

Heloísa de Paula Pedroza

Psychotria hoffmannseggiana:

UMA NOVA ESPÉCIE DE PLANTA TÓXICA PARA BOVINOS

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 Veterinárias.

Orientador: Benito Soto Blanco

Co-orientador (a): Marília Martins Melo

Belo Horizonte

Escola de Veterinária – UFMG

2015

P372p Pedroza, Heloísa de Paula, 1988-
Psychotria hoffmannseggiana: uma nova espécie de planta tóxica para bovinos /
Heloísa de Paula Pedroza. – 2015.
41 p. : il.

Orientador: Benito Soto Blanco
Co-orientador: Marília Martins Melo
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária.
Inclui bibliografia

1. Plantas venenosas – Toxicologia – Teses. 2. Plantas venenosas para o gado – Teses.
3. Toxicologia veterinária – Teses. 4. Bovino – Doenças – Teses. I. Blanco, Benito Soto.
II. Melo, Marília Martins. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Escola de
Veterinária. IV. Título.

CDD – 636.089 595 2

FOLHA DE APROVAÇÃO

HELOÍSA DE PAULA PEDROZA

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

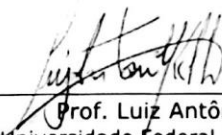
Aprovada em 09 de fevereiro de 2015, pela banca constituída pelos membros:



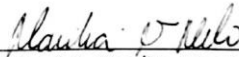
Prof. Benito Soto Blanco
Presidente - Orientador



Prof. Antônio Último de Carvalho
EMBRAPA



Prof. Luiz Antônio Moura Keller
Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro



Prof.ª. Marília Martins Melo
Universidade Federal de Minas Gerais - Escola de Veterinária

A tarefa não é tanto ver aquilo que ninguém viu, mas pensar o que ninguém pensou sobre aquilo que todo mundo vê.

Arthur Schopenhauer

AGRADECIMENTOS

À 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.

Aos meus bisavós, Antônio e Maria (*in memorian*), que sempre foram e serão parte importante da minha vida. Apesar deles não estarem mais presentes, acredito que estariam felizes por esse momento. Saudade de vocês.

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, Ricardo e Ivoneide, e ao meu irmão, Ricardo Henrique, por acreditarem sempre em mim. 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 Antônio Catunda, meu companheiro, amigo e confidente, obrigada pela paciência, segurança, pelas palavras de apoio, por sempre estar ao meu lado, por me tranquilizar e sempre ter uma palavra doce para me confortar. Amo você.

Aos meus avós, Marinalva, Oneide e Severiano, por sempre se interessarem por mim, querendo saber como estou, sempre apoiando e incentivando minhas decisões. Obrigada pelas orações. Aos meus tios avós Helena (*in memorian*) e Elísio, obrigada pelo apoio, serei eternamente grata.

As minhas tias, Gilda, Oneide, Célia, Gizélia, Liana e Auta pelo apoio e incentivos. Muito obrigado por depositarem toda essa confiança em mim.

Aos meus sogros, Vanda e Francisco, e minhas cunhadas, Camila e Morgana, obrigada pela torcida.

Aos professores Benito Soto, Marília Martins, Kelly Moura, Antônio Último e Elias Facury, pelos ensinamentos, paciência, disponibilidade, seriedade, dedicação e exemplo profissional.

A todos os amigos adquiridos durante este período, em especial, Raquel Cabala, Marina Ferreira, Lílian de Paula, Luisa Cangussú, Filipe Mendonça, Débora Freitas, Rodrigo Ribeiro, Sérgio Júnior, Cahuê Paz, Tatiana Fiuza e Ana Flávia pela colaboração mútua e companhia constante durante as horas de trabalho e lazer.

À todos os que, de forma direta ou indireta, contribuíram para que eu chegasse à conclusão desta etapa.

À CAPES pela concessão da bolsa de mestrado.

SUMÁRIO

RESUMO	8
1. INTRODUÇÃO	9
2. OBJETIVOS	9
3. REVISÃO DE LITERATURA	10
3.1. PLANTAS TÓXICAS NO BRASIL.....	10
3.2. PLANTAS TÓXICAS QUE CAUSAM “MORTE SÚBITA”.....	11
3.3. INTOXICAÇÃO POR MONOFLUOROACETATO DE SÓDIO.....	13
3.3.1. Toxicidade do monofluoroacetato de sódio.....	13
3.3.2. Mecanismo de ação.....	13
3.3.3. Sinais clínicos.....	15
3.3.4. Diagnóstico.....	15
3.3.5. Prognóstico.....	17
3.3.6. Tratamento.....	17
3.3.7. Profilaxia e controle.....	18
4. MATERIAL E MÉTODOS	19
4.1. RELATO DE UM SURTO DE MORTE SÚBITA EM BOVINOS.....	19
4.2. IDENTIFICAÇÃO DO MATERIAL VEGETAL.....	19
4.3. EXTRATO PARA QUANTIFICAÇÃO DE MFA NO MATERIAL VEGETAL.....	19
4.4. EXTRATO PARA QUANTIFICAÇÃO DO MFA NAS AMOSTRAS DE LÍQUIDO RUMINAL E FÍGADO.....	19
4.5. DETECÇÃO DE MFA NO MATERIAL VEGETAL, LÍQUIDO RUMINAL E FÍGADO POR CLAE-UV.....	20
4.6. COMPARAÇÃO DAS TÉCNICAS DE <i>CLEAN-UP</i> PARA DETECÇÃO DE MFA NO EXTRATO DO MATERIAL VEGETAL POR CLAE-UV.....	20
4.7. DETECÇÃO DE MFA DO MATERIAL VEGETAL POR CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA (CCD).....	20
5. RESULTADOS	21
5.1. INTOXICAÇÃO NATURAL.....	21
5.1.1. Aspectos epidemiológicos e clínicos.....	21
5.1.2. Identificação da planta.....	24
5.1.3. Detecção de MFA no material vegetal e nas amostras de tecido animal.....	24
5.2. TÉCNICAS DE <i>CLEAN UP</i>	24
5.3. DETECÇÃO DE MFA DO MATERIAL VEGETAL POR CCD.....	24
6. DISCUSSÃO	25
6.1. INTOXICAÇÃO POR <i>Psychotria hoffmannseggiana</i>	25
6.2. MÉTODOS DE DETECÇÃO DE MFA DO MATERIAL VEGETAL.....	29
7. CONCLUSÕES	29
8. REFERÊNCIAS	30
9. ANEXOS	37

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 –	Ação do monofluoroacetato de sódio no ciclo de Krebs.....	14
Figura 2 –	Pastos com acesso a mata nativa	21
Figura 3 –	Mata nativa e fonte de água nos quais os animais tinham acesso.....	21
Figura 4 –	Necropsia do BOV-1	22
Figura 5 –	Erva de rato	23

LISTA DE ABREVIATURAS

CCD	Cromatografia em camada delgada
CG	Cromatografia gasosa
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
DCCV	Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinárias
DHV	Degeneração hidropicovacuolar
EV-UFMG	Escola da Veterinária – Universidade Federal de Minas Gerais
MFA	Monofluoroacetato
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais
UV	Ultravioleta

RESUMO

No Brasil, diversas espécies de plantas produzem um quadro de intoxicação em bovinos conhecido como morte súbita. O princípio tóxico da maioria destas espécies foi confirmado como monofluoroacetato (MFA), um composto que promove bloqueio do ciclo do ácido cítrico. No estado de Minas Gerais, uma espécie de planta conhecida como erva de rato tem sido apontada como responsável por diversos surtos de intoxicação em bovinos, mas esta espécie é diferente das espécies de *Palicourea* descritas como tóxicas. Assim, o presente estudo teve por objetivo identificar esta espécie, relatar um surto de intoxicação natural, determinar se o princípio tóxico é o MFA e comparar técnicas para identificação deste composto. A planta foi identificada como *Psychotria hoffmannseggiana*. Os surtos de intoxicação foram relatados apenas em bovinos e são similares aos observados com *Palicourea marcgravii*. O princípio tóxico foi confirmado como sendo o MFA em amostras da planta de locais de surto. Por outro lado, a planta cultivada não apresentou níveis detectáveis de MFA, o que indica que a composição do solo e/ou microrganismos associados à raiz da planta são fatores determinantes para a produção deste composto tóxico. A determinação do MFA por meio de cromatografia em camada delgada (CCD) foi considerada pouco sensível e específica. A técnica de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) com leitor UV e separação de coluna C-610H para ácidos orgânicos (Supelcogel) foi bastante eficaz, com melhores resultados após *clean-up* com carvão ativado. Mesmo após secagem e armazenamento por 45 dias à temperatura ambiente, os níveis de MFA na planta permaneceram estáveis. Assim, foi verificado que *Psychotria hoffmannseggiana* é uma planta tóxica que contém MFA.

Palavras-chave: monofluoroacetato, morte súbita, Rubiaceae, *Palicourea*.

ABSTRACT

Several plants species in Brazil produce poisoning in cattle known as sudden death. The toxic compound of most of these species has been confirmed as monofluoroacetate (MFA), a compound which promotes blocking of the citric acid cycle. In the Brazilian state of Minas Gerais, a species of plant known as "erva de rato" has been implicated as responsible for several outbreaks of poisoning in cattle, but this species is different from Palicourea species described as toxic. Thus, this study aimed to identify this species, report natural poisoning outbreak, determine whether the toxic principle is the MFA and compare techniques for the identification of this compound. The plant was identified as Psychotria hoffmannseggiana. The poisoning outbreaks have been reported only in cattle and are similar to those observed with Palicourea marcgravii. The toxic principle has been confirmed as the MFA in plant samples collected at the local of outbreak. On the other hand, the cultivated plant showed no detectable levels of MFA, which indicates that the composition of the soil and/or microorganisms associated with plant roots are decisive factors for the production of this toxic compound. The determination of the MFA by thin layer chromatography (TLC) was considered of low sensitivity and specificity. The liquid chromatography technique (HPLC) with UV detector and separation of C-610H column for organic acids (Supelcogel) was quite effective, with best results after clean up with activated charcoal. Even after drying and storage for 45 days at room temperature, MFA levels remained stable in the plant. Thus, it was found that Psychotria hoffmannseggiana is a toxic plant containing MFA.

Keywords: monofluoroacetate, sudden death, Rubiaceae, Palicourea.

1. INTRODUÇÃO

Na natureza, um grande número de espécies vegetais apresentam princípios tóxicos capazes de promover distúrbios em animais. No entanto, são classificadas como plantas tóxicas de interesse pecuário aquelas que quando ingerida pelos animais domésticos, sob condições naturais, causam danos à saúde ou mesmo morte (Tokarnia et al., 2000; Barbosa et al., 2007).

Diversos fatores podem influenciar no consumo dessas plantas pelos animais domésticos, entre eles: palatabilidade, carência de forragens, longos períodos de privação hídrica, período de ingestão, espécie animal, idade, deficiências minerais, estado e armazenamento da planta, superlotação, queimadas, fenação, exercício físico, vício, tolerância, imunidade dos animais, transporte e introdução de animais (mantidos em locais onde não ocorre a planta) em pastagens desconhecidas (Barbosa et al., 2007; Pott et al., 2006; Tokarnia et al., 2012), tendo particular importância nas áreas em que se pratica pastoreio extensivo (Radostitis et al., 2002).

Inúmeros compostos químicos já foram identificados como responsáveis pela toxicidade das plantas. Geralmente esses compostos são produtos secundários do metabolismo da planta parecendo estar envolvidas como adjuvantes no mecanismo de sobrevivência, apresentando ampla variação em estrutura e propriedades químicas (Cheeke, 1998).

As classes químicas mais importantes de compostos tóxicos existentes nas plantas são: alcalóides, glicosídeos, lecitinas e ácidos orgânicos. Ainda, minerais absorvidos do solo e acumulados na planta, como por exemplo, selênio, bário, nitratos e oxalatos, podem ser responsáveis pela toxicidade de determinadas espécies vegetais acarretando prejuízos econômicos a pecuária nacional (Andrade e Mattos, 1968; Cheeke, 1998).

Uma das dificuldades existentes em relação às plantas tóxicas é a nomenclatura popular. Uma mesma espécie pode ser conhecida por diversos nomes, ao mesmo tempo em que um único nome pode ser empregado para diferentes espécies (Tokarnia et al., 2012). Dificultando na adoção de medidas de controle e profiláticas já que essas plantas podem conter características e princípios tóxicos diferentes.

No estado de Minas Gerais, uma espécie de planta conhecida popularmente como erva de rato tem sido apontada por veterinários como responsável por diversos surtos de intoxicação em bovinos, mas esta espécie é diferente das espécies do gênero *Palicourea* spp. descritas como tóxicas.

2. OBJETIVOS

Assim sendo, o presente estudo teve por objetivo identificar esta espécie, relatar um surto de intoxicação natural, determinar se o princípio tóxico é o MFA e comparar técnicas para identificação deste composto.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1. PLANTAS TÓXICAS NO BRASIL

As intoxicações por plantas representam uma importante causa de doenças nos animais de produção. No Brasil, o número de plantas conhecidas como tóxicas para ruminantes e equinos aumenta continuamente, havendo aproximadamente 131 espécies de 79 gêneros conhecidos. Apesar de mais de uma centena de espécies de plantas tóxicas serem conhecidas no país, há poucas responsáveis pela maioria das perdas econômicas. No entanto, a importância toxicológica varia de acordo com a região e a espécie afetada (Pessoa et al., 2013). No Rio Grande do Sul, por exemplo, a intoxicação por *Senecio* spp. é a principal causa de morte em bovinos (Pedroso et al., 2007; Rissi et al., 2007; Lucena et al., 2010), enquanto as intoxicações por *Baccharis coridifolia* e *Sida carpinifolia* apresentam maior importância para ovinos e caprinos, respectivamente (Pedroso et al., 2007; Rissi et al., 2007). Já em Rondônia, assim como no restante da região Norte, a *Palicourea marcgravii* assume o papel de principal planta tóxica para bovinos (Schons et al., 2012).

