



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

**UTILIZAÇÃO DE BACTÉRIAS PRODUTORAS DE DEHALOGENASES NO  
CONTROLE DA INTOXICAÇÃO POR MONOFLUOROACETATO DE SÓDIO  
PRESENTE EM *Amorimia septentrionalis***

**DANIELLE ALUSKA DO NASCIMENTO PESSOA**

**PATOS – PB  
AGOSTO – 2014**



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

**UTILIZAÇÃO DE BACTÉRIAS PRODUTORAS DE DEHALOGENASES NO  
CONTROLE DA INTOXICAÇÃO POR MONOFLUOROACETATO DE SÓDIO  
PRESENTE EM *Amorimia septentrionalis***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária do Centro de Saúde e Tecnologia Rural da Universidade Federal de Campina Grande, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Medicina Veterinária.

Mestranda: Danielle Aluska do Nascimento Pessoa  
Orientador: Prof. Dr. Felício Garino Júnior

PATOS – PB  
AGOSTO – 2014

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA DO CSRT DA UFCG**

P475u

Pessoa, Danielle Aluska do Nascimento

Utilização de bactérias produtoras de dehalogenases no controle da intoxicação por monofluoroacetato de sódio presente em *Amorimia septentrionalis*. / Danielle Aluska do Nascimento Pessoa. – Patos, 2014. 51f.

Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Universidade Federal de Campina Grande, Centro de Saúde e Tecnologia Rural, 2014.

"Orientação: Prof. Dr. Felício Garino Júnior"

Referências.

1. Detoxificação ruminal.
2. Intoxicações por plantas.
3. Bactérias produtoras de dehalogenases. I. Título.

CDU 636.084

**DANIELLE ALUSKA DO NASCIMENTO PESSOA**

**UTILIZAÇÃO DE BACTÉRIAS PRODUTORAS DE DEHALOGENASES NO  
CONTROLE DA INTOXICAÇÃO POR MONOFLUOROACETATO DE SÓDIO  
PRESENTE EM *Amorimia septentrionalis***

Dissertação aprovada em: \_\_/\_\_/\_\_

Comissão Examinadora:

---

Prof. Dr. Felício Garino Júnior  
Unidade Acadêmica de Medicina Veterinária UFCG/CSTR

---

Prof. Dra. Rosane Maria Trindade de Medeiros  
Unidade Acadêmica de Medicina Veterinária UFCG/CSTR

---

Prof. Dr. Ricardo Barbosa de Lucena  
Departamento de Medicina Veterinária UFPB/CCA

**A minha filha, Maria Vitória,**

**Aos meus pais Jomar e Célia,**

**Ao meu marido Fernando,**

**Pelo carinho e compreensão**

**DEDICO.**

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, misericordioso e fiel, por ter me dado tanta força durante toda essa caminhada e pelas bênçãos a mim concedidas.

Ao meu marido, pela paciência, compreensão, carinho, companheirismo e incentivo nas horas mais difíceis.

Aos meus pais Jomar e Célia, minha filha Maria Vitória e meus irmãos Raphael e Vanessa, pela força transmitida mesmo à distância, pelo carinho e palavras de incentivo.

Aos meus avós João e Marta, pelo incentivo e constante torcida pela minha vitória.

A minha vizinha Maria, pelas orações e bênçãos transmitidas.

Ao professor Felício Garino, pela paciência, orientação e todo conhecimento a mim transmitido.

A minha grande amiga Layze, pelos ensinamentos, momentos de alegria e tristeza compartilhados, pela grande ajuda na execução desse experimento e pela amizade compartilhada.

Aos meus colegas de laboratório, Meire, Silvia e Rodrigo pelo apoio diário e companheirismo.

Ao professor Franklin Riet-Correa e a professora Rosane Medeiros, pelo apoio, orientação e disposição a mim concedidos.

Ao INCT para o controle de plantas tóxicas por ter financiado toda esta pesquisa.

Ao Sr. José, pelo grande cuidado demonstrado aos animais durante todo o experimento.

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

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, pela contribuição acadêmica e convívio harmonioso.

A Gabriela, técnica do Laboratório de Patologia Clínica da Pós-Graduação, pela paciência e ajuda na execução deste experimento.

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

A todos muito obrigada!

## RESUMO

As intoxicações de animais domésticos por plantas que contêm monofluoroacetato de sódio, causam grandes prejuízos econômicos, uma vez que não existe antídoto capaz de reverter a intoxicação e as medidas profiláticas existentes não são totalmente eficientes. A detoxificação ruminal é um mecanismo que vem sendo usado como alternativa de controle nas intoxicações por plantas. Pode ser realizado por bactérias capazes de degradar compostos tóxicos, como o monofluoroacetato de sódio, geralmente essa degradação é facilitada pela produção de enzimas chamadas de dehalogenases. O objetivo do presente trabalho foi avaliar, em caprinos, a resistência ao MFA presente em *Amorimia septentrionalis*, induzida por inoculação ruminal das bactérias *Pigmentiphaga kullae* e *Ancylobacter dichloromethanicus*, isoladas de rúmen de caprino. Os caprinos foram divididos em dois grupos, cada um com 6 animais. No grupo 1, 60 mL de uma solução contendo as bactérias foi inoculada em cada animal, diariamente, durante 10 dias. No grupo 2, os caprinos não receberam as bactérias. No décimo dia de inoculação foi oferecida a todos os caprinos a planta na dose de 5g/kg de peso vivo, diariamente, sendo interrompida em cada animal após a observação dos primeiros sinais clínicos da intoxicação. Os caprinos do grupo 1 apresentaram sinais clínicos  $5,83 \pm 2,56$  dias após a administração da planta o que diferiu significativamente ( $p=0,037$ ) dos caprinos do grupo 2, que apresentaram sinais clínicos aos  $2,67 \pm 0,52$  dias. A quantidade de planta ingerida pelos caprinos inoculados ( $28,83 \pm 12,97$  g/kg) e os não inoculados ( $12,03 \pm 3,65$  g/kg) para desencadear os sinais clínicos foi, também, estatisticamente diferente entre os grupos ( $p=0,025$ ). Então conclui-se que a administração ruminal das bactérias *Pigmentiphaga kullae* e *Ancylobacter dichloromethanicus* induz resistência a intoxicação por plantas que contém monofluoroacetato de sódio, reforçando seu uso como forma de controle nas intoxicações.

**Palavras-chave:** detoxificação ruminal, intoxicações por plantas, monofluoroacetato de sódio.

## ABSTRACT

Poisoning of domestic animals by plants containing sodium monofluoroacetate, cause great economic losses, since there is no antidote capable of reversing intoxication and prophylactic measures available are not totally effective. The ruminal detoxification is a mechanism that has been used as an alternative control in poisoning by plants. Can be realized by bacteria able to degrade toxic compounds, such as sodium monofluoroacetate, usually this degradation is facilitated by the production of enzymes called dehalogenases. The objective of this study was to evaluate, in goats, the resistance present in MFA *Amorimia septentrionalis* induced by inoculation of ruminal bacteria *Pigmentiphaga kullae* and *Ancylobacter dichloromethanicus* isolated from the rumen of goats. The goats were divided into two groups, each with 6 animals. In group 1, 60 ml of a solution containing the bacteria was inoculated into each animal daily for 10 days. In group 2, the goats received no bacteria. On the tenth day of inoculation was offered to all goats plant at a dose of 5 g/kg body weight daily in each animal being stopped watching after the first clinical signs of intoxication. Goats from group 1 showed clinical signs  $5.83 \pm 2.56$  days after administration of the plant which differed significantly ( $p = 0.037$ ) in goats of group 2, which showed clinical signs to  $2.67 \pm 0.52$  days. The amount ingested by plant inoculated goats ( $28.83 \pm 12.97$  mg / kg) and non-inoculated ( $12.03 \pm 3.65$  g / kg) to cause clinical signs was also statistically different between groups ( $p = 0.025$ ). So it is concluded that administration of rumen bacteria *Pigmentiphaga kullae* and *Ancylobacter dichloromethanicus* induces resistance to poisoning plants containing sodium monofluoroacetate, enhancing its use as a means of controlling the poisoning.

**Key words:** rumen detoxification, poisoning plants, monofluoroacetate sodium.

## LISTA DE SÍMBOLOS, SIGLAS E ABREVIACÕES

**Ag** – Prata

**Asp** – Aspartato

**C** – Carbono

**DNA** – Ácido desoxirribonucleico

**F** – Flúor

**Fe** - Ferro

**His** – Histidina

**Hg** - Mercúrio

**Mg** – Magnésio

**Mn** – Manganês

**Phe** – Fenilalanina

**Tir** – Tirosina

**Trp** – Triptofano

## SUMÁRIO

CAPÍTULO I.....	14
Importância das bactérias produtoras de dehalogenases na detoxificação de compostos halogenados tóxicos .....	14
Dehalogenases importantes na degradação de compostos tóxicos ácidos.....	18
Fluoroacetato dehalogenase .....	18
L-2-haloácido dehalogenase .....	20
Bactérias produtoras de dehalogenases .....	21
<i>Pseudomonas</i> spp.....	21
<i>Burkholderia</i> spp. ....	22
<i>Moraxella</i> spp.....	23
<i>Sphingobium</i> spp. e <i>Sphingomonas</i> spp. ....	23
<i>Mycobacterium</i> spp.....	24
<i>Rhodococcus</i> spp. ....	24
<i>Pigmentiphaga kullae</i> e <i>Ancylobacter dichloromethanicus</i> .....	25
Aplicações de bactérias produtoras de dehalogenases como alternativas de detoxificação .....	26
Uso de bactérias produtoras dehalogenases em medicina veterinária.....	27
REFERÊNCIAS .....	28
CAPÍTULO II.....	34
Resistência à intoxicação por <i>Amorimia septentrionalis</i> em caprinos, induzida pela inoculação ruminal das bactérias <i>Pigmentiphaga kullae</i> e <i>Ancylobacter dichloromethanicus</i> .....	34
INTRODUÇÃO .....	37
MATERIAL E MÉTODOS.....	37
RESULTADOS .....	39
DISCUSSÃO .....	39
REFERÊNCIAS .....	41
CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	45
ANEXOS.....	46

## LISTA DE TABELAS E QUADROS

**Capítulo II – Resistência à intoxicação por *Amorimia septentrionalis* em caprinos, induzida pela inoculação ruminal das bactérias *Pigmentiphaga kullae* e *Ancylobacter dichloromethanicus***

**Quadro 1. Tempo para início dos sinais clínicos da intoxicação por *Amorimia septentrionalis* em caprinos inoculados com bactérias que degradam fluoracetato (grupo 1) e caprinos controle (grupo 2) ..... 443**

**Quadro 2. Dose de planta ingerida até o início dos sinais clínicos da intoxicação por *Amorimia septentrionalis* em caprinos inoculados com bactérias que degradam fluoracetato (grupo 1) e caprinos controle (grupo 2) ..... 443**

## INTRODUÇÃO GERAL

As intoxicações de animais domésticos por plantas tóxicas causam grande impacto econômico na produção e reprodução animal, gerando tanto perdas diretas relacionadas a morte de animais, diminuição dos índices reprodutivos, redução na produtividade dos animais sobreviventes e aumento na susceptibilidade a outras doenças devido à depressão imunológica, como perdas indiretas, estas incluem os custos no controle das pastagens com plantas tóxicas, medidas de manejo para evitar a intoxicação, diminuição do valor da terra, substituição dos animais que morreram e gastos com diagnóstico e tratamento das intoxicações (RIET-CORREA et al., 1993; JAMES 1994). No Brasil, estima-se que aproximadamente um milhão de bovinos morram anualmente intoxicados por essas plantas, justificando a necessidade da elaboração de medidas de controle efetivo, com objetivo de reduzir as perdas econômicas ocasionadas (PESSOA et al., 2013).

Intoxicações por plantas tóxicas que contém monofluoroacetato de sódio não possuem tratamento eficaz, uma vez que a evolução da intoxicação é superaguda. As medidas de controle se limitam a cercar as áreas infestadas ou erradicar a planta, mesmo assim elas não são eficientes (BARBOSA et al., 2003). A adoção de novas medidas profiláticas se faz necessária, como a indução da detoxificação do monofluoroacetato de sódio por bactérias produtoras de dehalogenases inoculadas no rúmen de animais, com intuito de torná-los resistentes a intoxicação por esse composto.

Esta Dissertação é composta por dois capítulos. No capítulo 1 é apresentada uma revisão de literatura sobre as bactérias que produzem dehalogenases e sua importância na detoxificação de compostos tóxicos, a qual foi submetida ao periódico Arquivos do Instituto Biológico. O capítulo 2 é composto por um artigo científico submetido ao periódico Pesquisa Veterinária Brasileira, cujo objetivo foi avaliar, em caprinos, a resistência ao monofluoroacetato de sódio presente em *Amorimia septentrionalis*, induzida por inoculação intraruminal das bactérias *Pigmentiphaga kullae* e *Acylobacter dichloromethanicus*.

