Biológicas, Departamento de Bioquímica, Universidade Federal do Paraná (UFPR), Rua Francisco H. dos Santos s/n, Centro Politécnico, Jardim das Américas, Curitiba, PR.

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

5 Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria (INIA), Plataforma de Salud Animal, Estación Experimental INIA La Estanzuela, Ruta 50 Km 11, 39173, Colonia, Uruguay

RESUMO.- *Herbaspirillum seropedicae* é uma bactéria fixadora de nitrogênio, capaz de utilizar compostos tóxicos como fonte de carbono. Bactérias com essa capacidade podem ser utilizadas para tornar os animais resistentes à intoxicação por plantas que contém monofluoroacetato (MFA), como *A. septentrionalis*. O objetivo do presente estudo é avaliar se *Herbaspirillum seropedicae* é eficiente na degradação do MFA presente em *A. septentrionalis* e se a inoculação dessa bactéria, em caprinos, confere proteção à intoxicação por *A. septentrionalis*. Foram realizados dois experimentos: no primeiro experimento foram utilizados 12 caprinos, divididos em dois grupos. Os caprinos do Grupo 1 receberam diariamente, oralmente, uma solução contendo a bactéria *H. seropedicae* durante 10 dias. A partir do décimo dia passaram a receber, diariamente, além da solução com a bactéria 5g/kg de *A. septentrionalis* até a observação de sinal clínico de intoxicação. Os caprinos do Grupo 2 receberam apenas a planta na mesma dose, também até que a observação de sinais clínicos de intoxicação. A quantidade de MFA encontrada em *A. septentrionalis* utilizada no experimento com caprinos foi de $1,6 \pm 0,058$ µg/mg de planta em média. A dose total de planta ingerida por todos os caprinos do Grupo 1 foi de $80,83 \pm 12,81$ g/kg ($129,33 \pm 20,50$ mg/kg de MFA), valores significativamente maiores ($p < 0,05$) do que os dos caprinos do Grupo 2 ($39,16 \pm 19,08$ g/kg de planta e $62,66 \pm 30,53$ mg/Kg de MFA). Os caprinos do Grupo 1 demoraram em média $16,16 \pm 2,56$ dias para desenvolver sinais clínicos da intoxicação pela planta, período significativamente maior ($p = 0,0012$) que os caprinos do Grupo 2 ($7,83 \pm 3,81$ dias em média). Dois caprinos do Grupo 2 morreram no mesmo dia que desenvolveram sinais clínicos da intoxicação. Na necropsia desses dois animais não foram observadas alterações significativas. No segundo experimento, amostras de *A. septentrionalis* foram pulverizadas com uma solução contendo a bactéria *H. seropedicae*. Antes e oito dias após a pulverização, as amostras foram prensadas e secas para posterior quantificação do MFA. A quantidade de MFA presente nas amostras de *A. septentrionalis* oito dias após a pulverização com *H. seropedicae* foi significativamente menor ($p = 0,017$) do que a encontrada antes da pulverização. Pode-se concluir que a administração de *H. seropedicae* em caprinos é capaz de causar uma maior resistência à intoxicação por *A. septentrionalis*, e a pulverização da planta com esta bactéria reduz significativamente a quantidade de MFA presente na planta.

TERMOS DE INDEXAÇÃO: *Amorimia septentrionalis*, *Herbaspirillum seropedicae*, caprinos, monofluoroacetato de sódio, bactérias degradadoras de MFA.

INTRODUÇÃO

As intoxicações de ruminantes por plantas tóxicas causam perdas importantes no rebanho brasileiro. Estima-se que 52.675 a 63.292 caprinos morrem anualmente, no Brasil, em decorrência de intoxicação por plantas. Já em bovinos esse número pode ultrapassar 1 milhão de cabeças de gado, e metade dessas mortes é em decorrência de intoxicações por plantas que

contém monofluoroacetato (MFA) e causam morte súbita associada ao exercício (Pessoa et al. 2013).