Os principais problemas relacionados à invasão de pastagens por plantas tóxicas incluem morte de bovinos, abortamentos, defeitos congênitos, baixo desempenho produtivo por doença crônica, subutilização de pastagens e altos custos com implantação de medidas de controle (Barbosa et al., 2007; Pedroso et al., 2007).

Dentre esses prejuízos, a morte de bovinos é um índice facilmente avaliado, enquanto que as outras perdas são de difícil mensuração, devido à escassez de dados (Rissi et al., 2007), e se tornam um problema constante nas propriedades.

Baseado na taxa de mortalidade, alguns estudos foram realizados no intuito de estimar as perdas causadas por óbito dos animais, por meio de dados elaborados por laboratórios de diagnóstico veterinário. Levando-se em conta a estimativa de que pelo menos 5% do rebanho bovino morre anualmente por diferentes causas no Brasil (Riet-Correa e Medeiros, 2001). Considerando os dados laboratoriais de diferentes regiões, concluiu-se que, entre 7,4% e 15,83% dessas mortes são causadas por plantas tóxicas (Riet-Correa e Medeiros, 2001; Pedroso et al., 2007; Rissi et al., 2007; Pessoa et al., 2013).

Devido ao grande número de espécies, as plantas tóxicas são estudadas em grupos, podendo estes ser formados de acordo com a divisão regional, com a ação patológica, com as famílias botânicas e com os princípios tóxicos. A forma de agrupamento considerada mais prática é a classificação das plantas de acordo com o quadro clínico-patológico que promovem (Tokarnia et al., 2000; Barbosa et al., 2007). Baseado nisso, as plantas podem ser classificadas como: plantas cianogênicas, plantas de ação radiomimética, plantas fotossensibilizantes, plantas hepatotóxicas, plantas nefrotóxicas, plantas que afetam a pele e anexos, plantas que afetam a reprodução, plantas que afetam o funcionamento do coração, plantas que afetam o tubo digestivo, plantas que causam anemia hemolítica, plantas que causam calcificação sistêmica (calcinose), plantas que causam degeneração e necrose musculares, plantas que causam intoxicação por nitratos/nitritos, plantas que causam intoxicação por oxalatos e plantas que causam perturbações nervosas (Tokarnia et al., 2000).

Dentre os grupos de plantas tóxicas, destacam-se as plantas que afetam o funcionamento do coração, em um subgrupo denominado plantas que causam “morte súbita” (Tokarnia et al., 2000).

3.2. PLANTAS QUE CAUSAM “MORTE SÚBITA”

As plantas que causam “morte súbita” formam o grupo de plantas tóxicas, que são consideradas as mais importantes no Brasil. Estas plantas apresentam como principais características a exacerbação da manifestação dos sinais clínicos quando os animais são movimentados e a ausência, na necropsia, de achados macroscópicos significativos (Tokarnia e Döbereiner, 1986). No Brasil, até o momento foram descritas 13 espécies plantas, pertencentes a três famílias, que causam esse quadro clínico:

- família Rubiaceae: *Palicourea marcgravii* (Moraes, 1993; Moraes-Moreau et al., 1995; Barbosa et al., 2003), *Palicourea aeneofusca* (Vasconcelos et al., 2008), *Palicourea juruana* (Oliveira et al., 2004) e *Palicourea grandiflora* (Schons et al., 2012);

- família Bignoniaceae: *Tanaecium bilabiatum* (anteriormente conhecida como *Arrabidaea bilabiata*) (Tokarnia et al., 2004), *Fridericia (Arrabidaea) japurensis* (Tokarnia e Döbereiner, 1981) e *Pseudocalymma elegans* (Helayel et al., 2009);

- família Malpighiaceae: *Amorimia (Mascagnia) rigida* (Pacífico da Silva et al., 2008; Vasconcelos et al., 2008), *Amorimia (Mascagnia) pubiflora* (Becker et al., 2013), *Amorimia (Mascagnia) exotropa* (Pavarini et al., 2011), *Amorimia* sp. (complexo *M. rigida*; *M. aff. rigida*) (Duarte et al., 2013), *Amorimia septentrionalis* (Albuquerque et al., 2014) e uma planta identificada como *Mascagnia sepium* (Schons et al., 2011; Barros e Meneguetti, 2014), mas que provavelmente se trata de *Amorimia (Mascagnia) amazônica* (Lee et al., 2012).

Estima-se que essas plantas sejam responsáveis por metade das mortes por plantas em bovinos no Brasil. Deste grupo, *Palicourea marcgravii* é considerada a mais importante, sendo a primeira planta tóxica a ser extensivamente estudada no Brasil, apresentando alta toxicidade, efeito acumulativo, boa palatabilidade e ampla distribuição geográfica, causando perdas econômicas severas em todo o país (Tokarnia et al., 2012; Pessoa et al., 2013; Cook et al., 2014). As demais espécies de *Palicourea* também capazes de causar “morte súbita” apresentam limitada distribuição geográfica (Tokarnia et al., 2012; Cook et al., 2014). Assim, *Palicourea juruana* é encontrada principalmente nos estados do Pará, Amazonas e Rondônia (Tokarnia e Döbereiner, 1982), *Palicourea grandiflora*, nos estados de Rondônia, Acre e Mato Grosso (Tokarnia et al., 1981) e *Palicourea aeneofusca*, em Pernambuco e na Bahia (Tokarnia et al., 1983).

Nas plantas da família Bignoniaceae, as intoxicações são limitadas à Bacia Amazônica, pela *Tanaecium bilabiatum* (Döbereiner et al., 1983; Pessoa et al., 2013); Roraima, pela *Fridericia japurensis* (Tokarnia e Döbereiner, 1981; Pessoa et al., 2013) e Rio de Janeiro, pela *Pseudocalymma elegans* (Helayel et al., 2009).

Na família Malpighiaceae, algumas espécies, designadas anteriormente como *Mascagnia*, foram reclassificadas dentro do gênero *Amorimia* (Anderson, 2006). Anteriormente classificada como *Mascagnia rigida*, *Amorimia rigida* tem importância nos estados da região Nordeste (Pacífico da Silva et al., 2008), Espírito Santo e Minas Gerais (Duarte et al., 2013), enquanto que a *Amorimia septentrionalis* ocorre especialmente nos estados do Ceará, Paraíba e Pernambuco (Mamede, 2010). Exemplos de *A. rigida* coletados na Paraíba (Vasconcelos et al., 2008) foram reclassificados como *A. septentrionalis*, de acordo com Anderson (2006), portanto, existe a possibilidade de que a *A. septentrionalis* ocorra em outros estados do Nordeste e que tenha sido identificada equivocadamente como *A. rigida*. A reclassificação das espécies de *Amorimia* que causam intoxicações nos estados do Nordeste e nas regiões Nordeste e Norte de Minas Gerais é

importante para determinar a distribuição geográfica de *A. rigida* e *A. septentrionalis* (Duarte et al., 2013).

Na região Centro-Oeste e áreas vizinhas da região Sudeste, destaca-se a *Amorimia pubiflora* (Becker et al., 2013). Apesar de também ocorrer nos estados da Bahia, Minas Gerais, São Paulo e Rio de Janeiro (Mamede et al., 2010), não há relatos de intoxicação nesses estados (Duarte et al., 2013).

A *Amorimia exotropica* ocorre principalmente na região sul (Gava et al., 1998; Soares et al., 2011) e *Amorimia* aff. *rigida* no Espírito Santo, apesar de haver indícios de que também ocorra na Bahia (Duarte et al., 2013).

Amorimia sepium foi relatada por causar síndrome da morte súbita em bovinos no estado de Rondônia (Schons et al., 2011), porém, foi visto que esta planta só está presente na região Sudeste. Além disso, imagens da planta no estudo apontam que na verdade se trata de *Amorimia amazonica* ao invés de *A. sepium* (Lee et al., 2012).

Baseado nisso, foi visto que a identificação das plantas muitas vezes é feita erroneamente. *Mascagnia divaricata* (*M. elegans*) foi descrita como tóxica para bovinos no sertão Pernambucano (Tokarnia et al., 1990). No entanto, não foram encontrados exemplares de *M. divaricata* em nenhum herbário da região semiárida do Brasil, e acredita-se que a planta identificada como *M. divaricata* tratava-se da *A. septentrionalis* (Lee et al., 2012; Duarte et al., 2013).

A *Palicourea juruana* é taxonomicamente problemática devido à identidade das plantas identificadas com este nome não ser clara, e esta denominação ser usada ocasionalmente por várias espécies diferentes (Cook et al., 2014). Isso porque, o nome *P. juruana* foi originalmente aplicado para plantas que são atualmente identificadas como *P. croceoides*. Para Cook et al. (2014), pelo menos algumas espécies conhecidas como *P. juruana*, que são conhecidas por ser tóxicas, pertencem a uma nova espécie ainda não descrita, diferente de *P. croceoides*.

Apesar de não fazer parte do grupo das plantas tóxicas que causam morte súbita, uma espécie identificada possivelmente como *Palicourea barbiflora*, mas sem certeza da identificação botânica, foi descrita como responsável por quadros de morte súbita em bovinos na região do Vale do Paraíba, SP. A toxicidade desta planta foi comprovada por meio de estudos experimentais em cobaias e bovinos (Camargo, 1962), mas a identificação botânica nunca foi esclarecida.

Anteriormente, *Palicourea barbiflora* e *Psychotria hoffmannseggiana* eram consideradas espécies distintas (Steyermark, 1972), mas estudos demonstraram que estes nomes foram aplicados para formas diferentes de uma espécie extremamente variável, sendo hoje considerados sinônimos (Taylor et al., 2004).

Psychotria é um gênero de relativa complexidade taxonômica (Nepokroeff et al., 1999), que compreende cerca de 2.000 espécies. Devido a falta de características morfológicas estáveis significativas e um tratamento taxonômico mundial abrangente, ainda são desconhecidas delimitações infragenéricas e/ou genéricas, e ainda as relações entre as espécies não são claras (Taylor et al., 2004; Nepokroeff et al., 1999). Assim, com base nas características morfológicas e distribuição geográfica, o gênero foi dividido em três subgêneros: *Psychotria* (pantropical), *Heteropsychotria* (neotropical) e *Tetramerae* (África e Madagascar) (Lopes et al., 2004; Simões-Pires et al., 2006). Com isso, observou-se que as espécies de *Palicourea* Aubl. e *Rudgea* Salisb. são mais estreitamente relacionadas aos membros do subgênero *Heteropsychotria*

(Taylor et al., 2013). Baseado nisso, análise filogenética molecular propõe a fusão de *Palicourea* e do subgênero *Heteropsychotria* em um gênero próprio (Nepokroeff et al., 1999). Se esse ponto de vista fosse aceito, este novo gênero seria nomeado de *Psychotrophum* P. Browne, com base em argumentos de regras de prioridade de Taylor et al., (2004).

Apesar da *Psychotria hoffmannseggiana* ter ampla distribuição no Brasil (Teixeira e Machado, 2004) e proprietários e médicos veterinários de campo relatarem a morte súbita de bovinos causada pela intoxicação por essa planta, não há estudos recentes que comprovem a toxicidade dessa espécie.

No geral, os animais intoxicados por plantas que causam “morte súbita” apresentam, perda de equilíbrio, ataxia, respiração laboriosa, tremores musculares e decúbito evoluindo para morte. Quadro clínico muito similar ao apresentado por animais intoxicados por monofluoroacetato (MFA). Portanto, suspeitou-se que este fosse o agente tóxico, presente nas plantas, responsável pela intoxicação. Assim, ao longo dos anos, diversos estudos determinaram os níveis de MFA nessas espécies, confirmando ser este o princípio tóxico (Moraes, 1993; Lee et al., 2012; Cook et al., 2014).

3.3. INTOXICAÇÃO POR MONOFLUOROACETATO DE SÓDIO

3.3.1. Toxicidade de monofluoroacetato de sódio

O MFA é uma das substâncias mais tóxicas já descobertas. Têm sido isolado de diversas espécies de plantas, cuja ingestão determina o quadro “morte súbita” na África do Sul, na Austrália e no Brasil. Dentre as 13 plantas brasileiras que causam morte súbita, demonstrou-se estar presente em *P. marcgravii* (Moraes, 1993; Cook et al., 2014), *P. grandiflora* (Cook et al., 2014), *P. aeneofusca* (Tokarnia et al., 2000; Vasconcelos et al., 2008), *A. rígida* (Castro da Cunha et al., 2012), *Amorimia* sp., *A. pubiflora*, *A. exotropicalis*, *A. septentrionalis*, *A. amazonica* (Lee et al., 2012), *P. juruana* (Cook et al., 2014) e *Tanaecium bilabiatum* (Krebs et al., 1994). Apesar de não ter sido detectado MFA na *Fridericia japurensis* e na *Pseudocalymma elegans*, os achados clínicos e patológicos dos bovinos intoxicados por essas plantas sugerem a presença desse composto (Tokarnia e Döbereiner, 1981; Helayel et al., 2008).

