

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

ESCOLA DE VETERINÁRIA

Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal

Indução de resistência, em bovinos, à intoxicação por plantas que contêm monofluoroacetato por meio da administração de análogo

ARISTÓTELES GOMES COSTA

Belo Horizonte - MG

Escola de veterinária - UFMG

2018

Aristóteles Gomes Costa

Indução de resistência, em bovinos, à intoxicação por plantas que contêm monofluoroacetato por meio da administração de análogo

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre na área de concentração de Medicina e Cirurgia Veterinária.

Orientador: Benito Soto Blanco

Co-orientador(a): Marília Martins Melo

Belo Horizonte -MG

Escola de Veterinária – UFMG

2018

C837i Costa, Aristóteles Gomes, 1986-
Indução de resistência, em bovinos, à intoxicação por plantas que contém monofluoracetato por meio da administração de análogo / Aristóteles Gomes Costa. – 2018.
55 p. : il.

Orientador: Benito Soto Blanco

Co-orientador: Marília Martins Melo

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais. Escola de Veterinária
Inclui bibliografia

1. Bovino – Teses. 2. Plantas venenosas – Teses. 3. Intoxicação alimentar – Teses.
4. Morte súbita – Teses. I. Blanco, Benito Soto. II. Melo, Marília Martins. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Escola de Veterinária. IV. Título.

CDD – 636.089 59

FOLHA DE APROVAÇÃO

ARISTÓTELES GOMES COSTA

Dissertação submetida à banca examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIA ANIMAL, como requisito para obtenção do grau de MESTRE em CIÊNCIA ANIMAL, área de concentração MEDICINA E CIRURGIA VETERINÁRIAS.

Aprovada em 09 de Fevereiro de 2018, pela banca constituída pelos membros:



Prof. Benito Soto Blanco
Presidente - Orientador



Prof. Felipe Pierezan
Escola de Veterinária - UFMG



Prof. Marina Guimarães Ferreira
Universidade Federal de Lavras - UFLA



Todo o conhecimento humano começou com intuições,
passou daí aos conceitos, e terminou com ideias.

Immanuel Kant

Agradecimentos

A Deus, aquele que me permitiu tudo isso, ao longo de toda a minha vida, e não somente nestes anos, é a Ele que dirijo minha maior gratidão.

À minha família, por sempre estarem presentes. Mesmo que a distância nos separe, sei que sempre estaremos juntos em todos os momentos, não importando se forem alegres ou tristes. Agradeço a vocês eternamente por tudo.

Aos meus pais, Geraldo, vulgo (Nem Velho) e Geralda, vulgo (Nega). Pelo incentivo, apoio, carinho e amor que me oferecem até hoje. Com quem eu aprendi a sempre lutar e nunca abaixar a cabeça, mesmo diante das dificuldades. Amo todos vocês intensamente.

À Mariana, minha esposa e amiga, obrigada pela paciência, segurança, e pelo exemplo de força e dedicação. Por sempre estar ao meu lado, me apoiar, tranquilizar e sempre me ajudar a enxergar o lado bom da vida. Amo você.

Á Pedro, meu filho, que mesmo sem dizer uma palavra devido à condição de recém-nascido, mas com um sorriso ou até pela simples existência trouxe luz e esperança pra minha vida. Amo você.

À Marilândia, minha tia, amiga e segunda mãe, obrigado pela paciência, apoio durante minha estadia na sua casa e em meu período inicial de adaptação na capital, Belo Horizonte. Amo você

Aos professores Benito Soto, Marília Martins, Zélia Inês, Maria Isabel pelos ensinamentos, paciência, disponibilidade, seriedade, dedicação e exemplo profissional me oferecidos desde a graduação.

A todos os amigos e colegas que, de forma direta ou indireta, participaram da minha vida, contribuíram para que eu chegasse à conclusão de mais uma etapa.

À CAPES pela concessão da bolsa de mestrado.

SUMÁRIO

RESUMO.....	9
1. INTRODUÇÃO.....	11
2. OBJETIVOS.....	13
2.1 Objetivo geral.....	13
2.2 Objetivos específicos.....	13
3. REVISÃO DE LITERATURA.....	13
3.1 Intoxicação por plantas tóxicas em animais de produção no Brasil.....	13
3.2 Plantas tóxicas responsáveis pela morte súbita	15
3.3 Intoxicação por monofluoracetato de sódio (MFA).....	16
3.3.1 Produção natural do MFA.....	16
3.3.2 Toxicidade do MFA.....	17
3.3.3 Mecanismo de ação do MFA.....	19
3.3.4 Toxicidade do MFA e das plantas que causam “morte súbita”.....	19
3.3.5 Apresentação clínica da intoxicação por MFA.....	20
3.3.6 Diagnóstico da intoxicação.....	21
3.3.6.1 Diagnóstico diferencial.....	23
3.3.7 Tratamento dos bovinos intoxicados.....	23
3.3.8 Controle e Profilaxia da intoxicação.....	24
3.4 Produção de Dehalogenase pela microbiota ruminal e seu mecanismo de ação.....	27
3.5 Bioquímica Sérica e plasmática.....	31
3.5.1 Glicose Sanguínea.....	32
3.5.2 lactato.....	32
3.5.3 Proteínas Totais.....	33
3.5.4 Albumina.....	34
3.5.5 Gamaglutamiltransferase GGT.....	35
3.5.6 Aspartato aminotransferase AST.....	35
3.5.7 Creatinina.....	36
3.5.8 Ureia.....	37
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	37
4.1 Autorização por Comissão de Ética.....	37
4.2 Obtenção do trifluoroacetato de sódio (TFA).....	37
4.3 Indução da resistência animal ao MFA.....	38
4.4 Avaliação clínica dos bovinos.....	38
4.5 Coleta de sangue periférico para provas bioquímicas séricas e plasmática.....	38
4.6 Material vegetal para desafio dos animais.....	39
4.7 Desafio dos animais.....	39
4.8 Análises estatística.....	40
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	40
5.1 Tabela resultados Glicose.....	40
5.2 Tabela resultados Lactato.....	40
5.3 Tabela resultados Ureia.....	41
5.4 Tabela resultados Creatinina.....	41
5.5 Tabela resultados Proteínas totais.....	41
5.6 Tabela resultados Albumina.....	41
5.7 Tabela resultados Aspartato aminotransferase (AST).....	42
5.5 Tabela resultados Gama-glutamil transferase (GGT).....	42
6. Conclusões.....	48
7. Referências.....	48

LISTA DE ABREVIATURAS

MFA	Monofluoracetato de sódio
TFA	Trifluoroacetato de sódio
MS	Ministério da saúde
CK	Creatinina Quinase
GGT	Gama Glutamiltransferase
AST	Aspartato aminotransferase
PFK	Fosfofrutoquinase
ATP	Adenosinatriposfato
SDH	Sorbitol desidrogenase
F ₂	Fluor
H ⁺	Hidrogênio
CH ₃	Metil
CO ₂	Dióxido de carbono
FCH ₂ N	Composto organofluorado
DL50	Dose letal mediana de uma dada substância para matar 50% de uma população em teste

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - LD ₅₀ do MFA para diferentes espécies animal e a diferença do período do início da sintomatologia e óbito.....	18
Tabela 2 - Classificação das espécies animais de acordo com a localização das alterações anatomopatológicas decorrentes da intoxicação pelo MFA.....	20
Tabela 3 - Níveis plasmáticos de glicose (em mg/dl) em bovinos que receberam TFA (grupo tratado) ou água (grupo controle) por 28 dias consecutivos.....	40
Tabela 4 - Níveis plasmáticos de lactato (em mg/l) em bovinos que receberam TFA (grupo tratado) ou água (grupo controle) por 28 dias consecutivos.....	40
Tabela 5 - Níveis plasmáticos de ureia (em mg/dl) em bovinos que receberam TFA (grupo tratado) ou água (grupo controle) por 28 dias consecutivos.....	41
Tabela 6 - Níveis plasmáticos de creatinina (em mg/dl) em bovinos que receberam TFA (grupo tratado) ou água (grupo controle) por 28 dias consecutivos.....	41
Tabela 7 - Níveis plasmáticos de proteínas totais (em g/dl) em bovinos que receberam TFA (grupo tratado) ou água (grupo controle) por 28 dias consecutivos.....	41
Tabela 8 - Níveis plasmáticos de albumina (em g/dl) em bovinos que receberam TFA (grupo tratado) ou água (grupo controle) por 28 dias consecutivos.....	41
Tabela 9 - Níveis séricos de aspartato aminotransferase (AST, em U/l) em bovinos que receberam TFA (grupo tratado) ou água (grupo controle) por 28 dias consecutivos.....	42
Tabela 10 - Níveis séricos de gama-glutamil transferase (GGT, em U/l) em bovinos que receberam TFA (grupo tratado) ou água (grupo controle) por 28 dias consecutivos.....	42

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Exemplar de <i>Palicourea marcgravii</i> , coletada na propriedade rural de São José do Jacuri – MG.....	39
---	----

Resumo

O monofluoracetato de sódio (MFA) é considerado uma das substâncias mais tóxicas existentes, sendo encontrado naturalmente em plantas responsáveis por causar a síndrome da morte súbita em ruminantes. Devido ao caráter hiperagudo da intoxicação e à impossibilidade de tratamento eficaz, a indução da resistência animal deve ser a melhor ferramenta no controle da intoxicação em ruminantes. Este estudo teve por objetivo promover resistência em bovinos aos efeitos tóxicos do MFA, por meio da sua degradação pela microbiota ruminal pela administração de trifluoroacetato de sódio (TFA). Foram utilizados 10 bovinos, separados em dois grupos: grupo controle (N=3) e grupo tratado (N=7). Os animais do grupo tratado receberam TFA, enquanto os do grupo controle receberam água, ambos por 28 dias consecutivos. Os animais foram submetidos à avaliação física diária e à determinação bioquímica sanguínea semanal: glicose, lactato, proteínas totais, albumina, GGT, AST, creatinina e ureia, com intuito de identificar qualquer sinal de intoxicação. No final dos 28 dias de tratamento com TFA ou água, foi realizada a administração das folhas de *Palicourea marcgravii*, para determinar a ocorrência de resistência. A aplicação do TFA não foi responsável por nenhuma alteração clínica ou bioquímica sanguínea. A administração de *P. marcgravii* induziu alterações clínicas nos bovinos do grupo controle, mas nenhuma alteração foi observada nos animais do grupo tratado. Assim, a administração do TFA a bovinos induz a resistência à intoxicação pelo MFA.

Palavras-chave: intoxicação, monofluoracetato, morte súbita, antitóxico, substrato, Palicuorea.

Abstract

Monofluoroacetate (MFA) is considered one of the most toxic substances known, and it is found naturally in plants responsible for causing sudden death syndrome in ruminants. Due to the hyperacute evolution of the poisoning and the impossibility of effective treatment, the induction of animal resistance might be the best tool to control MFA poisoning in ruminants. The objective of this study was to promote resistance in cattle to the toxic effects of MFA through its degradation by the ruminal microbiota after administration of sodium trifluoroacetate (TFA). Ten calves were used, distributed into two groups: control group (N=3) and treated group (N=7). The animals from the treated group received TFA, while those in the control group received water, both for 28 consecutive days. The animals were submitted to daily clinical evaluation and weekly blood biochemical determination, in order to identify any sign of poisoning. After 28 days of administration of TFA or water, application of the leaves of *Palicourea marcgravii* was performed to determine the occurrence of resistance. The administration of TFA was not responsible for any clinical or biochemical changes in blood. The administration of *P. marcgravii* induced clinical changes in the control group of cattle, but no alteration was observed in the animals of the treated group. Thus, the administration of TFA to cattle induces resistance to MFA poisoning.

Keywords: intoxication, monofluoroacetate, sudden death, antitoxic, substrate, Palicourea.

1. INTRODUÇÃO

O monofluoracetato de sódio (MFA), também conhecido como composto 1080, é considerado uma das substâncias mais tóxicas conhecidas. Foi extraído e sintetizado pela primeira vez na Bélgica, em 1896, a partir de extrato da planta *Dichapetalum cymosum*, conhecida como gifblaar (termo em africânder que significa “folha de veneno”) (Chenoweth *et al.*, 1949). Foi patenteado em 1927 como um potente preventivo contra traças, se destacando no cenário mundial como peça fundamental em campanhas públicas de combate a determinadas pragas. Entretanto, devido à sua elevada toxicidade, foi responsável por inúmeros casos de intoxicações acidentais e intencionais, frequentemente fatais, tanto de humanos quanto de animais (Sayama e Brunetti, 1952).

Este composto halogenado pertence à classe de produtos químicos conhecidos como fluoroacetatos, com fórmula química FCH_2COONa , é um pó branco, inodoro, não volátil e solúvel em água. Na natureza, é sintetizado por meio do mecanismo de halogenação, que se baseia na introdução enzimática de um halogênio no caso Flúor (F_2), em substituição de um hidrogênio (H) do hidrocarboneto. Esse composto pode ser encontrado naturalmente em plantas responsáveis por causar a síndrome da morte súbita, ou na forma sintética como um “sal”. As plantas produtoras de fluoroacetato no Brasil pertencem a três famílias botânicas amplamente distribuídas pelo território: Rubiaceae, Malpighiaceae e Bignoniaceae. Além dessas, existem inúmeras outras famílias com características botânicas diferentes que compartilham o mesmo composto tóxico, distribuídas por vários países, como Austrália e continente africano (Nogueira *et al.*, 2011; Tokarnia *et al.*, 2012).

No Brasil, o prejuízo decorrente da intoxicação por plantas tóxicas é frequente na atividade dos pecuaristas, se baseando principalmente em perdas por óbito dos animais acometidos e substituição do rebanho. Devido à gravidade das alterações clínicas, os animais geralmente vêm a óbito antes que haja qualquer possibilidade de atendimento clínico, caso contrário, tentativas de tratamento, geralmente pouco eficientes, resultariam em maiores perdas econômicas. Adicionalmente, pode haver óbito de animais multiplicadores, e conseqüente perda do valor genético do rebanho, além de gastos com exames para auxiliar no diagnóstico e mudança de manejo com o intuito de evitar áreas ou pastagens com maior ocorrência (Riet-Correa e Medeiros, 2001).

Levantamentos em arquivos de laboratórios de análises clínicas em Medicina Veterinária revelaram que, dos casos de bovinos analisados, aproximadamente 5% estão relacionados a óbito por ação de plantas tóxicas no período de um ano. Sendo assim, aproximadamente três mil bovinos morrem intoxicados diariamente no Brasil ao longo do ano. Possibilitando que as plantas tóxicas assumam a terceira posição de destaque entre as principais causas de mortalidade de bovinos no país, perdendo apenas para toxinfecção por botulismo e infecção pelo vírus da raiva (Pessoa *et al.*, 2013).

Na maioria dos casos de intoxicação animal com ocorrência de óbito, não há diagnóstico concreto e/ou geralmente não são enviadas amostras para laboratório para realização de análises, devido muitas vezes, à distância entre as propriedades e os

centros urbanos e, conseqüentemente, laboratórios. Já outra situação que corrobora para o desconhecimento da etiopatogênica, é a falta de interesse do proprietário ou até mesmo do profissional que está atendendo o caso, em obter diagnóstico mais preciso. Uma vez que o sinal clínico de intoxicação na maioria das vezes não é patognômico, com isso dificultando um diagnóstico somente com necropsia e sem exames complementares (Silva *et al.*, 2016).

Portanto, a dificuldade para mensurar as reais perdas econômicas causadas pela ingestão de plantas tóxicas está associada à escassez de informações e de uma possível dependência dos dados elaborados por laboratórios de diagnóstico, que geralmente se restringem as suas respectivas áreas de abrangência, que nem sempre coincidem com locais de prevalência da produção pecuária, levando a subestimação das reais perdas econômicas na pecuária brasileira em decorrência de intoxicação por plantas tóxicas (Rondelli *et al.*, 2017).

A intoxicação pelo MFA ocorre pela sua semelhança estrutural entre os radicais FCH_2N do fluoracetato com o radical CH_3 do acetato, possibilitando que o MFA seja incorporado ao ciclo de Krebs, por mimetismo. Nesse ciclo, o MFA reage com a acetil-coenzima A, formando o fluoroacetilCoA, que então conjuga o oxaloacetato por meio da condensação da citrato-sintetase, resultando em fluorocitrato. Esse último inibe a enzima aconitase, ocasionando interrupção do metabolismo energético celular e, conseqüentemente, hipóxia citotóxica (Collicchio-Zuanaze e Sakate, 2005). Deste modo, o efeito tóxico não é produzido pela ação direta do MFA, mas sim pela formação do metabólito ativo “fluorocitrato”. Esse mecanismo é, portanto, conhecido como “síntese letal”, por ocasionar morte do indivíduo por hipóxia celular (Riet-Correa *et al.*, 2001).

Uma das conseqüências da interferência do MFA sobre o ciclo de Krebs é o acúmulo de citrato, devido a sua não utilização, e de lactato, em decorrência da maior formação por meio da glicólise anaeróbica. O acúmulo de citrato ocorre em praticamente todos os tecidos, principalmente no miocárdio, no SNC e, em menor quantidade, no fígado. Adicionalmente combina-se com o cálcio, quelando-o, levando a conseqüente hipocalcemia (Melo *et al.*, 2005). Já o lactato o aumento da sua concentração é responsável pela queda do pH sanguíneo (Collicchio-Zuanaze *et al.*, 2005).

O tratamento da intoxicação geralmente é inviável, devido à evolução clínica hiperaguda (Nogueira *et al.*, 2011; Tokarnia *et al.*, 2012). Deste modo, a mortalidade de ruminantes por plantas tóxicas que contêm o fluoracetato é muito grande, com prevalência estimada em 5% da população total, com a incidência variável em decorrência do efeito da sazonalidade na produção das pastagens (Silva *et al.*, 2016). Assim, o desenvolvimento de uma forma de prevenção para esta mortalidade representará um impacto econômico significativo na pecuária nacional. Uma das técnicas disponíveis para evitar a intoxicação é a indução do condicionamento aversivo, fazendo com que os animais sejam condicionados a associar a ingestão da planta com desconforto. No entanto, este condicionamento deve ser aplicado por pessoal treinado e

repetido em todo o rebanho anualmente (Barbosa *et al.*, 2008; Pacífico da Silva e Soto-Blanco, 2010). Assim, é necessário o desenvolvimento de outra técnica de prevenção que seja de fácil aplicação e de baixo custo.