No Brasil, são conhecidas 13 plantas que causam morte súbita associada ao exercício em ruminantes, dentre elas *Amorimia septentrionalis*, anteriormente identificada como *Amorimia (Mascagnia) rigida*, e popularmente conhecida por tingui, encontra-se no Nordeste do Brasil, principalmente nos Estados da Paraíba, Pernambuco e Ceará (Duarte et al. 2013). E causa surtos de intoxicação em caprinos e ovinos, na Paraíba (Vasconcelos et al. 2008) e em bovinos, tanto na Paraíba como em Pernambuco (Albuquerque et al. 2014).

As medidas de controle e prevenção desse tipo de intoxicação eliminando a planta ou evitando o seu consumo pelos animais, nem sempre garantem eficiência (Barbosa et al. 2003). Então novas alternativas são sugeridas para tornar os animais resistentes à intoxicação, incluindo: a administração repetida, por períodos alternados, de doses não tóxicas da planta (Duarte et al. 2014); a transferência de fluido ruminal de ruminantes inoculados com bactérias degradadoras de MFA, que se tornaram resistentes à intoxicação, para ruminantes suscetíveis (Silva et al. 2015); a administração de bactérias que degradam MFA, isoladas do rúmen de caprinos, do solo e de plantas que contém MFA (Pessoa et al. 2015, Silva et al. 2016, Pessoa et al. 2018) e a utilização da técnica de aversão condicionada através do uso de cloreto de lítio (Brito et al. 2016). Dentre essas alternativas destaca-se a utilização de bactérias capazes de degradar o MFA presente na planta, uma vez que quando essas bactérias são administradas diariamente de forma contínua para os animais, estes desenvolvem diferentes graus de resistência à intoxicação por plantas que contém MFA (Silva et al. 2016, Pessoa et al., 2018).

Herbaspirillum seropedicae é uma bactéria gram-negativa, aeróbica, em forma de bastão, com motilidade positiva, pertencente à subdivisão β das proteobactérias, e utiliza ácidos orgânicos e inorgânicos como fonte de carbono (Schmid et al. 2006). Também é considerada diazotrófica e endofítica facultativa, ou seja, é capaz de fixar nitrogênio em condições de microaerofilia e colonizar as folhas, caules e raízes de gramíneas de grande interesse econômico como milho, trigo, sorgo, arroz e cana-de-açúcar (Roncato-Maccari et al. 2003, Baldani & Baldani 2004, Rodrigues et al. 2006). Apresenta metabolismo flexível, capaz de degradar diversos compostos orgânicos e inorgânicos, na maioria das vezes por meio da produção de enzimas, como as dehalogenases, que são capazes de catalisar a quebra da ligação carbono-halôgenio em compostos halogenados, como o monofluoroacetato de sódio, desativando-o (Fetzner & Lingens 1994, Pedrosa et al. 2011). Devido a essa versatilidade na capacidade de degradação de compostos tóxicos, o objetivo do presente estudo é avaliar a utilização de *H. seropedicae* como bactéria degradadora de MFA, tanto por meio da administração oral em caprinos expostos à intoxicação por *A. septentrionalis*, como por meio da pulverização de espécimes de *A. septentrionalis* a campo, com a bactéria. Para tanto foram realizados dois experimentos, um com a administração da bactéria em caprinos, e o outro por meio da pulverização da planta com a bactéria.

MATERIAL E MÉTODOS

Experimento 1

A. septentrionalis utilizada no estudo, foi coletada no município de Teixeira (7°12.24''S 37°15.11''W; elevação 749m), Paraíba. Uma exsicata da planta foi depositada no Herbário da Universidade Federal de Campina Grande, no Campus de Patos, Paraíba, Brasil (comprovante nº 6701). Para determinar a quantidade de monofluoroacetato de sódio presente na planta, pelo método de cromatografia gasosa (Santos-Barbosa et al. 2017), cinco amostras da planta, cada uma com 10 folhas, foram coletadas, prensadas e secas, e posteriormente, enviadas para o Poisonous Plant Laboratory, Agricultural Research Service, United States Department of Agriculture, Logan, EUA.