As concentrações de MFA diferem significativamente entre as espécies que causam “morte súbita” (Anexo 1), o que pode explicar as variações na incidência das intoxicações e as diferentes quantidades de material vegetal necessárias para causar a morte (Anexo 2) (Lee et al., 2012). Nas plantas, o MFA é aparentemente estável por um período indefinido de tempo. Apresenta toxicidade para uma ampla gama de organismos vivos (vertebrados, invertebrados, fungos, bactérias e vírus), com valores de DL_{50} que variam extraordinariamente entre as espécies animais (Anexo 3). Mesmo dentro de uma mesma espécie, pode haver muita variação entre as diferentes linhagens; além disso, a natureza da ação toxicodinâmica nem sempre é a mesma (Moraes, 1993).

3.3.2. Mecanismo de ação

O mecanismo toxicológico do fluoroacetato envolve o bloqueio do ciclo de Krebs, interrompendo a glicólise aeróbica, o que afeta drasticamente a produção de energia celular e resulta na falência múltipla de órgãos (Holstege et al., 2007).

O fluoroacetato em si, tem baixa toxicidade celular. Sua toxicidade ocorre pela ação do seu metabólito ativo, fluorocitrato, formado no organismo por meio da denominada “síntese letal”

(Peters, 1952). Após o fluoroacetato ser ingerido e absorvido, este se liga à acetil-coenzima A (CoA) para formar fluoroacetil-CoA, que substitui a acetil-CoA no ciclo de Krebs. O fluoroacetil-CoA, na presença de oxaloacetato, é convertido por citrato sintase em fluorocitrato (Peters, 1952; Peters, 1963; Twigg et al., 1986) (Figura 1).

O fluorocitrato bloqueia competitivamente a aconitase. Como a aconitase catalisa uma reação reversível do ciclo de Krebs, convertendo citrato em isocitrato, a inibição dessa enzima impede essa conversão, o que resulta no acúmulo de citrato em diversos tecidos e o bloqueio do ciclo de Krebs (Peters, 1952; Peters, 1954). Ademais, essas reações inibem a formação das coenzimas NADH e FADH₂, impedindo a transferência de elétrons para a cadeia respiratória e a formação de ATP a partir de ADP.

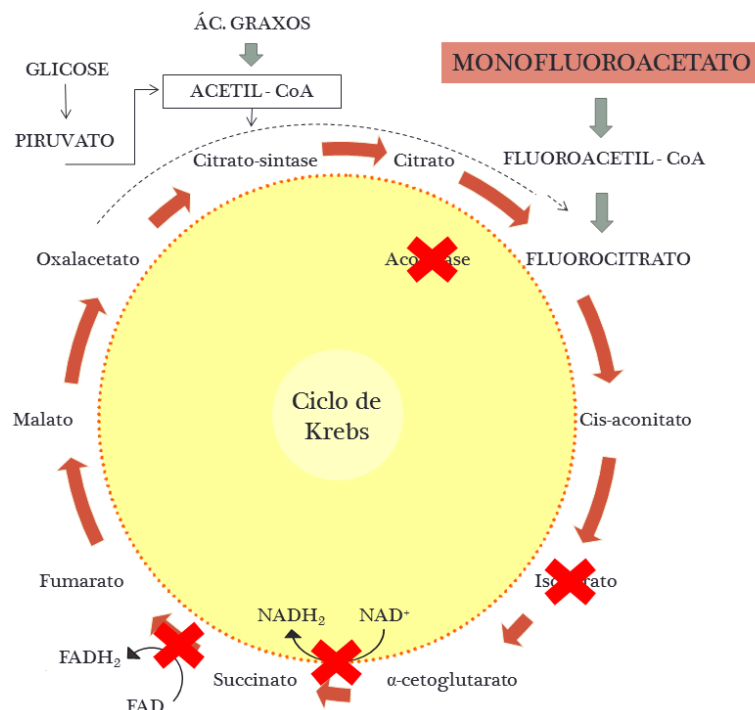


Figura 1. Ação do monofluoroacetato de sódio no ciclo de Krebs.

A queda na produção de ATP resulta no bloqueio dos processos metabólicos dependentes de energia (Gal et al., 1956), afetando sobretudo os órgãos que possuem altas taxas metabólicas, como coração, cérebro e rins (Suzuki, 1999).

A inibição do transporte de citrato dentro e fora da mitocôndria, pelo fluorocitrato, é outro fator que contribui para o acúmulo de citrato. O citrato acumulado nos tecidos pode provocar hipocalcemia, devido ao efeito quelante sobre o cálcio sérico (Gal et al., 1956; Sherley, 2004). Adicionalmente, elevados níveis de citrato interrompem a produção de energia através de glicólise por inibição secundária da enzima fosfofrutoquinase resultando em falha na respiração celular seguida de morte celular.

O bloqueio do ciclo de Krebs induzido por MFA provoca uma importante redução do metabolismo da energia oxidativa e também diminui a oxidação do acetato e a síntese hepática de acetoacetato. A utilização de acetoacetato nos tecidos é inibida e há acúmulo de compostos cetônicos no sangue, que são excretadas pela urina. Verifica-se também diminuição no uso do piruvato na incorporação de CO₂ nos ácidos orgânicos (Nogueira et al., 2011).

Outras enzimas secundariamente afetadas são succinato desidrogenase, hexoquinase, acetil-CoA carboxilase, matonil-CoA, piruvato carboxilase e ATP citrato-liase. Contudo, ainda não está bem esclarecida a relevância de tais interferências nessas enzimas.

3.3.3. Sinais clínicos

Diante da variação da sensibilidade e dos sinais clínicos manifestados pelas diferentes espécies de animais quando intoxicadas pelo MFA, as espécies animais têm sido classificadas em quatro categorias em função do efeito provocado pelo MFA: (I) ação no coração; (II) ação no sistema nervoso central; (III) ação sobre o coração e sistema nervoso central e (IV) sintomatologia atípica (Peixoto, 2010). Recentemente, esse sistema de classificação foi revisto e complementado. Os bovinos e ovinos, que anteriormente não foram incluídos na classificação, 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 e ratos e hamsters foram classificados na categoria III (Nogueira et al., 2011).

Nos bovinos, a sintomatologia da intoxicação por MFA é dividida por alguns autores em duas fases. Uma denominada de inicial, caracterizada pelos primeiros sinais clínicos, e a fase final ou também chamada de “dramática”, pois são os últimos achados clínicos antecedentes ao óbito, normalmente caracterizado por momentos de agonia, perda de consciência e sofrimento animal (Nogueira et al., 2011).

Na fase inicial, nos bovinos, podem ser observados taquicardia, taquipneia, jugular repleta com pulso venoso positivo, respiração abdominal, perda de equilíbrio, ataxia, posição de auto-auscultação, decúbito externo, tremores musculares, polaquíúria, sialorreia e midríase. Já na fase final ou dramática, observa-se apatia, inquietação, decúbito lateral, movimentos de pedalagem, hiperpneia, opistótomos, nistagmo, vocalização e morte (Barbosa et al., 2003; Nogueira et al., 2010).

A principal característica é a ausência de sinais clínicos detectáveis até minutos antes do óbito. O início dos sintomas podem aparecer a partir de 7 horas após o consumo de MFA, dependendo da quantidade ingerida (Barbosa et al., 2003). No entanto, os exercícios físicos, como andar ou correr, podem precipitar o aparecimento dos sintomas e a morte dos animais devido ao aumento do metabolismo e à distribuição mais rápida do princípio tóxico, tendo maior efeito quando o animal permanece exposto ao sol (Moraes, 1993).

3.3.4. Diagnóstico

O diagnóstico da intoxicação por MFA é realizado pelo histórico de ingestão do tóxico, pelos achados clínicos e confirmado pelo exame toxicológico (Moraes, 1993; Cunha, 2008; Nogueira et al., 2011). Diante da suspeita de intoxicação por plantas, o diagnóstico é realizado com base na epidemiologia, sinais clínicos, achados de necropsia e histopatológicos, associados à presença da planta na pastagem ou ao histórico de ingestão da planta pelos animais afetados (Rissi et al., 2007).

Tanto os sinais clínicos como os achados de necropsia dos animais intoxicados por MFA podem ser inespecíficos, o que pode dificultar o diagnóstico (Barbosa et al., 2003; Peixoto et al., 2011). No exame histopatológico, uma forma peculiar de degeneração hidrópico-vacuolar das células epiteliais dos túbulos uriníferos contorcidos distais tem sido considerada como característica dessa intoxicação em algumas espécies (Barbosa et al., 2003; Nogueira et al., 2011). No entanto, este achado não está sempre presente e não pode ser considerado patognomônico.

O diagnóstico definitivo da intoxicação por MFA pode ser realizado por meio da análise toxicológica, podendo ser usado métodos qualitativos e quantitativos. Os métodos qualitativos são os mais comuns e foram desenvolvidos principalmente para detecção de MFA em iscas líquidas, amostras de solo, sangue, urina, tecidos e plantas tóxicas (Sakai e Miyahara, 1981).

Em 1973, Vickery e colaboradores propuseram um método de análise de plantas contendo MFA empregando a cromatografia em papel, desenvolvida no sistema-solvente etanol-NH₄OH-piridina-água (95:3:1:1) e Azul do Nilo como cromogênico. Através dessa metodologia, foi possível a identificação do MFA na concentração de 20 µg e a separação do difluoroacetato e do trifluoroacetato. Além disso, a técnica apresentou boa especificidade, já que os sais de ácido fórmico ou acético não poderiam ser detectados.

Posteriormente, a metodologia de Vickery e colaboradores (1973) foi adaptada, substituindo o papel cromatográfico, por celulose microcristalina como fase estacionária utilizando-se, assim, a cromatografia em camada delgada (CCD) (Allender, 1990). Essa técnica, conforme proposta por Allender (1990), foi utilizada para detectar níveis de MFA nas folhas de *P. marcgravii* propiciando o reconhecimento de, no mínimo, 5 µg de MFA, sendo recomendada a sua utilização como recurso adequado para comparação deste composto em extratos de plantas (Moraes, 1993).

A CCD é uma técnica utilizada com grande frequência nos laboratórios, podendo ser de grande utilidade para a rotina analítica. Já que pode oferecer um bom grau de especificidade quanto ao composto, pois esta fundamentada na polaridade e natureza química da substância. Apesar de não ser conclusiva, oferece grande segurança quando bem padronizada (Moraes, 1993).

A espectrometria por ressonância magnética nuclear flúor¹⁹ (RMN¹⁹F) foi utilizada para comprovar a presença de MFA nos extratos de sementes e folhas de plantas do gênero *Acacia*, *Dichapetalum*, *Gastrolobium* e *Oxylobium* (Baron et al., 1987) e da espécie *Palicourea marcgravii* (Moraes, 1993). A RMN¹⁹F se mostrou um método conclusivo, simples e rápido, não exigindo a derivação da molécula e permitindo a quantificação do composto organofluorado, além de se apresentar como um ensaio não destrutivo, o que possibilita a reutilização da amostra.

A análise quantitativa de MFA pode ser realizada com técnicas de cromatografia gasosa (CG) e cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) (Minnaar et al., 2000). A cromatografia gasosa foi desenvolvida a partir da determinação de MFA como ácido livre em solventes aquosos (Kimball e Mishalaine, 1993). Este método de detecção permitiu a determinação de MFA em tecidos biológico e iscas empregando diferentes metodologias de extração e derivatização, demonstrando alta sensibilidade com baixos níveis de detecção (Casper et al., 1985; Allender, 1990; Kimball e Mishalaine, 1993; Demarchi et al., 2001; Sporkert et al., 2002).

Técnicas de CLAE também foram desenvolvidas para determinação quantitativa do MFA em amostras biológicas, iscas e para identificação do princípio ativo de *Dichapetalum cymosum* e *Palicourea marcgravii*. A substância foi identificada em amostras de plantas tóxicas, fígado bovino e rúmen em CLAE com coluna orgânica de análise ácida à temperatura ambiente, ácido fosfórico como eluente e detecção de ultravioleta (Minnaar et al. 2000). Em amostras biológicas mantidas a temperatura ambiente por 14 dias, houve uma redução de 50% na capacidade de identificação da substância. Isso ocorreu porque as amostras biológicas que contêm MFA devem ser analisadas em até sete dias, se mantidas em temperatura ambiente (Minnaar et al., 2000).

Recentemente, foram detectados níveis de MFA em espécies de *Palicourea* e *Amorimia* utilizando cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrometria de massas sequencial com ionização química a pressão atmosférica (CLAE/APCI-MS/MS) (Cunha, 2008; Lee et al., 2012; Cook et al., 2014). Esse método mostrou-se bastante eficaz.

3.3.5. Prognóstico

O prognóstico da intoxicação por MFA varia de ruim a grave e depende da quantidade ingerida do tóxico, bem como da gravidade dos sinais clínicos. Contudo, há melhora do prognóstico quando o tratamento com acetamida ou bicarbonato de sódio é instituído precocemente (Nogueira et al., 2011).