Uma estratégia para prevenção da intoxicação por diversos compostos em ruminantes está na manipulação da microbiota ruminal (Dominguez-Bello, 1996; Cheeke, 1998; Berny *et al.*, 2006). Neste sentido, a indução da resistência ao MFA mediada pela utilização de bactérias que produzem dehalogenases, enzimas inativadoras desse composto tóxico, vem sendo estudada com o objetivo de minimizar ou mesmo evitar a ocorrência de casos de intoxicações (Pessoa *et al.*, 2015).

Diante desse contexto, a solução prática para a prevenção da intoxicação por plantas que contêm MFA, exemplo, *Palicourea marcgravii*, vulgarmente conhecida como: cafezinho, café-bravo, erva de rato, roxinha, vick. Está na utilização de análogos atóxicos desse composto, que apresentam ampla margem de segurança toxicológica, para induzir a proliferação de bactérias produtoras da halogenase no rúmen dos animais a partir da presença do substrato.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Promover resistência em bovinos aos efeitos tóxicos do MFA, por meio da sua degradação pela microbiota ruminal pela administração do substrato trifluoroacetato de sódio (TFA).

2.2. Objetivos específicos

- Avaliar a segurança toxicológica do uso do trifluoroacetato de sódio em bovinos, em doses capazes de induzir a proliferação de bactérias produtoras de halogenase.
- Determinar se há resistência em bovinos à intoxicação por *P. marcgravii* após a administração diária de trifluoroacetato de sódio.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Intoxicações por plantas tóxicas em animais de produção do Brasil

Historicamente, a pecuária é uma das mais importantes e tradicionais atividades econômicas no Brasil. Essa atividade ocupou, inicialmente, terras da região do Nordeste brasileiro, mas, com o avançar das inovações tecnológicas e a expansão das fronteiras agrícolas, dispersou-se por todo o território nacional. Segundo dados do Censo

Agropecuário do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), o rebanho bovino brasileiro no corrente ano foi estimado em torno de 218 milhões de cabeça de gado. Segundo a Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura (FAO, 2015), este número supera a população humana, representando o maior rebanho comercial do mundo, e o segundo colocado no *ranking* mundial dos maiores rebanhos bovino, atrás apenas da Índia.

No Brasil, o processo de ocupação e povoamento do território geralmente é descrito pelo ditado popular como “seguiu o rastro do boi”. A pecuária desenvolveu-se inicialmente em torno dos engenhos de cana-de-açúcar situados no Nordeste do país. O gado criado nesses locais era utilizado na alimentação, produção de couro e leite, além da tração animal fundamental nos trabalhos para a obtenção do açúcar. Com a expansão das lavouras de cana-de-açúcar ao redor dos engenhos, foi necessário encontrar pastagens cada vez mais distantes para a criação de gado (Valverde, 1967).

A migração e expansão da pecuária demandaram novas áreas, geralmente não utilizadas para atividades econômicas concorrentes, possibilitando a ocupação de regiões antes pouco povoadas, a exemplo do Centro-Oeste e Norte do país, especialmente na região Amazônica. O processo de deslocamento da pecuária pelo território nacional a procura de terras mais baratas, permitiu o contato com novas plantas tóxicas, visto que, a flora nativa brasileira apresenta grande diversidade de plantas tóxicas particulares de cada região, principalmente aquelas responsáveis por produzirem o composto tóxico MFA (Pessoa *et al.*, 2013).

Na maioria dos estabelecimentos agropecuários, os animais de produção ainda são criados em sistema extensivo ou semiextensivo utilizando, para isso, pastagens nativas ou cultivadas, permitindo maior acesso dos animais às plantas tóxicas (Gomes, 2006). Esses sistemas de produção são amplamente utilizados no Brasil, devido a sua ampla extensão territorial. Em algumas situações, também pode ser devido à existência de uma cultura extrativista predatória, atividade caracterizada por retirar da natureza recursos que no caso da pecuária são: minerais, vegetais e água de forma indiscriminada sem preocupação de preservá-los ou até mesmo restituí-los.

Adicionalmente, segundo estudos realizados pela FAO (2009), o Brasil possui em torno de 20% das pastagens em situação de degradação localizadas, principalmente nas regiões com maior aglomeração de animais. Além disso, grande parte dessas pastagens se apresentam em locais de recente desmatamento ou com grau severo de degradação, com solos lixiviados, compactados e com grande presença de plantas invasoras. Esses fatores colaboram para aumentar a incidência de casos de intoxicação por plantas tóxicas no território brasileiro (Tokarnia *et al.*, 2012).

Entretanto, existem inúmeros outros fatores na epidemiologia da intoxicação dos animais, tão importantes quanto a simples presença destas plantas produtoras de MFA coabitando com os animais, para determinação dos casos de intoxicação. Situações como a “facilitação social”, quando ocorre influência de um animal adaptado a determinadas plantas, sobre outros recém-introduzidos no local. No caso de animais

debilitados e/ou submetidos à situação de fome, sede e pastagens degradadas, estes perdem momentaneamente parte da capacidade de discernimento e acabam ingerindo plantas que normalmente não seriam ingeridas (Tokarnia *et al.*, 2012; Oliveira *et al.*, 2013).

3.2 Plantas tóxicas responsáveis pela “morte súbita”

A expressão “morte súbita” geralmente é empregada para descrever a circunstância em que o animal morre em curto período, geralmente minutos, após o início da manifestação da sintomatologia clínica. Quando da ocorrência da intoxicação pelo MFA, a hiperagudicidade decorrentes da hipóxia, hipocalcemia e queda do pH, faz com que, muitas vezes, o proprietário já encontre o animal morto ou simplesmente seja possível apenas observa a estase da jugular, que é a alteração primária nos bovinos antes do óbito (Riet-Correa *et al.*, 2001; Pedroza, 2015).

Geralmente, o MFA é encontrado em plantas tropicais e subtropicais em diversas concentrações, devido à influência do solo, idade, época do ano e espécie vegetal. Essas plantas crescem em uma variedade ampla de tipos de solo e pH, abrangendo territórios de solo ácido a básico, incluindo também solos arenosos a argilosos. No continente Africano, as plantas que produzem MFA pertencem ao gênero *Dichapetalum*, ocupando geralmente as regiões de baixo relevo das savanas. Diferente das outras espécies produtoras de MFA em outras regiões, onde são nas folhas que há a maior concentração do composto tóxico, o princípio tóxico encontra-se majoritariamente nas sementes, podendo atingir aproximadamente 8000 mg/kg, concentração mais alta já registrada em partes de plantas (Leong *et al.*, 2017).

Na Austrália, existem cerca de 40 espécies de plantas comprovadamente capazes de produzir o MFA, pertencentes aos gêneros *Gastrolobium*, *Oxylobium* e *Acacia*. Essas plantas são amplamente distribuídas pelo território daquele país. Entretanto, *Gastrolobium grandiforum*, que contém por volta de 2600 mg/kg de MFA, mesmo não sendo a mais tóxica, é responsável pela maioria dos casos de intoxicação em bovinos devido a sua maior abundância nas regiões de prática da pecuária (Stephen *et al.*, 2014).

Já na América do Sul, diferente dos outros locais, a planta que tem se destacado é a *Palicourea marcgravii*, a qual pode conter níveis de até 500 mg/kg de MFA, principalmente localizado em suas folhas. Isso se deve pelo característico regime pluviométrico mais distribuído, solos mais ácidos, entre outros fatores edafoclimáticos presentes na região. Entretanto, existem inúmeras outras plantas sul-americanas que já foram confirmadas com a presença do MFA, como por exemplo, as dos gêneros *Amorimia* e *Fridericia* (anteriormente *Arrabidaea*). É provável que existam outras espécies que ainda não foram identificadas no continente Sul-Americano devido principalmente, a uma possível existência dessas plantas em locais ainda pouco explorados e pela grande diversidade botânica (Brand *et al.*, 2005).

No Brasil, devido à similaridade das características edafoclimáticas entre os países Sul-americanos, não existe uma grande divergência das espécies botânicas relacionadas à produção do MFA. No entanto, observa-se maior presença dessas plantas principalmente em áreas de solos básicos e férteis. Com isso os gêneros *Palicourea*, *Amorimia* e *Fridericia* também estão catalogados no Brasil como em países vizinhos (Tokarnia e Döbereiner, 1981).

As espécies de plantas responsáveis por “morte súbita” no Brasil já são bastante estudadas e pertencem às famílias Rubiaceae, Malpighiaceae e Bignoniaceae (Lee *et al.*, 2012; Tokarnia *et al.*, 2012). As espécies da família Rubiaceae incluem *Palicourea marcgravii* (Moraes, 1993), *Palicourea aeneofusca* (Vasconcelos *et al.*, 2008b), *Palicourea juruana* (Oliveira *et al.*, 2004) e *Palicourea grandiflora* (Schons *et al.*, 2012), e se caracterizam por arbustos que podem atingir até dois metros de altura e com boa palatabilidade. A família Malpighiaceae inclui as espécies *Amorimia (Mascagnia) rigida* (Vasconcelos *et al.*, 2008a), *Amorimia (Mascagnia) pubiflora* (Becker, 2013), *Amorimia (Mascagnia) exotropicalis* (Pavarini *et al.*, 2011) e *Amorimia (Mascagnia) amazonica* (Lee *et al.*, 2012), enquanto a família Bignoniaceae inclui as espécies *Fridericia (Pseudocalymma) elegans* (Tavares *et al.*, 1974), *Tanaecium bilabiatum (Arrabidaea bilabiata)* (Krebs *et al.*, 1994) e *Fridericia (Arrabidaea) japurensis* (Tokarnia e Döbereiner, 1981). Nessas duas famílias, as plantas são de porte arbustivo ou cipó, consideradas as plantas tóxicas mais importantes, conhecidas e difundidas da região nordeste, principalmente nos estados da Bahia, Piauí, norte de Minas Gerais e uma pequena parte da região sudeste do Brasil (Vasconcelos *et al.*, 2008b).

P. marcgravii é popularmente conhecida como “Erva-de-rato verdadeira”, “Cafezinho”, “Café-bravo”, “Erva-café” e “Roxinha” (Barbosa *et al.*, 2003). As plantas do gênero *Amorimia* são denominadas como “Tingui”, “Timbó”, “Quebra-bucho”, “Pela-bucho”, “Salsa-rosa”, “Rama-amarela”, “Suma-branca” e “Suma-roxa” (Tokarnia *et al.*, 2012). *T. bilabiatum* é conhecida como “Chibata”, “Gibata” e “Cipó corimbo” (Tokarnia *et al.*, 2004).

O princípio tóxico da maioria das plantas que causam “morte súbita” no Brasil foi identificado como MFA (Lee *et al.*, 2012; Cook *et al.*, 2014), mas provavelmente outras plantas também devam conter o mesmo princípio tóxico. Entretanto devido à dimensão territorial e a diversidade de biomas, é provável que ainda existam espécies deste grupo de plantas que ainda não tiveram o princípio tóxico determinado, mas que de alguma forma também possivelmente participem das frequentes intoxicações (Tokarnia *et al.*, 2012)

3.3. Intoxicação por MFA

3.3.1 Produção natural do MFA

A fluoração, processo pelo qual são produzidos compostos halogenados a partir da adição do F₂ em substratos orgânicos, é convenientemente dividida em três grupos, de

acordo com o produto obtido: perfluoração, trifluorometilação e fluoração seletiva. Aqui aborda-se à fluoração seletiva direta, a qual substitui hidrogênio por flúor (converte uma ligação C-H específica de um substrato em uma ligação C-F), portanto o que acontece na síntese natural da molécula do MFA em plantas, bactérias e fungos (Boechat *et al.*, 2014).

Na bactéria *Streptomyces cattleya*, o processo de fluoração é catalisado pela enzima fluorinase. Essa enzima catalisa a primeira etapa da via de síntese de metabólitos fluorados como o fluoroacetato e a 4-fluorotreonina, que consiste na formação de uma ligação C-F através de um ataque nucleofílico do flúor sobre a coenzima S-adenosil-L-metionina. Concomitantemente, há liberação de L-metionina para gerar a 5-fluoro-5-desoxiadenosina, o qual é posteriormente convertido no MFA (Leong, 2017).

Porém, o mecanismo de resistência da *Streptomyces cattleya* ao MFA não está bem esclarecido. Acredita-se que está relacionado com a produção de uma tioesterase específica de fluoroacetil-CoA, a qual hidrolisa seletivamente fluoroacetil-CoA sobre acetil-CoA e exibe uma eficiência catalítica 106 vezes maior para fluoroacetil-CoA em comparação com acetil-CoA (Domg *et al.*, 2004). No caso das plantas, ainda não foi comprovado se os metabólitos fluorados produzidos são sintetizados através de um mecanismo semelhante, mas pelo que se observa a reação de fluoração é uma reação exergônica necessitando, portanto, de enzimas específicas para catalisar o processo, não diferente do que ocorre em outros organismos produtores de MFA (Cardoso, 2015).

3.3.2 Toxicidade do MFA

Em toxicologia, a DL50 (dose letal mediana) é a dose necessária de uma dada substância para matar 50% de uma população em teste. Sendo geralmente medida em miligrama de substância por quilograma do peso corporal (Peixoto *et al.*, 2010). A DL50 de MFA para bovinos está estimada em 0,39 mg/kg, sendo com isso considerada a substância mais tóxica existente para bovinos e outros mamíferos até o momento (Tabela 1) (Peixoto *et al.*, 2010; Nogueira *et al.*, 2011).

Tabela 1: DL50 do MFA para diferentes espécies animal e a diferença do período do início da sintomatologia e óbito.

Espécie Animal	DL50 (mg/kg)	Início dos sintomas após a administração do MFA (horas)	Intervalo entre administração do MFA e o óbito dos animais (horas)
Bovinos (<i>Bos taurus</i>)	0.39	1.5-29	1.5-29.3
Equinos (<i>Equus caballus</i>)	1.0	1.5-2.0	6.0-10.5
Ovinos (<i>Ovis aries</i>)	0.5	6.2-37.6	9.6-61.6
Gatos (<i>Felis gatus</i>)	0.40	1.0-5.6	20.7-21
Coelhos (<i>Oryctolagus cunicullus</i>)	0.34-0.5	1.1-10.1	3.0-44.3
Porco selvagem (<i>Sus scrofa</i>)	1.0	1.9-47.3	2.8-10
Camundongos (<i>Mus musculus</i>)	8.33	1.3-2.8	2.2-68.3
Rato-preto (<i>Rattus rattus</i>)	0.76	0.8-27.8	2.4-36.5
Raposa vermelha (<i>Vulpes vulpes</i>)	0.12	4.1	5.5

Fonte: Adaptado de Orr e Bentley,(1994);Barbosa, (2009); Peixoto, (2010)

O MFA possui grande potencial tóxico para todos os organismos. Sua característica hidrossolúvel possibilita que o animal se intoxique por diversas formas de contato, sendo que as mais comuns são: digestivo, respiratório, conjuntiva e cutânea. A intoxicação pelo MFA pelo trato gastrointestinal é a forma mais comum, porém, tem-se observado vários relatos de intoxicação por feridas abertas, mucosas e epitélio pulmonar (Atzert *et al.*, 1971). É importante salientar que não existe diferença na toxicidade quanto à via de administração entre as espécies susceptíveis (Chenoweth *et al.*, 1949).

Desde a sua disponibilidade na forma sintética, o MFA está relacionado à mortalidade de animais da fauna silvestre, doméstica e em humanos principalmente devido a erros de manejo, prática criminosa e uso descontrolado. O composto se apresenta na forma de um pó de cor branca, inodoro, não volátil e muito solúvel, facilmente dispersado e veiculado na água. Essas características também favorecem que mucosas, conjuntivas e até a própria pele íntegra sejam vias para intoxicação (Animal Health Board, 2002).

O MFA sintético foi introduzido no Brasil como rodenticida em 1965; entretanto, em 1980, seu uso tornou-se restrito a campanhas públicas. Contudo, em 1982, sua fabricação, comercialização e uso, foram proibidos pelo Ministério da Saúde devido a inúmeros relatos de acidentes e crimes envolvendo a forma sintética do MFA. Entretanto, mesmo após a proibição da produção e comercialização, ainda há relatos de casos de intoxicações tanto de animais, quanto de humanos por esta substância, de forma acidental ou criminosa. Geralmente os ruminantes são intoxicados pela sua forma natural (em plantas), enquanto a maioria das intoxicações em monogástricos ocorre pela forma sintética (Nogueira *et al.*, 2011).

A ocorrência dos crimes com o uso do MFA na forma sintética ainda são comuns. Um exemplo ocorreu no zoológico da cidade de São Paulo, em 2004, onde 73 animais morreram envenenados com substância (Ortis, 2005). A ocorrência, 22 anos após a proibição de uso e comercialização pelo ministério da Saúde (MS), é possível devido a uma provável importação clandestina do produto e sua comercialização ilegal no Brasil, para uso como praguicida. Também existe a possibilidade da existência de estoques remanescentes do período de uso permitido, os quais, devido às características estáveis do produto no ambiente, ainda preservam seu potencial tóxico e a possível produção de forma clandestina em laboratórios brasileiros. Portanto, suspeita-se que grande parte de casos de intoxicação por MFA, principalmente em animais de companhia, como cães e gatos, advém da permanência do uso da formulação sintética, com preço baixo e livre acesso por parte da população ao produto no comércio informal (Riet-Correa *et al.*, 2001).