A bactéria degradadora de MFA *H. seropedicae*, utilizada no presente estudo, faz parte da cepa SmR1 e foi obtida em parceria com o Departamento de Bioquímica da Universidade Federal do Paraná.

Para obtenção da solução utilizada, *H. seropedicae* foi cultivada em meio NFbHP lactato ágar por 48 horas a 30°C (Machado et al. 1991), em estufa bacteriológica, logo após, foi diluída em 60 mL de NaCl a 0,9% estéril, até que atingisse o grau 1 da escala de Mac Farland (Gregg et al. 1998). Após testes pelo método de contagem de colônias em placas, determinou-se que nesse grau de turvação cada 1mL dessa solução contém aproximadamente $8,6 \times 10^7$ unidades formadoras de colônias da bactéria.

Foram utilizados 12 caprinos, mestiços, com idades variando de 1 a 4 anos, e peso de 25 a 45 kg, provenientes de áreas livres de plantas que contém MFA. Estes foram divididos em dois grupos, cada um com seis animais. Os caprinos do Grupo 1 receberam, oralmente e diariamente, durante 10 dias, 60mL da solução contendo *H. seropedicae* (Silva et al. 2016). A partir do décimo dia e até a observação de sinais clínicos de intoxicação, receberam associada à solução com a bactéria, 5g/kg de *A. septentrionalis*. Já os caprinos do Grupo 2 receberam somente a *A. septentrionalis* na mesma dose, também até a observação de sinais clínicos de intoxicação.

A planta era oferecida de forma voluntária aos caprinos, e os que não comiam recebiam a mesma por meio da administração de pequenas quantidades diretamente em suas bocas. Após a administração, todos os animais eram estimulados a se movimentar por 10 minutos, e diariamente, antes e depois da administração da planta eram mensurados temperatura retal, frequência cardíaca, frequência respiratória e movimentos ruminais de todos os caprinos, além de observada a presença de sinais clínicos da intoxicação. Os animais que morreram foram necropsiados e fragmentos de órgãos das cavidades abdominal e torácica e sistema nervoso central foram coletados, fixados em formol a 10%, processados de acordo com os métodos de rotina, corados pela hematoxilina-eosina (HE), e posteriormente avaliados histopatologicamente.

Para a análise estatística as variáveis dia de observação de sinais clínicos da intoxicação, quantidade de planta ingerida por cada caprino e quantidade de MFA ingerida por Kg de peso corporal, foram submetidas ao teste de normalidade Shapiro-Wilk, e em seguida, expressas em médias e desvios-padrões. A comparação entre os valores observados nos grupos foi feita por meio do teste t de Student para amostras independentes, tanto para o dia de observação de sinais clínicos da intoxicação como para a quantidade de planta ingerida e de MFA ingerido (Zar 1999). O programa utilizado para realização das análises foi o BioEstat 5.3, e o nível de significância adotado foi de 5%.

Experimento 2

Para o teste de pulverização, *H. seropedicae* foi diluída em 60ml de NaCl a 0,9% estéril, até que atingisse o grau 1 da escalada de Mac Farland, logo após, essa dose foi misturada em um litro de meio NFbHP lactato caldo, em seguida, foi incubada em estufa bacteriológica por 48 horas a 30°C (Machado et al. 1991). Para a realização do estudo foram utilizados oito litros da solução do meio com a bactéria, que após o período de incubação foram colocados em pulverizadores manuais estéreis para posterior pulverização das plantas.