3.3.6. Tratamento

Na realidade, não existe antídoto específico para a intoxicação por MFA porque não há substância que seja capaz ou de reverter o fluorocitrato à fluoroacetato ou de remover e inativar o fluorocitrato, uma vez que este já tenha sido formado. Como o fluorocitrato altera funções bioquímicas básicas, a intoxicação por fluoroacetato é multifatorial, de tal modo, requer uma terapia múltipla (Moraes, 1993).

Assim, a abrangência dos mecanismos envolvidos na intoxicação pelo MFA (Moraes, 1993), associado ao caráter superagudo da intoxicação (Barbosa et al., 2003), faz com que o tratamento da intoxicação por MFA seja um desafio, pois ainda não se conhece um agente capaz de revertê-la de maneira eficaz (Nogueira et al., 2011).

Experimentalmente, bons resultados foram obtidos em ratos com a administração de xilazina, hidrato de cloral (Górniak et al., 1993) e acetamida (Górniak et al., 1994; Peixoto et al., 2011). Por outro lado, apenas a acetamida foi eficaz na reversão desta intoxicação em bovinos (Peixoto et al., 2011).

A acetamida, por ser um dos compostos precursores de acetato (referido como “doador de acetato”), é capaz de reduzir a inibição competitiva do MFA pelo mesmo sítio ativo (CoA), impedindo ou reduzindo a ocorrência da chamada “síntese letal” (Pattison, 1959 e Egyed e Schultz, 1986 citados por Peixoto et al., 2011).

De acordo com Peixoto et al. (2011), a acetamida (CH_3CONH_2) quando previamente administrada em doses suficientemente altas em ratos, evitou o aparecimento dos sinais clínicos ou morte dos animais intoxicados por MFA, bem como pelas folhas frescas de *P. marcgravii* e extratos concentrados de *P. juruana*, *Pseudocalymma elegans*, *Arrabidaea bilabiata*, *Amorimia (Mascagnia) rígida*, *M. pubiflora*, *Amorimia (Mascagnia) exotropica* e *M. aff. rigida*. Quando administrada em bovinos intoxicados com 0,5 mg/kg de MFA e 1,0 g/kg de *Paliourea marcgravii*, a acetamida foi capaz de prevenir os sinais clínicos e a morte de todos os animais (Peixoto et al., 2011).

Embora diversos compostos tenham sido estudados, o único meio atualmente disponível para se evitar a morte dos animais por plantas que contem MFA é a remoção dela ou a restrição total do acesso dos animais a áreas onde ela esteja presente (Soto-Blanco et al., 2004).

3.3.7. Profilaxia e controle

Como os animais de produção são frequentemente intoxicados pelo MFA por meio de plantas tóxicas que causam “morte súbita”, as medidas profiláticas e de controle devem ser feitas baseadas no controle das plantas tóxicas.

A profilaxia e o controle das intoxicações por plantas no Brasil têm se realizado com base no conhecimento da epidemiologia das mesmas. Algumas medidas preventivas incluem: (1) o manejo dos animais e das pastagens, incluindo evitar o pastejo excessivo, utilizar animais de espécies ou idades resistentes a determinadas plantas e evitar colocar animais recentemente transportados com fome ou sede em pastagens contaminadas por plantas tóxicas; (2) a construção de cercas para isolar áreas infestadas por plantas tóxicas; (3) a eliminação das espécies tóxicas pela retirada manual, utilização de herbicidas, roçadas, capinas, aração, queimadas ou pelo pastejo com animais não susceptíveis; (4) a utilização de sementes controladas para evitar a difusão de espécies tóxicas; (5) a confecção de fenos e silagem cuja contaminação por plantas tóxicas seja evitada; e (6) dispor de reservas de forragem para evitar a carência alimentar durante a seca (Tokarnia et al., 2012).

No caso das plantas que causam “morte súbita”, nem todas essas medidas são eficazes. Os métodos de cercar bem as áreas infestadas e erradicar as plantas têm sido as medidas mais recomendadas (Soto-Blanco et al., 2004). No entanto, têm apresentado resultados insatisfatórios (Barbosa et al., 2003).

Como os búfalos são, aproximadamente, seis vezes mais resistentes à ação tóxica da *Palicourea marcgravii* do que os bovinos, Barbosa e colaboradores (2003) sugeriram criar bubalinos no lugar de bovinos em áreas onde ocorra *P. marcgravii*. No entanto, outros métodos profiláticos têm sido estudados, com o intuito de diminuir as perdas econômicas causadas por estas plantas.

Algumas técnicas alternativas de controle das intoxicações por plantas são: (1) vacinação, (2) controle biológico, (3) detoxificação microbiana no rúmen, (4) substâncias que neutralizam os princípios tóxicos e (5) aversão alimentar condicionada. Poderia se acrescentar ainda, métodos que impedissem ou diminuíssem a absorção do princípio tóxico pelo tubo digestivo e métodos que estimulassem processos de detoxificação do fígado ou por outros sistemas (Tokarnia et al., 2000).

Entre as técnicas alternativas, o método mais promissor e que deve ser investigado em primeiro lugar, é relativo ao mecanismo de detoxificação microbiana do MFA no rúmen. A detoxificação ruminal tem sido utilizada com êxito para a profilaxia de algumas intoxicações por plantas. Pesquisadores australianos modificaram geneticamente a bactéria ruminal *Butyrivibrio fibrisolvens*, mediante a introdução de um gene, isolado de *Moraxella* sp., que codifica uma dehalogenase, capaz de hidrolisar fluoroacetato. A introdução de *B. fibrisolvens* geneticamente modificado para o rúmen de animais ingerindo plantas que contêm MFA, como é o caso de *P. marcgravii*, seria uma técnica viável de controle da intoxicação mediante a detoxificação ruminal do princípio ativo (Gregg et al., 1994; Gregg et al., 1998).

O estudo da detoxificação bacteriana do MFA foi recentemente iniciando no Brasil. Camboim e colaboradores (2012), através do isolamento de bactérias que degradam MFA no rúmen de caprinos no Nordeste, sugeriram que essas bactérias existem no rúmen e que alimentação contendo substrato estimula a sua multiplicação. Isso poderia explicar o fato de que animais mantidos em áreas com *A. rigida* são mais resistentes do que os mantidos em áreas livres da planta (Silva et al., 2008).

A resistência às intoxicações por plantas é outro fator importante a ser considerado no controle das intoxicações (Soto-Blanco et al., 2004). Para o controle das plantas que contêm MFA mediante o aumento da resistência dos animais, há três possibilidades a serem sugeridas: 1) a administração repetida, por períodos alternados, de doses não tóxicas da planta; 2) a administração de MFA em doses não tóxicas o que permitiria, também, a proliferação de bactérias que tenham atividade de dehalogenases; e 3) a administração de outro substrato, não tóxico que estimule a proliferação de bactérias com atividade de dehalogenases (Oliveira et al., 2013). Considerando as dificuldades de administrar doses não tóxicas das plantas e o risco de trabalhar com MFA, Pessoa e colaboradores (2013) recomendam que a terceira possibilidade parece ser a mais adequada.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. RELATO DE UM SURTO DE MORTE SÚBITA EM BOVINOS

Foi investigado um surto de “morte súbita” em bovinos, ocorrido numa propriedade localizada no município de Esmeraldas/MG, nos meses de janeiro e fevereiro de 2014. Durante a vistoria da propriedade foi possível coletar dados a respeito do histórico e achados de necropsia, além de detectar a presença de plantas tóxicas.

O material vegetal suspeito de causar a intoxicação foi levado para identificação (item 4.2) e foi submetido a processamento (item 4.3) para detecção de monofluoroacetato de sódio (item 4.5). Assim como as amostras de fígado e fluido ruminal de um dos animais que vieram a óbito (item 4.4). Todas as amostras foram levadas para o Laboratório de Toxicologia da EV-UFGM, onde foram armazenadas a -23°C e processadas (item 4.5).

4.2. IDENTIFICAÇÃO DO MATERIAL VEGETAL

Amostras do material vegetal suspeito de causar a mortalidade foram coletadas e colocadas em exsiccatas para identificação botânica.

4.3. EXTRATO PARA QUANTIFICAÇÃO DE MFA NO MATERIAL VEGETAL

A extração do material vegetal para detecção do MFA foi realizada de acordo com Lee e colaboradores (2012). Para isso 100 mg de material vegetal foram pesados, triturados e colocados em tubos Falcon de 13 mL juntamente com 5 mL de água deionizada. Após 30 minutos no agitador mecânico, as amostras foram centrifugadas para separar o resíduo vegetal do extrato aquoso.

O extrato aquoso foi transferido para um tubo Falcon de 13 mL e o resíduo da planta foi extraído novamente com adição de 5 mL de água e 30 minutos no agitador mecânico. Os extratos aquosos foram combinados para um total de 10 mL. Uma alíquota de 1 mL foi filtrada (filtro de papel) e transferida para tubos de microcentrífuga de 1 mL para posterior análise por cromatografia líquida de alta eficiência com detector ultravioleta (CLAE-UV) (item 4.5).

4.4. EXTRATO PARA QUANTIFICAÇÃO DO MFA NAS AMOSTRAS DE LÍQUIDO RUMINAL E FÍGADO

Amostras de líquido ruminal (100ml) e fígado (26,1g) foram extraídas com água deionizada e analisadas diretamente por CLAE-UV (item 3.5), sem qualquer *clean-up*.

4.5. DETECÇÃO DE MFA NO MATERIAL VEGETAL, LÍQUIDO RUMINAL E FÍGADO POR CLAE-UV

A partir das extrações específicas propostas para os diferentes materiais, a detecção de MFA nas amostras foram avaliadas por detecção em CLAE-UV, segundo técnica proposta por Minnaar e colaboradores (2000b).

Alíquotas de 20 µl foram injetadas, avaliadas em um fluxo isocrático de 0,4 mL/min. Para separação se utilizou uma coluna de fase reversa (Supelcogel, modelo C-610H) e fase móvel de 0,04M H₃PO₄ e 5% de acetonitrila. Para detecção foi utilizada a configuração de 220 nm fixos. Para calibração foi utilizado o padrão externo, com solução aquosa de MFA (Sigma-Aldrich®), a partir de uma curva de calibração de cinco pontos entre a faixa de 10 e 500 µg/mL.

4.6. COMPARAÇÃO DAS TÉCNICAS DE *CLEAN-UP* PARA DETECÇÃO DE MFA NO EXTRATO DO MATERIAL VEGETAL POR CLAE-UV

Para essa comparação, foram utilizadas folhas frescas (56,6g) e secas (58,3g) do material vegetal coletado. Essas folhas foram trituradas juntamente com 200 mL de água destilada e filtradas (filtros de papel).

Em seguida, 10 métodos de *clean-up* foram testados para os dois tipos de folhas:

- 1- 500 mg de terra de infusão + 5 mL do extrato
- 2- 250 mg de terra de infusão + 5 mL do extrato
- 3- 100 mg de terra de infusão + 5 mL do extrato
- 4- 2,0 g de sílica gel 60 + 5 mL do extrato
- 5- 1,0 g de sílica gel 60 + 5 mL do extrato
- 6- 1,0 g de carvão ativado + 5 mL do extrato
- 7- 500 mg de carvão ativado + 5 mL do extrato
- 8- 100 mg de carvão ativado + 5 mL do extrato
- 9- 100 mg de carvão ativado + cartucho C18 + 5 mL do extrato
- 10- cartucho C18 + 5 mL do extrato

Em todos os cartuchos foi utilizado lã de vidro. Após preparo das amostras, 20 µL foram injetados no CLAE-UV (item 4.5).

4.7. DETECÇÃO DE MFA DO MATERIAL VEGETAL POR CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA (CCD)

Para determinar a presença de MFA por CCD, 30 g de folhas do material vegetal coletado foram pesados e triturados juntamente com 200 mL de água deionizada. Em seguida, a solução foi colocada num Becker e filtrada com filtro de papel. Uma alíquota do filtrado foi colocada diretamente numa placa de cromatografia. Outra parte (2 mL) foi colocada em um tubo Falcon juntamente com 0,6 g de carvão ativado, onde ficou um minuto no vórtex e cinco minutos na centrifuga. Após processamento, o sobrenadante foi colocado diretamente na placa cromatográfica.

Com o auxílio de um capilar, o padrão de MFA (Sigma-Aldrich®) e os extratos da planta filtrados e não filtrados foram aplicados em cromatoplasmas de silicagel. Após a secagem em temperatura ambiente, a cromatoplasma foi transferida para uma cuba previamente saturada, sendo composta por: metanol, água e ácido acético na proporção de 75:20:5, respectivamente,

até atingir o limite desejado, aproximadamente, 10 cm da placa. A cromatoplaça foi colocada para secar até a evaporação de todo o solvente, sendo, então, revelada com 20 mg de azul do Nilo, 5 mL de etanol e trietanolamina (até atingir coloração púrpura) e mais 5 mL de etanol, para a visualização de manchas.

A comparação das amostras foi feita com o padrão de MFA. Após a corrida cromatográfica, a leitura foi realizada em luz ultravioleta, para identificação dos compostos fluorescentes.

5. RESULTADOS

5.1. INTOXICAÇÃO NATURAL

5.1.1. Aspectos epidemiológicos e clínicos

Em uma propriedade dedicada á bovinocultura de corte, localizada no município de Esmeraldas/MG, vieram a óbito aproximadamente 30 bovinos, Nelore, nos últimos anos. A propriedade possuía fêmeas e animais em fase de engorda que eram mantidos a pasto e recebiam suplemento mineral comercial e sal branco (na proporção de 3:1), com o consumo estimado em 30g/dia/animal. Os cochos de sal eram cobertos e em boas condições.