## REFERÊNCIAS

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). *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v. 23, n. 4, p. 167-172, 2003.

JAMES L.F. Solving poisonous plant problems by a team approach, p.1-6. In: COLEGATE S.M. & DORLING P.R. (ed.) *Plant Associated Toxins*. CAB International, Wallingford. 1994.

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

RIET-CORREA F.; MENDEZ M.C.; SCHILD A.L. Intoxicações por plantas e micotoxicoses em animais domésticos. Editorial Hemisfério Sur, Montevideo. 340 p. 1993.

## **CAPÍTULO I**

**Importância das bactérias produtoras de dehalogenases na detoxificação de compostos halogenados tóxicos**

**(Artigo de revisão submetido ao periódico Arquivos do Instituto Biológico)**

# IMPORTÂNCIA DAS BACTÉRIAS PRODUTORAS DE DEHALOGENASES NA DETOXIFICAÇÃO DE COMPOSTOS HALOGENADOS TÓXICOS

**D.A.N. Pessoa<sup>1</sup>, F. JR. Garino <sup>1</sup>, L.C.A Silva,<sup>1</sup> K.N. Araújo<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Unidade Acadêmica de Medicina Veterinária (UAMV), Centro de Saúde e Tecnologia Rural (CSTR), Universidade Federal de Campina Grande (UFCG), Av. Universitária s/n, Bairro Santa Cecília, Patos, PB, 58700-970, Brasil. E-mail: danipessoavet14@gmail.com.

## RESUMO

Os compostos halogenados tóxicos constituem uma infinidade de poluentes ambientais, devido ao seu uso como herbicidas, inseticidas, fungicidas, pesticidas e como solventes na indústria química. São produzidos naturalmente, como o monofluoroacetato de sódio, encontrado como princípio tóxico de plantas em algumas regiões do mundo. O uso indiscriminado desses compostos tem causado grandes prejuízos, no que diz respeito à contaminação de solos, rios e plantações. Uma alternativa para a biorremediação de ambientes contaminados e até para proteger animais envenenados por esses compostos, é o uso de bactérias produtoras de enzimas, chamadas de dehalogenases, capazes de degradar esses compostos, resultando na descontaminação desses ambientes. O presente trabalho tem como objetivo relatar as principais bactérias capazes de produzir dehalogenases, dando ênfase a fluoroacetato dehalogenase e a L-2-haloácido dehalogenase, capazes de degradar o MFA e a importância do seu uso na descontaminação de ambientes.

**PALAVRAS CHAVE:** biorremediação, fluoroacetato dehalogenase, L-2-haloácido dehalogenase, compostos halogenados.

## ABSTRACT

**IMPORTANCE OF BACTERIA IN PRODUCING DEHALOGENASES  
BIOREMEDIATION OF TOXIC COMPOUNDS HALOGEN.** The toxic halogenated compounds are a myriad of environmental pollutants because of their use as herbicides,

insecticides, fungicides, pesticides and as solvents in chemical industry. Are produced naturally as monofluoroacetate sodium, found as toxic principles of plants in some regions of the world. The indiscriminate use of these compounds has caused great losses, with regard to contamination of soils, rivers and crops. An alternative for bioremediation of contaminated environments and even to protect animals poisoned by these compounds is the use of enzyme-producing bacteria, called dehalogenases capable of degrading these compounds, resulting in the decontamination of these environments. This paper aims to report the major bacteria capable of producing dehalogenases, emphasizing and fluoroacetate dehalogenase L-2-haloácido dehalogenase capable of degrading the MFA and the importance of its use in the decontamination of environments.

**KEYWORDS:** bioremediation, fluoroacetate dehalogenase, L-2-haloácido dehalogenase, halogenated compounds.

Os compostos halogenados, também conhecidos por haletos orgânicos ou hidrocarbonetos halogenados, são derivados dos hidrocarbonetos pela substituição de um ou mais hidrogênios por átomos de halogênios (Flúor, Cloro, Bromo e Iodo). Podendo ser classificados de acordo com o halogênio que está na cadeia carbônica como fluoretos, cloretos, brometos, iodetos ou mistos (HILL *et al.*, 1999).

Constituem um dos maiores grupos de poluentes ambientais, sendo resultado da sua utilização generalizada como herbicidas, inseticidas, fungicidas, solventes, fluidos de transferência de calor e hidráulicos, plastificantes e intermediários para sínteses químicas. Também ocorrem na natureza sendo produzidos por processos naturais: queimada, erupção vulcânica, macro algas no ambiente marinho, ou ainda por plantas tóxicas (FETZNER; LINGERS, 1994). Alguns exemplos desses compostos são monofluoroacetato de sódio, bromodiclorometano, ácido monocloroacético, dicloroacetoneitrila e 1,2 dicloroetano, este último é utilizado como solvente, sendo considerado cancerígeno para os seres humanos (PASCHOALATO *et al.*, 2008). Mais de 1500 compostos orgânicos halogenados são produzidos naturalmente, o que explicaria a capacidade dos microrganismos de degradar compostos halogenados tóxicos (ODBERG, 2002).

Muitos desses compostos são utilizados de forma indiscriminada, o que gera uma grande preocupação devido à contaminação principalmente de solos, águas e plantações, devido à capacidade dos mesmos de permanecer inalterados e inativos por muito tempo nesses ambientes. As alternativas para eliminação desses compostos tóxicos dos ambientes contaminados estão fundamentadas na capacidade de biodegradação por microrganismos (principalmente bactérias), sendo baseadas em técnicas denominadas de biorremediação, que consistem na mineralização dos contaminantes, produzindo gás carbônico ou outro gás, substância inorgânica e água (EWEIS *et al.*, 2002).

O uso e o estímulo do crescimento de bactérias produtoras de enzimas dehalogenases em áreas contaminadas por compostos halogenados é uma das alternativas mais práticas da biorremediação, devido ao menor impacto ambiental causado e a facilidade de adaptação dessas bactérias (SILVA *et al.*, 2004).

A detoxificação dos compostos halogenados, como por exemplo, o monofluoroacetato de sódio (FCH<sub>2</sub>COONa), também chamado de fluoroacetato de sódio, é de extrema importância, dado que o mesmo é considerado um dos compostos mais nocivos para os mamíferos (MURPHY *et al.*, 2003). Pode ser encontrado como princípio tóxico de plantas na Austrália, África e América do sul, causando morte súbita em várias espécies de animais, ocasionando perdas econômicas significativas, principalmente na pecuária (LEE *et al.* 2014). Na Austrália e na Nova Zelândia, é utilizado em larga escala como pesticida para vertebrados (coelhos, raposas, gambás, dingos) desencadeando grandes impactos na produção agrícola (TWIGG; KING, 2000).

Existem enzimas capazes de degradar esse composto, são denominadas de dehalogenases e se caracterizam por catalisar a clivagem da ligação carbono-halogênio. São utilizadas como biocatalisadoras industriais a fim de se permitir a síntese de produtos químicos. Devido a essas características são importantes na desintoxicação e biodegradação de compostos halogenados (DE JONG; DIJKSTRA, 2003).

A maioria delas são produzidas por bactérias ambientais como *Pseudomonas* sp., *Moraxella* sp., *Burkholderia* sp., *Xanthobacter autotrophicus*, *Sphingobium* sp. e *Sphingomonas* sp. (GOLDMAN, 1965; LIU *et al.*, 1998; KURIHARA *et al.*, 2003; FRANKEN *et al.*, 1991; MASAI *et al.*, 2007; NAGATA *et al.*, 1997). Pesquisas científicas com objetivo de identificar genes que codificam dehalogenases produzidas por bactérias, ou até modificar geneticamente bactérias para produzir essas enzimas, com intuito de induzir a detoxificação de compostos tóxicos são de extrema importância

para a compreensão do mecanismo de ação dessas enzimas e sua utilização na biorremediação. Esta revisão tem como objetivo relatar as principais bactérias produtoras de dehalogenases e sua utilização em processos de detoxificação de compostos tóxicos.

### **Dehalogenases importantes na degradação de compostos tóxicos ácidos**

O estudo da bioquímica e genética de dehalogenases microbianas pode ajudar a compreender e avaliar o potencial de degradação de compostos halogenados por microrganismos em ambientes naturais, fornecendo soluções biotecnológicas para a resolução de problemas ambientais (FETZNER; LINGERS, 1994).

No monofluoroacetato de sódio, a ligação carbono-flúor é estável, sendo considerada uma ligação forte e com alta energia iônica, com isso, as dehalogenases são capazes de clivar essa ligação por meio de vários mecanismos distintos de desalogenação, outro motivo para o uso das mesmas é o fato delas não necessitarem de cofator e algumas usarem água como co-substrato (HOLMQUIST, 2000).

As dehalogenases são classificadas de acordo com o composto halogenado que degradam, sendo divididas nos seguintes grupos: haloaromáticas dehalogenases, halohidrinas dehalogenases, haloácidos dehalogenases e haloalcano dehalogenases. Nesta revisão daremos ênfase apenas a dois tipos delas, a fluoroacetato dehalogenase e a dehalogenase L-2-haloácido, elas são classificadas como haloácido dehalogenases, e podem participar da degradação de compostos tóxicos ácidos, como o ácido monofluoroacético (fluoroacetato) (CHAN *et al.*, 2010).

#### **Fluoroacetato dehalogenase**

A fluoroacetato dehalogenase, faz parte do grupo das halidohidrolases haloacetato dehalogenases, atuando sobre a catálise da desalogenação de fluoroacetato e de outros haloacetatos. É o exemplo mais comum de uma enzima que catalisa a clivagem hidrolítica do carbono e do flúor, produzindo um íon flúor e glicolato. Bactérias ruminais geneticamente modificadas para produzi-la têm sido aplicadas para prevenir o envenenamento de animais domésticos causado pela ingestão de plantas que contém concentrações elevadas deste ácido (KURIHARA, 2011).

O mecanismo de ação de fluoroacetato dehalogenase, obtida a partir de uma cepa de *Moraxella* sp, sobre o monofluoroacetato, foi estudado por KURIHARA; ESAKI (2008), no Japão, por meio de análises estequiométricas, eles observaram que a partir do grupo carboxilato Asp105 da enzima, acontecia a formação de um éster intermediário, o qual era hidrolisado pelo ataque nucleofílico de uma molécula de água no carbono do ácido, promovendo assim o deslocamento do flúor, com consequente desalogenação. Os autores verificaram que esse mecanismo produzia um éster intermediário pela fluoroacetato dehalogenase, sendo semelhante ao mecanismo da dehalogenase L-2-haloácido, mesmo as duas não apresentando nenhuma semelhança entre as suas sequências de aminoácidos, o que pode favorecer a adaptação dessa enzima para degradação de novos compostos halogenados, como por exemplo, o fluoroacetato, sugerindo seu uso em processos de detoxificação do mesmo.

KAMACHI *et al.* (2009), no Japão, estudaram a ação da fluoroacetato dehalogenase baseando-se em cálculos quânticos e moleculares, constatando que a clivagem da ligação forte entre o carbono e o flúor do fluoroacetato é facilitada pelas interações entre as pontes de hidrogênio e o átomo de flúor, liberando três resíduos de aminoácidos His149, Trp150 e Tir212. Eles relataram também que o ataque nucleofílico a molécula de água é um passo determinante para a velocidade da reação da enzima.

Os resultados dos estudos de NAKAYAMA *et al.* (2012) também no Japão, reforçam esse mecanismo de atuação da enzima fluoroacetato dehalogenase, visto que os autores relatam que a quebra da ligação entre o C e o F inicia-se com a alteração na conformação do substrato, no caso o fluoroacetato, conseqüentemente ocorre liberação de resíduos de aminoácidos, os quais contribuem para a alta especificidade da enzima em relação ao substrato.

Na literatura existem relatos de bactérias que possuem genes codificadores para produção de fluoroacetato dehalogenase, a maioria delas dos gêneros *Burkholderia* spp., *Moraxella* spp. e da espécie *Pseudomonas fluorescens*, estas encontradas em vários tipos de solos (GOLDMAN, 1965; KAWASAKI *et al.*, 1981; KURIHARA *et al.*, 2003; DONNELLY; MURPHY, 2009).

O estudo da genética e codificação dos genes para produção da fluoroacetato dehalogenase é de extrema importância, visto que experimentos modificam geneticamente bactérias para produção da mesma (KAWASAKI *et al.*, 1984; FETZNER; LINGERS, 1994; GREGG *et al.*, 1998).