A área escolhida para pulverização foi o Sítio Lopes, uma propriedade na cidade de Teixeira (7°12.24”S 37°15.11”W; elevação 749 m), Paraíba, Brasil, que apresentava significativa quantidade de *A. septentrionalis*. Foram pulverizadas 25 espécimes da planta, em uma área de 100 m², onde aproximadamente cada planta recebeu 320ml da solução. A pulverização foi realizada no período de estiagem, logo no começo da manhã, uma única vez e oito dias após as plantas foram coletadas, prensadas e secas, e posteriormente, cinco

amostras, cada uma com 10 folhas, foram enviadas para o Poisonous Plant Laboratory, Agricultural Research Service, United States Department of Agriculture, em Logan, EUA, para a quantificação do MFA.

Para análise estatística as variáveis quantidade de MFA antes e após a pulverização foram submetidas ao teste de normalidade Shapiro-Wilk, e em seguida, expressas em médias e desvios-padrões. A comparação entre as médias antes e após a pulverização foi feita por meio do teste t de student para amostras relacionadas (Zar 1999). O programa utilizado para realização das análises foi o BioEstat 5.3, e o nível de significância adotado foi de 5%.

RESULTADOS

Experimento 1

Todos os caprinos apresentaram sinais clínicos de intoxicação, que consistiam em taquipneia, taquicardia, arritmia, balidos, tremores, incoordenação motora, relutância ao movimento, anorexia, apatia, queda, pescoço distendido (Fig.1A) e jugular ingurgitada com pulso venoso positivo (Fig.1B). O período para desenvolvimento de sinais clínicos da intoxicação nos caprinos do Grupo 1, que receberam a bactéria, foi de $16,16 \pm 2,56$ dias, valor significativamente maior ($p=0,0012$) que o dos caprinos do Grupo 2, que foi de $7,83 \pm 3,81$ dias (Quadro 1).

Considerando que a quantidade de MFA encontrada em *A. septentrionalis* foi $1,6 \pm 0,58$ $\mu\text{g}/\text{mg}$, a dose de 5g/Kg de planta que foi fornecida aos animais, corresponde em média a 8mg de MFA por Kg de peso corporal. A dose total de planta ingerida pelos caprinos do Grupo 1 foi de $80,83 \pm 12,81\text{g}/\text{kg}$, então os caprinos ingeriram $129,33 \pm 20,50\text{mg}/\text{Kg}$ de MFA no total, enquanto que os caprinos do Grupo 2 ingeriram $39,16 \pm 19,08$ g/kg de planta e $62,66 \pm 30,53\text{mg}/\text{Kg}$ de MFA (Quadro 1). Tanto a quantidade de planta como a de MFA ingeridos pelos caprinos do Grupo 1 foram significativamente maiores ($p<0,05$) que a dos caprinos do Grupo 2.

Os caprinos em ambos os Grupos (1 e 2) se recuperaram em média três dias após o fim da ingestão da planta. No entanto, em dois caprinos do Grupo 2 os sinais clínicos de intoxicação evoluíram para morte no mesmo dia em que foram observados, e não foram verificadas alterações significativas na necropsia desses animais.

Experimento 2

A quantidade de MFA presente nas amostras de *A. septentrionalis* oito dias após a pulverização com *H. seropedicae* ($0,24 \pm 0,05$ $\mu\text{g}/\text{mg}$) foi significativamente menor ($p = 0,017$) do que antes da pulverização ($1,21 \pm 0,53$ $\mu\text{g}/\text{mg}$) (Quadro 2).

DISCUSSÃO

Os resultados do presente estudo demonstram que os caprinos que ingeriram *H. seropedicae* demoraram um período maior para desenvolver sinais clínicos de intoxicação por *A. septentrionalis*, contendo 0,16% de MFA, do que os caprinos que não receberam a bactéria. Além disso, nos caprinos que receberam a bactéria, não foi registrada nenhuma morte, enquanto que do grupo que não recebeu a bactéria dois caprinos morreram. Isto sugere que a bactéria degrada parcialmente o MFA contido na planta. Estes resultados são similares aos obtidos com outras bactérias degradadoras de MFA (Pessoa et al. 2015, Silva et al. 2016, Pessoa et al. 2018).