A água disponível para consumo era de açude, onde os animais tinham livre acesso e todos os animais eram vacinados contra clostridioses (*Clostridium chauvoei*, *C. septicum*, *C. perfringens* B, C e D, *C. novyi* e *C. sodelli*) e febre aftosa.

De acordo com o proprietário, os óbitos ocorreram nos pastos onde os animais tinham acesso à mata nativa (Figuras 2 e 3), alguns dias após a mudança de pasto. Primeiramente, os animais apresentaram fraqueza evoluindo para decúbito (após se locomover para beber água) e óbito no intervalo entre um e cinco dias após o início dos sintomas, com alguns animais vindo a óbito sem apresentar manifestações clínicas prévias. Os animais acometidos foram fêmeas adultas (paridas ou não) e apenas um macho.



Figura 2. Pastos com acesso a mata nativa.



Figura 3. Mata nativa e fonte de água nos quais os animais tinham acesso.

Diante dos óbitos, um veterinário de campo, previamente consultado, suspeitou inicialmente tratar-se de intoxicação por plantas tóxicas. No entanto, após a ausência de achados macroscópicos de necropsia de um animal, ele chegou à conclusão de que se tratava de botulismo.

Baseado nisso, foi recomendada a remoção das carcaças dos locais de fácil acesso e vacinação dos animais. No início de janeiro de 2014, foi realizada a vacinação contra botulismo de todos os animais adultos, sendo administrado soro anti-botulínico 10 dias após a vacinação e reforço da vacina 30 dias após a primeira dose. No mês seguinte, vieram a óbito mais quatro bovinos apresentando a mesma sintomatologia.

Um animal (BOV-1) que apresentava fraqueza e estava em decúbito há aproximadamente uma semana, foi encaminhado ao Hospital Veterinário da EV-UFMG para ser atendido, porém veio a óbito antes do desembarque.



Figura 4. Necropsia do BOV-1.

Durante a necropsia, não foram observadas alterações macroscópicas dignas de nota, no entanto, durante a inspeção do conteúdo ruminal foram visualizados fragmentos de folhas (Figura 4). Amostras de fígado e conteúdo ruminal foram coletadas e encaminhadas para dosagem de MFA no Laboratório de Toxicologia da EV-UFMG.

Amostras do sistema nervoso central foram coletadas para imunofluorescência direta para raiva, no qual o resultado foi negativo. Da mesma forma, o conteúdo intestinal foi coletado para detecção de toxina botulínica, também com resultado negativo.

Dois dias após a necropsia do BOV-1, foi feita uma visita à propriedade. Durante a vistoria dos pastos, pôde-se perceber uma grande quantidade de plantas tóxicas, como *Cestrum* sp (coerana) e, sobretudo, de uma espécie conhecida como erva de rato (Figura 5), mas diferente das espécies de *Palicourea* relatadas como responsáveis por intoxicações. Algumas plantas dessa espécie apresentavam sinais claros de consumo pelos animais. Baseado nisso, amostras do material vegetal foram coletadas e encaminhadas para identificação botânica.



Figura 5. Erva de rato encontrada na propriedade.

Apesar de não terem sido encontradas carcaças no local, o proprietário relatou que, durante a época de alta mortalidade, algumas carcaças foram deixadas nas áreas onde os animais tinham acesso.

Durante a visita a propriedade, foi feita a necropsia de um animal que veio a óbito no mesmo dia. Segundo o proprietário, a vaca (BOV-2) começou a apresentar fraqueza e letargia durante aproximadamente três a quatro dias antes do óbito. O animal permanecia em decúbito esternal no pasto, apresentando dificuldade para se levantar, quando então veio a óbito. Apesar de ser fornecida água e alimento, o consumo era reduzido.

O bovino foi encontrado em decúbito lateral esquerdo e a área sugeria que o animal permaneceu no local por tempo prolongado e realizou movimentos de pedalagem. O animal apresentava condição de escore corporal 2 e presença de ectoparasitas (*Amblyomma cajennense*), sobretudo na região perianal. Observou-se enoftalmia moderada, edema moderado na região submandibular e porção ventral do terço cranial do pescoço e a presença de escaras de decúbito e ovos de moscas nas extremidades ósseas do lado esquerdo. A gengiva apresentava-se moderadamente retraída nos dentes incisivos.

Quantidade discreta de líquido avermelhado translúcido foi encontrada na cavidade abdominal. O fígado apresentava-se moderadamente aderido ao diafragma, com áreas de fibrose e extensa área deprimida na porção central de consistência firme, contendo áreas de cor vermelho escuro. O padrão centrolobular estava evidenciado ao corte (fígado com aspecto de noz moscada), caracterizando necrose centrolobular e os vasos hepáticos com calibre aumentado.

Grande quantidade de corpos estranhos como: fragmentos ósseos, pedaços de tecido e corda, foram encontrados no conteúdo ruminal.

O abomaso exibia quantidade moderada de úlceras hemorrágicas (tipo II), sobretudo próximas ao piloro.

O pulmão esquerdo e porção medial do pulmão direito apresentava uma coloração vermelho escuro e aspecto firme e hipocrepitante, sugerindo congestão hipostática. Grande quantidade de líquido espumoso na porção caudal da traquéia e pulmões sugeria edema pulmonar.

No coração, aproximadamente 150 mL de fluido translúcido avermelhado foi encontrada no saco pericárdico (hidropericárdio), além da presença de petéquias e sufusões em quantidade moderada a alta no miocárdio. Não foram visualizadas alterações macroscópicas no SNC.

5.1.2. Identificação da planta

A planta conhecida como erva de rato, suspeita de causar a intoxicação, foi identificada como *Psychotria hoffmannseggiana* (Willd. ex Roem. & Schult.) Müll. Arg., também conhecida como *Palicourea barbiflora*.

5.1.3. Detecção de MFA no material vegetal e nas amostras de tecido animal

Níveis de MFA foram detectados, através de CLAE-UV, tanto nos extratos aquosos das folhas secas e frescas de *P. hoffmannseggiana*, bem como das amostras de fígado e fluido ruminal do BOV-1. Por outro lado, não foram obtidos níveis detectáveis de MFA em oito diferentes amostras de *P. hoffmannseggiana* cultivadas no canteiro de plantas tóxicas da EV-UFMG.

5.2. TÉCNICAS DE CLEAN UP

Diante da presença de MFA nas amostras de material vegetal e animal, viu-se a necessidade de testar métodos de *clean-up* durante o processamento das amostras, no intuito de obter resultados mais claros e sensíveis nas leituras por meio de CLAE-UV. Neste sentido, foram testados 10 métodos de *clean-up* nos extratos aquosos das folhas frescas e secas de *P. hoffmannseggiana*. Dos 10 métodos testados, a utilização do carvão ativado mostrou ser o método mais eficaz para remoção de interferentes sem afetar o MFA, com resultados equivalentes com o uso de 0,5 g e 1,0 g de carvão ativado para 5 mL do extrato. Por outro lado, a utilização de terra de infusão, sílica gel 60 e cartucho de C18 não foram eficientes para a remoção dos interferentes.

5.3. DETECÇÃO DE MFA DO MATERIAL VEGETAL POR CCD

A detecção de MFA do material vegetal por cromatografia em camada delgada (CCD) usando a metodologia descrita, não se mostrou eficaz.

6. DISCUSSÃO

6.1. INTOXICAÇÃO POR *Psychotria hoffmannseggiana*

Dados epidemiológicos evidenciaram a ocorrência de mortalidade, em pelo menos um bovino, causada por uma “nova” erva de rato identificada como *Psychotria hoffmannseggiana*. O animal foi encontrado numa pastagem com grande quantidade dessa planta, com sinais de consumo pelos animais. A área vistoriada na propriedade apresentava condições propícias para a ocorrência dessa planta, como terreno arenoso, solo úmido de vereda e mata com moderada entrada de luz solar.

Possivelmente as primeiras notícias sobre a toxicidade desta planta para o gado foram fornecidas em 1962 por um sitiante da região de Pouso Frio, município de Pindamonhangaba/SP (região do Vale do Paraíba). O proprietário relatou ter deixado algumas novilhas no local, sendo encontradas mortas no dia seguinte. Durante a necropsia foram detectados no rúmen a presença de folhas desta erva parcialmente digeridas. Baseado nestes dados, Camargo (1962) propôs a existência de uma nova planta tóxica identificada possivelmente como *Palicourea barbiflora*, conhecida pelo nome popular de “erva de rato” ou “graúda”, e comprovou sua toxicidade por meio de experimentos em cobaias e bovinos. Segundo o estudo, a planta apresentava não apenas elevada toxidez, mas também uma grande variação no grau de toxicidade, conforme as fases do seu ciclo vegetativo. Entretanto, a identificação botânica da planta não foi confirmada.

Recentemente, a *Psychotria barbiflora* (sinônimo de *P. hoffmannseggiana*) foi citada pelos médicos veterinários e produtores rurais como responsável por provocar surtos de “morte súbita” em bovinos no estado de Rondônia, sendo conhecida na região como cafezinho da flor branca (Schons, 2011). Apesar de haver poucos estudos a respeito desta planta no Brasil, os veterinários de campo relataram que a “morte súbita” em áreas que contêm *P. hoffmannseggiana*, conhecida por eles como *Palicourea barbiflora*, ocorre esporadicamente há muitos anos no estado de Minas Gerais.

O princípio tóxico detectado nas folhas de *P. hoffmannseggiana* é o composto presente nas plantas que causam morte súbita no Brasil, o MFA. Estudos anteriores detectaram a presença de cromóforo indol (Lopes et al., 2004) e β -carbolina (Oliveira et al., 2013) nas folhas dessa planta. O presente estudo foi dirigido primariamente para a confirmação da presença de MFA nas folhas de *P. hoffmannseggiana* sem, contudo, excluir a presença de outros princípios ativos que poderiam também contribuir, em sinergismo com o MFA, para a intoxicação dos animais.

O quadro clínico das intoxicações por plantas que contêm MFA é de evolução superaguda e os animais afetados morrem, em geral, em poucos minutos com uma “fase final dramática”, de morte súbita (Moraes-Moreau et al., 1995; Pinto, 2007).

No entanto, devemos levar em consideração que o conceito de “morte súbita” é muito amplo. Para Casteel e Turk (1996), a “morte súbita” é uma morte inexplicável que ocorre em animais aparentemente saudáveis no intervalo entre 12 e 24 horas sem manifestação clínica prévia ou sintomas. Já para Lincoln (2012), o termo “morte súbita” é comumente usado para descrever situações em que bovinos são encontrados mortos ou são vistos morrer de repente. Obviamente esta definição depende muito das habilidades de observação do proprietário ou do funcionário responsável pelos animais (Casteel e Turk, 1996). Assim, o mais adequado seria denominar o atual grupo de plantas responsáveis por “morte súbita” como plantas que possuem MFA.

No presente estudo, embora o proprietário tenha relatado que alguns animais vieram a óbito sem apresentar manifestação clínica prévia (caracterizando um quadro de “morte súbita”), outros levaram até cinco dias para morrer, como foi o caso do BOV-1. O animal apresentou um quadro de fraqueza e decúbito durante aproximadamente cinco dias e veio a óbito durante o transporte, logo antes do desembarque no Hospital Veterinário da EV-UFMG.

De acordo com Helayel e colaboradores (2009), a evolução muito mais longa do que normalmente ocorre na grande maioria das plantas que causam “morte súbita” deve-se provavelmente, à dose limítrofe. Isso significa que a dose foi suficiente para lesar gravemente o coração e provocar insuficiência que redundou na morte do animal, mas ainda incapaz de induzir à parada cardíaca rápida, como normalmente ocorre nos casos naturais e experimentais em animais que ingerem doses maiores das plantas deste grupo. A provável dose-limítrofe ingerida pelo animal BOV-1 pode estar relacionada à grande variação no grau de toxicidade da planta, conforme descrita por Camargo (1962), ou a pouca quantidade de folhas ingerida pelo animal.

Na intoxicação por *P. marcgravii*, planta tóxica que contém MFA como princípio tóxico, verificou-se que a recuperação espontânea ou terapêutica em uma intoxicação somente ocorre pela ingestão de doses subletais ou limítrofes (Eisler, 1995), favorecida pelo repouso físico absoluto (Tokarnia et al., 2000). No presente estudo, provavelmente o manuseio do animal para colocar em cima do transporte e a exposição ao sol durante o percurso de aproximadamente uma hora e meia (40 km) até o Hospital Veterinário da EV-UFMG tenham precipitado a morte do animal (BOV-1). Já que os exercícios físicos, a movimentação dos animais e a exposição ao sol podem predispor o aparecimento dos sintomas e a morte dos animais devido ao aumento do metabolismo e à distribuição mais rápida do princípio tóxico (Moraes-Moreau, 1995).