## L-2-haloácido dehalogenase

Faz parte da superfamília haloácido dehalogenase, que inclui também as ATPases e as hidrolases. Ela é responsável pela desalogenação hidrolítica dos ácidos carboxílicos halogenados, como o 2-cloroacetato. A L-2-haloácido dehalogenase obtida a partir de *Pseudomonas* sp. representa a dehalogenase melhor estudada de toda essa superfamília. Em relação ao seu mecanismo de ação sabe-se que o Asp 10 presente nessa enzima, apresenta papel essencial na catálise, já que é a proteína que se mantém conservada durante a desalogenação (DE JONG; DIJKSTRA, 2003; NAKAMURA *et al.*, 2009).

No estudo de LIU *et al.* (1994), no Japão, foi realizada a purificação e caracterização de duas L-2-haloácido dehalogenase, a partir de *Pseudomonas* sp., relatando que essas enzimas não atuam somente sobre ácidos com carbonos de cadeia curta como o monocloroacetato, mas também atua sobre ácidos de cadeia longa como 2-bromohexanoato.

CHAN *et al.* (2010), no Canadá, através de estudos baseados em genomas de bactérias presentes em solos: *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas putida*, *Rhodopseudomonas palustris*, *Streptomyces avermitilis* e *Sinorhizobium meliloti*, identificaram quatro novas L-2-haloácido dehalogenases capazes de hidrolisar o fluoroacetato, ou seja, função semelhante à dehalogenase fluoroacetato, mostrando a capacidade de degradação inespecífica por parte da L-2-haloácido dehalogenases, fato que possibilita mais ainda seu uso em processos de detoxificação de ambientes contaminados por compostos halogenados em geral.

As bactérias participam de forma importante na degradação de compostos halogenados, uma vez que elas são capazes de produzir as dehalogenases, principais responsáveis por esse processo. Essa capacidade de degradação pode ser explicada pela transferência genética entres esses microrganismos, e estudos apontam que os genes que codificam as enzimas degradadoras estão presentes nos plasmídeos bacterianos, o que facilita a transmissão horizontal desses genes para outras espécies. A adaptação de uma dehalogenase precursora a determinado ambiente com altas concentrações de compostos halogenados parece estar relacionada com a presença de genes que determinam o mecanismo de desalogenação (SKLADANY; METTING JÚNIOR, 1992; POELARENDS *et al.*, 2000), demonstrando a importância do uso da biotecnologia

desses microrganismos como auxílio na busca de alternativas para detoxificação de ambientes poluídos por compostos tóxicos.

### **Bactérias produtoras de dehalogenases**

*Pseudomonas* spp.

São bactérias aeróbias, gram-negativas, que se apresentam sob a forma de bastonetes e não formam esporos. Estão presentes em vários ambientes, no solo, na água e em plantas. São positivas nas provas de catalase e oxidase, e no ágar macconkey crescem de maneira satisfatória. Também são consideradas oportunistas, podendo causar graves infecções tanto em humanos como em animais com imunidade reduzida (KISKA; GILLIGAN, 1999).

As primeiras dehalogenases estudadas foram a partir desse gênero de bactérias. GOLDMAN (1965), nos Estados Unidos, isolou *Pseudomonas* sp. do solo e constatou que ela era capaz de utilizar fluoroacetato como única fonte de carbono, devido a produção de dehalogenases, a reação ocorrida era a desfluoração do fluoroacetato, resultando no íon flúor e em glicolato.

KAWASAKI *et al.*, 1981, no Japão, purificaram, cristalizaram e determinaram as propriedades da H-1 halidohidrolase obtida a partir de espécies de *Pseudomonas*, sendo relatada como a primeira vez que essa estirpe foi cristalizada.

YANG *et al.* (1994), nos Estados Unidos, evidenciaram que a (4-clorobenzoil) coenzima A dehalogenase produzida a partir de *Pseudomonas* sp. cepa CBS3 era responsável pela catálise da desalogenação hidrolítica do carbono saturado de compostos halogenados resultando na produção de (4-hidroxibenzoil) coenzima A, semelhante ao mecanismo das enzimas hidrolase e 2-haloalcano dehalogenase.

No estudo de NARDI-DEI *et al.* (1999), no Japão, foi observado que a D-L-2-haloácido dehalogenase, produzida a partir de *Pseudomonas* sp. era capaz de realizar a desalogenação hidrolítica de ácidos haloalcanóicos sem que houvesse a produção de um éster intermediário, diferentemente dos outros tipos de dehalogenases haloácido.

DONNELLY; MURPHY (2009), na Irlanda, purificaram e relataram as propriedades de uma fluoroacetato dehalogenase produzida a partir de *Pseudomonas fluorescens* isolada de solo, concluindo que a enzima era específica para o fluoroacetato

e que íons  $Mg^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$  e  $Fe^{3+}$  estimulavam sua atividade, e íons  $Hg^{2+}$  e  $Ag^{2+}$  inibiam sua atividade.

### *Burkholderia* spp.

As bactérias pertencentes a esse gênero são bacilos, gram-negativos, aeróbios, móveis e são positivas nas provas de oxidase e catalase. São microrganismos saprófitos, participam de maneira importante na degradação da matéria orgânica e estão distribuídas mundialmente (WHITLOCK; TORRES, 2007).

Algumas espécies de *Burkholderia* são utilizadas na agricultura, com objetivo de garantir a biodegradação, como controle biológico e para o crescimento de rizobactérias. Sua utilização nesses processos se dá devido à produção de dehalogenases que degradam substâncias tóxicas (herbicidas e inseticidas). A *Burkholderia cepacia* tem se tornado importante na agricultura, por causa da sua capacidade de facilitar o crescimento de plantas, se tornando uma alternativa sustentável se comparada com o uso de fertilizantes químicos (TABACCHIONI *et al.*, 2002).

KURIHARA *et al.* (2003), no Japão, purificaram e caracterizaram uma nova fluoroacetato dehalogenase (FAC-DEX FA1) obtida a partir de *Burkholderia* sp., isolada de solo, com fluoroacetato como única fonte de carbono, concluindo que a enzima era específica para haloacetatos, sendo o fluoroacetato o seu melhor substrato.

ZANG *et al.* (2004), na China, construíram estrutura 3D detalhada da fluoroacetato dehalogenase (FAC-DEX FA1) produzida por *Burkholderia* sp. com auxílio de homologias e simulações, com isso, eles perceberam que Asp 104 e outros cinco resíduos (Fen34, Tri148, Tir147, Tir212 e His271) estavam presentes no sítio ativo da enzima, sendo o Asp104 o resíduo nucleofílico fundamental na ligação com o substrato.

JITSUMORI *et al.* (2009), no Japão, determinaram experimentalmente a primeira estrutura tridimensional por cristalografia de raio-X de fluoroacetato dehalogenase a partir de *Burkholderia* sp., concluindo que a interação entre o Tri 150, presente no sítio ativo da enzima, e o átomo de flúor é de extrema importância na redução da energia de ativação para que aconteça a clivagem da ligação C-F no fluoroacetato. Também constataram que o Asp 104 funciona como nucleófilo catalítico para a desalogenação do mesmo.

*Moraxella* spp.

Espécies do gênero *Moraxella* são coco bacilos Gram-negativos pertencentes à família *Moraxellaceae* (ou  $\gamma$  proteobacteria). Apresentam tamanho 0,7-1,3  $\mu\text{m}$  de diâmetro, são imóveis, aeróbios, oxidase e catalase positivo, não acidificam açúcares e são sensíveis à penicilina. Podem ser encontrados como microrganismos comensais das superfícies mucosas, ocasionalmente causando doença e também são isolados de solos e águas naturais (HARDIE, 1986).

LIU *et al.* (1998), no Japão, estudaram o mecanismo de ação de fluoroacetato dehalogenase (CE 3.8.1.3) produzida a partir de *Moraxella* sp., e observaram que esta enzima podia catalisar a clivagem do fluoroacetato por meio de dois mecanismos, o primeiro acontecia por atuação do Asp 105, que agia como nucleófilo, com objetivo de atacar o carbono do substrato, o que levava a formação de um éster intermediário, que era hidrolisado por uma molécula de água gerando a enzima livre e o 2 hidroxí-ácido, o segundo mecanismo seria a substituição nucleofílica de um 2-haloácido ocasionada por uma molécula de água, que é ativada por uma base de enzima.

*Sphingobium* spp. e *Sphingomonas* spp.

As bactérias do gênero *Sphingomonas* (anteriormente classificadas como *Pseudomonas*) são gram-negativas, presentes em vários ambientes (terrestre, aquático, raízes de plantas, entre outros), aeróbicas e apresentam metabolismo versátil, uma vez que podem utilizar como fonte de energia vários compostos de ocorrência natural e também alguns contaminantes ambientais. Por isso são empregadas em biotecnologia e tecnologia de alimentos. Algumas espécies como a *Sphingomonas paucimobilis* foram isoladas de solos contaminados por compostos tóxicos (NISHIYAMA *et al.*, 1992; BALKWILL *et al.*, 1999).

A 1,3,4,6-tetracloro-1,4-ciclohexadieno halidohidrolase, produzida a partir de *Sphingomonas paucimobilis*, foi purificada e caracterizada como haloalcano dehalogenase, capaz de degradar o  $\gamma$ -Hexaclorociclohexano, inseticida orgânico halogenado utilizado em todo o mundo, mas devido a sua toxicidade e sua longa persistência, tem sido proibido em vários países e muitos deles ainda tem regiões contaminadas (NAGATA *et al.*, 1997).

As bactérias do gênero *Sphingobium* pertencem à mesma família das *Sphingomonas*, mas se diferem em relação à composição lipídica desta. Também são gram-negativas, geralmente isoladas de solos e igualmente apresentam a capacidade de degradar compostos tóxicos, mas somente existe uma estirpe desse gênero, o *Sphingobium* sp. cepa SYK-6, que é capaz de degradar lignina, substância aromática mais abundante na natureza, o que torna a utilização eficaz da lignina para obtenção de produtos químicos industrializados (MASAI *et al.*, 2007; MASAI *et al.*, 2012).

O *Sphingobium indicum* B90A é capaz de degradar o composto organoclorado Hexaclorociclohexano (HCH), inseticida de largo espectro, usado para controle de pragas na agricultura. Essa capacidade de degradação deve-se a produção da haloalcano dehalogenase, enzima capaz de promover a desalogenação do hexaclorociclohexano e dos seus intermediários pentaclorociclohexanol e tetraclorociclohexanodiol (SHARMA *et al.*, 2006).

#### *Mycobacterium* spp.

As bactérias desse gênero são chamadas de micobactérias e fazem parte da família *Mycobacteriaceae*. O nome *Mycobacterium* foi proposto por Leahmann e Neumann em 1896, devido à formação de uma película por parte do *Mycobacterium tuberculosis* em superfícies de meios líquidos. São bacilos imóveis, apresentam metabolismo aeróbio ou microaerófilo, e sua principal característica é a resistência a descoloração quando tratados com álcool-ácido. Podem ser classificadas de acordo com o grau de patogenicidade, sendo as estritamente patogênicas: *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium leprae* e *Mycobacterium africanum* (GRANGE, 1990).

JESENSKÁ *et al.* (2005), no Japão, realizaram a clonagem e determinação das propriedades químicas de genes produtores de haloalcano dehalogenase (*dmbA* e *dmbB*), a partir de micobactérias do complexo *Mycobacterium tuberculosis* (*M. bovis*, *M. bovis BCG*, *M. africanum*, *M. caprae*, *M. microti* e *M. pinnipedii*), trazendo grande contribuição para os estudos da catálise enzimática das haloalcano dehalogenases.

#### *Rhodococcus* spp.

O gênero *Rhodococcus*, é composto por 27 espécies, classificadas de acordo com a diversidade de metabolismo, aplicação industrial ou potencial em biorremediação

(PRESCOTT, 2004). Estas fazem parte da ordem dos Actinomicetos, que são bactérias gram-positivas, móveis, com metabolismo aeróbio e estão presentes em uma grande variedade de ambientes como solos, águas e até no interior de células eucarióticas. Sendo este gênero o mais importante da ordem no que diz respeito à produção industrial, uma vez que podem ser utilizados para produção de esteróides bioativos, biodesulfurização de combustível fóssil, para produção de acrilamida e ácido acrílico, e como biocatalisador microbiano. O estilo de vida dessas bactérias e sua presença no solo são fatores que contribuem para a degradação de uma vasta quantidade de compostos orgânicos, muito possivelmente por meio das suas atividades enzimáticas (BANERJEE *et al.*, 2002; VAN DER GEIZE; DIJKHUIZEN, 2004).