3.3.3 Mecanismo de ação do MFA

A semelhança estrutural entre os radicais FCH_{2n} do fluoracetato com o CH_3 do acetato, permite que o MFA mimetize sua função e se incorpore ao ciclo de Krebs (Collicchio-Zuanaze e Sakate, 2005). No ciclo de Krebs, ao se ligar à acetil-coenzima A, formando o fluoroacetilCoA, conjuga o oxaloacetato por meio da condensação da citratossintetase, resultando no fluorocitrato. Além de não ser transformado em cis-acetonato, o fluorocitrato inibe a enzima aconitase, a qual é responsável por transformar o citrato em isocitrato. Com o bloqueio da aconitase, há a interrupção do metabolismo energético celular, pelo transporte de elétrons e, conseqüentemente, hipóxia citotóxica. Portanto, o efeito tóxico não é produzido diretamente pela presença do MFA, mas sim, pela formação do metabólito ativo fluorocitrato. Deste modo, este mecanismo é conhecido como “síntese letal” (Riet-Correa *et al.*, 2001).

A “síntese letal” está relacionada com a sequência de alterações clínicas que o animal apresenta de forma simultânea. Alterações como hipóxia, acúmulo do citrato responsável pela lesão celular e hipocalcemia aguda, e o lactato responsável pela queda do pH sanguíneo, dos quais ocorrem em praticamente todos os tecidos, principalmente no miocárdio e no sistema nervoso central (SNC) e em menor quantidade no fígado, podendo variar de acordo com a espécie (Collicchio-Zuanaze *et al.*, 2005; Melo *et al.*, 2005).

3.3.4 Toxicidade do MFA e das plantas que causam “morte súbita”

O MFA, além do efeito tóxico irreversível, possui também efeito acumulativo no organismo, e com sua ação tóxica pode ser produzida por doses letais individuais, conforme sensibilidade da espécie e/ou exposição prolongada a doses subletais (Eason e Turk, 2002).

Há grande diferença entre algumas espécies animais, quanto à resistência ao MFA na sua formulação sintética. Em ordem crescente de resistência temos: cão, bovino, ovino/caprino ambos praticamente a mesma resistência, felino doméstico, suíno, equino, aves e homem (Peixoto *et al.*, 2010). No caso dos bubalinos, quando comparado com bovinos, o primeiro apresenta resistência aproximadamente 4 a 6 vezes maior ao efeito tóxico do MFA, fato esse relacionado com as características da microbiota particular dessa espécie de ruminantes (Barbosa *et al.*, 2003).

Na forma natural em plantas a quantidade ingerida necessária para causar intoxicação em bovinos é muito variável entre as espécies vegetais. No entanto, para o composto tóxico MFA sintético, a dose mínima tóxica estimada está entre 0,15 a 0,62 g/kg (Santos *et al.*, 2014). Para ocorrer à intoxicação de bovinos pela ingestão da planta, *P. marcgravii*, sabidamente a mais tóxica da categoria no Brasil, é necessária a ingestão a partir de 0,5 g/kg de folhas verdes (Barbosa *et al.*, 2003). Baseado no princípio da proporção de g/kg de MFA na planta, são consideradas menos tóxicas as plantas do gênero *Amorimonia*, que apresentam dose tóxica letal a partir de 2 g/kg (Becker *et al.*, 2013) e *T. bilabiatum*, com dose tóxica letal de 5 g/kg (Tokarnia *et al.*, 2004).

3.3.5 Apresentação clínica da intoxicação por MFA

Para que haja manifestação clínica da intoxicação, é necessário que se atinja a dose tóxica para o organismo em questão. Fato diretamente relacionado com as variações da sensibilidade e da intensidade dos sinais clínicos manifestados pelas diferentes espécies de animais, quando intoxicadas pelo MFA. As espécies foram classificadas em três categorias, em função da predominância dos efeitos provocados pelo MFA: (I) alterações cardíacas (II) ação no sistema nervoso central; e (III) ação equivalente sobre o coração e sistema nervoso central (SNC), citado por Peixoto *et al.*, (2010).

Os bovinos e ovinos foram agrupados na categoria I, uma vez que o principal efeito do MFA nessas espécies se faz sobre o coração. Os equinos foram incluídos na categoria II, efeito sobre o SNC, e ratos e hamster foram classificados na categoria III, sem predominância de efeitos sobre coração ou SNC, citado por Nogueira *et al.*, (2011).

Tabela 2: Classificação das espécies animais de acordo com a localização das alterações anatomopatológicas decorrentes da intoxicação pelo MFA.

Categoria	Espécie Animal	Alterações anatomopatológicas
I	Bovinos e ovinos	Alterações cardíacas
II	Suínos, macacos, gatos, cães e homem	Alterações SNC
III	Ratos, hamsters e camundongos	Sem predominância

Fonte: citado por Peixoto, (2010);Nogueira, (2011)

Nos bovinos, os sinais clínicos da intoxicação iniciam em torno de poucas horas após a ingestão da dose letal (Freitas *et al.*, 1995). Os principais sinais clínicos observados são: inapetência, atonia ruminal, distensão da jugular, apatia, tremores musculares, inquietação, taquicardia, taquipneia, relutância em movimentar-se, queda repentina, “pedalagem” (movimento que o animal realiza com as patas após o decúbito lateral) e morte dentro de poucos minutos (Serodio *et al.*, 2012).

No entanto, atitudes como submeter animal intoxicado e/ou sob suspeita de intoxicação por MFA à prática de exercícios físicos, como andar ou correr e deixá-lo exposto ao sol, podem precipitar o aparecimento dos sinais clínicos e até mesmo sua morte devido à aceleração do metabolismo e da distribuição do princípio tóxico (Tokarnia *et al.*, 2012).

3.3.6 Diagnóstico da intoxicação

O diagnóstico geralmente é realizado associando as informações obtidas na avaliação física do animal a outros diversos fatores correlatos, tais como o histórico do animal, presença da planta na pastagem e sinais de predação. Caso seja realizada necropsia, é possível, em algumas situações, observar a presença da planta no trato gastrointestinal do animal e alterações macroscópicas como discreta congestão cardíaca, hepática, renal e edema pulmonar moderado. No entanto tais achados da necropsia não são prescindíveis para o diagnóstico, uma vez que não são patognomônicos para tal intoxicação (Tokarnia *et al.*, 2012).

Pode-se ainda realizar exames complementares como bioquímica sanguínea em que se espera observar, em casos de intoxicação por MFA, a presença de hiperglicemia, hiperlactatemia e aumento de citrato sérico (Peixoto *et al.*, 2010; Nogueira *et al.*, 2011). É possível ainda avaliar a presença de lesões hepáticas a partir da determinação das atividades séricas das enzimas aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT), gama glutamiltransferase (GGT) e fosfatase alcalina (FoAl), ou ainda avaliar a função renal pela dosagem de ureia e creatinina séricas (Peixoto *et al.*, 2010).

Existem, ainda, exames mais complexos e específicos para o diagnóstico de alterações celulares, como por exemplo, a análise histopatológica. Esse exame consiste na análise microscópica dos tecidos para a detecção de possíveis lesões existentes, com a finalidade de informar ao clínico a natureza, a gravidade, a extensão, a evolução e a intensidade das lesões, além de sugerir ou até mesmo confirmar a causa da afecção (Almeida *et al.*, 2017).

Em bovinos intoxicados com MFA, as alterações histopatológicas têm sido observadas com predominância nos rins, fígado e coração. No entanto, a degeneração hidrópico-vacuolar dos túbulos renais, associados à picnose nuclear, tem se mostrado de grande importância no diagnóstico da intoxicação, pela sua predominância. Em pelo menos

60% dos animais intoxicados por MFA esta alteração esta presente, entretanto, não sendo achados patognomônicos (Tokarnia *et al.*, 2000).

Adicionalmente, pode se constatar no fígado a presença de edema no espaço de Disse, tumefação difusa dos hepatócitos e moderado infiltrado inflamatório (Nogueira *et al.*, 2010; Peixoto *et al.*, 2010). No coração, ocorre a presença de severa tumefação e vacuolização de cardiomiócitos, com distribuição multifocal à difusa com fibras cardíacas esparsas e com citoplasma vacuolizado. Pode-se observar ainda, necrose individual de cardiomiócitos, com distribuição esparsa e geralmente de intensidade discreta, caracterizada por hipereosinofilia citoplasmática, perda das estriações e, por vezes, cariopcnose (Barbosa *et al.*, 2015).

As alterações histopatológicas, específicas em cada órgão, possivelmente são dependentes de variáveis, como, grau de permeabilidade da membrana celular ao MFA, demanda energética, capacidade de metabolização do composto tóxico e diferenças morfológicas e funcionais entre grupos celulares. Já a grande presença de células inflamatórias nos órgão lesados é justificada pela lesão celular ou necrose tecidual no que resulta na liberação de citocinas na circulação, que ativam as células de defesa levando à migrações de células pró-inflamatórias para estes sítios (Peixoto *et al.*, 2010).

No processo da “síntese letal”, a hipóxia provocada pela diminuição da fosforilação oxidativa tem como principal consequência, o desequilíbrio na manutenção da integridade das células. Principalmente na bomba de sódio e potássio, onde há um aumento do influxo de cálcio, água e sódio, com saída de potássio para o meio extracelular. Ao mesmo tempo, ocorre aumento na glicólise, com exaustão das reservas de glicogênio, acúmulo de ácido lático e consequente redução do pH sanguíneo. Essa desestruturação celular, com alterações na permeabilidade da membrana, induz a liberação de fosfolipases, ativa enzimas lisossômicas e libera radicais livres, podendo evoluir para lesão irreversível e morte celular (Collicchio-Zuanaze e Sakate, 2005).

O processo de lesão e morte celular, causado pela ação do MFA, pode levar a liberação de enzimas de indução ou extravasamento, funcionando assim como mecanismo de diagnóstico em casos de intoxicação. Como exemplo a espécie bovina, que apresenta principalmente acometimento cardíaco, com ocorrência de lesões e morte celular, que resultam no extravasamento das enzimas troponinas (Tn-I e Tn-T) e creatina quinase (CK-MB). Essas enzimas podem ser mensuradas a partir de exames de bioquímica sérica, constituindo importante método de diagnóstico para casos de intoxicação em bovinos (Peixoto *et al.*, 2010).

A cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) é uma ferramenta analítica laboratorial de diagnóstico, amplamente utilizada na toxicologia veterinária para pesquisa de compostos endógenos ou exógenos e/ou seus metabólitos em matriz biológica, a exemplo do MFA. Essa metodologia investigativa tem valor qualitativo quando usada sozinha, indicando a presença ou ausência da substância na amostra (Rissi *et al.*, 2007). Entretanto, apresenta baixa especificidade devida interferência de outras

substâncias na matriz biológica a exemplo do ácido acético muito frequente em amostras de fluido ruminal (Cassiano *et al.*, 2009).

No entanto, quando a CLAE é usada acoplada ao espectrômetro de massas (Cromatografia Líquida acoplada à Espectrometria de Massas - LC-MS), tem valor qualitativo e quantitativo e não sofre influência de impurezas da amostra. O LC-MS, além de indicar, a presença ou ausência da substância, ainda faz sua identificação química, por meio da sua identidade atômica. Portanto, trata-se de uma metodologia de alta especificidade e sensibilidade capaz de trabalhar com concentrações de picogramas (Lanças, 2009).

3.3.6.1 Diagnóstico diferencial

No Brasil existem diversas doenças de bovinos marcadas pela hiperagudicidade das alterações clínico-patológicas. Portanto, sempre que houver a ocorrência de morte súbita no rebanho, é necessário realizar exame diferencial. Doenças infecciosas a exemplo da babesiose cerebral e enterotoxissêmicas como, carbúnculo sintomático (Silva *et al.*, 2016). Adicionalmente, plantas cianogênicas, intoxicação por ureia e picada de cascavel, também podem compor a lista de diagnósticos diferenciais (Tokarnia *et al.*, 2012).

Portanto, diante da diversidade de agentes correlatos para um possível diagnóstico precoce, é de extrema importância à realização de exame físico minucioso, avaliação do histórico do animal e coleta de material biológico, tanto *ante mortem* quanto *post mortem*, para a realização de exames para se obter um diagnóstico conclusivo confiável (Pavarini *et al.*, 2011).

3.3.7 Tratamento dos bovinos intoxicados

A complexidade e abrangência dos mecanismos envolvidos na intoxicação pelo MFA (Moraes, 1993), associado ao caráter hiperagudo da doença (Barbosa *et al.*, 2003), dificulta a disponibilidade de antídoto específico para a intoxicação ou até mesmo um tratamento adequado para o animal. Não existem substâncias que sejam capazes de reverter, remover, ou inativar o fluorocitrato que já tenha sido formado, somente substâncias paliativas para efeitos secundários da sua acumulação (Tokarnia *et al.*, 2012). Produtos denominados doadores de acetato, exemplo da acetamida na concentração 2,5 a 5,0 g/kg, via oral logo após ingestão da planta, associada à aplicação de acetato de glicerol (Monoacetin®) intramuscular 0,5 mg/kg a cada 30 minutos durante o tempo de instabilidade do quadro clínico pode apresentar bons resultados na terapêutica da intoxicação (Nogueira *et al.*, 2011).

É importante destacar que a acetamida, dentre os doadores de acetato, ainda se constitui como o melhor para tratamento da intoxicação por MFA em bovinos. Sua característica

de precursora de acetato (referido como “doador de acetato”), é capaz de reduzir a inibição competitiva do MFA pelo mesmo sítio ativo CoA, impedindo ou reduzindo assim, a ocorrência da chamada “síntese letal” (Peixoto *et al.*, 2012).

Já o acetato de glicerol fornece um aporte energético para o animal, que geralmente já se encontra com déficit de ATP. Por fim o bicarbonato de cálcio pelas suas características tamponantes tem oferecido bons resultados no restabelecimento do pH decorrente da acidose metabólica, além de fonte de cálcio para suprir a hipocalcemia relacionada a quelação pelo citrato (Collicchio-Zuanaze, 2002).

É fundamental a realização de fluidoterapia intravenosa, adicionada de tamponantes, exemplo do bicarbonato de cálcio na concentração e volume de acordo com o déficit de base do animal. Sendo este o melhor protocolo de tratamento e suporte clínico para bovinos intoxicados por MFA (Cook, 2001; Barbosa *et al.*, 2003). Entretanto, apesar de se falar deste protocolo, ainda é baixo o índice de tratamento dos animais intoxicados. Fato esse possivelmente relacionado à rapidez com que óbito ocorre, deficiência de conhecimento técnico dos Médicos Veterinários sobre uso dos protocolos de tratamento intensivo na Medicina Veterinária e da pouca disponibilidade e com alto custo da acetamida e do acetato de glicerol no mercado (Peixoto *et al.*, 2012).

3.3.8 Controle e profilaxia das intoxicações

O conhecimento da epidemiologia das intoxicações por plantas tóxicas é muito importante para o estabelecimento e a implantação de medidas profiláticas. No Brasil existem inúmeras medidas e ferramentas para mitigação de risco de intoxicação de ruminantes. Entretanto, não se sabe ao certo por qual motivo, mas especula-se que, por questões de erro de manejo ou até mesmo extensão territorial, estas medidas preventivas muitas vezes se tornam ineficazes (Riet-Correa *et al.*, 2001).

Dentre as opções de manejo, a mais importante, é a restrição de espaço, para evitar que os animais entrem em contato ou permaneçam no local de presença de plantas tóxica, (Riet-Correa *et al.*, 2001).

Alternativas, não menos importantes incluem o manejo eficiente dos animais e das pastagens; evitar pastejo excessivo e superlotação para que não falte forragem em qualidade e quantidade, principalmente nas épocas de estiagem; suplementação mineral adequada para cada categoria (Tokarnia *et al.*, 2012).

Realizar controle biológico com auxílio de microrganismos patogênicos para o tipo de planta em questão (Morandi e Bettiol, 2009). Prévio pastoreio de animais de espécies ou idades resistentes a determinadas plantas; evitar colocar animais recentemente transportados com fome e/ou sede em pastagens contaminadas por plantas tóxicas (Riet-Correa *et al.*, 2001).

Também é possível a realização do controle manual (arrancar ou capinar), mecânico (roçadeira ou aração) ou químico (herbicidas) das plantas tóxicas. Até mesmo o simples cuidado na utilização de sementes controladas para evitar a difusão de espécies tóxicas em pastagens em fase de implantação (Tokarnia *et al.*, 2012).

O cercamento das reservas (Reserva Legal e/ou Área de Preservação Permanente), tipos mais comuns de acordo com a legislação ambiental brasileira, com arames ou outro dispositivo de restrição, tem o mesmo princípio da restrição de espaço supracitado. No entanto, muito mais importante não só pelos aspectos de preservação ecológica, mas também pelo fato de que nestes locais geralmente há uma concentração de plantas tóxicas muito superiores quando comparados às pastagens. Grande parte das espécies de plantas tóxicas apresenta significativa sensibilidade à variação da radiação solar. Portanto, estas plantas encontram-se em menor número, ou até mesmo inexistem em pastagens abertas e estabelecidas onde a radiação solar é alta, também no interior das reservas onde a radiação solar é muito baixa. Com isso, geralmente se observa maior concentração de plantas tóxicas nas bordas de matas (“reservas”), em relação aos outros ambientes supracitados, facilitando seu isolamento dos animais (Riet-Correa *et al.*, 2001; Tokarnia *et al.*, 2012).

Alguns estudos têm sido realizados no intuito de desenvolver a aversão alimentar condicionada, com aplicação de cloreto de lítio, com auxílio da sonda ruminal ou pistolas dosadoras logo após a ingestão da planta que se quer evitar o consumo. Esta técnica se mostrou eficaz para evitar que ruminantes ingiram plantas que contenham MFA, entretanto é de difícil aplicação em escala de rebanho, devido à exigência do manejo individual. Ademais, foi observado que os animais perdem a aversão a curto período (Barbosa *et al.*, 2008; Pacífico da Silva e Soto-Blanco, 2010; Oliveira *et al.*, 2013).