Silva et al. (2016) apresentaram resultados mais satisfatórios do que os do presente estudo, uma vez que a resistência permaneceu durante os 30 dias de administração de *Ralstonia* sp. e *Burkholderia* sp. sem que os caprinos apresentassem nenhum sinal clínico de

intoxicação. No trabalho de Silva et al. (2016) não se menciona a concentração de MFA da planta utilizada. No entanto, a quantidade de MFA detectada nas amostras de *A. septentrionalis* utilizadas no experimento 1 (0,16 %) foi maior que a encontrada em estudos anteriores: 0,002 % (Lee et al. 2012), 0,0021 % (Albuquerque et al. 2014) e 0,00074 % (Lopes et al. 2019, no prelo). Marcadas variações no conteúdo de MFA em *A. septentrionalis* são reportadas também por Lee et al. (2012). Provavelmente *H. seropedicae* não sobreviva ou não se multiplique no rúmen em número suficiente para hidrolisar quantidades significativas de MFA.

As bactérias *Ralstonia* sp., *Burkholderia* sp., *Paenibacillus* sp. e *Cupriavidus* sp. induzem resistência a intoxicação por *A. septentrionalis*, no entanto, essa resistência acaba depois de um período de 55 dias após o final da ingestão das bactérias (Pessoa et al. 2018). No caso de *H. seropedicae*, que é uma bactéria endofítica, foi testada também a possibilidade de que ela colonizasse a planta degradando o MFA. Os resultados obtidos, onde houve uma significativa redução na concentração de MFA, de $1,21 \pm 0,53$ µg/mg imediatamente antes da pulverização com a bactéria para $0,24 \pm 0,05$ µg/mg oito dias após uma única pulverização, sugerem que *H. seropedicae* é capaz de colonizar *A. septentrionalis* diminuindo significativamente a concentração deste composto na planta. Novos experimentos deverão ser realizados para comprovar estes dados e constatar a persistência de *H. seropedicae* em *A. septentrionalis* e provavelmente em outras plantas que contêm MFA, principalmente em espécies de *Palicourea*, que contêm maiores concentrações de MFA e são mais difundidas no Brasil.

CONCLUSÃO

Conclui-se que a inoculação de *H. seropedicae* em caprinos, foi capaz de causar maior resistência à intoxicação por *A. septentrionalis*, e a pulverização de amostras de *A. septentrionalis* com *H. seropedicae* foi capaz de diminuir significativamente a quantidade de MFA presente na planta.

Comitê de ética – Este experimento foi aprovado pelo Comitê de Ética em experimentação animal (Processo CEP 69-2013).

Agradecimentos – Este trabalho foi financiado pelo Projeto Universal do CNPq (Processo 402140/2016-8).

REFERÊNCIAS

- Albuquerque S.S.C., Rocha B.P., Almeida V.M., Oliveira J.S., Riet-Correa F., Lee S.T., Evêncio Neto J. & Mendonça F.S. 2014. Fibrose cardíaca associada à intoxicação por *Amorimia septentrionalis* em bovinos. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 34(5):433-437.
- Baldani J.I, Baldani V.L.D. 2004. History on the biological nitrogen fixation research in graminaceous plants: special emphasis on the Brazilian experience. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*. 77(3):549-579.
- Barbosa J.D., Oliveira C.M.C., Tokarnia C.H. & Riet-correa F. 2003. Comparação da sensibilidade de bovinos e búfalos à intoxicação por *Palicourea marcgravii* (Rubiaceae). *Pesq. Vet. Bras.* 23(4):167-172.
- Duarte A.L., Medeiros R.M.T. & Riet-correa F. 2013. Intoxicação por *Amorimia* spp. em ruminantes. *Ciência Rural, Santa Maria*. 43(7):1294-1301.
- Fetzner S. & Lingers F. 1994. Bacterial dehalogenases: biochemistry, genetics, and Biotechnological applications. *Microbiol. Revs* 58(4):641- 685.