O *Rhodococcus* sp. RHA1 foi isolado de solo contaminado por lindano (pesticida usado na agricultura; isômero do hexaclorociclohexano), no Japão, e apresenta grande capacidade de degradar compostos bifenilos policlorados (PCB's), possivelmente pela ação da enzima dehalogenase bifenilo dioxigenase (SETO *et al.*, 1995). Estudos da sua sequência de DNA demonstraram que o mesmo era semelhante ao *Rhodococcus opacus*, capaz de utilizar uma grande variedade de compostos aromáticos, hidratos de carbono, nitrilos, esteróides e outros compostos como única fonte de carbono e energia (GURTLER *et al.*, 2006).

POELARENDS *et al.* (2000) no Reino Unido, compararam a sequência de DNA de bactérias gram-positivas, isoladas de solos contaminados na Europa, Japão e Estados Unidos, produtoras de haloalcano dehalogenase e constataram que estas eram semelhantes a bactérias do gênero *Rhodococcus*, sugerindo que pode ter ocorrido a transferência de genes entre essas bactérias por meio da utilização generalizada de haloalcanos sintéticos na indústria e na agricultura.

#### *Pigmentiphaga kullae* e *Ancylobacter dichloromethanicus*

*Pigmentiphaga kullae* pertence à família *Alcaligenaceae*. É classificada como bactéria gram-negativa, com metabolismo anaeróbico facultativo, não formadora de esporos e apresenta motilidade. Expressa grande capacidade de adaptação à utilização de compostos tóxicos como fonte de energia, podendo ser encontrada comumente em solos contaminados pelos mesmos (BLÜMEL *et al.*, 2001).

*Ancylobacter dichloromethanicus* pertence a classe Alphaproteobacteria, é considerada bactéria gram-negativa, não formadora de esporos, imóvel, com

metabolismo anaeróbio facultativo e pode utilizar diclorometano, metanol, formiato e policarbonato de formaldeído como fontes de energia (RAJ; MALOY, 1990; FIRSOVA *et al.*, 2009).

FIRSOVA *et al.* (2009), na França, sugeriram essa nova espécie de *Ancylobacter* (*Ancylobacter dichloromethanicus*) e citaram que existe a participação da diclorometano dehalogenase, dependente de glutatona, na catálise da desalogenação primária do composto diclorometano ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ).

CAMBOIM *et al.* (2012), no Brasil, isolaram as bactérias *Pigmentiphaga kullae* e *Ancylobacter dichloromethanicus* do rúmen de caprinos e constataram que elas eram capazes de degradar o MFA, provavelmente por meio da produção de enzimas dehalogenases específicas ou inespecíficas como a fluoroacetato dehalogenase ou a L-2-haloácido dehalogenase, respectivamente. Indicando o uso dessas bactérias produtoras de dehalogenases em processos de detoxificação ruminal do MFA presente em plantas, comumente responsável por reproduzir intoxicação em ruminantes.

### **Aplicações de bactérias produtoras de dehalogenases como alternativas de detoxificação**

O uso de enzimas na indústria é favorável, dado que são específicas para determinadas ações e não apresentam toxicidade. Atualmente, é possível modificar geneticamente os microrganismos para que forneçam qualquer enzima, se tornando tendência substituir as produzidas por vegetais e animais pelas de origem microbiana. Muitas dessas enzimas são chamadas de dehalogenases, e são aplicadas em tecnologia ambiental e na indústria química, por meio da degradação de compostos halogenados tóxicos (MUSSATO, 2007).

As dehalogenases mais comumente utilizadas na indústria são as hidrolases, liases e isomerases, estas participam de processos biocatalíticos, utilizando cofatores solúveis ou não alterando o estado de oxidação durante a catálise, por isso apresentam aplicabilidade comercial, como por exemplo, na produção de ácido L-aspártico a partir da adição de amoníaco ao ácido fumárico. As liases de halogênios são amplamente utilizadas na indústria farmacêutica e agroquímica (SWANSON, 1999).

Essas dehalogenases apresentam capacidade de degradação, por isso são utilizadas indiretamente nas bactérias modificadas, que conseqüentemente podem

participar da descontaminação de ambientes poluídos, como solos e águas subterrâneas contaminadas por compostos tóxicos (FETZNER; LINGERS, 1994).

No experimento realizado por SHORT *et al.* (1991), nos Estados Unidos, bactérias geneticamente modificadas para produzir dehalogenases foram capazes de degradar o composto tóxico 2,4- diclorofenoxiacetato (2,4- D) inoculado em solos áridos, podendo constatar que a utilização dessa alternativa de biorremediação não pode ser aplicada a todos os tipos de solo, uma vez que as propriedades biológicas e químicas do solo avaliado podem sofrer alterações com a presença do microrganismo.

Ácido 3-cloroacrílico dehalogenase obtida a partir de *Pseudomonas pavonaceae*, pode ser utilizada para degradar o 1,3-dicloropropeno, composto tóxico utilizado na agricultura como nematicida. Inicialmente ocorre a conversão do 1,3-dicloropropeno em 3-cloroacrilato, por meio de uma haloalcano dehalogenase, esse produto é degradado pela ácido 3-cloroacrílico dehalogenase em semialdeído malonato, um íon cloreto e um próton, mostrando a importância da possível aplicação dessa bactéria como alternativa na detoxificação desse composto tóxico em áreas agrícolas contaminadas (DE JONG; DIJKSTRA, 2003).

### **Uso de bactérias produtoras dehalogenases em medicina veterinária**

Em medicina veterinária, pesquisas vêm utilizando bactérias produtoras de dehalogenases, modificadas geneticamente ou não, com objetivo de proteger os animais do envenenamento por monofluoroacetato de sódio, bem como utilizar essas bactérias para outras biotecnologias, relacionadas com a degradação de compostos tóxicos (GREGG *et al.*, 1994; GREGG *et al.*, 1998; MAYER; VAN ROOYEN, 1996).

Nos ruminantes, pode ocorrer a detoxificação ruminal de compostos tóxicos por meio de bactérias ruminais capazes de produzir dehalogenases, ou microrganismos podem ser modificados geneticamente para produzir essas enzimas, ou ainda bactérias ruminais de ruminantes resistentes podem ser transferidas para ruminantes não resistentes, garantindo assim a resistência a compostos halogenados tóxicos (GREGG; SHARPE, 1991).

CRAIG; BLYTHE (1994), na Inglaterra, estudaram a utilização de bactérias ruminais para a detoxificação de trinitrotolueno (TNT), nitrocomposto utilizado como explosivo, e observaram que era possível reduzi-lo, por meio de bactérias ruminais produtoras de uma desaminase redutiva, em ácidos graxos de cadeia curta. Esse

processo de biorremediação é uma nova alternativa para o uso de bactérias ruminais para detoxificar poluentes ambientais.

No estudo de GREGG *et al.* (1998), na Austrália, foram inoculadas no rúmen de ovinos, por meio de fistulação ruminal, quatro estirpes de *Butyvirbio fibrisolvens* modificadas geneticamente com gene que codifica a produção da enzima fluoroacetato dehalogenase, obtida a partir de uma espécie de *Moraxella*, com o objetivo de avaliar se as bactérias protegeriam os ruminantes da intoxicação por monofluoroacetato de sódio, constatando que ocorreu a redução dos sinais clínicos da intoxicação nos ovinos inoculados, confirmando a proteção conferida pelas bactérias.

As bactérias que apresentam capacidade de produzir dehalogenases podem ser utilizadas como alternativas para processos de detoxificação de compostos tóxicos contaminantes em solos, águas e até mesmo em animais que são intoxicados com esses compostos. O uso dessas bactérias na biotecnologia da biorremediação de compostos tóxicos é de extrema importância, uma vez que elas apresentam capacidade de adaptação para degradação e são portadoras de genes que codificam enzimas, podendo ser potencialmente usados na transferência genética para outros microrganismos.

## REFERÊNCIAS

BALKWILL, D. L.; FREDRICKSON, J. K.; ROMINE M. F. *Sphingomonas* and Related Genera. In: DWORKIN, *et al.* (eds.) *The Prokaryotes: An Evolving Electronic Resource for the Microbiological Community*, 3. ed., New York: Springer-Verlag, 1999.

BANERJEE, A.; SHARMA, R.; BANERJEE, UC. The nitrile-degrading enzymes: current status and future prospects. *Applied Microbiology Biotechnology*, v. 60, n.5, p.33–44, 2002.

BLÜMEL, S.; MARK, B.; BUSSE, H. J.; KÄMPFER, P.; STOLZ, A. *Pigmentiphaga kullae* gen. nov., sp. nov., a novel member of the family Alcaligenaceae with the ability to decolorize azo dyes aerobically. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v. 51, n.5, p. 1867–1871, 2001.

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. Isolation and identification of sodium fluoroacetate degrading bacteria from caprine rumen in Brazil. *The Scientific World Journal* 2012:178254.

CHAN, W.Y.; WONG, M.; GUTHRIE, J.; SAVCHENKO, A.V.; YAKUNIN, A.F.; PAI, E.F.; EDWARDS, E.A. Sequence- and activity-based screening of microbial genomes for novel dehalogenases. *Microbial Biotechnology*, v. 3, n. 1, p.107–120, 2010.

CRAIG A.M.; BLYTHE L.L. Review of ruminal microbes relative to detoxification of plant toxins and environmental pollutants. In: COLEGATE S.M. & DORLING P.R. Plant associated toxins. Wallingford: CAB International, p.462-467. 1994

DE JONG, R.M.; DIJKSTRA, B.W. Structure and mechanism of bacterial dehalogenases: different ways to cleave a carbon-halogen bond. *Current Opinion in Structural Biology*, v. 13, n. 6, p. 722–730, 2003.

DONNELLY, C.; MURPHY, C. D. Purification and properties of fluoroacetate dehalogenase from *Pseudomonas fluorescens* DSM 8341. *Biotechnology Letters*, v. 31, n. 2, p. 245, 2009.

EWEIS, J. B.; ERGAS, S. J.; CHANG, P. Y.; SCHROEDER, E. D. *Bioremediation principles*. Boston: McGraw-Hill, 1998.

FETZNER, S.; LINGER, F. Bacterial Dehalogenases: Biochemistry, Genetics, and Biotechnological Applications. *American Society for Microbiology*. v. 58, n. 4, p. 641-685, 1994.

FIRSOVA, J.; DORONINA, N.; LANG, E.; SPRÖER, C.; VUILLEUMIER, S.; TROTSSENKO, Y. *Ancylobacter dichloromethanicus* sp. nov.- a new aerobic facultatively methylotrophic bacterium utilizing dichloromethane. *Systematic and Applied Microbiology*, v. 32, n.4, p. 227–232, 2009.

FRANKEN, S.M.; ROZEBOOM H.J.; KALK K.H.; DIJKSTRA B.W. Crystal structure of haloalkane dehalogenase - an enzyme to detoxify halogenated alkanes. *The EMBO Journal*, v.10, n. 6, p. 1297-1302, 1991.

GOLDMAN, P. The enzymatic cleavage of the carbon-fluorine bond in fluoroacetate. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 240, n. 8, p. 3434–3438, 1965.

GRANGE, J.M. The Mycobacteria. In: TOPLEY and WILSON. *Principles of Bacteriology, Virology and Immunity*. London, p.74101. 1990.

GREGG, K.; SHARPE, H. Enhancement of Rumen Microbial Detoxification by gene transfer. In: TSUDA, T.; SASAKI, Y.; KAWASHIMA, R. *Physiological aspects of digestion and metabolism in ruminants*. Australia: Academic Press, Inc., p. 719-735, 1991.

GREGG, K.; COOPER, C.L.; SCHAFER, D.J.; SHARPE, H.; BEARD, C.E.; ALLEN, G.; XU, J. Detoxification of the plant toxin fluoroacetate by a genetically modified rumen bacterium. *Nature*, v. 12, n.13, p. 1361-1365, 1994.

GREGG, K.; HAMDORF, B.; HENDERSON, K.; KOPENCY, J.; WONG, C. Genetically modified ruminal bacteria protect sheep from fluoracetate poisoning. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 64, n.9, p. 3496-3498, 1998.

GURTLER, V.; MALL, BC; SEVIOUR, R. Can whole genome analysis refine the taxonomy of the genus *Rhodococcus*? *FEMS Microbiology Reviews*, v. 28, n.3, p.377–403, 2004.

HARDIE, J.M. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Williams and Wilkins, Baltimore, 1986. 722p.

HILL, J. W.; BAUM, S. J.; FEIGEL, D. M. *Chemistry and Life: An Introduction to General, Organic, and Biological Chemistry*. Prentice Hall, 6 ed., 1999. 839p.

HOLMQUIST, M. Alpha/beta-hydrolase fold enzymes: structures, functions and mechanisms. *Current Protein and Peptide Science*, v.1, n. 2, p. 209–235, 2000.