Durante a necropsia, não foram encontradas alterações macroscópicas significativas. Isso é compatível com os achados de outros animais intoxicados por plantas que contém MFA. A manifestação hiperaguda da doença, não permite que ocorram alterações perceptíveis. Uma alternativa a isto seria a realização de um estudo histopatológico. De acordo com Nogueira e colaboradores (2010), animais intoxicados experimentalmente por MFA apresentam degeneração hidrópico-vacuolar (DHV) das células epiteliais dos túbulos uriníferos contorcidos distais. Por outro lado, nem todos os bovinos intoxicados por plantas que causam morte súbita desenvolvem a típica DHV. Esse fenômeno está relacionado à quantidade ingerida e ao tempo de evolução (Nogueira et al., 2010). Ao nosso ver, assim como ocorre com a *P. marcgravii*, quanto maior a dose ingerida de *P. hoffmannseggiana*, mais curto deve ser o período de aparecimento dos sinais clínicos. Assim, animais que ingerem quantidades maiores de MFA morrem por parada cardíaca, antes que a eliminação da substância tenha causado a lesão renal (Nogueira et al., 2010).

No caso em questão, não foi realizado exame histopatológico, o que poderia contribuir para confirmar o diagnóstico de intoxicação por MFA presente nas folhas de *Psychotria hoffmannseggiana*. Por outro lado, por meio da detecção e quantificação através de CLAE-UV foi possível detectar MFA nas amostras de fígado e fluido ruminal desse animal, confirmando assim a intoxicação por esse composto presente nas folhas da planta.

O diagnóstico da intoxicação por plantas que contêm MFA é realizado pelo histórico de ingestão, pelos achados clínicos e confirmado por exame toxicológico (Nogueira et al., 2011). O diagnóstico da intoxicação por *Psychotria hoffmannseggiana* foi baseado no histórico de “morte súbita” após mudança de pasto, presença de grande quantidade da planta com sinais de

consumo, ausência de achados macroscópicos na necropsia e detecção de MFA no material vegetal e nas amostras de fígado e fluido ruminal de um bovino intoxicado (BOV-1).

Os ácidos acético, fórmico e propiônico, além de outros ácidos graxos voláteis, são compostos que estão presentes normalmente no fluido ruminal e extratos de algumas plantas. Assim, podendo interferir na detecção de amostras com baixos níveis (<100µg/mL) de MFA por CLAE-UV, comprometendo o resultado, o que poderia levar a um falso positivo (Minnaar et al., 2000b). Para minimizar esses efeitos, Minnaar e colaboradores (2000b) realizaram testes, por meio de injeções no CLAE-UV, dos possíveis compostos que poderiam interferir no resultado, ajustando a metodologia, através da fortificação dos extratos aquosos com H₃PO₄ (pH 1). A metodologia utilizada por esses autores faz com que os ácidos sejam extraídos e separados de forma satisfatória, com os outros ácidos eluindo após o MFA.

No presente estudo, a extração das amostras foram feitas com água, no entanto, diferentemente de Minnaar e colaboradores (2000b) não foi feita a fortificação dos extratos. Tendo em vista a possível interferência com ácido acético, foi feita uma injeção isolada desse composto no CLAE-UV. Observou-se que o pico do ácido acético apresentou-se bastante próximo ao do MFA, comprovando que o ácido acético poderia realmente interferir na detecção de baixos níveis de MFA.

Durante a vistoria das pastagens, além da grande quantidade de *Psychotria hoffmannseggiana*, foi detectada a presença de *Cestrum* sp, provavelmente *Cestrum auxilare (laevigatum)*. A intoxicação por essa planta tem caráter agudo, com os sinais clínicos se manifestando entre 15 e 24 horas após a ingestão da planta e caracterizando-se por apatia, anorexia, parada ou atonia ruminal, dorso arqueado, constipação e fezes ressecadas, untadas por muco e, às vezes, com estrias de sangue. Em alguns animais podem-se observar, tremores musculares e sinais neurológicos como cambaleios, excitação e agressividade, evoluindo para decúbito e morte, que ocorre entre seis e 48 horas após as primeiras manifestações clínicas (Döbereiner et al., 1969).

Diante da pouca palatabilidade do *Cestrum* para bovinos, devido à presença da cestrumida (substância amarga), os animais só consomem a planta sob condições específicas: carência alimentar (geralmente na época de seca), superlotação de pastagens ou após o pasto ser roçado, onde as folhas murchas tornam-se um pouco mais palatáveis (Tokarnia et al., 2012; Coutinho et al., 2013). No entanto, nenhuma destas condições condiziam com a realidade da propriedade.

Quando comparamos a palatabilidade das duas plantas (*Cestrum* sp e *P. hoffmannseggiana*), embora não haja dados suficientes sobre a *P. hoffmannseggiana*, supõe-se que esta apresenta uma palatabilidade maior do que o *Cestrum*. Isso, quando levamos em consideração a palatabilidade para bovinos das plantas do gênero *Palicourea* (Barbosa et al., 2003; Vasconcelos et al., 2008, Tokarnia et al., 2012) e para caprinos da *Psychotria perotensis* (Castillo-Campos et al., 2009), plantas que pertencem a mesma família e gênero da *P. hoffmannseggiana*, respectivamente. Assim, sugere-se que diante da presença das duas plantas os animais preferam ingerir a *P. hoffmannseggiana* a ingerir o *C. laevigatum*, sendo mais susceptível a sua intoxicação. Desse modo, de acordo com os dados fornecidos pelo proprietário e as observações feitas durante a inspeção da propriedade, esta não apresentava condições que favorecessem a ingestão do *Cestrum*, apesar dos animais terem tido acesso a mesma.

Os achados de necropsia dos bovinos com intoxicação aguda por *Cestrum* são bastante característicos. A lesão mais importante esta localizada no fígado, cuja superfície de corte apresenta aspecto de noz-moscada (Coutinho et al., 2013). Embora um animal (BOV-2) tenha apresentado este achado, outros achados descritos por Döbereiner e colaboradores (1969) e

Tokarnia e colaboradores (2012), como edema e hemorragia na mucosa da vesícula biliar, ressecamento do conteúdo do omaso e do intestino grosso, encontrando-se sob forma de esferas envoltas por muco sanguinolento, não foram observadas nos animais necropsiados (BOV-1 e BOV-2). Deste modo, diante dessas informações, não há indícios suficientes que corroborem com a intoxicação por essa planta. Além disso, deve-se levar em consideração que o fígado com aspecto de noz moscada também ocorre em virtude de insuficiência cardíaca crônica, secundária a endocardites e a outras afecções do coração (fígado cardíaco) (Tokarnia et al., 2012).

A suplementação mineral fornecida aos animais, composta de suplemento mineral comercial misturado a sal comum (cloreto de sódio) não atendia as necessidades minerais diárias dos animais. Além da pouca quantidade oferecida, a adição do sal comum provocou um desequilíbrio na suplementação mineral culminando com uma carência de fósforo, cálcio e zinco entre outros minerais, o que poderia deixar os animais suscetíveis a outras doenças, como o botulismo.

A forma epidêmica do botulismo assume grande importância econômica e sanitária no Brasil, estando relacionado com a osteofagia observada em bovinos mantidos em áreas deficientes em fósforo, sem a adequada suplementação mineral, e com a presença de restos cadavéricos contaminados (Dutra et al., 2001; Dutra et al., 2005; Câmara et al., 2014). O *Clostridium botulinum* e seus esporos são amplamente distribuídos no ambiente, solo, sedimentos e no trato gastrointestinal de peixes e animais (Freeman e Bevan, 2007). Em função da carência mineral, os animais desenvolvem o hábito de roer restos de carcaças, onde o agente permanece viável por até um ano. Sempre que isso ocorre, existe a forte possibilidade de que o bovino esteja ingerindo os esporos e a toxina botulínica previamente formada na matéria orgânica em decomposição (Câmara et al., 2014).

A carência de minerais pode ser manifestada através do apetite depravado e presença de doença periodontal. Durante a necropsia do BOV-2, pôde-se observar retração gengival moderada dos dentes incisivos, caracterizando a doença periodontal, e grande quantidade de corpos estranhos no conteúdo ruminal, incluindo pedaços de tecido, corda e fragmentos ósseos, caracterizando apetite depravado.

Os achados de necropsia de animais com botulismo são raros (Lobato et al., 2013). No animal BOV-2, os achados de necropsia consistiram em alterações decorrentes do longo período de decúbito, com congestão hipostática do pulmão, edema pulmonar, hidropericárdio, hemorragias petequiais e sufusões no pericárdio, escaras de decúbito e ovos de mosca nas extremidades ósseas do lado esquerdo.

Parte do conteúdo intestinal foi coletado e enviado para laboratório para a detecção de toxina botulínica. Apesar do resultado negativo, não se pode descartar essa possibilidade. Como o animal apresentou o quadro durante alguns dias, fica difícil a confirmação da suspeita por meio de testes laboratoriais.

A associação entre os achados epidemiológicos, achados de necropsia e a detecção de MFA nas amostras de fígado e fluido ruminal, sugerem mais de uma causa para o surto de mortalidade na propriedade. Suspeita-se que inicialmente os animais vieram a óbito pela intoxicação por MFA presente na *P. hoffmannseggiana*, posteriormente, a exposição das carcaças aliada à carência mineral contribuiu com as condições necessárias para o aparecimento do botulismo.

Para o controle das intoxicações por plantas tóxicas recomendou-se a retirada dos animais dos pastos próximos a mata nativa, já que a extensão da área impossibilitava a remoção das plantas tóxicas presentes no local. Como medida preventiva adicional, foi recomendada a correção da

suplementação mineral, com a administração do suplemento mineral comercial *ad libitum*, sem adição do sal comum. Além de estimar o consumo por animal com o objetivo de saber se as necessidades minerais estão sendo atendidas.

6.2. MÉTODOS DE DETECÇÃO DE MFA DO MATERIAL VEGETAL

Quando comparado os resultados da detecção de MFA por CCD e por CLAE-UV, observou-se que a utilização de CLAE-UV é um método muito mais sensível e específico. Ao utilizar CCD para detecção de MFA, Cunha (2010) obteve resultados que considerou satisfatórios. No entanto, o mesmo não foi visto no presente estudo. Baseado nisso, conclui-se que alguns ajustes devem ser feitos na metodologia, mas que a técnica de CCD não é capaz de substituir a de CLAE-UV como método para detecção de MFA.

Pela presença de outros picos visualizados durante a leitura no CLAE-UV, viu-se a necessidade de associar a metodologia utilizada para detecção de MFA com técnicas prévias de limpeza da amostra (*clean-up*). Para isso, foram testados 10 métodos de *clean up* das amostras do mesmo material vegetal. Após limpeza das amostras pelos diferentes métodos, estas foram injetadas no CLAE-UV. O método que mostrou resultados mais satisfatórios na detecção de MFA do material vegetal foi a utilização do carvão ativado. Este composto removeu grande número de interferentes, mas não afetou os níveis de MFA. Outra vantagem do carvão ativado é ser um produto de fácil acesso e baixo custo. Em trabalhos futuros, a utilização do carvão ativado como método de *clean up* pode ser utilizado como forma de melhorar a detecção de MFA por meio de CLAE-UV. Tendo em vista que trabalhos anteriores não mostraram a utilização dessa técnica.

A técnica de detecção de MFA por meio de CLAE-UV também foi utilizada em oito diferentes amostras de *P. hoffmannseggiana* cultivadas no canteiro de plantas tóxicas da EV-UFMG. No entanto, não foram obtidos níveis detectáveis de MFA, o que indica que a produção deste composto dependa de componentes do solo e/ou de microrganismos associados às raízes da planta. Além disto, recomenda-se que futuros estudos experimentais com *P. hoffmannseggiana*, assim como com outras plantas que contem MFA, devam ser feitos com plantas coletadas em propriedades onde ocorram surtos de intoxicação. A utilização da planta cultivada provavelmente resultaria em resultados negativos.

7. CONCLUSÕES

Psychotria hoffmannseggiana foi identificada como uma espécie de planta tóxica para bovinos, sendo responsável por surtos de morte súbita nesta espécie animal. O princípio tóxico foi identificado como MFA. A falta de dados a respeito da toxicidade dessa planta pode ser devido a uma confusão com a nomenclatura, que também é conhecida popularmente pelo nome de erva de rato e cafezinho; sua intoxicação pode estar sendo atribuída as plantas do gênero *Palicourea*.

A determinação de monofluoroacetato de sódio por meio de cromatografia em camada delgada foi considerada pouco sensível e específica. A técnica de CLAE-UV foi bastante eficaz, mas apresenta interferência com ácido acético. A utilização de carvão ativado no *clean-up* das amostras se mostrou um método eficaz na remoção dos interferentes sem afetar os níveis de MFA.