Uma forma interessante de promover a resistência dos animais foi o desenvolvimento de bactérias transgênicas capazes de degradar o fluoroacetato com capacidade de se adaptar e sobreviver no fluido ruminal. Essas bactérias são produtoras da enzima halogenase, por meio da incorporação de plasmídeo contendo a codificação genética para a produção da enzima. Deste modo, a inoculação dessas bactérias no conteúdo ruminal visa promover a resistência dos animais à intoxicação por plantas que contenham o MFA (Gregg *et al.*, 1994; Mayer e Van Rooyen, 1994; Gregg *et al.*, 1998).

No entanto, por se tratar de um microrganismo geneticamente modificado, deve-se ter precauções quanto à sua ampla disseminação, além de sua produção, manutenção e transporte para evitar a inviabilização do microrganismo. Além disto, a população dessa bactéria, na microbiota ruminal, sofre redução substancial na ausência do substrato resultando na necessidade de sua reaplicação periódica, ademais o uso de microrganismos transgênicos esbarra em legislações sanitárias nacionais (Pessoa *et al.*, 2013).

Alguns estudos revelaram que dentre grupos de animais que ingeriam subdoses de plantas diariamente, alguns desses morriam em decorrência da dose tóxica pelo efeito

acumulativo, e outros exigiam doses significativamente altas em relação a DL50 para a espécie ao longo do tempo. Fetzner e Lingers (1994) pesquisando a microbiota de animais resistentes ao MFA identificaram que tal resistência se deve à presença de bactérias ruminais que degradavam o MFA via enzima dehalogenase. Observaram que tais bactérias pelo mecanismo natural de degradação no rumem, hidrolisavam o MFA, tornando-o indisponível para ser absorvido.

Já pesquisadores brasileiros realizaram diversos experimentos aonde foi possível estudar e isolar bactérias que degradam MFA no rúmen de búfalos e caprinos, criados na região do nordeste brasileiro com grande presença de plantas do gênero *Amorimia*. Esses estudos demonstraram que estas bactérias já existiam no rúmen em pequeno número, mas que a alimentação com plantas que contém MFA estimula a sua multiplicação em decorrência da presença do substrato (Camboim *et al.*, 2012b). Este achado poderia explicar a maior resistência de animais mantidos em áreas endêmicas para este tipo de planta, em relação aos mantidos em áreas livres da planta (Silva *et al.*, 2016).

Além disso, foi demonstrado que a administração de pequenas quantidades de folhas verdes de plantas das famílias Malpighiaceae (Duarte *et al.*, 2013) e Rubiaceae (Oliveira *et al.*, 2013) induz resistência parcial em caprinos, quando o fluido ruminal de animais resistentes foi transfundido para outros animais, estes demonstraram aumento da resistência. Camboim *et al.* (2012b) ratificaram a hipótese que grande parte do fator de resistência animal à intoxicação por MFA se dá pela ação da enzima dehalogenase, produzida por uma gama de bactéria ruminal primitivas.

A capacidade das bactérias ruminais em processar alimentos de origem vegetal, antes da sua passagem para as demais porções do sistema digestório, possibilita que os ruminantes sejam frequentemente mais resistentes e adaptados a diferentes regiões quando comparados aos não ruminantes. No entanto, a presença de tais bactérias ruminais, evolutivamente vai além da simples função digestiva. Grande parte dessas bactérias, durante a degradação da celulose e outros polissacarídeos vegetais são capazes de degradar compostos tóxicos e proporcionar aos ruminantes a possibilidade de ingerir plantas tóxicas sem que ocorra intoxicação (Dominguez-Bello, 1996; Cheeke, 1998).

A capacidade de detoxificação ruminal vem sendo estudada como alternativa para desempenho zootécnico, nutricional, sanitário, e agora no controle de intoxicações e redução de perdas econômicas, muito frequentes no Brasil e no mundo. O estudo das bactérias detoxificantes de MFA no rúmen, iniciadas na Austrália, visa ampliar as possibilidades para controle de intoxicações por plantas e micotoxinas. Desta forma, a detoxificação de compostos nocivos ao organismo animal resultará na redução das perdas diretas pela substituição dos animais mortos, ou indiretas pelo tratamento dos doentes (Gregg *et al.*, 1994; Mayer e Van Rooyen, 1994; Gregg *et al.*, 1998).

Nesta linha de promoção da degradação ruminal, foram desenvolvidas bactérias transgênicas capazes de degradar o fluoroacetato, e com capacidade de se adaptar e sobreviver no fluido ruminal. Essas bactérias são produtoras da enzima halogenase, por

meio da incorporação de plasmídeo contendo a codificação genética para a produção da enzima. Deste modo, a inoculação dessas bactérias no conteúdo ruminal visa promover a resistência dos animais à intoxicação por plantas que contenham o MFA (Gregg *et al.*, 1994,; Mayer e Van Rooyen, 1994 Gregg *et al.*, 998). No entanto, por se tratar de um microrganismo geneticamente modificado, deve-se ter precauções quanto à sua ampla disseminação, além de sua produção, manutenção e transporte para evitar a inviabilização do microrganismo. Além disto, a população dessa bactéria, na microbiota ruminal, sofre redução substancial na ausência do substrato resultando na necessidade de sua reuplicação periódica (Pessoa *et al.*, 2013).

Para evitar o uso de bactérias transgênicas, alguns estudos brasileiros recentes isolaram, do solo e de plantas, espécies de bactérias produtoras de halogenase (Camboim *et al.*, 2012a). Posteriormente, esses estudos demonstraram o aumento da resistência à intoxicação por plantas produtoras de MFA em caprinos, inoculados com algumas destas bactérias degradadoras de MFA, especialmente *Ancylobacter dichloromethanicus* e *Pigmentiphaga kullae* isoladas do conteúdo ruminal (Camboim *et al.*, 2012b). Além disso, foi verificado que essa resistência pode ser transmitida de animais resistentes para animais susceptíveis pela transfaunação de conteúdo ruminal. No entanto, esse mecanismo tem efeito limitado, pois há uma significativa redução na capacidade de degradação do MFA um mês após a inoculação (Silva *et al.*, 2016).

Foi verificado que a ingestão, por diversos dias, de quantidades não letais de plantas que contêm o fluoroacetato é capaz de induzir a proliferação de bactérias que produzem uma enzima (halogenase) que o degrada, protegendo os animais da intoxicação (Oliveira *et al.*, 2013). No entanto, durante esse processo de indução, há o risco de estimular os animais a consumir a planta tóxica que esteja na propriedade, favorecendo a ocorrência da intoxicação.

Além disso, a quantidade de MFA nas plantas é variável, podendo ser insuficiente para promover a indução da resistência, ou elevada o suficiente para promover a toxicidade. Uma alternativa já testada é a utilização do MFA na forma sintética para a indução da degradação ruminal (Santos *et al.*, 2014). No entanto, esse composto é extremamente tóxico, representando um grave risco para os animais e também para as pessoas que o manipulam, inviabilizando sua utilização prática. Além disto, há indícios de que esse composto pode causar aborto nos animais, ou ainda ser excretado no leite, gerando um risco para a saúde pública (Vasconcelos *et al.*, 2008a).

3.4 Produção da dehalogenase pela microbiota ruminal e seu mecanismo de ação

A história da relação dehalogenase, microrganismo e MFA passou a ser estudada, após os pesquisadores Goldman, em 1965 e Evans, 1966, isolarem pseudomonádáceas em amostras de solo onde cresciam as plantas *Gastrolobium* sp, *Gompholobium* sp, *Oxylobium* sp, *Nemcia* sp e *Acacia* sp, todas frequentes no território australiano. Observaram ainda que tais bactérias que cresciam em solos com presença de MFA,

eram resistentes pelo fato de produzirem a enzima, dehalogenase. A partir disso, inúmeros estudos foram desenvolvidos com intuito de desvendar o mecanismo de resistência e degradação do MFA por esses microrganismos.

Com a constatação de tais bactérias no solo, passou-se a pesquisar a existência de outros microrganismos com capacidade semelhante. Assim, foi possível isolar em outros ambientes microrganismos com características semelhantes, como por exemplo, do rúmen de animais (Gregg *et al.*, 1998) e de plantas (Twiggg e Socha, 2001; Camboim *et al.*, 2012a,b; Davis *et al.*, 2012).

Estudos realizados na Paraíba isolaram bactérias ruminais primitivas como, *Pigmentiphaga kullae* e *Ancylobacter dichloromethanicus* do rúmen de caprinos criados em áreas livres de plantas que contêm MFA (Camboim *et al.*, 2012a), e também em plantas como a *Arabidopsis thaliana*, todas com capacidade de degradar o MFA já que produziam dehalogenase (Lazzarotto, 2011).

No entanto a partir de tais descobertas e inúmeros outros estudos complementares subsequentes, foi observado que existe no Brasil uma gama de outros microrganismos resistentes ao MFA, dos quais, tal habilidade é decorrente da produção da dehalogenase, exemplo das bactérias *Moraxella* spp, *Pseudomonas* spp, *Ancylobacter* spp, *Rhodococcus* spp, *Mycobacterium* spp, *Burkholderia* spp, *Staphylococcus* spp, *Stenotrophomonas* spp e *Pigmentiphaga kullae*, e fungos *Fusarium* spp e *Paenobacillus* spp, presentes nos mais variados ambientes (Camboim *et al.*, 2012b).

A enzima dehalogenase, com o passar do tempo, teve reconhecido seu potencial tecnológico quando das inúmeras possibilidades de aplicação no campo científico e industrial, passou a ser utilizada em processo de detoxificação de solos contaminados por agentes fitossanitários usados na agricultura ou por acidentes industriais. Já na produção animal, um dos pioneiros desse reconhecimento foram Gregg *et al.* (1994, 1998), que utilizaram bactérias *Butyrivibrio fibrisolvens* modificadas geneticamente, pela adição do plasmídeo de *Moraxella* spp, reconhecidas pela habilidade da alta produção de dehalogenase. Três cepas de *Butyrivibrio fibrisolvens*, identificadas como OB156, OB291 e OR85, foram transplantadas com o plasmídeo pBHf, o qual é responsável pela atividade de desalogenação do MFA. As *Butyrivibrio fibrisolvens* híbridas foram inoculadas em ovinos, promovendo aumento da resistência desses animais quando comparados ao grupo controle (Gregg *et al.*, 1994, 1998).

Existem diversos compostos halogenados, também conhecidos por haletos orgânicos ou hidrocarbonetos halogenados, derivados dos hidrocarbonetos pela substituição de um ou mais hidrogênios por átomos de halogênios (Flúor, Cloro, Bromo e Iodo), fenômeno denominado halogenação. Adicionalmente, ainda podem ser classificados de acordo com o halogênio que está na cadeia carbônica, como: fluoretos, cloretos, brometos, iodetos ou mistos, também como mono-, di-, tri- e tetra-halogenados. Esta diversidade de compostos possibilita que os mesmos estejam relacionados a diferentes tipos de intoxicações e contaminações ambientais (Hill *et al.*, 1999).

As dehalogenases são classificadas de acordo com o composto halogenado (substrato) que degradam, portanto divididas nos seguintes grupos: haloaromáticas dehalogenases, halohidrinas dehalogenases, haloácidos dehalogenases e haloalcano dehalogenases. No entanto, para detoxificação ruminal, as de maior interesse são: fluoroacetato dehalogenase e a dehalogenase L-2-haloácido, sendo classificadas como haloácido dehalogenases, por serem mais especializadas na degradação de compostos tóxicos ácidos, como o ácido monofluoroacético (Chan *et al.*, 2010).

As dehalogenases, ao contrário das halogenases, atuam por meio da clivagem da ligação carbono-halogênio. No caso do MFA, as enzimas mais comuns, dehalogenase fluoroacetato e a L-2-haloácido dehalogenase, atuam quebrando a ligação carbono-flúor, ocasionando a inativação desse composto tóxico. Já as halogenases atuam na produção dos compostos halogenados pela substituição da ligação hidrogênio-carbono por um halogênio (Fetzner e Lingers, 1994; Chan *et al.*, 2010).

No MFA, a ligação carbono-flúor é estável, sendo considerada uma ligação forte e com alta energia iônica, apesar disso, as dehalogenases são capazes de clivar essa ligação por meio de vários mecanismos distintos de dehalogenação. Outro fator importante para o uso das dehalogenase é a ausência da necessidade de outros cofatores, sendo que algumas usam simplesmente, água como co-substrato (Holmquist, 2000).

Inúmeras espécies de microrganismos podem ser encontradas no rúmen, porém os critérios de classificação de uma espécie como autóctone deste órgão variam entre autores, não havendo consenso universal. Existem aqueles que sugerem que a importância de uma determinada espécie bacteriana no processo fermentativo deve ser baseada numa população mínima de 10^6 células/g de conteúdo ruminal fresco, ser isolada pelo menos dez vezes em dois ou mais animais e ser isolada em, no mínimo, duas diferentes localidades geográficas (Raskin *et al.*, 1997).

No entanto, também é possível tal classificação se forem satisfeitos os seguintes requisitos: ser anaeróbio, apresentar população mínima de 10^5 células/g de conteúdo ruminal fresco, ter sido isolada pelo menos dez vezes em dois ou mais animais, ter sido isolada em pelo menos duas diferentes localizações geográficas e produzir subprodutos encontrados no rúmen (Gall e Huttanen, 1989).

A enorme diversidade da microbiota ruminal geralmente está relacionada à complexidade e a variedade do substrato. Isso está sujeito às variáveis do sistema de produção, estação do ano e localidade geográfica. Portanto, sobrevivem e predominam as espécies de microrganismo que possuam em seu material genético as informações para a síntese de enzimas que compõe as vias metabólicas mais eficientes no aproveitamento da energia contida no substrato que lhes são apresentados (Abrão, 2012).

Apesar do importante papel e do grande número de protozoários e fungos presentes no rúmen, esses não conseguem nem se quer aproximar-se das bactérias como os microrganismos mais ativos em relação à produção enzimática. O rúmen apresenta mais

de 20 espécies de bactérias, e uma concentração entre 10^8 a 10^9 células/g de conteúdo ruminal, sendo classificadas geralmente de acordo com o processo digestivo e a fermentação do substrato específico. Grande parte das bactérias ruminais são anaeróbicas, no entanto podem também existir anaeróbicas facultativas (Oliveira *et al.*, 2007).

Bactérias celulolíticas produzem a enzima celulase extracelular, com capacidade de hidrolisar a celulose. Alguns exemplos são *Ruminococcus* spp, *Flavefaciens* spp, *Bacteroides succinogenes* e *Butyrivibrio fibrosolvens*, que possuem mecanismo de adesão à fibra, que permite a digestão de conteúdos fibrosos da dieta. No glicocálice da célula, à medida que a celulase vai sendo degradados, fragmentos do envelope celular vegetal são utilizados para compor a matriz do glicocálice, local onde as celulases continuam a digerir a celulose. O produto desta digestão geralmente são os ácidos graxos de cadeia ramificada como acetato, propionato, butirato e succinato (Lynch *et al.*, 2015).

Bactérias amilolíticas produzem enzima amilase relacionadas à degradação do amido, e são representadas por espécies do gênero *Bacteroides*, dentre estas, *Bacteroides amylophilus*, a qual utiliza amido, entretanto, incapaz de utilizar glicose ou outros monossacarídeos. Já as amilolíticas *Streptococcus bovis* e *Selenomonas ruminantium* utilizam tanto o amido quanto açúcares solúveis, gerando como produto final o acetato e metanol quando carboidratos solúveis estão abundantes, quando não, produzem acetato e propionato. Nesta última rota há uma maior produção de energia por grama de substrato (Reis *et al.*, 2015).

Bactérias essencialmente proteolíticas utilizam somente aminoácidos como fonte de energia primária, exemplo das *Clostridium Lachheadii*, *Bacillus licheniformes*, *Prevotella ruminicola*, *Ruminobacter amylophilus*, *Bacteroides amylophilus* e *Bacteroides ruminicola* (Reis, 2015; Lage, 2010). Entretanto, esse processo metabólico não diferente dos outros, necessita de certo controle visto que a degradação excessiva da proteína no rúmen causa redução na retenção de nitrogênio pelo hospedeiro. Os microrganismos existentes no rúmen possuem intensa atividade proteolítica, no entanto a velocidade com que as proteínas são degradadas em peptídeos, aminoácidos livres e amônia estão diretamente relacionados à solubilidade das proteínas presentes na dieta (Rao *et al.*, 1998).

Ademais a ureia, importante fonte de nitrogênio para bactérias, é dependente de uma concentração mínima de carboidratos, minerais e sulfatos, para ser incorporada à proteína microbiana. Por ser solúvel, é rapidamente hidrolisada no rúmen em amônia e dióxido de carbono pela ação direta da urease, numa velocidade quatro vezes superior a capacidade de aproveitamento bacteriano o que causa, portanto, alterações patológicas letais nos animais quando em excesso no organismo (Kozloski, 2016).

As bactérias utilizam a amônia disponível no conteúdo ruminal como principal fonte de nitrogênio para a síntese de proteína microbiana. Algumas bactérias utilizam diretamente os peptídeos e aminoácidos. A amônia é a principal fonte de nitrogênio

solúvel presente no fluido ruminal, no entanto sua concentração depende da quantidade e solubilidade da proteína da dieta, quantidade de ureia que é reciclada no rúmen através da saliva, da difusão da ureia pela parede do rúmen e da taxa de absorção da amônia no rúmen (Neto, 2008).

As bactérias metanogênicas são anaeróbias estritas, organismos capazes de produzir metano a partir de CO₂ e H₂ proveniente de uma dieta fibrosa. Representadas pelo grupo das *Methanobrevibacter ruminantium*, *Methanobacterium formicicum*, *Methanosarcina barkeri* e *Methanomicrobium mobile*, são extremamente importantes para o ecossistema ruminal, pois possuem papel na regulação da fermentação pela remoção das moléculas de H₂ e conseqüentemente estabilidade do pH ruminal. Praticamente todo o metano é produzido pelas reações de redução de CO₂ acoplada ao fornecimento de elétrons pelo H₂. Entretanto, este processo contínuo representa uma significativa perda de energia consumida pelo animal (Abreu *et al.*, 2010).