JESENSKÁ, A.; PAVLOVÁ, M.; STROUHAL, M.; CHALOUPKOVÁ, R.; TĚŠÍNSKÁ, I.; MONINCOVÁ, M.; PROKOP, Z.; BARTOŠ, M.; PAVLÍK, I.; RYCHLÍK, I.; MÖBIUS, P.; NAGATA, Y.; DAMBORSKÝ, J. Cloning, biochemical properties, and distribution of mycobacterial haloalkane dehalogenases. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 71, n. 11, p. 6736–6745, 2005.

JITSUMORI, K.; OMI, R.; KURIHARA, T.; KURATA, A.; MIHARA, H.; MIYAHARA, I.; HIROTSU, K.; ESAKI, N. X-Ray Crystallographic and Mutational Studies of Fluoroacetate Dehalogenase from *Burkholderia* sp. Strain FA1. *Journal of Bacteriology*, v. 191, n.8, p. 2630–2637, 2009.

KAMACHI, T.; NAKAYAMA, T.; SHITAMICHI, O.; JITSUMORI, K.; KURIHARA, T., ESAKI, N.; YOSHIZAWA, K. The catalytic mechanism of fluoroacetate dehalogenase: a computational exploration of biological dehalogenation. *Chemistry: A Europe Journal*, v. 15, n. 30, p. 7394 – 7403, 2009.

KAWASAKI, H.; MIYOSHI, K.; TONOMURA, K. Purification, crystallization and properties of haloacetate halidohydrolase from *Pseudomonas* species. *Agriculture and Biological Chemistry*, v. 45, n. 2, p. 543-544, 1981.

KAWASAKI, H.; YAHARA, H.; TONOMURA, K. Cloning and expression in *Escherichia coli* of the haloacetate dehalogenase genes from *Moraxella* plasmid PU01. *Agriculture and Biological Chemistry*, v. 48, n. 11, p. 2627-2632, 1984.

KISKA D.L.; GILLIGAN PH. *Pseudomonas* and *Burkholderia*. In: MURRAY, P.R.; BARON, E.J.; PFALLER, M.A.; TENOVER, F.C.; YOLKEN, R.H. (Editors), *Manual of Clinical Microbiology*. 7. ed. Washington: American Society for Microbiology, v. 2, 1999.

KURIHARA, T.; YAMAUCHI, T.; ICHIYAMA, S.; TAKAHATA, H.; ESAKI, N. Purification, characterization, and gene cloning of a novel fluoroacetate dehalogenase from *Burkholderia* sp. FA1. *Journal of Molecular Catalysis B*, v. 23, n. 3, p. 347-355, 2003.

KURIHARA, T.; ESAKI, N. Bacterial hydrolytic dehalogenases and related enzymes: occurrences, reaction mechanisms, and applications. *The Chemical Record*, v. 8, n. 2, p. 67–74, 2008.

KURIHARA, T. A. Mechanistic analysis of enzymatic degradation of organohalogen compounds. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, v. 75, n. 2, p 189–198, 2011.

LEE, S.T.; COOK, D.; PFISTER, J.A.; ALLEN, J. G.; COLEGATE, S.M.; RIET-CORREA, F.; TAYLOR, C. M. Monofluoroacetate-containing plants that are potentially toxic to livestock. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. v. 62, n. 30, p 7345-3354, 2014.

LIU, JQ; KURIHARA, T.; HASAN, AK; NARDI-DEI, V.; KOSHIKAWA, H.; ESAKI, N.; SODA, K. Purification and characterization of thermostable and nonthermostable 2-haloacid dehalogenases with different stereospecificities from *Pseudomonas* sp. strain YL. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 60, n. 7, p. 2389-2393, 1994.

LIU, JQ; KURIHARA, T. ; ICHIYAMA, S.; MIYAGI, M.; TSUNASAWA, S.; KAWASAKI, H.; SODA, K.; ESAKI, N. Reaction Mechanism of Fluoroacetate Dehalogenase from *Moraxella* sp. B. *The journal of biological chemistry*. v. 273, n. 47, p. 30897–30902, 1998.

MASAI E.; KATAYAMA Y.; FUKUDA M. Genetic and biochemical investigations on bacterial catabolic pathways for lignin-derived aromatic compounds. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, v. 71, n.1, p. 1-15, 2007.

MASAI, E.; KAMIMURA, N.; KASAI, D.; OGUCHI, A.; ANKAI,A.; FUKUI,S.; TAKAHASHI, M.; YASHIRO, I.; SASAKI, H.; HARADA, T.; NAKAMURA, S.; KATANO,Y.; NARITA-YAMADA,S.; NAKAZAWA, H.; HARA, H.; KATAYAMA, Y.; FUKUDA, M.; YAMAZAKI, S.; FUJITAB, N. Complete Genome Sequence of *Sphingobium* sp. Strain SYK-6, a Degrader of Lignin-Derived Biaryls and Monoaryls. *Journal of Bacteriology*, v. 194, n.2, p. 534–535, 2012.

MAYER, J. J. M.; VAN ROOYEN, S. W. Fluoroacetate metabolism by a bacterium from *Dichapetalum braunii*, p. 457-461. In: COLEGATE, S.M.; DORLING P.R. (ed.). *Plant Associated Toxins*. Wallingford, CAB International,1994.

MURPHY, C. D.; SCHAFFRATH C.; O’HAGAN, D. Fluorinated natural Products: the biosynthesis of fluoroacetate and 4-fluorothreonine in *Streptomyces Cattleya*. *Chemosphere*, v. 52, n. 2, p. 455–461, 2003.

MUSSATO, S. I.; FERNANDES, M.; MILAGRES, A. M. F. Enzimas Ferramenta na Indústria. *Ciência Hoje*. São Paulo, 2007. p. 28 – 33.

NAGATA, Y.; MIYAUCHI, K.; DAMBORSKY, J.; MANOVA, K.; ANSORGOVA, A.; TAKAGI, M. Purification and characterization of a haloalkane dehalogenase of a new substrate class from a g-hexachlorocyclohexane- degrading bacterium, *Sphingomonas paucimobilis* UT26. *Applied and environmental microbiology*, v. 63, n. 9, p. 3707–3710, 1997.

NAKAMURA, T.; YAMAGUCHI, A.; KONDO, H.; WATANABE, H.; KURIHARA, T.; ESAKI, N.; HIRONO, S.; TANAKA, S. Roles of K151 and D180 in L-2-haloacid dehalogenase from *Pseudomonas* sp. YL: Analysis by molecular dynamics and ab initio fragment molecular orbital calculations. *Journal Computational Chemistry*, v. 30, n. 16, p. 2625-2634, 2009.

NAKAYAMA, T.; KAMACHI, T.; JITSUMORI, K.; OMI, R.; HIROTSU, K.; ESAKI, N.; KURIHARA, T.; YOSHIKAWA, K. Substrate specificity of fluoroacetate dehalogenase: an insight from crystallographic analysis, fluorescence spectroscopy, and theoretical computations. *Chemistry: A European Journal*, v. 18, n. 27, p. 8392 – 8402, 2012.

NARDI-DEI, V.; KURIHARA, T.; PARK, C.; MIYAGI, M.; TSUNASAWA, S.; SODA, K.; ESAKI, N. DI-2-haloacid dehalogenase from *Pseudomonas* sp. 113 is a new class of dehalogenase catalyzing hydrolytic dehalogenation *not* involving enzyme-substrate ester intermediate. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 274, n. 30, 1999.

NISHIYAMA, M.; SENOO, K.; WADA, H.; MATSUMOTO, S. Identification of soil micro - habitats for growth, death and survival of a bacterium, g-1, 2, 3, 4, 5, 6-hexachlorocyclohexane-assimilating *Sphingomonas paucimobilis*, by fractionation of soil. *FEMS Microbiology Ecology*, v. 101, n.3, p. 145–150, 1992.

OBERG, G. The natural chlorine cycle - fitting the scattered pieces. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 58, n. 6, p. 565-581, 2002.

PASCHOALATO, C. F. P. R.; TRIMAILOVAS, M. R.; DI BERNARDO, L. Formação de subprodutos orgânicos halogenados nas operações de pré-oxidação com cloro, ozônio e peróxido e pós-cloração em água contendo substância húmica. *Engenharia Sanitária e Ambiental* [online].v.13, n.3, p. 313-322, 2008.

POELARENDS, G.J.; ZANDSTRA, M.; BOSMA, T.; KULAKOV, L.A.; LARKIN, M.J.; MARCHESI, J.R.; WEIGHTMAN, A.J.; JANSSEN, D.B. Haloalkane-utilizing *Rhodococcus* strains isolated from geographically distinct locations possess a highly conserved gene cluster encoding haloalkane catabolism. *Journal of Bacteriology*, v. 182, n. 10, p. 2725-2731, 2000.

PRESCOTT, J.F. *Rhodococcus equi*. In: PRESCOTT, C.L. *et al. Pathogenesis of bacterial infections of animals*. 3.ed. Ames: Blackwell, 2004. p.110-121.

RAJ, H. D.; MALOY, S. R. Family Spirosomaceae: gramnegative ring-forming aerobic bacteria. *Critical Reviews in Microbiology*, v. 17, n. 5, p. 329–364, 1990.

SETO, M.; KIMBARA, K.; SHIMURA, M.; HATTA, T.; FUKUDA, M.; YANO, K. A novel transformation of polychlorinated biphenyls by *Rhodococcus* sp. Strain RHA1. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 61, n. 9, p. 3353–3358, 1995.

SHARMA, P.; RAINA, V.; KUMARI, R.; MALHOTRA, S.; DOGRA, C.; KUMARI, H.; KOHLER, H-P. E.; BUSER, H-R.; HOLLIGER, C.; LAL, R. Haloalkane dehalogenase LinB is responsible for  $\beta$ - and  $\delta$ -hexachlorocyclohexane transformation in *Sphingobium indicum* B90A. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 72, n. 9, p. 5720–5727, 2006.

SHORT, K. A.; DOYLE, J. D.; KING, R. J.; SEIDLER, R. J.; STOTZKY, G.; OLSEN, R. H. Effects of 2,4-Dichlorophenol, a Metabolite of a Genetically Engineered Bacterium, and 2,4-Dichlorophenoxyacetate on Some Microorganism-Mediated

Ecological Processes in Soil. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 57, n. 2, p. 412-418, 1991.

SILVA, C. M. M. S.; FAY, E. F.; MELO, I. S. Biotransformação de Agrotóxicos e Biorremediação. In: \_\_\_\_\_. *Agrotóxico e ambiente / editores técnicos*. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, p. 145-182, 2004.

SKLADANY, G. J.; METTING JÚNIOR, F.B. Bioremediation of contaminated soil. In: METTING JÚNIOR, F.B. (ed.) *Soil microbial ecology: applications in agricultural and environmental management*. New York: M. Dekker, p. 483-513, 1992.

SWANSON, P. E. Dehalogenases applied to industrial-scale biocatalysis. *Current Opinion in Biotechnology*. v. 10, n. 4, p. 365-369, 1999.

TABACCHIONI, S.; BEVIVINO, A.; DALMASTRI, C.; CHIARINI, L. *Burkholderia cepacia* complex in the rhizosphere: a minireview. *Annals of Microbiology*, v. 52, n.2, p. 103-117, 2002.

TWIGG, L. E.; KING, D. R. Artificially enhanced tolerance to fluoroacetate and its implications for wildlife conservation. *Pacific Conservation Biology*, v.6, n.1, p. 9-13, 2000.

VAN DER GEIZE, R.; DIJKHUIZEN L. Harnessing the catabolic diversity of Rhodococci for environmental and biotechnological applications. *Current Opinion in Microbiology*, v.7, n. 3, p. 255-261, 2004.

YANG, G.; LIANG, P.-H.; DUNAWAY-MARIANO, D. Evidence for nucleophilic catalysis in the aromatic substitution reaction Catalyzed by (4-chlorobenzoyl) coenzyme a dehalogenase. *Biochemistry*, v. 33, n. 28, p. 8527-8531, 1994.

ZHANG, Y.; LI, ZS.; WU, J. Y.; SUN, M.; ZHENG, QC.; SUN, CC. Homology modeling and SN2 displacement reaction of fluoroacetate dehalogenase from *Burkholderia* sp. FA1. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 325, n. 2, p. 414-420, 2004.

WHITLOCK, G.C.; ESTES, D.M.; TORRES, A.G. Glanders: off to the races with *Burkholderia mallei*. *FEMS Microbiology Letters*, v. 277, n. 2, p. 115 - 122, 2007.