8. REFERÊNCIAS

- ALBUQUERQUE, S.S.C.; ROCHA, B.P.; ALMEIDA, V.M. Fibrose cardíaca associada á intoxicação por *Amorimia septentrionalis* em bovinos. *Pesq. Vet. Bras.*, v. 34, n. 5, p.433-437, 2014.
- ANDERSON, W.R. Eight segregates from the neotropical genus *Mascagnia* (Malpighiaceae). *Novon*, v. 16, n. 2, p. 168-204, 2006.
- ANDRADE, S.O.; MATTOS, J.R. Contribuição do estudo de plantas tóxicas no estado de São Paulo. Instituto Biológico, São Paulo. 101p. 1968.
- BARBOSA, J.D.; OLIVEIRA, C.M.C.; TOKARNIA, C.H.; RIET-CORREA, F. Comparação da sensibilidade de bovinos e búfalos à intoxicação por *Palicourea marcgravii* (Rubiaceae). *Pesq. Vet. Bras.*, v. 23, n. 4, p.167-172, 2003.
- BARBOSA, R.R.; FILHO, M.R.R.; SILVA, I.P.; SOTO-BLANCO, B. Plantas tóxicas de interesse pecuário: importância e formas de estudo. *Acta Vet. Brasilica*, v.1, n.1, p.1-7, 2007.
- BARON, M.L; BOTHOROYD, C.M.; ROGERS, G.I. et al. Detection and measurement of fluoroacetate in plant extracts by ¹⁹FMNM. *Phytochem.*, v. 26, n. 8, p. 2293-2295, 1987.
- BARROS, M.A.B.; MENEGUETTI, D.U.O. Relato de prováveis mortes súbitas em bovinos causadas pela ingestão de *Amorimia (Mascagnia) sepium* (Malpighiaceae) no estado de Rondônia, Brasil. Colégio de Aplicação da Universidade Federal do Acre, v. 1, n. 1., p.3-9, 2014.
- BECKER, M.; CALDEIRA, F.H.B.; CARNEIRO, F.M. et al. Importância da intoxicação por *Amorimia pubiflora* (Malpighiaceae) em bovinos em Mato Grosso: reprodução experimental da intoxicação em ovinos e bovinos. *Pesq. Vet. Bras.*, v. 33, n. 9, p.1049-1056, 2013.
- BICUDO, P.L. Principais plantas tóxicas de interesse veterinário. In: Curso de Toxicologia Animal. Viçosa, MEC/ABEAS, 1987. p.1-17.
- CÂMARA, A.C.L.; OLIVEIRA, C.M.M.; VALE, A.M.; BATISTA, J.S.; SOTO-BLANCO, B. Epidemiologia, sinais clínicos, achados laboratoriais e patológicos em oito surtos de botulismo em bovinos no Rio Grande do Norte. *Acta Sci. Vet.*, v. 42, n. 1200, 2014.
- CAMARGO, W.A. Uma nova “erva-de-rato” para bovinos *Palicourea barbiflora* (?), Rubiaceae; comparação com a *Palicourea marcgravii* var. *Pubescens* e com a *Psychotria officinalis*, Rubiaceae. *Arq. Inst. Biol.*, v. 29, 1962.
- CAMBOIM, E.K.A.; TADRA-SFEIR, M.Z.; SOUZA, E.M., et al. Defluorination of sodium fluoroacetate by bacteria from soil and plants in Brazil. *Sci. World J.*, 2012.
- CASTEEL, S.W.; TURK, J.R. Collapse/Sudden Death. In: SMITH, B.P. *Large Animal Internal Medicine*, 2ª ed. St. Louis, MO.: Mosby, 1996.
- CASTILLO-CAMPOS, G.; MEHLTRETER, K.; GARCIA-FRANCO, J.G.; MARTINEZ, M.L. *Psychotria perotensis* (Rubiaceae, Psychotrieae), a new species from the Montane Cloud Forest in Veracruz, México. *Novon*, v.19, p. 426-431, 2009.

CASTRO DA CUNHA, L.; PÍPOLE, F; RETZ DE CARVALHO, L. et al. Isolation and characterization of sodium 2-fluoroacetate from *Mascagnia rigida* using chromatography and infrared spectroscopy. *Toxicon*, v. 1, n. 60, p. 329-332, 2012.

CHEEKE, P.R. *Natural toxicants in feeds, Forages, and Poisonous Plants*. 2^oed. Danville: Interstate Publishers, 1998. 479p.

CHENOWETH, M. B.; GILMAN, A. Studies on the pharmacology of fluoroacetate. I. Species responses to fluoroacetate. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, v. 87, p. 90-103, 1946.

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

COUTINHO, L.T.; COSTA, N.A.; MENDONÇA, C.L. et al. Intoxicação natural de bovinos leiteiros por *Cestrum laevigatum* (Solanaceae) no agreste de Pernambuco – Brasil. *Ciênc. Anim. Bras.*, v.14, n.3, 2013.

CUNHA, L.C. *Avaliação dos efeitos tóxicos da Mascagnia rigida em ratos. Estudo anatomopatológico. Comparação entre metodologias cromatográficas para detecção do fluoroacetato de sódio*. 2008. 100f. Dissertação (Mestrado em Patologia Experimental e Comparada) - Universidade de São Paulo, São Paulo.

DÖBEREINER, J.; TOKARNIA, C.H.; CANELLA, C.F.C. Intoxicação por *Cestrum laevigatum* Schlecht., a causa de mortandades em bovinos no estado do Rio de Janeiro. *Pesq. Agropec. Bras.*, v.4, p. 165-193, 1969.

DÖBEREINER, J.; TOKARNIA, C.H.; SILVA, M.F. Intoxicação por *Arrabidaea bilabiata* em bovinos na Região Amazônica do Brasil. *Pesq. Vet. Bras.*, v. 3, n. 1, p. 17-24, 1983.

DUARTE, A.L.; MEDEIROS, R.M.T.; RIET-CORREA, F. Intoxicação por *Amorimia* spp. em ruminantes. *Ciênc. Rural*, v. 43, n. 7, p. 1294-1301, 2013.

DUTRA, I.S.; DÖBEREINER, J.; ROSA, I.V., et al. Surto de botulismo em bovinos no Brasil associados á ingestão de água contaminada. *Pesq. Vet. Bras.*, v.21, n.2, p. 43-48, 2001.

DUTRA, I.S.; DÖBEREINER, J.; SOUZA, A.M. Botulismo em bovinos alimentados com cama de frango. *Pesq. Vet. Bras.*, v. 25, n. 2, p. 115-119, 2005.

EGYED, M. N.; SCHULTZ, R. A. The efficacy of acetamide for the treatment of experimental *Dichapetalum cymosum* (Gifblaar) poisoning in sheep. *Onderstepoort J. Vet. Res.*, v. 54, p. 231-234, 1986.

EISLER, R. *Sodium monofluoroacetate (1080) hazards to fish, wildlife, and invertebrates: A synoptic review*. Biological Report 27, Patuxent Environmental Science Centre, U.S. National Biological Service, Washington DC., USA, 1995, p.1-47.

FREEMAN, P.; BEVAN, P. Botulism in cattle. *Primefact*, n.596, 2007.

GAL, E. M.; PETERS, R. A.; WAKELIN, R. A. Some effects of synthetic fluoro-compounds on the metabolism of acetate and citrate. *Biochem. J.*, v. 64, n. 1, p. 161-168, 1956.

GAVA, A.; CRISTANI, J.; BRANCO, J.V. et al. Mortes súbitas em bovinos causadas pela ingestão de *Mascagnia* sp. (Malpighiaceae), no Estado de Santa Catarina. *Pesq. Vet. Bras.*, v. 18, n. 1, p.16-20, 1998.

GÓRNIAK, S. L.; PALERMO-NETO, J.; SPINOSA, H. S. Effect of CNS depressant drugs on acute intoxication from *Palicourea marcgravii* St Hill in rats. *Vet. Hum. Toxicol.*, v. 35, p. 19-21, 1993.

GÓRNIAK, S.L.; PALERMO-NETO, J.; SOUZA-SPINOSA, H. Effects of acetamide on experimentally-induced *Palicourea marcgravii* (St. Hill.) poisoning in rats. *Vet. Hum. Toxicol.*, v. 36, p. 101-102, 1994.

GÓRNIAK, S.L.; PALERMO-NETO, J.; SOUZA-SPINOSA, H. Effects of CNS depressant drugs on acute intoxication from *Palicourea marcgravii* St. Hil. in rats. *Vet. Hum. Toxicol.*, v. 35, p. 19-21, 1993.

GREGG, K; HAMDORF, B.; HENDERSON, K, et al. Genetically modified ruminal bacteria protect sheep from fluoroacetate poisoning. *App. Environ. Microbiol.*, v. 9, p. 3496–3498, 1998.

HELAYEL, M.A.; FRANÇA, T.N.; SEIXAS, J.N. et al. Morte súbita em bovinos causada pela ingestão de *Pseudocalymma elegans* (Bignoniaceae) no município de Rio Bonito, RJ. *Pesq. Vet. Bras.*, v. 29, n. 7, p. 498-508, 2009.

HOLSTEGE, C.P.; BECHTEL, L.K.; REILLY, T.H. et al. Unusual but potential agents of terrorists. *Emerg. Med. Clin. N. Am.*, v. 25, p. 549-566, 2007.

HUMPHREYS, D. J. *Veterinary Toxicology*. 3 ed. London: Bailliere Tindall, 1988, 356p.

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. 909-913, 1994.

LEE, S.T.; COOK, D.; PFISHER, J.A. et al. Monofluoroacetate-containing plants that are potentially toxic to livestock. *J. Agric. Food Chem.*, 2014.

LEE, S.T.; COOK, D.; RIET-CORREA, F. et al. Detection of monofluoroacetate in *Palicourea* and *Amorimia* species. *Toxicon*, v. 60, n. 5, p. 791-796, 2012.

LINCOLN, S.D. Sudden death in feeder cattle. *Cattle Producer's Handbook*, 3ª ed., p. 652, 2012.

LOPES, S.; VON POSER, G.L.; KERBER, V.A. et al. Taxonomic significance of alkaloids and iridoid glucosides in the tribe *Psychotria* (Rubiaceae). *Biochem. Syst. Ecol.*, v. 32, p. 1187-1195, 2004.

LUCENA, R.B.; PIEREZAN, F.; KOMMERS, G.D. et al. Doenças de bovinos no Sul do Brasil: 6.706 casos. *Pesq. Vet. Bras.*, v.30, n. 5, p. 428-434, 2010.

MAMEDE, M.C.H. *Amorimia* in Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 2010. Acesso em 12 janeiro de 2015. Online. Disponível em: <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/2015/FB101439>.

MINNAAR, P.P.; MCCRINDLE, R.I.; NAUDÉ, T.W.; BOTHA, C.J. Investigation of biological samples for monofluoroacetate and *Dichapetalum cymosum* poisoning in southern Africa. *Onderstepoort J. Vet. Res.*, v. 67, n. 1, p. 27-30, 2000a.

MINNAAR, P.P.; SWAN, G.E.; MCCRINDLE, et al. A high-performance liquid chromatographic method for the determination of monofluoroacetato. *J. Chromatogr. Sci.*, v.38, p.16-20, 2000b.

MORAES, R.L.F. *Comprovação química e biológica da presença de monofluoroacetato nas folhas de Palicourea marcgravii* St. Hil. 1993. 83f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Universidade de São Paulo, São Paulo.

MORAES-MOREAU, R.L.; HARAGUCHI, M.; MORITA, H.; PALERMO-NETO J. Chemical and biological demonstration of the presence of mono-fluoroacetate in the leaves of *Palicourea marcgravii* St. Hil. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, v. 28, p. 685-692, 1995.

NEPOKROEFF, M.; BREMER, B.; SYTSMA, K. J. Reorganization of the genus *Psychotria* and tribe Psychotrieae (Rubiaceae) inferred from ITS and rbcL sequence data. *Syst. Bot.*, v. 24, n. 1, p. 5–27, 1999.

NOGUEIRA, V.A.; FRANÇA, T.N.; PEIXOTO, T.C. et al. Intoxicação experimental por monofluoroacetato de sódio em bovinos: aspectos clínicos e patológicos. *Pesq. Vet. Bras.*, v. 30, n. 7, p. 533-540, 2010.

NOGUEIRA, V.A.; PEIXOTO, T.C.; FRANÇA, T.N. et al. Intoxicação por monofluoroacetato em animais. *Pesq. Vet. Bras.*, v. 31, n. 10, p. 823-838, 2011.

OLIVEIRA, A.M.; LEMOS, R.P.L; CONSERVA, L.M. β -Carboline alkaloids from *Psychotria barbiflora* DC. (Rubiaceae). *Biochem. Syst. Ecol.*, v.50, p. 339-341, 2013.

OLIVEIRA, C.M.C.; BARBOSA, J.D.; MACEDO, R.S.C. et al. Estudo comparativo da toxidez de *Palicourea juruana* (Rubiaceae) para búfalos e bovinos. *Pesq. Vet. Bras.*, v. 24, n. 1, p. 27-30, 2004.

PACÍFICO DA SILVA, I.; LIRA, R.A.; BARBOSA, R.R. et al. Intoxicação natural pelas folhas de *Mascagnia rigida* (Malpighiaceae) em ovinos. *Arq. Inst. Biol.*, v. 75, n. 2, p.229-233, 2008.

PATTISON F. L. *Toxic aliphatic fluorine compounds*. London: Elsevier Publishing, 1959. 227 p.

PAVARINI, S.P.; SOARES, M.P.; BANDARRA, P.M. et al. Mortes súbitas em bovinos causadas por *Amorimia exotropa* (Malpighiaceae) no Rio Grande do Sul. *Pesq. Vet. Bras.*, v. 31, n. 4, p. 291-296, 2011.

PEDROSO, P.M.O.; PESCADOR, C.A.; OLIVEIRA, E.C. et al. Intoxicações naturais por plantas em ruminantes diagnosticadas no setor de patologia da UFRGS no período de 1996-2005. *Acta Sci. Vet.*, v. 30, n. 2., p. 213-218, 2007.

PEIXOTO, T.C. *Aspectos clínico-patológicos e laboratoriais da intoxicação experimental por monofluoroacetato de sódio em ovinos*. 2010. 127f. Dissertação (Mestrado em Patologia) – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.