Alguns estudos apontam a hipótese de que as enzimas presentes no rumen poderiam alterar a utilização dos alimentos, por meio do efeito direto sobre a dieta e do aumento da digestão ruminal e/ou pós-ruminal de determinadas substâncias pelo sinergismo dos microrganismos do rúmen. De fato, os inúmeros mecanismos de ação possivelmente estão interligados, de modo que as alterações mediadas pelas enzimas refletem diretamente na digestão ruminal dos substratos e conseqüentemente no aumento da disponibilidade de outros de interesse zootécnico ou clínico (Reis, 2015).

O aumento da concentração das enzimas digestivas visa aumentar a eficiência do processo fermentativo e digestivo, favorecendo a atuação de microrganismos desejáveis, em substratos específicos como o MFA. Nesse caso as dehalogenases utilizadas atuam indisponibilizando o MFA por defluoração e com isso impedindo a intoxicação. Tem-se verificado que resultados com aditivos enzimáticos exógenos como celulases, xilanases e ligninases, todas fundamentais na digestão dos ruminantes ou promotores enzimáticos diretamente relacionados a bactérias ruminais, tanto na silagem quanto no preparo de rações, geralmente apresentam resultados satisfatórios (Reis, 2015).

Entretanto, alguns estudos divergem sobre o melhor método de utilização de tais enzimas de ação ruminal exclusiva. Estudos com enfoque nutricional destacam ainda que a aplicação das enzimas no ambiente ruminal por meio de alimentos pode apresentar menor eficiência enzimática do que sua produção *in loco*, pelo fato de que algumas possivelmente são parcialmente degradadas, ou sofrem alguma alteração conformacional antes que atinjam o substrato específico (Queiroz, 2004; Kozloski, 2016).

3.5 Bioquímica sérica e plasmática em bovinos

Segundo Barini (2007), a concentração e a composição bioquímica sérica e plasmática reflete a situação metabólica dos tecidos animais. Situação de fundamental importância

para indicar patologias como: lesões teciduais, transtornos no funcionamento dos órgãos e também desequilíbrios metabólicos específicos ou de origem nutricional.

A avaliação da bioquímica é complexa, tanto aplicada a rebanhos quanto a indivíduos, devido a grande variação desses níveis em função de fatores como raça, idade, estresse, dieta, nível de produção leiteira, manejo, clima e estado fisiológico. Porém, ainda assim, constitui excelente ferramenta para complementar a pesquisa de alterações clínico-patológicas em ruminantes sem manifestação clínica aparente (González e Scheffer 2003).

3.5.1 Glicose sanguínea

Valores de referência para bovinos de glicose plasmática estão entre 50 a 70 mg/dL recomendado por (Rosenberger, 1993; Kaneko, 1997; Meyer e Harvey, 2004). A hiperglicemia clínica é frequente em pacientes com deficiência de tiamina, disfunção hepática, animais submetidos a situações de estresse, altos níveis de cortisol, processo inflamatório associados à ação de vasopressores, e também na intoxicação por compostos como MFA (Sant'Ana, 2009; Patelli, 2017).

A glicose é o principal substrato orgânico usado como fonte de energia pelos organismos, e a única fonte energética utilizada de forma direta pelas hemácias e tecido nervoso. Portanto, para que haja um máximo desempenho na produção e utilização dessa energia, esse substrato, é submetido a etapas de processamento como, glicólise, ciclo de Krebs e fosforilação oxidativa. Com objetivo em comum de produzir ATP por reações exergônicas a partir de um substrato energético (Silveira, 2011; Oliveira, 2012).

3.5.2 Lactato

Valores de referência para bovinos do lactato plasmático estão entre 2,0 a 13,0 mg/dL recomendado por (Rosenberger, 1993; Kaneko, 1997; Meyer e Harvey, 2004). Historicamente houve uma confusão entre ácido láctico e lactato; entretanto, estes não são sinônimos. O ácido láctico, é um ácido forte que em pH fisiológico é ionizado para lactato. O lactato é produzido naturalmente durante a glicólise nas células musculares e células sanguíneas, como por exemplo, nas hemácias. No entanto, o lactato é constantemente consumido no fígado pelo “ciclo de Cori” onde é transformado novamente em piruvato e posteriormente em glicose, sendo lançada novamente na circulação (Gonzalez, 2000).

Acidose láctica nos bovinos é caracterizada quando o ácido láctico ultrapassa 5 mmol/L de sangue. O aumento do lactato sanguíneo (hiperlactatemia) em pacientes submetidos à terapia intensiva geralmente é avaliado como parâmetro de morbidade, por estar relacionado a diversos fatores, dentre eles sepse, deficiência de tiamina, disfunção hepática, e intoxicação por composto como, chumbo, cobre, arsênio e MFA. Também

em situações não clínicas como na glicólise muscular durante exercício físico, aumento da adrenalina e locais ou regiões com baixa saturação de oxigênio (González, 2000; Barini, 2007).

Em ruminante quando há uma ingestão de carboidratos solúveis que ultrapassa as capacidades metabólicas do rumem, ocorre alta disponibilidade de ácidos graxos voláteis o que resulta no declínio do pH ruminal pelo acúmulo de ácido láctico (González *et al.*, 2006). A acidose láctica pode assemelhar-se a muitas outras condições sépticas ou tóxicas, incluindo: mastite ou metrite séptica, peritonite difusa aguda, paresia puerperal, intoxicações por chumbo, sal, arsênico ou nitrato, e enterotoxemia (Costa *et al.*, 2008a).

Ambas as formas D e L de ácido láctico são produzidas, sendo que a forma L é utilizada mais rapidamente que o isômero D, o qual se acumula e causa uma grave acidose. Se a velocidade de entrada do ácido láctico para os líquidos do organismo não for tão rápida, os mecanismos compensadores do rúmen e tamponantes do sangue não conseguem manter o pH num nível compatível até que a crise seja superada. Há também diminuição do fluxo sanguíneo renal e da velocidade de filtração glomerular, resultando em anúria e eventualmente há choque e morte (Costa *et al.*, 2008a)

O lactato é produzido no citosol das células musculares pela via anaeróbia da glicólise, também conhecida como, “sistema lactato”. Entretanto a hipóxia não é um pré-requisito para essa via, portanto ela ocorre naturalmente no músculo durante exercício na presença de O₂. Em situações de hipóxia e consequente deficiência do organismo em usar outras vias, tais como sistema ATP-fosfocreatina e glicólise aeróbica, exigentes de O₂, o sistema anaeróbio é exigido para suprir demanda de ATP do organismo, considerando que o sistema lactato geralmente é mais rápido na produção de energia do que as vias aeróbicas, para compensar o menor rendimento de energia por mol de substrato. Portanto, o acúmulo de lactato ocorre por que o mecanismo de consumo do fígado não consegue acompanhar o ritmo da intensa produção na aerobiose e consequentemente o mesmo acontece com H⁺, já que este não está sendo usado na fosforilação oxidativa (Ronsein, 2004; Ferreira, 2017).

No sistema da glicólise anaeróbica, o lactato é produzido a partir do glicogênio muscular de maneira sequencial em glicose, posteriormente em glicose 6-fosfato, e por fim em piruvato que, pela ação da enzima lactato desidrogenase, da origem a dois lactatos e dois íons de H⁺ por molécula de glicogênio. Com isso, a queda do pH sanguíneo na glicólise é decorrente do H⁺ secundário e não propriamente do lactato. Portanto através deste mecanismo, em animais intoxicados por substâncias que atuam bloqueando o ciclo de Krebs, observa-se um aumento sérico do lactato e uma consequente queda do pH (Ronsein, 2004).

3.5.3 Proteínas totais

As concentrações de proteínas totais plasmáticas em bovinos podem variar de 6,5 a 7,5 g/dL (Rosenberger, 1993; Kaneko, 1997; Meyer e Harvey, 2004). As proteínas totais englobam todas as proteínas presentes no organismo, sendo as principais delas a albumina, as globulinas e o fibrinogênio. Essas proteínas são principalmente sintetizadas pelo fígado e apresentam diferentes funções que podem estar relacionadas à manutenção da pressão oncótica e da viscosidade do sangue a participação nos mecanismos de hemostasia, transporte de nutrientes, hormônios e metabólitos, além de produtos de excreção pelo organismo e da manutenção do pH sanguíneo (González, 2000).

Pode-se observar a ocorrência de hipoproteinemia em casos de insuficiência hepática, levando a redução da produção, em animais com transtornos intestinais, levando a falha na absorção em doentes renais, por perda de proteínas pela urina em animais com quadros de hemorragia crônica, causando perda de proteínas e outros nutrientes fundamentais, além de casos de subnutrição ou até mesmo inanição, quando as proteínas disponíveis são utilizadas como fonte alternativa de energia para o organismo. A hiperproteinemia é comumente observada em casos de desidratação, que leva a um quadro de hemoconcentração. Pode-se observar também em animais mais velhos a presença de hiperproteinemia geralmente causado pela aumento da fração de globulinas (Fagliari, 2003).

3.5.4 Albumina

Segundo Gonzalez (2000), a albumina é uma das proteínas sintetizadas no fígado representando a maior fração, cerca de 50 a 65% das proteínas séricas ou plasmáticas totais. Suas principais funções estão relacionadas com a atividade osmótica do plasma e a função específica do transporte de produtos de várias substâncias endógenas e exógenas, bilirrubina, ácidos graxos, corantes, cálcio e fármacos.

A hipoalbuminemia, tem importante significado clínico, podendo indicar a presença de hepatopatias, síndromes nefróticas e enteropatias. Outras situações de diminuição da concentração de albumina ocorrem nos processos inflamatórios agudos, agindo como proteína de fase aguda negativa, subnutrição, má absorção nos caso de queimaduras cutâneas extensas e caquexia neoplásica (Barini, 2007). Adicionalmente a albumina pode também ser usada como um indicador de status nutricional proteico. Valores persistentemente baixos de albumina sugerem inadequado consumo de proteínas. Em casos de subnutrição severa, a concentração de albumina sérica pode cair a níveis inferiores a 20 g/l (Barini, 2007).

A hiperalbuminemia, por sua vez, se destaca em situações de desidratação, quando ocorre hemoconcentração, oscilação comum ao longo do ano em função das variações climáticas e o efeito da qualidade das pastagens. Geralmente no verão, podem ser encontrados altos níveis de albumina sérica, possivelmente devido a pastagens ou dieta

de melhor qualidade, associado a altas temperaturas com baixa ingestão de água característico da desidratação subclínica (Gregory *et al.*, 1999; Barini, 2007).

3.5.5 Gama glutamiltransferase (GGT)

As atividades séricas de GGT em bovinos variam de 6 a 17 U/L (Rosenberger, 1993; Kaneko, 1997; Meyer e Harvey, 2004). A GGT, também conhecida como gama glutamil-transpeptidase (GTP), é responsável por catalisar a transferência de grupos glutamil entre peptídeos, e também está envolvida em reações da glutathione (Thrall, 2008). Localizada na membrana celular, a GGT é considerada uma enzima de indução. Sintetizada por quase todos os tecidos corporais, sendo que, maiores concentrações são observadas nos rins e pâncreas, e em menores concentrações no fígado, mucosa intestinal e glândulas mamárias de determinadas espécies (Thrall, 2008).

A maior parte da atividade da GGT sérica é oriunda do fígado, isso porque os maiores produtores de GGT do organismo, rins e pâncreas, tem todo produto final eliminado na urina e na secreção pancreática respectivamente, não atingindo a circulação sanguínea, portanto não contribuindo grandemente para a atividade sérica da enzima (Thrall, 2008).

A elevação da atividade sérica da GGT pode ser observada em casos de colestase ou hiperplasia biliar, ocorrendo devido ao aumento da produção da enzima ou pela maior solubilização, causada pelos ácidos biliares, e consequente liberação da GGT aderida à membrana celular (Stockham e Scott, 2011). Em ruminantes, a faixa de normalidade é limitada, tornando-a mais sensível e específica nessas espécies do que FA. Aumento marcante da atividade sérica de GGT também pode ser observado em filhotes que ingeriram colostro, em vacas leiteiras com lipidose hepática e em animais infestados com *Fasciola hepatica* (Thrall, 2008; Stockham e Scott, 2011).

Alterações de GGT relacionadas a intoxicação por plantas tóxicas, principalmente aquelas consideradas hepatotóxicas, como, *Cestrum laevigatum* (coerana, baúna), *Seslea brasiliensis* (canela-de-veado, peroba-d'água), e também em situações na qual tem manifestação de fotossensibilização decorrentes de alterações hepáticas como observado na intoxicação por *Lantana* spp (chumbinho, camará); *Pithomyces chartarum* associado as *Brachiarias* spp. Sendo que em tais alterações supracitadas são comuns elevação dos níveis séricos da GGT dos animais (Tokarnia *et al.*, 2000).

3.5.6 Aspartato aminotransferase (AST)

As atividades séricas de AST em bovinos podem ser de até 130 U/L (Rosenberger, 1993; Kaneko, 1997; Meyer e Harvey, 2004). A AST, também conhecida como transaminase oxaloacética (TGO), é uma enzima que catalisa a reação de transaminação de aspartato e α -cetogluturato em oxalacetato e glutamato. Está presente em hepatócitos, miócitos do músculo esquelético, miócitos cardíacos e eritrócitos, sendo

que a maior concentração está localizada em hepatócitos e células musculares de todas as espécies. Portanto, não se trata de uma enzima específica de origem hepática. Em virtude disso, o aumento isolado da atividade sérica desta enzima pode não ser específico de alteração hepática, devendo esta ser determinada em conjunto com outras enzimas como, a creatina quinase (CK). A CK apresenta maior especificidade para lesões musculares, porém, sua meia vida sérica é inferior à meia vida sérica da AST, permitindo que, casos de lesões musculares, possam apresentar aumentos isolados de AST sem a paridade com CK, limitando o emprego da CK como método diferencial (Stockham e Scott, 2011).

AST é a enzima de extravasamento presente em maior concentração nas membranas mitocondriais e em menor proporção no citosol das células. Essa característica permite a avaliação da gravidade da lesão, já que para sua liberação deve-se ocorrer uma lesão celular mais intensa. Sendo mais comum em casos de necrose, lesão subletal de hepatócitos e células musculares (Thrall, 2008). No entanto a AST é mais utilizada para avaliar lesão hepática em grandes animais, devido a sua maior concentração hepática nessas espécies. Pelo fato de ter meia vida mais curta que ALT, a AST pode fornecer uma melhor indicação de lesão ativa de hepatócitos (Stockham e Scott, 2011).

Espera-se observar aumentos na atividade sérica da AST em casos de doença hepática grave com necrose ou lesão subletal, semelhante o que ocorre na intoxicação por plantas hepatotóxicas (Tokarnia, 200). Regeneração de doença hepática, hemólise in vitro, doenças musculoesqueléticas, infarto cerebral, anemia hemolítica, queimaduras e no uso de determinadas drogas. Já a redução dos níveis de AST está presente em casos de azotemia, diálise renal crônica e cirrose hepática (Stockham e Scott, 2011).

3.5.7 Creatinina

As concentrações de creatinina plasmática em bovinos variam de 0,6 a 2,0 mg/dL (Rosenberger, 1993; Kaneko, 1997; Meyer e Harvey, 2004). A creatinina é um composto nitrogenado produzido a partir da fosfocreatina, sendo que a quantidade de creatinina formada é relativamente constante para um determinado indivíduo, e pouco afetada pela alimentação, inclusive pelo consumo de proteína, portanto, não apresenta grandes variações durante o dia. É excelente ferramenta para monitorar e corrigir mudanças nas variações de ureia sanguínea frequente quando há variação do status de consumo energético em bovinos (González, 2000; Barini, 2007).

Mostra-se muito eficiente como indicador sanguíneo para mobilização de reservas, como no caso dos ácidos graxos livres, também da utilização de substratos energéticos dentro da célula, através das variações do fósforo sanguíneo frequentes em animais em hipóxia, hipoglicemia ou deficientes de ATP. A deficiência de tais substratos energéticos pode aumentar os níveis de fósforo no sangue devido à diminuição de sua utilização no metabolismo energético, o que tem servido como parâmetro para avaliar o balanço energético animal (González, 2000; Barini, 2007).

A eliminação da creatinina sérica é realizada exclusivamente por via renal, não apresentando reabsorção pelos túbulos renais. Dessa forma a creatinina é um excelente marcador da taxa de filtração renal, e conseqüentemente da função renal. Pode-se, portanto observar valores elevados de creatinina sérica em casos de redução do fluxo renal, obstrução urinária, doenças renais, além de hipotensão, desidratação, síndrome hepato-celular e dano muscular. Já a diminuição das concentrações de creatinina sérica é observada em casos de insuficiência hepática, super-hidratação e miopatias (González, 2000; Barini, 2007).

3.5.8 Ureia

As concentrações de ureia plasmática em bovinos podem variar 6 a 13 mg/dL (Rosenberger, 1993; Kaneko, 1997; Meyer e Harvey, 2004). A ureia é um composto nitrogenado, sintetizado no fígado a partir da amônia produzida no rúmen ou proveniente do catabolismo de aminoácidos. A concentração de ureia sérica é um dos componentes usados na avaliação da atividade metabólica proteica do animal e, na maioria das espécies, é um bom indicador do funcionamento renal (González, 2000; Barini, 2007).

Os níveis de ureia tem relação direta com o nível de proteína na alimentação. Considerando que rebanhos que utilizam dietas ricas em teor de proteína bruta encontram seus valores altos no sangue, enquanto, uma baixa ingestão proteica parece não afetar de maneira significativa seus índices (González, 2000; Barini, 2007).

No caso da elevação da ureia de origem não nutricional, geralmente são observadas concentrações elevadas de ureia sérica nos casos de doença renal, desidratação, obstrução do trato urinário, hipotensão e diabetes mellitus. Já níveis baixos, são esperados em animais submetidos a dietas pobres em proteínas, insuficiência hepática, síndrome da má absorção e na super-hidratação (Stockham e Scott, 2011).

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Autorização por Comissão de Ética

O projeto deste estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), sob protocolo número 149/2017.