## CAPÍTULO II

**Resistência à intoxicação por *Amorimia septentrionalis* em caprinos, induzida pela inoculação ruminal das bactérias *Pigmentiphaga kullae* e *Ancylobacter dichloromethanicus***

**(Artigo científico submetido ao periódico Pesquisa Veterinária Brasileira)**

**Resistência à intoxicação por *Amorimia septentrionalis* em caprinos, induzida pela inoculação ruminal das bactérias *Pigmentiphaga kullae* e *Ancylobacter dichloromethanicus*<sup>1</sup>**

Danielle A. N. Pessoa<sup>2</sup>, Franklin Riet-Correa<sup>2</sup>, Layze C. A. Silva<sup>2</sup>, José R. G. Lopes<sup>2</sup>, Meire M. S. Macêdo<sup>2</sup>, Sérgio S. Azevedo<sup>2</sup> e Felício JR. Garino<sup>2</sup>

**ABSTRACT.-** Pessoa D.A.N., Riet-Correa F., Silva L.C.A., Garino F.J., Lopes J.R.G., Macêdo M. M. S. & Azevedo S. S. [Resistance to poisoning by *Amorimia septentrionalis* in goats induced by ruminal inoculation of the bacteria *Pigmentiphaga kullae* and *Ancylobacter dichloromethanicus*]. Resistência à intoxicação por *Amorimia septentrionalis* em caprinos, induzida pela inoculação ruminal das bactérias *Pigmentiphaga kullae* e *Ancylobacter dichloromethanicus*. Pesquisa Veterinária Brasileira 00(0):00-00. Unidade Acadêmica de Medicina Veterinária (UAMV), Centro de Saúde e Tecnologia Rural (CSTR), Universidade Federal de Campina Grande (UFCG), Av. Universitária s/n, Bairro Santa Cecília, Patos, PB, 58700-970, Brasil. \*Autor para correspondência: danipessoavet14@gmail.com.

In Brazil, it is estimated that the poisoning of livestock by sodium monofluoroacetato (MFA) contained plants cause the death of approximately 500.000 cattle per year. The ruminal inoculation of bacteria that degrade MFA has been proposed as a way to prevent this poisoning. This study aimed to evaluate, in goats, resistance to the MFA-containing plants *Amorimia septentrionalis* induced by ruminal inoculation of the bacteria *Pigmentiphaga kullae* and *Ancylobacter dichloromethanicus*. Twelve goats, with no previous contact with MFA-containing plants, were divided into two groups of six animals each. In group 1, 60 ml of a mixture of the two bacteria was inoculated every day for 10 days in each goat. In group 2, the goats received no bacteria. At the 10th day of inoculation, *A. septentrionalis* started to be administered daily at a dose of 5g/kg bodyweight, to both groups. The administration was interrupted in each animal after the observation of the first clinical signs of

---

<sup>1</sup> Recebido em...

Aceito para publicação em...

<sup>2</sup>Unidade Acadêmica de Medicina Veterinária (UAMV), Centro de Saúde e Tecnologia Rural (CSTR), Universidade Federal de Campina Grande (UFCG), Av. Universitária s/n, Bairro Santa Cecília, Patos, PB, 58700-970, Brasil. \*Autor para correspondência: danipessoavet14@hotmail.com

poisoning. The goats of group 1 showed clinical signs  $5.83 \pm 2.56$  days after the administration of the plant which differed significantly ( $p=0.037$ ) from goats of group 2, which showed clinical signs  $2.67 \pm 0.52$  days after the start of the ingestion. The amount of plant ingested by inoculated goats ( $28.83 \pm 12.97$  g/kg) to cause clinical signs was significantly greater ( $p = 0.025$ ) than the plant ingested by the non-inoculated ( $12.03 \pm 3.65$ ) to cause clinical signs was also statistically different between the groups. We conclude that the intraruminal administration of *P. kullae* and *A. dichloromethanicus* increases the resistance to poisoning by MFA-containing plants.

INDEX TERMS: Sodium monofluoroacetato, poisoning plants, resistance to poisoning, dehalogenases.

**RESUMO.** – No Brasil, estima-se que as intoxicações por plantas tóxicas que contêm monofluoroacetato de sódio (MFA) causam a morte de aproximadamente 500.000 bovinos ao ano. A inoculação ruminal de bactérias que degradam MFA tem sido proposta como uma forma de prevenir a intoxicação. O presente trabalho teve como objetivo avaliar, em caprinos, a resistência ao MFA presente em *Amorimia septentrionalis*, induzida por inoculação ruminal das bactérias *Pigmentiphaga kullae* e *Ancylobacter dichloromethanicus*. Doze caprinos, que nunca tiveram contato prévio com plantas que contêm MFA, foram divididos em dois grupos, com seis animais cada. No grupo 1, 60 mL de uma mistura das duas bactérias foi inoculada, diariamente, durante 10 dias em cada caprino. No grupo 2, os caprinos não receberam as bactérias. A partir do 10º dia de inoculação, *A. septentrionalis* foi administrada, diariamente, na dose de 5g/kg de peso vivo, sendo interrompida em cada animal após a observação dos primeiros sinais clínicos da intoxicação. Os caprinos do grupo 1 apresentaram sinais clínicos  $5,83 \pm 2,56$  dias após a administração da planta o que diferiu significativamente ( $p=0,037$ ) dos caprinos do grupo 2, que apresentaram sinais clínicos aos  $2,67 \pm 0,52$  dias. A quantidade de planta ingerida pelos caprinos inoculados ( $28,83 \pm 12,97$  g/kg) e os não inoculados ( $12,03 \pm 3,65$  g/kg) para desencadear os sinais clínicos foi, também, estatisticamente diferente entre os grupos ( $p=0,025$ ). Conclui-se que a administração intraruminal de *P. kullae* e *A. dichloromethanicus* induz resistência à intoxicação por plantas que contêm MFA.

TERMOS DE INDEXAÇÃO: Monofluoroacetato de sódio, intoxicação por plantas, resistência às intoxicações, dehalogenases.

## INTRODUÇÃO

A intoxicação de animais domésticos por plantas que possuem monofluoroacetato de sódio (MFA), incluindo *Amorimia* spp., *Palicourea* spp., e *Arrabidaea* spp. é responsável, anualmente, por aproximadamente 410.380 a 877.881 mortes de bovinos, o que representa 50% das mortes ocasionadas por todas as plantas tóxicas no Brasil, estimadas em 820.761 e 1.755.763 bovinos (Pessoa et al. 2013). A *Amorimia septentrionalis*, anteriormente identificada como *Amorimia (Mascagnia) rigida* (Duarte et al. 2014), popularmente conhecida por tinguí é uma das plantas tóxicas mais importantes da Paraíba (Medeiros et al. 2002, Vasconcelos et al. 2008ab).

O controle desse tipo de intoxicação pode ser realizado por meio da detoxificação do MFA, no rúmen, por bactérias produtoras de dehalogenases capazes de degradar esse composto (Gregg et al. 1998), que podem ser isoladas do rúmen de animais, do solo e de plantas (Twigg & Socha 2001, Camboim et al. 2012ab, Davis et al. 2012). As dehalogenases produzidas pelas bactérias atuam por meio da clivagem da ligação carbono-halogênio e no caso do MFA, a dehalogenase fluoroacetato e a L-2-haloácido dehalogenase são capazes de atuar sobre a ligação carbono-flúor, ocasionando a inativação desse composto tóxico (Fetzner & Lingers 1994, Chan et al. 2010).

Na Paraíba, as bactérias que degradam MFA, *Ancylobacter dichloromethanicus* e *Pigmentiphaga kullae* foram isoladas do rúmen de caprinos criados em áreas livres de plantas que contêm MFA (Camboim et al. 2012b).

O presente trabalho teve como objetivo avaliar a eficácia da utilização de bactérias degradadoras de MFA, isoladas do rúmen de caprinos, na detoxificação ruminal do MFA presente em *A. septentrionalis*, indicando uma possível forma de controle para a intoxicação por essa planta.

## MATERIAL E MÉTODOS

A *A. septentrionalis* foi coletada no município de Teixeira (S 7°12.24' O 37°15.11'; elevação 749 m), localizado no estado da Paraíba, no mesmo lugar utilizado por Duarte et al. (2014) para coletar planta com objetivo de induzir resistência à intoxicação em caprinos.

Foram utilizados 12 caprinos, mestiços, com idades de 1 a 3 anos, pesando de 20 a 40 kg, todos sem histórico de intoxicação ou contato prévio com *A. septentrionalis*, divididos em dois grupos. O Grupo 1, foi composto por seis animais que receberam,

durante 10 dias, por administração oral, 60 mL de uma solução contendo as bactérias *Ancylobacter dichloromethanicus* e *Pigmentiphaga kullae*, isoladas de rúmen de caprino (Camboim et al. 2012b).

Para obtenção dessa solução, as bactérias foram semeadas em ágar nutriente e ágar sangue de ovino desfibrinado a 5%, e incubadas em estufa bacteriológica a 37°C por 24-48 horas. Cada bactéria era diluída em solução fisiológica a 0,9% estéril até que atingisse o grau 1 da escala de Mac Farland. O inóculo para cada animal era preparado misturando 50 mL da solução de cada bactéria, de onde se retirava os 60 mL para posterior inoculação (Gregg et al., 1998).

No décimo dia de inoculação, iniciou-se a administração diária de folhas verdes da planta na dose de 5g/kg. Essa dose foi determinada após a administração previa a dois caprinos que adoeceram após dois dias de ingestão da planta. Outros dois caprinos que receberam, diariamente, 3g/kg de *A. septentrionalis* durante 15 dias, não apresentaram sinais clínicos. A planta era oferecida de forma voluntária aos caprinos, e os que não comiam recebiam a planta mediante a administração de pequenas quantidades da mesma diretamente em suas bocas.

No grupo 2, controle, constituído, também, por seis caprinos, não foram inoculadas as bactérias e a planta foi oferecida da mesma forma que aos animais do grupo 1. Em razão de os sinais clínicos serem desencadeados pelo exercício, logo após a administração da planta, todos os caprinos eram estimulados a se exercitar durante 10 minutos. Antes e depois de oferecer a planta, a temperatura retal, frequência cardíaca, frequência respiratória e movimentos ruminais foram mensurados e modificações comportamentais foram observadas. Interrompeu-se a administração da planta assim que os animais demonstraram sinais clínicos de intoxicação.

Amostras de aproximadamente 4 mL de sangue, foram coletadas por punção da veia jugular em tubo a vácuo (vacutainer®), sem anticoagulante, antes da primeira administração da planta, a cada 2 dias após a administração da mesma e 15 dias após a última dose. Em seguida, as amostras foram centrifugadas (Centrifuga Eppendorf®, modelo 5804R) a 1600G por 15 minutos para obtenção do soro. As concentrações séricas de creatinina, ureia, albumina, magnésio, cálcio, fósforo e proteínas totais e as atividades séricas de fosfatase alcalina, aspartato aminotransferase (AST) e gama glutamil transferase (GGT) foram mensuradas por meio da utilização de kits comerciais

(Labtest®). A leitura foi realizada com auxílio de analisador bioquímico semi-automático Bioclin Systems II.

A resistência à intoxicação pela planta foi avaliada pelo tempo para o aparecimento dos sinais clínicos e quantidade de planta consumida para desencadear os mesmos. Os dados foram analisados estaticamente pelo teste não-paramétrico de U de Mann-Whitney, uma vez que os dados não apresentaram distribuição normal (Zar 1999). O programa Bioest 5.3, foi utilizado para as análises, e o nível de significância adotado foi de 5%.

## RESULTADOS

Os sinais clínicos observados nos caprinos intoxicados foram depressão, taquicardia, taquipneia, relutância ao movimento, mugidos, diarreia, incoordenação motora, tremores musculares e ingurgitamento da veia jugular com pulso venoso positivo. Em três animais do grupo 1 os únicos sinais clínicos observados foram taquicardia e ingurgitamento da jugular. O tempo após o início da ingestão em que cada caprino apresentou sinais clínicos foi significativamente maior ( $p=0,037$ ) no grupo dos caprinos que receberam a bactéria (Quadro 1). A dose de planta ingerida pelos animais inoculados (grupo 1) foi, também, significativamente maior do que a ingerida pelos caprinos do grupo 2 (controle) ( $p=0,025$ ) (Quadro 2).

Todos os animais se recuperaram dentro de 24 horas após o final da ingestão de *A. septentrionalis*. Somente o caprino 9 do grupo 2 morreu dois dias após o início dos primeiros sinais clínicos da intoxicação. Na necropsia, foram observados coágulos no ventrículo esquerdo. Histologicamente, no rim, pode-se constatar a presença de degeneração hidrópico-vacuolar e necrose das células epiteliais dos túbulos contornados distais.