- Gregg K., Hamdorf B., Henderson K., Kopency J. & Wong C. 1998. Genetically modified ruminal bacteria protect sheep from fluoracetate poisoning. *Appl. Environ. Microbiol.* 64(9):3496-3498.
- 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., Araújo J.A., Pessoa D.A.N., Lee S., Riet-Correa F., Medeiros R.M.T. 2019. Mortalidade neonatal associada ao monofluoroacetato de sódio em cabritos alimentados com colostro de cabras ingerindo *Amorimia septentrionalis*. *Pesquisa Veterinária Brasileira* (No prelo).
- Machado H.B., Funayama S., Rigo L.U. & Pedrosa F.O. (1991) Excretion of ammonium by *Azospirillum brasiliense*. *Can. J. Microbiol.* 37: 549-553.
- Rodrigues L.S., Baldani V.L.D., Reis V.M. & Baldani J.I. 2006. Diversidade de bactérias diazotróficas endofíticas dos gêneros *Herbaspirillum* e *Burkholderia* na cultura do arroz inundado. *Pesquisa Agropecuária Brasileira.* 41(2):275-284.
- Roncato-Maccari L.D.B., Ramos H.J.O., Pedrosa F.O., Alquini Y., Chubatsu L.S., Yates M.G., Rigo L.U., Steffens M.B.R. & Souza E.M. (2003). Endophytic *Herbaspirillum seropedicae* expresses nif genes in gramineous plants. *FEMS Microbiology Ecology* 45:39-47.
- Pedrosa F.O., Monteiro R.A., Wassem R., Cruz L.M., Ayub R.A. et al. (2011) Genome of *Herbaspirillum seropedicae* Strain SmR1, a Specialized Diazotrophic Endophyte of Tropical Grasses. *PLoS Genet* 7(5): e1002064. doi:10.1371/journal.pgen.1002064.
- Pessoa C.R.M., Medeiros R.M.T. & Riet-correa F. 2013. Importância econômica, epidemiologia e controle das intoxicações por plantas no Brasil. *Pesq. Vet. Bras.* 33(6):752-758.
- Pessoa D.A.N., Silva L.C.A., Lopes J.R.G., Macêdo M.M.S., Garino Jr F., Azevedo S.S. & Riet-correa F. 2015. Resistência à intoxicação por *Amorimia septentrionalis* em caprinos, induzida pela inoculação ruminal das bactérias *Pigmentiphaga kullae* e *Ancylobacter dichloromethanicus*. *Pesq. Vet. Bras.* 35(2):125-128.
- Pessoa D.A.N., Silva L.C.A., Mendonça F.S., Almeida V.M., Lopes J.R.G., Albuquerque L.G., Silva A.A. & Riet-correa, F. 2018. Evaluation of resistance to natural poisoning by *Amorimia septentrionalis* in goats which had received sodium monofluoroacetate degrading bacteria. *Pesq. Vet. Bras.* 38(10):1913-1917. DOI: 10.1590/1678-5150-PVB-5840.
- 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.
- Schmid M., Baldani J.I. & Hartmann A. 2006. The genus *Herbaspirillum*. In: Dworkin M., Falkow S., Rosenberg E., Schleifer K. & Stackebrandt E. *The Prokaryotes: a handbook on the biology of bacteria.* 3rd ed. New York, EUA. v. 5, p.141-150. DOI: 10.1007/0-387-30745-1_7.
- Silva L.C.A., Riet-correa F., Pessoa D.A.N., Lopes J. R.G., Silva L.S.A., Albuquerque L.G., Medeiros R.M.T. & Garino F.JR. 2015. Transferência da resistência à intoxicação por *Amorimia septentrionalis* em caprinos mediante transfaunação de conteúdo ruminal proveniente de

caprinos inoculados com bactérias degradadoras de monofluoroacetato de sódio. *Cienc. Rural*. 45(12):2218-2222.