4.2 Obtenção do trifluoroacetato de sódio (TFA)

O TFA foi obtido utilizando modificações da metodologia descrita para síntese do trifluoroacetato de cálcio (Khrstov *et al.*, 1998). Para esta síntese, utilizou-se o ácido

trifluoroacético P.A. (Merck KGaA, Darmstadt, Alemanha) e carbonato de sódio P.A. (Synth, São Paulo, SP).

4.3 Indução da resistência animal

Foram utilizados 10 bovinos, da raça Holandesa, com aproximadamente 4 meses de idade e peso médio de 150 kg. Os animais foram separados em dois grupos: grupo controle (N=3) e grupo tratado (N=7). Os animais do grupo tratado receberam 0,1 mg/kg de TFA dissolvidos em 5 ml de água destilada por via oral, enquanto os do grupo controle receberam somente 5 ml de água destilada. A administração oral, tomando-se o cuidado da aplicação ser realizada na região da base da língua com o auxílio de uma seringa no intuito de evitar perdas, por 28 dias consecutivos. Diariamente, os animais foram submetidos à avaliação física, com intuito de identificar qualquer sinal de intoxicação. Durante todo o período do estudo, foi fornecido diariamente aos animais silagem de milho e água *ad libitum*, além de 1,0 kg de ração e sal mineral próprio para a espécie.

4.4 Avaliação física dos bovinos

Foi feita a avaliação física dos animais no intuito de observar qualquer indicio de intoxicação no uso da terapia preventiva com TFA e no desafio com o composto tóxico MFA. Foram realizada aferição da temperatura transretal, coloração da mucosa da conjuntiva, auscultação cardíaca e pulmonar, aferição do tempo de perfusão periférica, motilidade ruminal e frequência respiratória de todos os animais antes e após desafio proposto pelo experimento para detectar possíveis alterações (Rosenberger, 1993).

4.5 Coleta de sangue periférico para análise de bioquímica sérica e plasmática

A cada sete dias, foram realizadas coletas de sangue periférico por meio de punção da veia jugular, com agulha acoplada a tubos com vácuo sem anticoagulante e outro contendo EDTA com fluoreto. As amostras de sangue coletadas foram centrifugadas, para a separação do soro (tubo sem anticoagulante) ou plasma (tubo contendo EDTA com fluoreto), que foi armazenado e congelado a -12 °C por 60 dias até o momento das análises no laboratório de toxicologia da EV- UFMG.

As amostras de plasma foram utilizadas para as determinações dos níveis plasmáticos de glicose, lactato, albumina, ureia, creatinina e proteínas totais, e as amostras de soro foram destinadas para as mensurações das atividades de aspartato aminotransferase (AST), gama-glutamil transferase (GGT). As determinações bioquímicas foram realizadas utilizando kits comerciais específicos (Kovalent, São Gonçalo, RJ) e um analisador bioquímico automático (Cobas Mira Plus, Roche, Montclair, NJ, EUA).

4.6 Material vegetal para o desafio dos animais

Foram realizadas coletas da parte aérea da planta *Palicourea marcgravii* (Figura 3), em propriedades localizadas no município de São José do Jacuri, estado de Minas Gerais, no período da primeira semana de Julho. Todas estas propriedades tinham relatos de mortalidade de bovinos por intoxicação principalmente na época da “seca”. As amostras foram colhidas com o auxílio de “tesouras de poda”. Foram coletadas amostras com ramos completos, de preferencia exemplares com flores, frutos e folhas íntegras. Após as coletas, as amostras foram posteriormente acondicionadas em recipiente plástico que oferecia boa vedação e submetidas ao congelamento em primeiro momento na propriedade onde foram coletadas, para que posteriormente transportadas nas mesmas condições para o laboratório de Toxicologia da EV-UFMG.

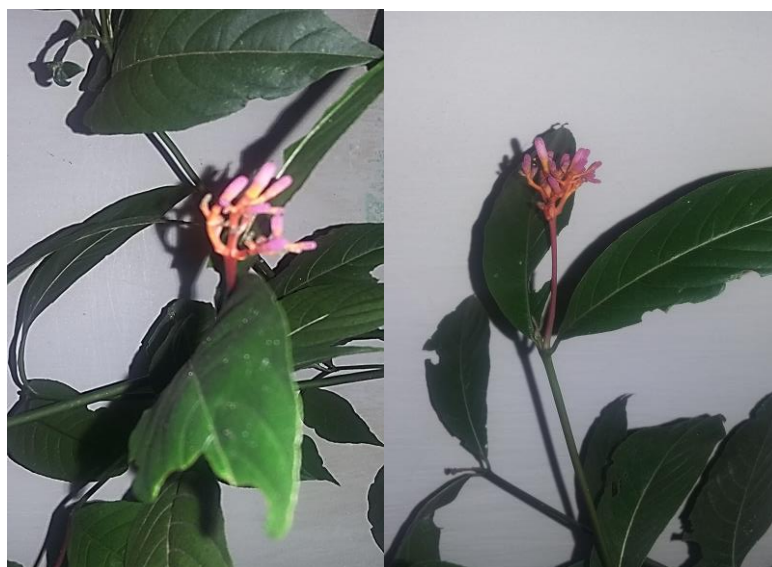


Figura 1. Exemplar de *Palicourea marcgravii*, coletada na propriedade rural de São José do Jacuri - MG: Fonte arquivo pessoal

4.7 Desafio dos animais

Foi realizada nova pesagem dos animais após os 28 dias da administração do TFA no grupo tratado ou água no grupo controle. Dessa forma, folhas de *P. macgravii* na concentração de 2,0 g/kg/animal foram trituradas e reservadas de maneira individual para cada animal. Adicionou-se ao triturado, água no volume de até cinco litros, com o intuito de tornar a solução diluída o suficiente para que não houvesse resistência quando do fornecimento por meio de sonda esofágica.

A administração da solução foi realizada entre as 8:00h e 9:00h, com os animais em jejum alimentar desde as 17:00h do dia anterior. Após três horas do término do fornecimento da planta, foi iniciada a movimentação dos animais, com duração de cinco

minutos e com intervalos de uma hora, quando era observada possível manifestação clínica da intoxicação.

4.8 Análise estatística

Os resultados das avaliações bioquímicas foram avaliados estatisticamente utilizando a análise de modelo misto por procedimento MIXED (PROC MIXED), sendo cada animal determinado como uma unidade fixa e o tempo como variável. Esta análise estatística foi realizada com o auxílio do programa SAS for Windows v.8.0. O nível de significância será estabelecido como $p < 0,05$.

5. Resultados e discussão

Os 28 dias da administração do TFA (grupo tratado) ou água (grupo controle) foram divididos em tempos, onde T0 corresponde à primeira coleta realizada antes dos animais receberem o tratamento. Sendo que o T0 também foi utilizado como parâmetro de referencia para outros tempos. O T1 se refere aos sete dias após o inicio do tratamento, T2 se refere aos 14 dias após inicio do tratamento, T3 se refere aos 21 dias após inicio do tratamento, T4.1 corresponde a coleta realizada aos 28 dias após inicio do tratamento e por fim, T4.2 corresponde ao momento após o desafio dos animais.

Tabela 3: Níveis plasmáticos de glicose (em mg/dl) em bovinos que receberam TFA (grupo tratado) ou água (grupo controle) por 28 dias consecutivos.

Tempo (Semanas)	Grupo Tratado (n=7)	Grupo Controle (n=3)
0	69,2 ± 8,89	66,3 ± 8,12
1	67,2 ± 6,64	63,0 ± 3,20
2	67,1 ± 7,25	66,5 ± 4,27
3	68,2 ± 6,39	60,9 ± 3,16
4.1	71,1 ± 8,90	61,4 ± 1,48
4.2	67,7 ± 8,00	62,5 ± 1,71

Tabela 4: Níveis plasmáticos de lactato (em mg/l) em bovinos que receberam TFA (grupo tratado) ou água (grupo controle) por 28 dias consecutivos.

Tempo (Semanas)	Grupo Tratado (n=7)	Grupo Controle (n=3)
0	15,9 ± 31,5	10,1 ± 0,23
1	8,02 ± 17,4	8,87 ± 11,3
2	7,11 ± 11,8	10,7 ± 11,3
3	23,8 ± 19,5	11,3 ± 11,1
4.1	10,3 ± 11,8	10,6 ± 6,71
4.2	10,5 ± 20,0	12,1 ± 2,97

Tabela 5: Níveis plasmáticos de ureia (em mg/dl) em bovinos que receberam TFA (grupo tratado) ou água (grupo controle) por 28 dias consecutivos.

Tempo (Semanas)	Grupo Tratado (n=7)	Grupo Controle (n=3)
0	12,8 ± 4,04*	6,80 ± 1,11
1	6,58 ± 2,19	7,80 ± 2,82
2	9,03 ± 2,96	6,13 ± 2,73
3	10,8 ± 4,60	9,04 ± 2,48
4.1	13,2 ± 5,20	9,42 ± 3,07
4.2	10,0 ± 3,02	11,4 ± 6,51

* p<0,05 em relação ao grupo controle (Proc Mixed do SAS)

Tabela 6: Níveis plasmáticos de creatinina (em mg/dl) em bovinos que receberam TFA (grupo tratado) ou água (grupo controle) por 28 dias consecutivos.

Tempo (Semanas)	Grupo Tratado (n=7)	Grupo Controle (n=3)
0	0,81 ± 0,10	0,91 ± 0,18
1	0,87 ± 0,09	0,81 ± 0,05
2	0,81 ± 0,16	0,87 ± 0,12
3	0,84 ± 0,13	0,93 ± 0,21
4.1	0,80 ± 0,12	0,83 ± 0,11
4.2	0,90 ± 0,15	0,76 ± 0,23

Tabela 7: Níveis plasmáticos de proteínas totais (em g/dl) em bovinos que receberam TFA (grupo tratado) ou água (grupo controle) por 28 dias consecutivos.

Tempo (Semanas)	Grupo Tratado (n=7)	Grupo Controle (n=3)
0	6,69 ± 0,34	6,33 ± 0,44
1	6,57 ± 0,55	6,64 ± 0,81
2	6,68 ± 0,33	6,80 ± 0,46
3	6,32 ± 0,60	6,10 ± 0,19
4.1	6,80 ± 0,59	6,24 ± 1,00
4.2	6,51 ± 0,89	5,65 ± 0,52

Tabela 8: Níveis plasmáticos de albumina (em g/dl) em bovinos que receberam TFA (grupo tratado) ou água (grupo controle) por 28 dias consecutivos.

Tempo (Semanas)	Grupo Tratado (n=7)	Grupo Controle (n=3)
0	2,88 ± 0,17	3,15 ± 0,30
1	2,94 ± 0,16	3,35 ± 0,54
2	2,90 ± 0,15	3,23 ± 0,12
3	2,84 ± 0,22	2,99 ± 0,14
4.1	2,84 ± 0,37	2,94 ± 0,43
4.2	2,92 ± 0,55	2,72 ± 0,73

Tabela 9: Níveis séricos de aspartato aminotransferase (AST, em U/l) em bovinos que receberam TFA (grupo tratado) ou água (grupo controle) por 28 dias consecutivos.

Tempo (Semanas)	Grupo Tratado (n=7)	Grupo Controle (n=3)
0	93,5 ± 17,3	73,5 ± 8,87
1	85,1 ± 15,5	77,3 ± 6,22
2	91,9 ± 19,5	71,5 ± 5,20
3	91,8 ± 21,3	76,0 ± 16,3
4.1	88,4 ± 25,8	82,7 ± 20,5
4.2	94,9 ± 22,3	73,5 ± 14,8

Tabela 10: Níveis séricos de gama-glutamil transferase (GGT, em U/l) em bovinos que receberam TFA (grupo tratado) ou água (grupo controle) por 28 dias consecutivos.

Tempo (Semanas)	Grupo Tratado (n=7)	Grupo Controle (n=3)
0	25,0 ± 12,9	16,3 ± 1,09
1	24,3 ± 13,4	17,6 ± 2,15
2	22,4 ± 9,28	15,2 ± 2,68
3	23,7 ± 10,8	20,2 ± 8,45
4.1	22,2 ± 9,79	18,0 ± 3,72
4.2	24,5 ± 8,74	16,7 ± 3,11

O resultado das avaliações físicas realizadas nos bovinos, referentes à auscultação cardíaca, pulmonar, coloração das mucosas, temperatura transretal, aferição do tempo de perfusão periférica, motilidade ruminal e frequência respiratória não apresentaram variação estatísticas quando comparados com os valores propostos pela literatura (Rosenberger, 1993), que indicasse indícios de manifestação clínica de intoxicação.

Após o desafio com *P. marcgravii* nenhum dos animais tratados com o TFA apresentaram qualquer alteração física caracterizando intoxicação, mesmo sendo submetidos a exercício físico intenso.

Por outro lado, nos animais do grupo controle tratados apenas com água e não com o substrato TFA foi constatado o início da manifestação clínica, por meio da observação visual da estase da jugular e exame físico adicional, exemplo das alterações nos valores de referência para espécie na auscultação cardíaca e pulmonar, mensuração do tempo preenchimento capilar (Rosenberger, 1993). Adicionalmente, também foi observada relutância ao exercício, alterações de deambulação do animal e quedas no solo, ficando em primeiro momento na posição de decúbito esternal.

Assim que estes animais apresentaram as primeiras manifestações da intoxicação, como estase da jugular e relutância em andar, foram deixados em repouso e receberam o suporte clínico necessário, pois não era desejado o óbito.

Em relação aos sinais clínicos decorrentes do envolvimento cardiocirculatório na intoxicação pelo MFA, a congestão venosa, clinicamente evidenciada como estase e

pulso jugular, é a mais frequente, e amplamente encontrada em outros experimentos envolvendo o MFA (Tokarnia, 2012), uma vez que bovinos estão classificados na Categoria I, sendo o principal efeito do MF no coração (Peixoto, 2010).

A alteração cardíaca ocorre possivelmente devido ao acúmulo de citrato, e/ou hipersensibilidade a hipóxia e a hipocalcemia das células deste órgão em bovinos. A hipóxia provocada pela diminuição da fosforilação oxidativa tem ação direta sobre as células cardíacas dos bovinos (Silveira, 2011; Oliveira, 2012). A consequência dessa ação é pelo desequilíbrio na manutenção da integridade das células, principalmente na bomba de sódio e potássio, com aumento do influxo de cálcio, água e sódio, com saída de potássio para o meio extracelular. Ao mesmo tempo, ocorre aumento na glicólise, com exaustão das reservas de glicogênio. Essa desestruturação celular, com alterações na permeabilidade da membrana, induz a liberação de fosfolipases, enzimas lisossômicas, liberação de radicais livres e conseqüentemente morte celular (Collicchio-Zuanaze e Sakate, 2005).

A incapacidade cardíaca de bombear o sangue vindo do corpo para o pulmão acarreta o acúmulo de sangue difusamente pelo corpo, com aumento da pressão da veia cava superior e inferior, ocasionando a turgência da veia jugular, acúmulo de sangue nos vasos intra-hepáticos, que podem provocar hepatomegalia e degeneração na região centro-lobular hepática, possivelmente em razão da hipóxia (Collicchio-Zuanaze e Sakate, 2005).

A hipóxia geralmente se manifesta pelo padrão respiratório, uma vez que bovinos normalmente apresentam respiração costo-abdominal. No entanto em casos de dores abdominais, asfixia cianose, enfisema pulmonar e edema pulmonar o padrão respiratório geralmente se apresenta como respiração abdominal (Rosenberger, 1993).

Em casos de cianose, quando a coloração das mucosas vai de azulada a púrpura em decorrência da baixa pressão de O₂, que no caso da intoxicação por MFA é muito frequente. O que corrobora para a importância da avaliação física de tais mucosas durante o processo de intoxicação pelo MFA, já que a interrupção do ciclo de Krebs provoca esta queda na pressão do O₂ e conseqüentemente um quadro de cianose (Collicchio-Zuanaze e Sakate, 2005).

Sialorréia, perda do equilíbrio e convulsões, alterações patológicas muito frequentes antes do óbito pelo MFA estão relacionadas com alterações principalmente no SNC (Rosenberger, 1993). Entretanto tais alterações não são característica nos casos de intoxicação por MFA na espécie bovina, então mais relacionadas com a hipóxia generalizada e do acúmulo de metabolitos da respiração anaeróbia durante o processo do bloqueio do ciclo de Krebs no SNC (Peixoto, 2010).

As análises de bioquímica sanguínea e séricas foram utilizadas no presente estudo com o objetivo de avaliar os possíveis efeitos tóxicos do TFA usado na indução da resistência animal, uma vez que não existem relatos na literatura do seu uso e/ou aplicação na dieta de animais. Além das coletas sanguíneas realizadas durante a fase de

indução da resistência, também foi realizada uma coleta momentos após o desafio dos animais com a planta tóxica, com intuito de identificar alterações plasmáticas agudas, oriundas de uma possível intoxicação pelo MFA.

Na intoxicação pelo MFA, geralmente, somente a glicose, lactato e a topônima podem ser usados como parâmetros para avaliação da intoxicação. Pelo fato das alterações referentes às funções hepática e renal serem mais tardias, portanto não compatíveis com a hiperagudicidade das alterações clínico-patológicas e o óbito, comuns na intoxicação por MFA (Tokarnia, 2000). De fato, alterações nas concentrações de ureia e creatinina ocorrem em torno de 12 a 24 horas após lesão renal, enquanto as mudanças nas atividades das enzimas AST indicativa de lesão recente ocorrem em torno de 24 a 48 horas, já a enzima GGT pode tardar, sendo em torno de 7 a 8 dias (González et al., 2000).

Foi observado que as concentrações de glicose plasmática dos animais avaliados, não apresentaram alterações ($P > 0,05$) durante toda a fase experimental (Tabela 3). A glicemia geralmente não é um bom parametro para avaliação do status energético, nutricional e clínico de animais, por estar sujeita a uma estreita regulação homeostática (Rosenberger, 1993; Kaneko, 1997; Meyer e Harvey, 2004). No entanto esperava se uma hipoglicemia nos animais caso ocorresse uma possível intoxicação pelo TFA ou até mesmo falha deste como substrato, o que não ocorreu.