Na avaliação da bioquímica sérica dos dois grupos, os valores estavam dentro do normal (Kaneko et al. 2008) e não diferiram entre os grupos.

## DISCUSSÃO

Os resultados deste trabalho comprovam que a inoculação intraruminal das bactérias *Ancylobacter dichloromethanicus* e *Pigmentiphaga kullae* é capaz de induzir resistência a plantas que contêm MFA em caprinos. Possivelmente essa resistência é induzida pela capacidade de adaptação dessas bactérias em ambientes contaminados pelo MFA,

permitindo que utilizem essa substância como fonte de carbono e energia (Blümel et al. 2001, Firsova et al., 2009). Resultados semelhantes foram observados por Gregg et al. (1998) que inocularam em ovinos a bactéria ruminal, *Butyrivibrio fibrisolvens* modificada geneticamente com um gene que codifica a produção da enzima fluoroacetato dehalogenase, obtido a partir de uma espécie de *Moraxella*, comprovando que os ovinos inoculados eram resistentes a doses maiores de MFA do que os animais controles.

Estes resultados também se assemelham aos observados por Duarte et al. (2014) em caprinos que receberam, repetidamente, doses não tóxicas de *A. septentrionalis*. Entretanto, em ovinos, a administração de doses não tóxicas de MFA não aumentou a resistência à intoxicação (Santos et al. 2014). Em trabalhos anteriores do nosso grupo de pesquisa foi sugerido que havia quatro possibilidades de induzir resistência a intoxicação por plantas que contêm MFA: 1) a administração repetida, por períodos alternados, de doses não tóxicas da planta; 2) a administração de MFA em doses não tóxicas o que permitiria, também, a proliferação de bactérias que tenham atividade de dehalogenases; 3) a administração de outro substrato semelhante a MFA, não tóxico, que estimule a proliferação de bactérias com atividade de dehalogenases; e 4) a administração de bactérias que degradam MFA (Camboim et al. 2012ab, Oliveira et al. 2013, Santos et al. 2014). Considerando os resultados negativos obtidos pela inoculação de MFA (Santos et al. 2014), assim como o risco e as dificuldades de administrar doses não tóxicas de plantas que contem MFA, fica evidenciado a utilização de bactérias que hidrolisam este composto como uma alternativa viável para conferir resistência a intoxicação. Por outro lado, não se conhece o grau nem a duração da resistência que pode ser adquirida pela inoculação de bactérias, utilizadas isoladamente ou em um consorcio de bactérias.

Novos trabalhos deverão ser realizados para tentar aumentar a resistência e determinar sua duração, utilizando diferentes bactérias por períodos diferentes. Outra variável a ser levada em consideração é a quantidade de planta que os animais ingeriram espontaneamente, pois se com a inoculação de bactérias se aumenta a resistência de forma que os animais possam ingerir doses maiores sem adoecer, é provável que a ingestão dessas doses em forma continuada possa aumentar ou manter uma resistência necessária para não ocorrer mortes. Um fato bem conhecido é que animais criados em áreas onde ocorrem plantas que contem MFA são menos susceptíveis que animais

criados em áreas onde não ocorrem essas plantas (Silva et al. 2008). Porém, não há o conhecimento se essa resistência é adquirida pela ingestão de doses não tóxicas da planta ou é devido a seleção natural em consequência da morte dos animais susceptíveis.

O rol de bactérias que degradam MFA na resistência à intoxicação por *A. septentrionalis* é evidenciado, também, por estudos recentes do nosso grupo de pesquisa, que revelaram ser possível evitar a intoxicação mediante transfaunação de fluido ruminal de caprinos resistentes, que receberam bactérias que degradam MFA e posteriormente *A. septentrionalis*, para caprinos susceptíveis (dados não publicados). Resultados semelhantes foram encontrados por Duarte et al. (2014), que induziram resistência em caprinos por meio de transferência de fluido ruminal de animais resistentes, que receberam doses repetidas não tóxicas de *A. septentrionalis*, para animais susceptíveis.

Os sinais clínicos demonstrados pelos caprinos intoxicados e as lesões histológicas do animal que morreu foram semelhantes aos relatados anteriormente na intoxicação por *A. septentrionalis* (Vasconcelos et al. 2008ab, Duarte et al. 2014).

Conclui-se que a inoculação ruminal simultânea de *Ancylobacter dichloromethanicus* e *Pigmentiphaga kullae* aumenta a resistência à intoxicação por plantas que contem monofluoroacetato de sódio.

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

## REFERÊNCIAS

- Blümel S., Mark B., Busse H. J., Kämpfer & P. Stolz A. 2001. *Pigmentiphaga kullae* gen. nov., sp. nov., a novel member of the family Alcaligenaceae with the ability to decolorize azo dyes aerobically. Internat. J. Syst. Evol. Microbiol. 51(5):1867–1871.
- 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. Scientif. 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. *Scientif. World J.* 2012:178254.
- Chan W.Y., Wong M., Guthrie J., Savchenko A.V., Yakunin A.F., Pai E.F. & Edwards E.A. 2010. Sequence- and activity-based screening of microbial genomes for novel dehalogenases. *Microbial Biotech.* 3(1):107–120.
- 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.
- 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. & Lingers F. 1994. Bacterial Dehalogenases: Biochemistry, Genetics, 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. App. 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. and Environ. Microbiol.* 64(9): 3496-3498.
- Kaneko J.J., Harvey J.W. & Bruss M.L. (Eds). 2008. Blood analyte reference values in some laboratory animals, p. 881-887. In: \_\_\_\_. *Clinical biochemistry of domestic animal.* 6<sup>th</sup> ed. Academic, Philadelphia. 896p.
- Medeiros R.M.T., Geraldo Neto S.A., Barbosa R.C., Lima E.F. & Riet-Correa F. 2002. Sudden death caused by *Mascagnia rigida* in cattle in Paraíba, Northeastern Brazil. *Vet. Human Toxicol.* 44(5):286-288.
- 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.

- 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.
- 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(2):229-233.
- Twigg L.E. & Socha L.V. 2001. Defluorination of sodium monofluoroacetate by soil microorganisms from central Australia. *Soil Biol. Biochem.* 33(2): 227– 234.
- Vasconcelos J.S., Riet-Correa F., Dantas A.F.M., Medeiros R.M.T. & Dantas A.J.A. 2008a. Mortes súbitas causadas por *Palicourea aeneofusca* e *Mascagnia rigida* na Zona da Mata Paraibana. *Pesq. Vet. Bras.* 28(10):457-460.
- Vasconcelos J.S., Riet-Correa F., Dantas A.F.M., Medeiros R.M.T. & Dantas A.J.A. 2008b. Intoxicação por *Mascagnia rigida* (Malpighiaceae) em ovinos e caprinos. *Pesq. Vet. Bras.* 28(10):521-526.
- Zar J. H. 1999. *Biostatistical Analysis*. 4<sup>rd</sup> ed. USA: Prentice Hall, New Jersey. 929 p.

**Quadro 1. Tempo para início dos sinais clínicos da intoxicação por *Amorimia septentrionalis* em caprinos inoculados com bactérias que degradam fluoracetato (grupo 1) e caprinos controle (grupo 2)**

	Grupo 1						Grupo 2					
Animais (Nº)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Dias para início dos sinais clínicos	8	2	4	8	5	8	3	3	3	2	3	2
Média ± desvio-padrão	5,83±2,56 <sup>a</sup>						2,67±0,52					

<sup>a</sup>Diferença estatisticamente significativa com o grupo controle (P<0,05).

**Quadro 2. Dose de planta ingerida até o início dos sinais clínicos da intoxicação por *Amorimia septentrionalis* em caprinos inoculados com bactérias que degradam fluoracetato (grupo 1) e caprinos controle (grupo 2)**

	Grupo 1						Grupo 2					
Animais (Nº)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Dose de planta (g/kg) ingerida	40	10	20	40	23	40	15	15	15	8,2	12	7
Média ± desvio-padrão	28,83±12,97 <sup>a</sup>						12,03±3,65					

<sup>a</sup>Diferença estatisticamente significativa com o grupo controle (P<0,05).

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

Com a realização do presente estudo pode-se constatar que várias bactérias, produtoras de enzimas dehalogenases, podem ser utilizadas como alternativas para detoxificação de ambientes poluídos, devido a capacidade de adaptação dessas bactérias, promovida pela utilização do composto tóxico como fonte de energia, e possível transferência dos genes codificadores da produção de enzimas para outros microrganismos.

O uso de bactérias, capazes de degradar MFA, no controle das intoxicações dos animais por plantas que contém MFA é indicado, uma vez que elas induzem resistência ao composto, mas novos estudos devem ser realizados, dado que não se sabe até que ponto essas bactérias induzem resistência, então seria necessário avaliar a quantificação e manutenção desses microrganismos no rúmen dos animais.

## ANEXOS



Apresentação: os trabalhos deverão ser digitados em Word 97 ou versão superior, página A4, com margens de 2,5 cm, fonte Times New Roman, tamanho 12, espaço duplo e páginas numeradas em sequência.

As linhas deverão ser numeradas de forma contínua, utilizando a ferramenta Layout em Configurar Página.

O máximo de páginas será 25 para artigos de revisão, 20 para artigos científicos e 10 para comunicação científica, incluindo tabelas e figuras.

Artigo científico: compreenderá os seguintes itens: título, nome do(s) autor(es), endereço do primeiro autor e local de origem dos demais autores, resumo em português, palavras-chave, título em inglês, abstract, key words, introdução, material e métodos, resultados, discussão, conclusões, agradecimentos e referências.

Comunicação científica: compreenderá os seguintes itens: título, nome do(s) autor(es), endereço do primeiro autor e local de origem dos demais autores, resumo em português, palavras-chave, título em inglês, abstract, key words, texto sem subdivisões e referências.

Artigo de revisão: compreenderá os seguintes itens: título, nome do(s) autor(es), endereço do primeiro autor e local de origem dos demais autores, resumo em português, palavras-chave, título em inglês, abstract, key words, texto sem subdivisões e referências.

Aprovação do trabalho pela Comissão de Ética e Biossegurança: quando o trabalho envolver estudos em animais de experimentação e/ou organismos geneticamente modificados, incluir o número do processo no trabalho e encaminhar uma cópia da aprovação fornecida pelo respectivo Comitê responsável da Instituição de origem do primeiro autor.

Idioma: o trabalho poderá ser redigido em português, inglês ou espanhol. Quando escrito em português, o resumo deverá ter uma versão em inglês. No caso de artigo escrito em inglês ou espanhol deverá ter um resumo em inglês ou espanhol e outro em português.

**Título:** embora breve, deverá indicar com precisão o assunto tratado no artigo, focalizando bem a sua finalidade principal.

**Endereço(s) do(s) autor(es):** abaixo do(s) nome(s) do(s) autor(es), com chamada numérica. Descrever endereço postal (Instituição/Universidade, Centro/Faculdade, Laboratório/Departamento, estado, país) e eletrônico do autor principal. No rodapé da primeira lauda descrever somente a Instituição e Departamento dos demais autores.

**Resumo:** deverá apresentar concisamente o objetivo do trabalho, material e métodos e conclusões, em um único parágrafo. Não ultrapassar 250 palavras.

**Palavras-chave:** abaixo do resumo e separado por um espaço, citar no máximo cinco palavras-chave, separadas por vírgula. Evitar termos que apareçam no título.

**Abstract:** apresentar uma tradução para o inglês, do título do trabalho e do resumo. A seguir, relacionar também em inglês (ou espanhol) as mesmas palavras-chave (key words, palabras-clave) já citadas. Não ultrapassar 250 palavras.

**Introdução:** descrever a natureza e o objetivo do trabalho, sua relação com outras pesquisas no contexto do conhecimento existente e a justificativa da pesquisa feita.

**Material e Métodos:** apresentar descrição breve, porém suficiente para permitir uma repetição do trabalho. Técnicas e processos já publicados, exceto quando modificados, deverão ser apenas citados. Nomes científicos de espécies, bem como drogas, deverão ser citados de acordo com regras e padrões internacionais.

**Resultados:** apresentá-los acompanhado de tabelas e/ou figuras, quando necessário. As tabelas e figuras devem ser inseridas após as referências.

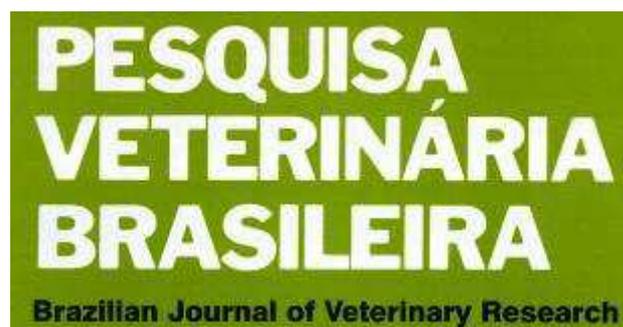
**Discussão:** discutir os resultados obtidos comparando-os com os de outros trabalhos publicados (resultados e discussão poderão fazer parte de um único item).