Silva L.C.A., Pessoa D.A.N., Lopes J.R.G., Albuquerque L.G., Silva L.S.A, Garino F.JR & Riet-correa F. 2016. Protection against *Amorimia septentrionalis* poisoning in goats by the continuous administration of sodium monofluoroacetate-degrading bacteria. *Toxicon*. 111: 65-68.

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.* v. 28, n. 10, p. 521-526.

Zar J.H. 1999. *Biostatistical Analysis*. 4th ed. Prentice Hall, New Jersey. 929p.

LEGENDA DA FIGURA

Fig.1. (A) Caprino do grupo controle apresentando severa depressão e decúbito esternal após a ingestão de *Amorimia septentrionalis*. (B) Mesmo animal apresentando ingurgitamento da veia jugular.

QUADROS

Quadro 1. Período de observação de sinais clínicos na intoxicação por *Amorimia septentrionalis*, quantidade de planta ingerida e quantidade de MFA ingerida até o aparecimento dos sinais clínicos nos caprinos do Grupo 1, que ingeriram *Herbaspirillum seropedicae* e *Amorimia septentrionalis* e do Grupo 2, que ingeriram somente a planta

Grupo/Caprino	Dia de observação de sinais clínicos da intoxicação*	Dose de planta ingerida (g/kg)*	Dose de MFA ingerida (mg/kg)*
Grupo 1			
1	18	90	144
2	20	100	160
3	14	70	112
4	14	70	112
5	17	85	136
6	14	70	112
Média ± desvio padrão	16,16 ± 2,56 ^a	80,83 ± 12,81 ^a	129,33 ± 20,50 ^a
Grupo 2			
7	5	25	40
8	6	30	48
9*	11	55	88
10*	3	15	24
11	13	65	104
12	9	45	72
Média ± desvio padrão	7,83 ± 3,81 ^b	39,16 ± 19,08 ^b	62,66 ± 30,53 ^b

*Teste t de student; ^{a,b} Letras diferentes em uma mesma coluna indicam diferença estatística ($p < 0,05$) entre os grupos. *Os animais 9 e 10 morreram no mesmo dia que apresentaram sinais clínicos de intoxicação.

Quadro 2. Quantidade de MFA mensurada antes e oito dias após a pulverização de espécimes de *Amorimia septentrionalis* com a bactéria *Herbaspirillum seropedicae*

Amostra	Quantidade de MFA ($\mu\text{g}/\text{mg}$)	
	Antes da pulverização	8 dias após a pulverização
A 1	0,61	0,23
A 2	0,85	0,27
A 3	1,2	0,32
A 4	1,4	0,19
A 5	2,0	0,22
Média ± desvio-padrão*	1,21 ± 0,53 ^a	0,24 ± 0,05 ^b

*Teste t de student para amostras relacionadas; ^{a,b} Letras diferentes em colunas diferentes representam diferença estatística significativa ($p < 0,05$).

FIGURA



CONCLUSÃO GERAL

Nesta tese foi realizada uma revisão das técnicas para o controle da intoxicação em ruminantes por plantas que contém MFA e causam morte súbita associada ao exercício. Visto que o tratamento dessas intoxicações na maioria das vezes apresenta sucesso limitado, a melhor opção é conhecer as medidas mais eficazes para prevenir esse tipo de intoxicação. Dentre elas, as medidas convencionais como evitar movimentação dos animais e removê-los das pastagens infestadas pelas plantas ainda são as mais indicadas, uma vez que os novos métodos de controle só foram aplicados experimentalmente.

Além disso, foi estudada a duração da resistência à intoxicação por *Amorimia septentrionalis* em caprinos, induzida por bactérias que hidrolisam MFA, quando os animais ingerem a planta naturalmente, no campo. Os resultados mostraram que a resistência induzida por essas bactérias tem uma duração limitada, que no caso deste trabalho foi de em média 58 dias. Esses resultados sugerem que para a resistência induzida por bactérias que hidrolisam MFA seja duradoura os animais têm que ingerir continuamente as bactérias, como já proposto na literatura, que também propõe a administração das bactérias sob a forma de probióticos adicionados no alimento, na água ou no sal mineral. Futuros trabalhos deverão ser realizados para comprovar esta hipótese.