Não se sabe ao certo qual o mecanismo da intoxicação por MFA que provoca a hiperglicemia, entretanto existem várias teorias, sendo que uma delas aborda a fosfofrutoquinase (PFK) responsável por controlar e catalisar a velocidade da fosforilação, etapa principal da glicólise. A PFK geralmente é inibida quando há aumento do citrato, queda do pH e hipocalcemia, ao contrario ocorre quando há queda da concentração do ATP (Riet-Correa *et al.*, 2001).

Durante o processo de intoxicação pelo MFA, a ação do fluoracitrato, inibindo a aconitase, não permite que o citrato seja convertido em isocitrato. Este bloqueio do ciclo de Krebs afeta diretamente a cadeia de transporte de elétrons já que ela é acoplada ao ciclo, e com isso não há reoxidação do $\text{NADH}^+ \text{H}^+$ e FADH_2 , principais transportadores de elétrons, consumo de oxigênio e a produção de ATP (Riet-Correa *et al.*, 2001).

Portanto, o bloqueio do ciclo de Krebs além de afetar todo mecanismo metabólico de produção e consumo da glicose, sugere deslocar temporariamente sentido da glicólise (Riet-Correa *et al.*, 2001), a qual acarreta um quadro de hiperglicemia, não observada nos animais do experimento. Ademais, a hiperglicemia é responsável por alterações secundárias, como hipercoagulabilidade, hipofibrinólise e danos vasculares, os quais associados correspondem à gravidade sistêmica do quadro de intoxicação pelo MFA (Barbosa, 2014).

Na intoxicação por MFA o músculo entra em anaerobiose, ocorre aumento do conteúdo de AMP, ADP, NH_4^+ e P_i que, ao contrário do ATP, são também, potentes ativadores da PFK. Porém, quando a razão ATP/ADP é baixa, ocorre remoção do efeito inibitório do

citrato na PFK, favorecendo o fluxo glicolítico e a elevação do lactato (Riet-Correa *et al.*, 2001; Silveira, 2011; Oliveira, 2012)). Tanto a glicólise, quanto a gliconeogênese ocorrem simultaneamente, porém em vias diferentes e de maneira ordenada. Entretanto, em casos de alterações fisiológicas, exemplo do que ocorre na hipóxia e na alteração da concentração da glicose sanguínea este equilíbrio é deslocado (Silveira, 2011; Oliveira, 2012).

O nível de glicose plasmática é sensível à influência de mudanças nutricionais, estresse além de hormônios reguladores do metabolismo da glicose como a insulina, glucagon, hormônio do crescimento e cortisol (Collicchio-Zuanaze e Sakate, 2005). No entanto, em condições de déficit energético severo e em animais que não estão em gestação e/ou lactação prolongada, existe uma tendência para menor formação de glicose, o que pode acarretar uma hipoglicemia facilmente diferenciada da relacionada a alterações clínicas, quando comparada ao histórico e condição física do animal (Rosenberger, 1993; Kaneko, 1997; Meyer e Harvey, 2004).

A hiperglicemia decorrente do cortisol, hormônio do estresse, está relacionada com todas as alterações clínicas presente no processo de intoxicação. Já que a hipóxia tecidual, agonia clínica e a alterações fisiológicas decorrentes da ação do princípio tóxico provocam grande estresse no animal, inclusive com reflexos nas atitudes agressivas em animais com histórico de comportamento dócil. Portanto durante a intoxicação por MFA o cortisol, possivelmente seja um dos responsáveis pela hiperglicemia, gliconeogênese e a resistência periférica a insulina pelo bloqueio dos receptores Glut-4 responsáveis pelo transporte da glicose para o interior da célula. Isso ocorre porque, durante o estresse, há potencialização de praticamente todas as etapas da via gliconeogênica no fígado, principalmente consumo de lactato, para que glicose seja lançada diretamente no sangue e consequente hiperglicemia (Silveira, 2011; Oliveira, 2012).

Os animais deste estudo não apresentaram variações nas concentrações de lactato ($P > 0,05$) durante toda a fase experimental em ambos os tratamentos (Tabela 4). No entanto baseado nos resultados comparativos de outras literaturas (González, *et al.*, 2000; Barini, 2007), uma possível hiperlactatemia era esperada caso houvesse intoxicação dos animais, o que não ocorreu no tempo das coletas sanguíneas propostas pelo atual estudo. Quando da intoxicação do animal por MFA, a hiperlactatemia está relacionada ao bloqueio do ciclo de Krebs, deslocamento do ciclo metabólico para anaerobiose na tentativa de suprir a demanda energética e pela incapacidade do fígado de metabolizar todo lactato formado no ciclo de Cori (Collicchio-Zuanaze e Sakate, 2005).

As concentrações de ureia dos animais do presente estudo não apresentaram alterações ($P > 0,05$) durante toda a fase experimental em ambos os tratamentos (Tabela 5). A ureia se mostrou dentro dos níveis plasmáticos normais para a espécie (González, *et al.*, 2000; Barini, 2007), sendo que esse resultado pode ser atribuído à dieta eficiente em proteína, pois a quantidade de ureia no sangue é dependente da relação energia/proteína e, valores

elevados de ureia indicam um aporte excessivo de proteínas no rúmen ou deficiência de energia (González *et al.*, 2000). O déficit energético é comum quando há deficiência nutricional decorrente de uma dieta pobre em carboidratos e/ou intoxicação por MFA, quando ocorre impossibilidade do uso da glicose pelo animal, associado a um translocamento de reservas corporais caracterizando um déficit energético de origem não nutricional (Rosenberger, 1993; Kaneko, 1997; Meyer e Harvey, 2004).

As concentrações de creatinina plasmática dos animais do presente estudo não apresentaram alterações ($P>0,05$) durante toda a fase experimental em ambos os tratamentos (Tabela 6). A concentração plasmática de creatinina se mostrou dentro dos valores de referência nos animais (González *et al.*, 2000), uma vez que alteração na concentração da creatinina sérica pode ser visto em casos de lesão muscular contínua, excesso de proteína na dieta e alterações renais e hepáticas. Sendo que estas situações não foram constatadas durante o estudo.

Dados da literatura relatam que o aumento das concentrações de ureia e creatinina, observados na maioria dos animais intoxicados com MFA, é um indicativo de que o MFA realmente causa lesões renais e danos musculares indiretos (Rosenberger, 1993; Kaneko, 1997; Meyer e Harvey, 2004). Porém, tais alterações supracitadas, possíveis de serem observadas na intoxicação por MFA, não foram constatadas nos exames de função renal e hepática dos animais submetidos ao experimento. No grupo tratado isso possivelmente é devido ao fato da não toxicidade do TFA na dose utilizada, além da não ocorrência da intoxicação quando do fornecimento do MFA. Já no grupo controle é justificado pela indução de intoxicação branda dos animais, portanto não suficiente para tais alterações patológicas, e/ou pelo fato de uma única coleta pós-desafio não ser suficiente para observar o pico de ureia e creatinina provenientes de uma lesão renal, já que tais alterações geralmente são mais tardias.

No presente estudo, as concentrações plasmáticas de proteínas totais e albumina não apresentaram alterações ($P>0,05$) durante toda a fase experimental em ambos os tratamentos (Tabelas 7 e 8). Variações dos valores da concentração das proteínas totais e albumina são comuns em animais com déficits de proteína e energia, principalmente quando os animais são submetidos a situações de restrição alimentar, situação comum nas épocas do ano com escassez de pastagens (González *et al.*, 2000). Já alteração da concentração referente a patologias debilitantes, disfunção hepática e renal decorrentes de processos infecciosos, ingestão de plantas tóxicas é comum observar baixas concentrações das proteínas totais e albumina na bioquímica sérica (Rosenberger, 1993; Kaneko, 1997; Meyer e Harvey, 2004).

Os valores de AST séricos não apresentaram alterações ($P>0,05$) durante toda a fase experimental em ambos os tratamentos (Tabelas 9). A ausência de diferenças significativas nos valores de AST, como observado nos resultados, não extrapolaram os valores de referência para espécie bovina, demonstrando, com isso, ausência de indícios de lesão hepática, renal e muscular nos animais do experimento (González *et al.*, 2000). Os resultados relacionados ao aumento da AST eram esperados, devido à hipótese de

que a movimentação a qual os animais eram submetidos durante o desafio após receberem a planta *P. macgravi* na dieta poderia elevar a concentração plasmática dessa enzima. No entanto como observado na Tabela 9, a AST não apresentou discrepância.

A elevação da atividade da AST é variável durante atividade física, mesmo que os efeitos do exercício sobre sua concentração também dependam de variáveis, tais como, estado de saúde dos animais, intensidade e duração do exercício ao qual são submetidos, bem como do ambiente (Rosenberger, 1993; Kaneko, 1997; Meyer e Harvey, 2004). Portanto, baseado nos resultados para AST sugere-se que esses animais não foram submetidos a exercícios físicos extenuantes no intuito da precipitação da manifestação clínica da intoxicação. Ademais, quando da manifestação da intoxicação, os animais não apresentaram indícios de lesões hepáticas relacionadas com aumento da enzima AST.

Os valores de GGT séricos não apresentaram alterações ($P > 0,05$) durante a fase experimental (Tabelas 10). Porém o aumento desta enzima geralmente ocorre em caso de hepatopatias de etiologia diversas, inclusos as de origem infecciosa, parasitárias e intoxicações. Também em casos de obstrução dos ductos biliares, sendo assim, nenhum destas alterações foram observadas durante o experimento baseado nos resultados dos outros exames laboratoriais complementares (Rosenberger, 1993; Kaneko, 1997; Meyer e Harvey, 2004). Mesmo sendo a GGT um parâmetro sensível para pesquisa de disfunção hepática (González *et al.*, 2000), entretanto, para que seja conclusiva para presença de tal alteração hepática, são necessárias outras alterações compatíveis nos exames complementares, das quais não ocorreram.

No caso deste experimento, o aumento da concentração da enzima GGT era esperado se o sal TFA fosse hepatotóxico para os animais, o que não ocorreu. Em relação ao grupo controle não tratado, uma possível alteração da GGT era esperada, no entanto, esta não foi observada provavelmente pelo curto período da coleta após o desafio. Portanto sem tempo de resposta para detecção do analíto.

O aumento da concentração da ureia e creatinina podem ser observados em animais intoxicados com MFA que não atinjam o óbito, portanto, podem ser um indicativo de lesão renal. Fato este relacionado com os processos de hipóxia, queda do ATP e a excreção do princípio ativo (aumento do contato do órgão com o princípio tóxico), que no caso do fluoracitrato pelos rins (Pessoa *et al.*, 2015). Porém, tais alterações supracitadas não foram constatadas nos animais do presente estudo, uma vez que o no grupo tratado, isto possivelmente se deve ao fato da ausência de toxicidade do TFA na dose utilizada. Já no grupo controle, é justificado pela indução de intoxicação branda dos animais, portanto não suficiente para tais alterações patológicas, associado a um curto período pós-desafio.

Diante da grande ocorrência de casos de intoxicação de ruminantes por plantas tóxicas produtoras de MFA e da ineficiência dos métodos profiláticos existentes (Tokarnia, 2000), a tecnologia proposta por este estudo, pelo uso do substrato TFA, análogo não tóxico do MFA é a melhor alternativa para combater tal intoxicação, pela qualidade da resistência conferida via microbiota já existente no rúmen dos animais, também pelo

baixo custo e praticidade, facilidade de aplicação. Uma vez que o TFA se mostrou possível de ser usado em veículos como, alimentação, água de bebida dos animais e até mesmo associados a dispositivos intra-ruminais de liberação lenta utilizado com certa frequência para outras substâncias empregadas na produção pecuária.

6. Conclusões

As avaliações físicas e as análises bioquímicas sanguíneas demonstraram que a administração diária do TFA a bovinos por 28 dias não induziu nenhum efeito tóxico. Além disso, a administração das folhas de *P. marcgravii* induziu quadro clínico característico da intoxicação em bovinos nos animais controle, porém não nos animais tratados com TFA. Deste modo, a administração de TFA a bovinos é capaz de induzir resistência eficaz à intoxicação pelo MFA.

O TFA, análogo não tóxico do MFA atualmente é a melhor alternativa para combater a intoxicação por plantas produtoras de MFA devido à qualidade da resistência conferida via microbiota já existente no rúmen dos animais, e também pelo baixo custo e praticidade e facilidade de aplicação.

7. Referências

ABRÃO, F. O.; PESSOA, M. S.; FREITAS, C. E. S. et al. Potencialidades e limitações da utilização de aditivos na produção de bovinos de corte. *Caderno de Ciências Agrárias*, v. 4, p. 43-60, 2012.

ABREU, M. W. Análise do consumo de energia direta e indireta das famílias brasileiras por faixa de renda. 2017. 166p. (Dissertação de Mestrado). Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.

ALMEIDA, T. H. S.; ALBUQUERQUE, R. F.; ALMEIDA, V. M. et al. Poisoning by *Thiloa glaucocarpa* (Combretaceae) in cattle in the semiarid regions of Paraíba and Pernambuco, Brazil. *Brazilian Journal of Veterinary Pathology*, v.10, p.111-116, 2017.

ATZERT, S. P. *A review of monofluoroacetate (Compound 1080) its properties, toxicology and use in predator and rodent control*. Washington: U.S. Bureau of Sport Fisheries and Wildlife Fish, 1971. 34p.

BARBOSA, E. F. G., CARDOSO, S. P., CABRAL FILHO, S. L. S. et al. Sinais clínicos e patologia da intoxicação crônica experimental de caprinos por *Palicourea marcgravii*. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v.35, p.209-215, 2015.

BARBOSA, J. D.; OLIVEIRA, C. M. C.; TOKARNIA C. H. et al. Comparação da sensibilidade de bovinos e búfalos à intoxicação por *Palicourea marcgravii* (Rubiaceae). *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v.23, p.167-172, 2003.

BARBOSA, R. R.; PACÍFICO DA SILVA, I.; SOTO-BLANCO, B. Development of conditioned taste aversion to *Mascagnia rigida* in goats. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v.28, p.571-574, 2008.

BARINI, A. C. Bioquímica sérica de bovinos (*Bos taurus*) sadios da raça curraleiro de diferentes idades. 2007. 104p. (Dissertação de Mestrado). Universidade Federal de Goiás, Goiânia.

BASSON, P. A.; NORVAL, A. G.; HOFMEYR, J. M. et al. Antelope and poisonous plants: 1. Gifblaar *Dichapetalum cymosum* (Hooker) Engler e Prantl containing monofluoroacetate. *Madoqua*, v.13, p.59-70, 1982.

BECKER, M. Importância da intoxicação por *Amorimia pubiflora* (Malpighiaceae) em bovinos em Mato Grosso: reprodução experimental da intoxicação em ovinos e bovinos. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v.33, p.1049-1056, 2013.

BERNY, P. J.; OLIVEIRA, L. A.; VIDEMANN, B. et al. Assessment of ruminal degradation, oral bioavailability, and toxic effects of anticoagulant rodenticides in sheep. *American Journal of Veterinary Research*, v.67, p.363-371, 2006.

BOECHAT, M. L.; RIBEIRO, M. O.; RIBEIRO, L. O. et al. Lodos de esgoto doméstico e industrial no crescimento inicial e qualidade de mudas de pinhão-mansô. *Bioscience Journal*, v. 30, p. 782-791, 2014.

BRAND, K. América do Sul invadida: a crescente ameaça das espécies exóticas invasoras. Nairobi: GISP, 2005. 80p.

CAMBOIM, E. K. A.; ALMEIDA, A. P.; TADRA-SFEIR, M. Z. et al. Isolation and identification of sodium fluoroacetate degrading bacteria from caprine rumen in Brazil. *Scientific World Journal*, v.2012, p. 1-6, 2012b.

CAMBOIM, E. K.; TADRA-SFEIR, M. Z.; SOUZA, E. M. et al. Defluorination of sodium fluoroacetate by bacteria from soil and plants in Brazil. *Scientific World Journal*, v. 2012, 2012a.

CARDOSO, T. P. Análise estrutural de halogenases encontradas em clusters gênicos da biossíntese de antibióticos glicopeptídicos. 2015. 106p. (Tese Doutorado). Universidade Federal de São Paulo, São José do Rio Preto.

CASSIANO, N. M.; BARREIRO, J. C.; MARTINS, L. R. R. et al. Validação em métodos cromatográficos para análises de pequenas moléculas em matrizes biológicas. *Química Nova*, v.32, p.1021-1030, 2009.

CHAN, W.Y.; WONG, M.; GUTHRIE, J. et al. Sequence- and activity-based screening of microbial genomes for novel dehalogenases. *Microbial Biotechnology*, v.3, p.107–120, 2010.

CHEEKE, P. R. Natural toxicants in feeds, forages, and poisonous plants. 2 ed. Danville: Interstate Publishers, 1998. 479p.

CHENOWETH, M. B. Monofluoroacetic acid and related compounds. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, v.97, p.383-424, 1949.

COLLICCHIO, R.C. Intoxicação por fluoroacetato de sódio: avaliações clínica, hemogasométrica, eletrocardiográfica e da eficácia do gluconato de cálcio e succinato de sódio como protocolo terapêutico. 2002. 133p. (Dissertação de Mestrado) Universidade Estadual Paulista, Botucatu.

COLLICCHIO-ZUANAZE, R. C.; SAKATE, M. Aspectos clínicos e terapêuticos da intoxicação por fluoroacetato de sódio em animais domésticos: revisão. *Veterinária Notícias*, v.11, p.81-89, 2005.

COOK, C. J.; EASON, C. T.; WICKSTROM, M. et al. Developments of antidotes for sodium monofluoroacetate (1080). *Biomarkers*, v.6, p.72-76, 2001.

COOK, D.; LEE, S.T.; TAYLOR, C.M. et al. Detection of toxic monofluoroacetate in *Palicourea* species. *Toxicon*, v.80, p.9-16, 2014.