**Tabelas e Figuras:** incluir título claro e conciso que possibilite o seu entendimento sem consultas ao texto. As tabelas não deverão conter linhas verticais. No texto, use a palavra abreviada (ex.: Fig. 3). As figuras devem estar no formato jpg (fotos) ou gif (gráficos e esquemas) e com tamanho inferior a 500 Kb. As figuras originais ou com maior resolução poderão ser solicitadas após o aceite. Devem ser enviadas em arquivos individuais e nomeadas de acordo com o número da figura. Exemplos: Fig1.gif, Fig2.jpg.

**Conclusões:** serão citadas em ordem de importância. Poderão constituir um item à parte ou serem incluídas na discussão.

**Agradecimentos:** poderão ser incluídos a pessoas ou instituições. Referências e citações no texto: citações no texto e referências estão diretamente vinculadas. Todos os autores citados devem figurar nas referências, exceção para informações obtidas por canais informais que deverão ser citadas apenas no texto: (JUNQUEIRA, comunicação pessoal), (JUNQUEIRA, informação verbal). A referência no texto deve seguir o

sistema sobrenome do autor e ano de publicação e deverá estar em caixa alta reduzida ou versalete, tal como: 1 autor - ALLAN (1979) ou (ALLAN, 1979); 2 autores – LOPES; MACEDO (1982) ou (LOPES; MACEDO, 1982); mais de 2 autores - BESSE et al. (1990) ou (BESSE et al., 1990); coincidências de autoria e ano de publicação - (CURI, 1998a), (CURI, 1998b) ou (CURI, 1998a, 1998b). As referências deverão ser baseadas na Norma NBR 6023/2002, da Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT), e estar em ordem alfabética de primeiro autor. A exatidão dos dados nas referências é da responsabilidade dos autores.



Os trabalhos para submissão devem ser enviados por via eletrônica, através do e-mail <[jurgen.dobereiner@pvb.com.br](mailto:jurgen.dobereiner@pvb.com.br)>, com os arquivos de texto na versão mais recente do Word e formatados de acordo com o modelo de apresentação disponível no site da revista ([www.pvb.com.br](http://www.pvb.com.br)). Devem constituir-se de resultados de pesquisa ainda não publicados e não considerados para publicação em outra revista.

Para abreviar sua tramitação e aceitação, os trabalhos sempre devem ser submetidos conforme as normas de apresentação da revista ([www.pvb.com.br](http://www.pvb.com.br)) e o modelo em Word (PDF no site). Os originais submetidos fora das normas de apresentação, serão devolvidos aos autores para a devida adequação.

Apesar de não serem aceitas comunicações (*Short communications*) sob forma de “Notas Científicas”, não há limite mínimo do número de páginas do trabalho enviado, que deve, porém, conter pormenores suficientes sobre os experimentos ou a metodologia empregada no estudo. Trabalhos sobre Anestesiologia e Cirurgia serão recebidos para submissão somente os da área de Animais Selvagens.

Embora sejam de responsabilidade dos autores as opiniões e conceitos emitidos nos trabalhos, o Conselho Editorial, com a assistência da Assessoria Científica, reserva-se o direito de sugerir ou solicitar modificações aconselháveis ou necessárias. Os trabalhos submetidos são aceitos através da aprovação pelos pares (*peer review*).

NOTE: Em complementação aos recursos para edição da revista (impressa e online) e distribuição via correio é cobrada taxa de publicação (*page charge*) no valor

de R\$ 250,00 por página editorada e impressa, na ocasião do envio da prova final, ao autor para correspondência.

1. Os trabalhos devem ser organizados, sempre que possível, em Título, ABSTRACT, RESUMO, INTRODUÇÃO, MATERIAL E MÉTODOS, RESULTADOS, DISCUSSÃO, CONCLUSÕES (ou combinação destes dois últimos), Agradecimentos e REFERÊNCIAS:

a) o Título do artigo deve ser conciso e indicar o conteúdo do trabalho; pormenores de identificação científica devem ser colocados em MATERIAL E MÉTODOS.

b) O(s) Autor(es) deve(m) sistematicamente encurtar os nomes, tanto para facilitar sua identificação científica, como para as citações bibliográficas. Em muitos casos isto significa manter o primeiro nome e o último sobrenome e abreviar os demais sobrenomes:

Paulo Fernando de Vargas Peixoto escreve Paulo V. Peixoto ou Peixoto P.V.; Franklin Riet-Correa Amaral escreve Franklin Riet-Correa ou Riet-Correa F.; Silvana Maria Medeiros de Sousa Silva poderia usar Silvana M.M.S. Silva, inverso Silva S.M.M.S., ou Silvana M.M. Sousa-Silva, inverso, Sousa-Silva S.M.M., ou mais curto, Silvana M. Medeiros-Silva, e inverso, Medeiros-Silva S.M.; para facilitar, inclusive, a moderna indexação, recomenda-se que os trabalhos tenham o máximo de 8 autores;

c) o ABSTRACT deverá ser apresentado com os elementos constituintes do RESUMO em português, podendo ser mais explicativos para estrangeiros. Ambos devem ser seguidos de “INDEX TERMS” ou “TERMOS DE INDEXAÇÃO”, respectivamente;

d) o RESUMO deve apresentar, de forma direta e no passado, o que foi feito e estudado, indicando a metodologia e dando os mais importantes resultados e conclusões. Nos trabalhos em inglês, o título em português deve constar em **negrito** e entre colchetes, logo após a palavra RESUMO;

e) a INTRODUÇÃO deve ser breve, com citação bibliográfica específica sem que a mesma assuma importância principal, e finalizar com a indicação do objetivo do trabalho;

f) em MATERIAL E MÉTODOS devem ser reunidos os dados que permitam a repetição do trabalho por outros pesquisadores. Na experimentação com animais, deve constar a aprovação do projeto pela Comissão de Ética local;

g) em RESULTADOS deve ser feita a apresentação concisa dos dados obtidos. Quadros devem ser preparados sem dados supérfluos, apresentando, sempre que indicado, médias de várias repetições. É conveniente, às vezes, expressar dados complexos por gráficos (Figuras), ao invés de apresentá-los em Quadros extensos;

h) na DISCUSSÃO devem ser discutidos os resultados diante da literatura. Não convém mencionar trabalhos em desenvolvimento ou planos futuros, de modo a evitar uma obrigação do autor e da revista de publicá-los;

i) as CONCLUSÕES devem basear-se somente nos resultados apresentados no trabalho;

j) Agradecimentos devem ser sucintos e não devem aparecer no texto ou em notas de rodapé;

k) a Lista de REFERÊNCIAS, que só incluirá a bibliografia citada no trabalho e a que tenha servido como fonte para consulta indireta, deverá ser ordenada alfabeticamente pelo sobrenome do primeiro autor, registrando-se os nomes de todos os autores, em caixa alta e baixa (colocando as referências em ordem cronológica quando houver mais de dois autores), o título de cada publicação e, abreviado ou por extenso (se tiver dúvida), o nome da revista ou obra, usando as instruções do “Style Manual for Biological Journals” (American Institute for Biological Sciences), o “Bibliographic Guide for Editors and Authors” (American Chemical Society, Washington, DC) e exemplos de fascículos já publicados ([www.pvb.com.br](http://www.pvb.com.br)).

2. Na elaboração do texto deverão ser atendidas as seguintes normas:

a) os trabalhos devem ser submetidos seguindo o exemplo de apresentação de fascículos recentes da revista e do modelo constante do site sob “Instruções aos Autores” ([www.pvb.com.br](http://www.pvb.com.br)). A digitalização deve ser na fonte Cambria, corpo 10, entrelinha simples; a página deve ser no formato A4, com 2cm de margens (superior, inferior, esquerda e direita), o texto deve ser corrido e não deve ser formatado em duas colunas, com as legendas das figuras e os Quadros no final (logo após as REFERÊNCIAS). As Figuras (inclusive gráficos) devem ter seus arquivos fornecidos separados do texto. Quando incluídos no texto do trabalho, devem ser introduzidos através da ferramenta “Inserir” do Word; pois imagens copiadas e coladas perdem as informações do programa onde foram geradas, resultando, sempre, em má qualidade;

b) a redação dos trabalhos deve ser concisa, com a linguagem, tanto quanto possível, no passado e impessoal; no texto, os sinais de chamada para notas de rodapé serão números arábicos colocados em sobrescrito após a palavra ou frase que motivou a nota. Essa numeração será contínua por todo o trabalho; as notas serão lançadas ao pé da página em que estiver o respectivo sinal de chamada. Todos os Quadros e todas as Figuras serão mencionados no texto. Estas remissões serão feitas pelos respectivos números e, sempre que possível, na ordem crescente destes. ABSTRACT e RESUMO serão escritos corridamente em um só parágrafo e não deverão conter citações bibliográficas.

c) no rodapé da primeira página deverá constar endereço profissional completo de todos os autores e o e-mail do autor para correspondência, bem como e-mails dos

demais autores (para eventualidades e confirmação de endereço para envio do fascículo impresso);

d) siglas e abreviações dos nomes de instituições, ao aparecerem pela primeira vez no trabalho, serão colocadas entre parênteses e precedidas do nome por extenso;

e) citações bibliográficas serão feitas pelo sistema “autor e ano”; trabalhos de até três autores serão citados pelos nomes dos três, e com mais de três, pelo nome do primeiro, seguido de “et al.”, mais o ano; se dois trabalhos não se distinguem por esses elementos, a diferenciação será feita através do acréscimo de letras minúsculas ao ano, em ambos. Trabalhos não consultados na íntegra pelo(s) autor(es), devem ser diferenciados, colocando-se no final da respectiva referência, “(Resumo)” ou “(Apud Fulano e o ano.)”; a referência do trabalho que serviu de fonte, será incluída na lista uma só vez. A menção de comunicação pessoal e de dados não publicados é feita no texto somente com citação de Nome e Ano, colocando-se na lista das Referências dados adicionais, como a Instituição de origem do(s) autor(es). Nas citações de trabalhos colocados entre parênteses, não se usará vírgula entre o nome do autor e o ano, nem ponto-e-vírgula após cada ano; a separação entre trabalhos, nesse caso, se fará apenas por vírgulas, exemplo: (Christian & Tryphonas 1971, Priester & Haves 1974, Lemos et al. 2004, Krametter-Froetcher et. al. 2007);

f) a Lista das REFERÊNCIAS deverá ser apresentada isenta do uso de caixa alta, com os nomes científicos em itálico (grifo), e sempre em conformidade com o padrão adotado nos últimos fascículos da revista, inclusive quanto à ordenação de seus vários elementos.

3. As Figuras (gráficos, desenhos, mapas ou fotografias) originais devem ser preferencialmente enviadas por via eletrônica. Quando as fotos forem obtidas através de câmeras digitais (com extensão “jpg”), os arquivos deverão ser enviados como obtidos (sem tratamento ou alterações). Quando obtidas em papel ou outro suporte, deverão ser anexadas ao trabalho, mesmo se escaneadas pelo autor. Nesse caso, cada Figura será identificada na margem ou no verso, a traço leve de lápis, pelo respectivo número e o nome do autor; havendo possibilidade de dúvida, deve ser indicada a parte inferior da figura pela palavra “pé”. Os gráficos devem ser produzidos em 2D, com colunas em branco, cinza e preto, sem fundo e sem linhas. A chave das convenções adotadas será incluída preferentemente, na área da Figura; evitar-se-á o uso de título ao alto da figura. Fotografias deverão ser apresentadas preferentemente em preto e branco, em papel brilhante, ou em diapositivos (“slides”). Para evitar danos por grampos, desenhos e fotografias deverão ser colocados em envelope.

Na versão online, fotos e gráficos poderão ser publicados em cores; na versão impressa, somente quando a cor for elemento primordial a impressão das figuras poderá ser em cores.

4. As legendas explicativas das Figuras conterão informações suficientes para que estas sejam compreensíveis, (até certo ponto autoexplicativas , com independência do texto) e serão apresentadas no final do trabalho.

5. Os Quadros deverão ser explicativos por si mesmos e colocados no final do texto. Cada um terá seu título completo e será caracterizado por dois traços longos, um acima e outro abaixo do cabeçalho das colunas; entre esses dois traços poderá haver outros mais curtos, para grupamento de colunas. Não há traços verticais. Os sinais de chamada serão alfabéticos, recomeçando, se possível, com “a” em cada Quadro; as notas serão lançadas logo abaixo do Quadro respectivo, do qual serão separadas por um traço curto à esquerda.