Os resultados do presente estudo mostraram que a utilização de bactérias endofíticas que hidrolisam MFA, como *H. seropedicae*, é uma alternativa possível para diminuir a toxicidade de plantas que contém essa substância. No entanto, novos experimentos devem ser realizados, para demonstrar a colonização, persistência e eficiência dessa bactéria em diminuir as concentrações de MFA nas plantas. E devem ser realizados para comprovar essa possibilidade de utilização dessa bactéria no controle das intoxicações por plantas que causam morte súbita associada ao exercício e contém MFA.

ANEXO

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. Essa regra vale para artigos submetidos a partir de 1 de janeiro de 2018.

Os 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 da PVB, 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. Em 18 de setembro de 2018.

1. Os artigos devem ser organizados em TÍTULO, ABSTRACT, RESUMO, INTRODUÇÃO, MATERIAL E MÉTODOS, RESULTADOS, DISCUSSÃO, CONCLUSÕES (de preferência os últimos três separadamente), Agradecimentos, Declaração de conflito de interesse 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 Declaração de conflito de interesse e da Lista de Referências. Em 18 de setembro de 2018.

m) A **Declaração de conflito de interesse** é obrigatória e deve ser mencionada nos casos positivos ou negativos; deve ser sucinta e colocada imediatamente antes da Lista de Referências.

n) 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 “°C”.

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). Em 18 de setembro de 2018.

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 parênteses 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. Apresentação das Figuras:

a) As figuras devem ser salvas em 300dpi, arquivo TIF.

b) Enviar cada figura separadamente.

c) Identificar as figuras em ordem conforme a menção no texto.

d) As figuras solitárias devem ter seus arquivos identificados como (Fig.1, Fig.2 ...)

e) As figuras que serão destinadas a formar uma prancha devem ter seus arquivos identificados como (Fig.1A, Fig.1B ...). As pranchas devem ser compostas por 2 ou 4 ou 6 subfiguras. Imagens destinadas a uma prancha devem ser de mesmo tamanho.

f) Para micrografias usar, de preferência, barras de escala para indicar o aumento; apresentar na legenda sempre o método de coloração e a objetiva, p. ex.: HE, obj.40x.

g) As legendas de figuras devem conter inicialmente o que se observa na imagem, seguida das informações adicionais (Formato típico da legenda: Fig.1. (A) Descrição da imagem. Diagnóstico, órgão ou tecido, espécie animal, número do caso. Método de coloração e objetiva.).

h) As legendas de figuras devem ser apresentadas junto com o texto do artigo, após as Referências. Em 18 de setembro de 2018

4. 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:

Martins K.P.F., Fonseca T.R.S., Silva E.S., Munhoz T.C.P., Dias G.H.S., Galiza G.J.N., Oliveira L.G.S. & Boabaid F.M. 2018. Bócio em bovinos. *Pesq. Vet. Bras.* 38(6):1030-1037.

Rondelli L.A.S., Silva G.S., Bezerra K.S., Rondelli A.L.H., Lima S.R., Furlan F.H., Pescador C.A. & Colodel E.M. 2017. Doenças de bovinos no Estado de Mato Grosso diagnosticadas no Laboratório de Patologia Veterinária da UFMT (2005-2014). *Pesq. Vet. Bras.* 37(5):432-440.

Hooiveld M., Smit L.A., Wouters I.M., Van Dijk C.E., Spreeuwenberg 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 “ponto-vírgulas” (;) 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. Em 18 de setembro de 2018

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:

Rech R.R. 2007. Alterações no encéfalo de bovinos submetidos à vigilância das encefalopatias espongiiformes transmissíveis. Tese de Doutorado, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria. 228p.

(Notem: (1) Deve-se evitar citações de Dissertações ou Teses; deve-se preferir citar 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!)