COSTA, S. F., M. N. PEREIRA, L. Q. MELO, J. C. RESENDE, Lactate, propionate and, butyrate induced morphological alterations on calf ruminal mucosa and epidermis. Ultrastructural aspects. *Arquivo Brasileiro Medicina Veterinária Zootecnia*, v.60, p.1–9, 2008a.

DAVIS, C. K.; WEBB, R I.; SLY, L. I. et al. Isolation and survey of novel fluoroacetate-degrading bacteria belonging to the phylum *Synergistetes*, *FEMS Microbiology Ecology*, v.80, p.671–684, 2012.

DOMINGUEZ-BELLO, M. Detoxification in the rumen. *Annales de Zootechnie*, v.45, p.323-327, 1996.

DUARTE, A. L. L.; MEDEIROS, R. M. T.; CARVALHO, F. K. L. et al. Induction and transfer of resistance to poisoning by *Amorimia (Mascagnia) septentrionalis* in goats. *Journal of Applied Toxicology*, v.34, p.220-223, 2013.

EASON, C. T.; TURCK, P. Uma avaliação de toxicidade por 90 dias do composto 1080 (monofluoroacetato de sódio) em ratos Sprague-Dawley. *Toxicological Sciences*, Nova Zelândia, v.69, p.439–447, 2002.

- EVANS, M. C. W.; BUCHANAN, B. B.; ARNON, D. I. A new ferredoxin-dependent carbon reduction cycle in a photosynthetic bacterium. *PNAS*, v.55, p. 928-934, 1966.
- FAGLIARI, J. J.; WEISS, D. J.; MCCLENANHAN, D. et al. Serum protein concentrations in calves with experimentally induced pneumonic pasteurellosis. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v.55, p.383-387, 2003.
- FETZNER, S.; LINGERS, F. Bacterial dehalogenases: biochemistry, genetics, and biotechnological applications. *Microbiological Reviews*, v.58, p.641-685, 1994.
- FREITAS, S. P.; SILVA, J. F. S.; FERREIRA, L. R. Principais plantas tóxicas para herbívoros. Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, v.1, p.32, 1995.
- GALL, L. W.; HUTTANEN, C.N. Criteria for considering a bacteria isol om the rumen as a bona flide rumen organism. *Journal of Animal Science*, v.67, p.558, 1989.
- GOLDMAN, P. The enzymatic cleavage of the carbon-fluorine bond in fluoroacetate. *The Journal of Biological Chemistry*, v.240, p.3434–3438, 1965.
- GOMES, S.T. Diagnóstico da pecuária leiteira do Estado de Minas Gerais no período de 2005: relatório de pesquisa. Belo Horizonte: FAEMG, 2006. 156 p.
- GONZÁLEZ, F.H.D. Uso de perfil metabólico para determinar o status nutricional em gado de corte. In: GONZÁLEZ, F.H.D.; BARCELLOS, J.O; OSPINA, H. et al. *Perfil Metabólico em ruminantes: seu uso em nutrição e doenças nutricionais*. Porto Alegre:UFRGS, 2000. 108p.
- GONZÁLEZ, F.H.D.; SILVA, S.C. Bioquímica clínica de glicídes. Introdução a bioquímica clínica veterinária. 2ed. Porto Alegre: Editora da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2006, p.153- 207.
- GREGG, K.; HAMDORF, B.; HENDERSON, K. et al. Genetically modified ruminal bacteria protect sheep from fluoroacetate poisoning. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 9, p.3496–3498, 1998.
- GREGORY, L. E. H.; BIRGEL JUNIOR, R. M. S. MIRANDOLA, W. P. et al. Valores de referência da atividade enzimática da aspartato-aminotransferase e da gama-glutamilttransferase em bovinos da raça Jersey. Influência dos fatores etários, sexuais e da infecção pelo vírus da leucose dos bovinos. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v.51, p.515-522, 1999.

HILL, J. W.; BAUM, S. J.; FEIGEL, D. M. *Chemistry and life: an introduction to general, organic and biological chemistry*. 6. ed. Milwaukee: University of Wisconsin, 1999. 839p.

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

Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) Disponível em: <<https://www.ibge.gov.br/estatisticasnovoportaleconomicas/agriculturaepecuaria/9827-censo-agropecuario.html?=&t=o-que-e>> Acesso em: 02 de Agosto de 2016.

KHRISTOV, M ; PESHEV. P.; ANGELOVA, O. et al. Preparation, thermal behaviour, and structure of calcium trifluoroacetate monohydrate. *Monatshefte für Chemie - Chemical Monthly*, v.129, p.1093, 1998.

KOZLOSKI, G. V. *Bioquímica dos Ruminantes*, 3. ed. Santa Maria: UFSM, 2016. 212p.

KREBS, H.C.; KEMMERLING, W.; HABERMEHL, G. Qualitative and quantitative determination of fluoroacetic acid in *Arrabidaea bilabiata* and *Palicourea marcgravii* by F-NMR spectroscopy. *Toxicon*, v.32, p.909-13, 1994.

KREBS, H.C.; KEMMERLING, W.; HABERMEHL, G. Qualitative and quantitative determination of fluoroacetic acid in *Arrabidaea bilabiata* and *Palicourea marcgravii* by ¹⁹F-NMR spectroscopy. *Veterinary and Human Toxicology*, v.32, p.909-913, 1994.

LAGE, J. F.; PAULINO, P. V. R.; PEREIRA, L. G. R. et al. Glicerina bruta na dieta de cordeiros terminados em confinamento. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v.45, p.1012-1020, 2010.

LANÇAS, F. M. Cromatografia líquida, espectrometria de massas. *Scientia Chromatographica*. v.1. p.35, 2009.

LAZZAROTTO, F. TEIXEIRA, F. K; ROSA, S. B. et al. Ascorbate peroxidase-related is a new heme-containing protein functionally associated with ascorbate peroxidase but evolutionarily divergent. *New Phytology*, v.191, p.234-250, 2011.

LEE, S. T.; COOK, D.; RIET-CORREA, F. et al. Detection of monofluoroacetate in *Palicourea* and *Amorimia* species. *Toxicon*, v.60, p.791-796, 2012.

LEONG, L. E. X.; KHAN, S.; DAVIS, C. K et al. Fluoroacetate in plants – a review of its distribution, toxicity to livestock and microbial detoxification. *Journal of Animal Science and Biotechnology*, v.8, p.1-11, 2017.

LYNCH, K F. S. Microbiota in allergy and asthma and the emerging relationship with the gut microbiome. *Cell Host Microbe*, v.17, p. 592–602, 2015.

MAYER, J. J. M.; VAN ROOYEN, S. W. Fluoracetate metabolism by a bacterium from *Dichapetalum braunii*. In: COLEGATE, S. M.; DORLING, P. R.; ALLEN, J. G et al. *Plant associated toxins: agricultural, phytochemical and ecological aspects*. 1. ed. Wallingford: CAB International. 1994. p.457-461.

MELO M. M.; SILVA JUNIOR, P. G. P.; RABELO, R. C. et al. *Fundamentos de terapia intensiva veterinária em pequenos animais: condutas no paciente crítico*. Rio de Janeiro: LF Livros, 2005. 772p.

MINNAAR, P. P.; SWAN, G. E.; MCCRINDLE, R. I. et al. A high-performance liquid chromatographic method for the determination of monofluoroacetate. *Journal of Chromatographic Science*, v.38, p.16-20, 2000.

MORAES, R. L. F. Comprovação química e biológica da presença de monofluoroacetato nas folhas de *Palicourea marcgravi*. 1993. 83f. (Tese Doutorado). Universidade Federal de São Paulo, São Paulo.

MORANDI, M.A.B. E BETTIOL, W. Controle biológico de doenças de plantas no Brasil. In: Bettiol, W; Morandi, M.A.B. *Biocontrole de doenças de plantas: uso e perspectivas*. Jaguariúna, Embrapa Meio Ambiente, p.07-14, 2009.

NOGUEIRA V. A.; FRANÇA T. C.; PEIXOTO T. C. et al., Intoxicação experimental por monofluoroacetato de sódio em bovinos: aspectos clínicos e patológicos. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, Rio de Janeiro, v. 30, n. 7, p. 533-540, 2010.

NOGUEIRA, V. A., FRANÇA, T. N.; PEIXOTO, T. C. et al. Intoxicação experimental por monofluoroacetato de sódio em bovinos: aspectos clínicos e patológicos. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v.30, p.533-540, 2010.

NOGUEIRA, V. A.; FRANÇA T. N.; PEIXOTO T.C. et al. Intoxicação por monofluoroacetato em animais. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v.31, p.823-838, 2011.

OLIVEIRA, C. M. C.; BARBOSA, J. D.; MACEDO, R. S. C. et al. A comparative study of the toxicity of *Palicourea juruana* (*Rubiaceae*) to buffalo and cattle. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v.24, p.27-30, 2004.

OLIVEIRA, M. D.; RIET-CORREA, F.; CARVALHO, F. K. L. et al. Indução de resistência à intoxicação por *Palicourea aeneofusca* (*Rubiaceae*) mediante administração de doses sucessivas não tóxicas. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v.33, p.731-734, 2013.

OLIVEIRA, R. B.; GIMENEZ, V. M. M.; GODOY, S. A. P. Intoxicações com espécies da família Euphorbiaceae. *Revista Brasileira de Biociências*, v. 5, p. 69-71, 2007.

ORTIS M. Comissão externa destinada a acompanhar as investigações sobre o envenenamento de animais ocorrido na Fundação Zoológico de São Paulo (envenenamento no Zoológico de São Paulo). 2005. Disponível em: <www.camara.gov.br/sileg/integras/292702.pdf>. Acesso em: 29 de Setembro de 2017.

PACÍFICO DA SILVA, I.; SOTO-BLANCO, B. Conditioning taste aversion to *Mascagnia rigida* (Malpighiaceae) in sheep. *Research in Veterinary Science*, v.88, p.239-241, 2010.

PATELLI, T. H. C.; FAGNANI, R.; CUNHA FILHO, L. F. C. et al. Hipocalcemia no deslocamento de abomaso de bovinos: estudo de 39 casos. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v. 37, p. 17-22, 2017.

PAVARINI, S. P.; SOARES, M. P.; BANDARRA, P. M. et al. Mortes súbitas em bovinos causadas por *Amorimia exotropica* (Malpighiaceae) no Rio Grande do Sul. *Veterinária Brasileira*, v.31, p.291-296, 2011.

PEDROZA, H. P. *Psychotria hoffmannseggiana*: uma nova espécie de planta tóxica para bovinos. 2015. 41f. (Dissertação de Mestrado). Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

PEIXOTO, T. C.; NOGUEIRA, V. A.; COELHO, C. D. et al. Aspectos clínico-patológicos e laboratoriais da intoxicação experimental por monofluoroacetato de sódio em ovinos. *Pesquisa Veterinária Brasileira*. v. 30, p.1021-1030, 2010.

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, p.752-758, 2013.

PESSOA, D. A. N.; SILVA, L. C. A.; LOPES, J. R. G. et al. Resistência à intoxicação por *Amorimia septentrionalis* em caprinos, induzida pela inoculação ruminal das bactérias *Pigmentiphaga kullae* e *Ancylobacter dichloromethanicus*. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v.35, p.125-128, 2015.

QUEIROZ, R. C.; BERGAMASCHINE, A. F.; BASTOS, J. F. P. et al. Uso de produto à base de enzima e levedura na dieta de bovinos: digestibilidade dos nutrientes e desempenho em confinamento. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v.33, p.1548-1556. 2004.

RAO, M. B.; TANKSALE, A. M.; GHATGE M. S. et al. Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, v.62, p.597-635, 1998.

RASKIN, L.; CAPMAN, W. C.; SHARP, R. et al. Molecular ecology of gastrointestinal ecosystems. In: MACKIE, R. I.; WHITE, B. A.; ISAACSON, R. E. *Gastrointestinal microbiology*. v. 2. New York: Chapman and Hall. p. 243 – 298, 1997.

REIS, R. A.; JOBIM, C. C.; RABELO, C. H. S. et al. An overview about the role of silage inoculants in Brazil: a good strategy to improve the silage quality. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, Belo Horizonte, v.52, p.1-43, 2015.

RIET-CORREA, F.; MEDEIROS R. M. T. Intoxicações por plantas em ruminantes no Brasil e no Uruguai: importância econômica, controle e riscos para a saúde pública. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v.21, p.38-42, 2001.

RISSI, D. R.; RECH, R. R.; PIEREZAN, F. et al. Intoxicações por plantas e micotoxinas associadas a plantas em bovinos no Rio Grande do Sul. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v.27, p.261-268, 2007.

RONDELLI, L. A. S.; SILVA, G. S.; BEZERRA, K. S.; et al. Doenças de bovinos em Mato Grosso diagnosticadas no Laboratório de Patologia Veterinária da UFMT (2005-2014). *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v.37, p.432-440, 2017.

RONSEIN, G. E.; DUTRA, R. L.; SILVA, E. L. et al. Influência do estresse nos níveis sanguíneos de lipídios, ácido ascórbico, zinco e outros parâmetros bioquímicos. *Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana*, v.38, n.1, p. 39-46, 2004.

SAKATE, M.; SCHWARTZ, D. S.; TEREZZA, E. et al. Calcium gluconate and sodium succinate for therapy of sodium fluoroacetate experimental intoxication in cats: clinical and electro-cardiographic evaluation. *Human e Experimental Toxicology*, v.25, p.175-182, 2005.

SANTOS, A. C.; RIET-CORREA, F.; HECKLER, R. F. et al. Administração repetida de doses não tóxicas de monofluoroacetato de sódio não protege contra a intoxicação por este composto em ovinos. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v.34, p.649-654, 2014.

SAYAMA, K.; BRUNETTI, O. The effects of sodium fluoroacetate (1080) on *California quail*. *Fish Game*, v.38, p.295-300, 1952.

SCHONS, S. V.; LOPES, T. V.; MELO, T. L. et al. Intoxicações por plantas em ruminantes e equídeos na região central de Rondônia. *Ciência Rural*, v.42, p.1257-1263, 2012.

SERODIO, J. J.; CALACA, A. M. M.; SILVA, J. A. E. et al. Intoxicação experimental por *Palicourea margravii* em bovinos Nelore e Curraleiro. In: VII ENDIVET - Encontro Nacional de Diagnóstico Veterinário, Porto Alegre, v. 1, p. 135-135, 2012.

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

SILVA, L. C. A. PESSOA, D. A. N. LOPES, J. R. G. et al., Protection against *Amorimia septentrionalis* poisoning in goats by the continuous administration of sodium monofluoroacetate-degrading bacteria, *Toxicon*, v.111, p.65-68, 2016.

SILVA, L. C. A. Técnica de transfaunação, mediante a utilização de bactérias, induz resistência em caprinos à intoxicação por *Amorimia septentrionalis*. *Ciência Rural*, v.45 n.12. 2016.

SILVEIRA, L. R.; PINHEIRO, C. H. J.; ZOPPI C. C. et al. Regulação do metabolismo de glicose e ácido graxo no músculo esquelético durante exercício físico. *Arquivo Brasileiro de Endocrinologia Metabólica*, v.55, p.303-313, 2011.

STEPHEN T. L, DANIEL C., JAMES A. Taylor *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.62, n.30, p. 7345-7354, 2014.

STOCKHAM , S. L; SCOTT, M. A. *Fundamento de Patologia Clínica Veterinária*. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2011. 729p.

TAVARES, M. I.; REZENDE, A. M. L.; DÖBEREINER, J. Intoxicação experimental por *Pseudocalymma elegans* em coelhos e cobaias. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v.9, p.91-94, 1974.

The State Of Food And Agriculture (FAO) - Livestock in the balance, Rome, (2009). Disponível em: <http://www.fao.org/docrep/012/i0680e/i0680e.pdf> acesso em 02 de agosto de 2016.

THRALL, M. A; BAKER, D. C; CAMPBELL, E.W; et al. *Hematologia e Bioquímica Clínica Veterinária*. São Paulo: Roca, 2007. 582p.

TOKARNIA, C. H. *Plantas Tóxicas do Brasil*. 2. ed. Rio de Janeiro: Helianthus. 2012. 566p.

TOKARNIA, C. H.; BARBOSA, J. D.; OLIVEIRA, C. M. C. et al. Aspectos epidemiológicos e clínico-patológicos comparados da intoxicação por *Arrabidaea bilabiata* (*Bignoniaceae*) em búfalos e bovinos. *Pesquisa Veterinária Brasileira*. v.24, p.74-79 2004.

TOKARNIA, C. H.; DÖBEREINER, J. Intoxicação experimental por *Palicourea juruana* (*Rubiaceae*) em bovinos e coelhos. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v.2, p.17-26, 1982.

TOKARNIA, C. H.; DÖBEREINER, J. Intoxicação por *Arrabidaea japurensis* (Bignoniaceae) em bovinos em Roraima. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v.1, p.7-17, 1981.

TOKARNIA, C. H.; DÖBEREINER, J.; PEIXOTO, P. V. Deficiências minerais em animais de fazenda, principalmente bovinos em regime de campo. *Pesquisa Veterinária Brasileira*. v.20, p.127-138, 2000.

TWIGG, L. E.; SOCHA, L. V. Defluorination of sodium monofluoroacetate by soil microorganisms from central Australia. *Soil Biology e Biochemistry*, v.33, p.227- 234, 2001.

VALVERDE, O. Geografia da pecuária no Brasil. *Finisterra*, v.2, p.244-261, 1967.

VASCONCELOS J. S.; RIET-CORREA, F.; DANTAS, A. F. M. et al. Intoxicação por *Mascagnia rigida* (Malpighiaceae) em ovinos e caprinos. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v.28, p.521-526, 2008b.

VASCONCELOS, J. S.; RIET-CORREA, F.; DANTAS, A. F. M. et al. Mortes súbitas em bovinos causadas por *Palicourea aeneofusca* (Rubiaceae) e *Mascagnia rigida* (Malpighiaceae) na Zona da Mata Paraibana. *Pesquisa Veterinária Brasileira*. v.28, p.457-460, 2008a.

VOET, D.; VOET, J. G. *Bioquímica*. 4. ed. Porto Alegre: Artmed, 2013. 1512p.