PEIXOTO, T.C.; OLIVEIRA, L.I.; CALDAS, S.A. et al. Efeito protetor da acetamida sobre as intoxicações experimentais em ratos por monofluoroacetato de sódio e por algumas plantas brasileiras que causam morte súbita. *Pesq. Vet. Bras.*, v. 31, n. 11, p. 938-952, 2011.

PERRY, P. (dados não publicado). Department of Chemistry, University of Manchester, Institute for Science and Technology, 1993. Citado por MINNAAR, P.P.; MCCRINDLE, R.I.; NAUDÉ, T.W.; BOTHA, C.J. Investigation of biological samples for monofluoroacetate and *Dichapetalum cymosum* poisoning in southern Africa. *The Onderstepoort Journal of Veterinary Research*, v. 67, n. 1, p. 27-30, 2000.

PERRY, R. (dados não publicados). Departamento de Química, Universidade de Manchester, Instituto de Ciência e Tecnologia, 1993.

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

PETERS, R. A. *Biochemical lesions and lethal synthesis*. New York: Macmillan, 1963. 312 p.

PETERS, R. A. Lethal synthesis. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, v. 139, n. 895, p. 143-170, 1952.

PINTO, L.F. *Efeitos dos extratos aquoso e hidro-alcoólico e das soluções ultradiluídas de *Palicourea marcgravii* (Rubiaceae) em ratos*. 2007. 196f. Tese (Doutorado em Sanidade Animal) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica.

POTT, A.; POTT, V.J.; SOUZA, T.W. Plantas daninhas de pastagem na região dos cerrados. *EMBRAPA Gado de Corte*. Campo Grande, MS. 2006. 336 p.

RADOSTITIS, O.M.; GAY, C.C.; BLOOD, D.C.; HINCHCLIFF, K.W. Doenças causadas por toxinas de plantas, fungos, cianofitas, clavibactéria e por venenos de carrapatos e animais vertebrados. In: RADOSTITIS, O.M.; GAY, C.C.; BLOOD, D.C.; HINCHCLIFF, K.W. (Eds). *Clínica Veterinária*. 9ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002. p. 1472-1547.

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. *Pesq. Vet. Bras.*, v. 21, n. 1, 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: 461 casos. *Pesq. Vet. Bras.*, v. 27, n. 7, p. 261-268, 2007.

SCHONS, S.V. *Plantas tóxicas para ruminantes e eqüídeos na região central de Rondônia*. 2011. 78f. Tese (Doutorado em Patologia) – Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

SCHONS, S.V.; LOPES, T.V.; MELO, T.L. et al. Intoxicação por plantas em ruminantes e eqüídeos na região central de Rondônia. *Ciênc. Rural*, v. 42, n. 7, p.1257-1263, 2012.

SHERLEY, M. The traditional categories of fluoroacetate poisoning signs and symptoms belie substantial underlying similarities. *Toxicol. Lett.*, v. 151, p. 399-406, 2004.

- SILVEIRA, A.L.; ROCHA, A.O.B.; MELO, A.F.M. et al. Plantas que ocorrem no Estado da Paraíba e suas potencialidades tóxicas. *Pesq. Vet. Bras.*, v. 24, n. 70, 2004.
- SIMÕES-PIRES, C.A.; FARIAS, F.M.; MARSTON, A., et al. Indole monoterpenes with antichemotactic activity from *Psychotria myriantha*: Chemotaxonomic significance. *Nat. Prod. Commun.*, v. 1, n. 1101, 2006.
- SOARES, M.P.; PAVARINI, S.P.; ADRIEN, M.L. et al. *Amorimia exotropa* poisoning as a presumptive cause of myocardial fibrosis in cattle. *J. Vet. Diagn. Invest.*, v. 23, n. 6, p. 1226-1229, 2011.
- SOTO-BLANCO, B.; HARAGUCHI, M.; SILVA, J.A.; GÓRNIK, S.L. Intoxicação natural de caprinos e ovinos por *Palicourea marcgravii* St. Hil. (Rubiaceae). *Caatinga*, v.17, n. 1, p. 52-56, 2004.
- STEYERMARK, J. A. *Rubiaceae, part IX*. In: MAGUIRE, B.; STEERE, W. C.; IRWIN, H. S.; CRONQUIST, A. (editors), The Botany of the Guyana Highland. *Mem. New York Bot. Gard.*, v. 23, p. 227-832, 1972.
- SUZUKI, K. Poisoning by organofluorines and organochlorines. *Asian Med. J.*, v. 42, p. 558-562, 1999.
- TAYLOR, C.M. The neotropical genus *Ronadea* (Rubiaceae, Lasiatheae). *Syst. Geogr.*, v. 74, p. 35-42, 2004.
- TAYLOR, C.M.; CAMPOS, M.T.V.A.; ZOPP, D. Flora da reserva duckei Amazonas, Brasil: Rubiaceae. *Rodriguésia*, v.58, n. 3, p. 549-616, 2007.
- TEIXEIRA, L.A.G.; MACHADO, I.C. Biologia da polinização e sistema reprodutivo de *Psychotria barbiflora* DC. (Rubiaceae). *Acta Bot. Bras.*, v. 18, n. 853. 2004.
- TOKARNIA, C.H. et al. Poisonous plants affecting heart function of cattle in Brazil. *Pesq. Vet. Bras.*, v.10, p.1-10, 1990.
- 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. *Pesq. Vet. Bras.*, v. 24, n. 2, p. 74-79, 2004.
- TOKARNIA, C.H.; BRITO, M.F.; BARBOSA, J.D. et al. 2ª ed. *Plantas Tóxicas do Brasil*. Rio de Janeiro: Helianthus, 2012. 556p.
- TOKARNIA, C.H.; DÖBEREINER J. Intoxicação experimental por *Palicourea juruana* (Rubiaceae) em bovinos e coelhos. *Pesq. Vet. Bras.*, v. 2, n. 1, p. 17-26, 1982.
- TOKARNIA, C.H.; DÖBEREINER, J. Intoxicação por *Arrabidaea japurensis* (Bignoniaceae) em bovinos em Roraima. *Pesq. Vet. Bras.*, v. 1, n. 1, p.7-17, 1981.
- TOKARNIA, C.H.; DÖBEREINER, J.; COUCEIRO, J.E.M.; SILVA, A.C.C. Intoxicação por *Palicourea aeneofusca* (Rubiaceae), a causa de .mortes súbitas. em bovinos na Zona da Mata de Pernambuco. *Pesq. Vet. Bras.*, v. 3, n. 3, p. 75-79, 1983.

TOKARNIA, C.H.; DÖBEREINER, J.; PEIXOTO, P.V. *Plantas Tóxicas do Brasil*. Helianthus, Rio de Janeiro. 2000, 310p.

TOKARNIA, C.H.; DÖBEREINER, J.; SILVA M.F. Intoxicação por *Palicourea grandiflora* (Rubiaceae) em bovinos no Território de Rondônia. *Pesq. Vet. Bras.*, v. 1, n. 3, p. 85-94, 1981.

VASCONCELOS, J.S.; RIET-CORREA, F.; DANTAS, A.F. et al. Mortes súbitas em bovinos causadas por *Palicourea aeneofusca* (Rubiaceae) e *Mascagnia rígida* (Malpighiaceae) na zona da Mata Paraibana. *Pesq. Vet. Bras.*, v.28, n. 10, 2008.

9. ANEXOS

Anexo 1. Concentração de MFA presente nas plantas que causam morte súbita.

Espécie	Concentração de MFA %	Referências
<i>Palicourea marcgravii</i>	0,00054 (f) 0,24 GO (fm) 0,21 SP (fm) 0,88 SP (fj)	Krebs et al., 1994 Lee et al., 2012
<i>Palicourea grandiflora</i>	Presente	Cook et al., 2014
<i>Palicourea juruana</i>	Presente	Cook et al., 2014
<i>Palicourea aeneofusca</i>	0,09 (f)	Tokarnia et al., 2000 Vasconcelos et al., 2008
<i>Amorimia septentrionalis</i>	0,002 (f) 0,001 (c) 0,008 (fl) 0,006 (s)	Lee et al., 2012
<i>Amorimia sp. (rigida complex; M. aff. rigida)</i>	0,005	Lee et al., 2012
<i>Amorimia rigida</i>	0,002	Lee et al., 2012
<i>Amorimia amazônica</i>	<0,0007	Lee et al., 2012
<i>Amorimia exotropica</i>	0,02	Lee et al., 2012
<i>Amoria pubiflora</i>	0,006	Lee et al., 2012
<i>Tanaecium bilabiatum</i>	0,0003 (f) 0,00641 (s)	Krebs et al., 1994

GO – amostras de Goiás; SP – Amostras de São Paulo; (f) folhas; (fm) folha madura; (fj) folha jovem; (c) caule; (fl) flores; (s) sementes.

Anexo 2. Aspectos clínico-patológicos da intoxicação experimental pelas plantas que causam “morte súbita” em bovinos (continuação).

Planta	Dose letal (g/kg)	Tempo entre a adm. e o óbito	Quadro clínico	Achados de necropsia	Achados histopatológicos
<i>P. marcgravii</i>	0,6	4h a 24h45min	Pulso venoso positivo, desequilíbrio, instabilidade, tremores musculares, decúbito esterno-abdominal e lateral, taquipnéia, pedalagem, opistótono, mugido e morte.	Negativo	Alterações regressivas e circulatórias em fígado, rim e coração. DHV dos túbulos contornados distais no rim.
<i>P. aeneofusca</i>	0,75	12 a 24h	Cai em decúbito lateral e morre.	Negativo	DHV dos túbulos uriníferos contornados distais dos rins e vacuolização dos hepatócitos.
<i>P. juruana</i>	2,0	11h50min a 13h46min	Dispneia, taquicardia, queda, perda de controle dos movimentos, decúbito lateral, movimentos de pedalagem, mugidos e morte.	Negativos	Necrose hepática e necrose do miocárdio (em um bovino). Leve a moderada DHV dos hepatócitos.
<i>P. grandiflora</i>	1,0 e 2,0	Até 24h	Relutância em mover-se, decúbito esternal, decúbito lateral, opistótono, movimentos de pedalagem, mugidos e morte.	Negativos	DHV dos túbulos uriníferos contornados distais associada à picnose nuclear.
<i>Tanaecium bilabiatum</i>	15	6h a 24h	Instabilidade, tremores musculares, dispnéia, pulso venoso positivo, queda abrupta, pedalagem, mugidos e morte.	Negativos	DHV dos túbulos uriníferos contornados distais associada à picnose nuclear.
<i>Fridericia japurensis</i>	1,5 a 10	6h a 22h	Relutância em andar, instabilidade, tremores musculares, micções e defecações frequentes, dispnéia, taquicardia, pulso venoso positivo, queda em decúbito, pedalagem, mugidos ocasionais e morte.	Negativos	DHV dos túbulos uriníferos contornados distais associada à picnose nuclear.
<i>P. elegans</i>	0,5 a 10	5h30m a 73h	Andar rígido, instabilidade, tremores musculares, deita-se rápido ou cai em decúbito esternal com membros posteriores esticados, opistótono, nistagmo e taquicardia.	Ocasionalmente ressecamento do conteúdo do omaso e reto.	Vacuolização citoplasmática de hepatócitos e miocárdio. DHV dos túbulos uriníferos contornados distais associada à picnose nuclear.

Tabela adaptada de Pinto (2007) e Peixoto (2010).

Anexo 2. Aspectos clínico-patológicos da intoxicação experimental pelas plantas que causam “morte súbita” em bovinos (continuação).

Planta	Dose letal (g/kg)	Tempo entre a adm. e o óbito	Quadro clínico	Achados de necropsia	Achados histopatológicos
<i>Amorimia rígida</i>	Indet.	24h a 48h	Relutância em andar, tremores musculares, queda em decúbito e morte.	Negativos	Infiltrados linfo-histiocitários no miocárdio, edema e processos degenerativos nas fibras musculares do coração. DHV associada à picnose nuclear das células epiteliais dos túbulos contornados distais no rim.
<i>Amorimia publiflora</i>	5,0 a 20	16h a 48h	Relutância em mover-se, andar rígido, tremores musculares, micção frequente, deita-se ou cai quando movimentado, decúbito lateral, movimentos de pedalagem, mugidos e morte.	Negativos	DHV dos túbulos uriníferos contornados distais associada à picnose nuclear.
<i>Amorimia sp (M. aff rígida)</i>	0,6 a 2,5	17h45min a 37h45min	Queda em decúbito esterno-abdominal depois decúbito lateral, movimentos desordenados com a cabeça, tremores musculares, pulso venoso positivo, dispnéia, movimentos de pedalagem, mugidos, respiração espaçada ou forçada, movimentos de pedalagem e morte.	Em administrações repetidas, observaram-se áreas branco-acinzentadas na região do músculo papilar.	DHV dos túbulos uriníferos contornados distais associada á picnose nuclear. Em administrações repetidas, processo degenerativo, necrótico, proliferativo e inflamatório na região do músculo papilar.
<i>Amorimia exotropica</i>	5,0 a 10	14h a 23h	Cansaço, jugular ingurgitada, tremores, taquicardia, decúbito, morte.	Coloração avermelhada na mucosa do intestino delgado e edema da subserosa da parede da vesícula biliar.	DHV dos túbulos uriníferos contornados distais associada à picnose nuclear, congestão hepática centrolobular e hemorragias na mucosa do intestino delgado.
<i>Amorimia septentrionalis</i>	Indet.	Indet.	Lentidão, decúbito esternal prolongado, relutância em se movimentar quando em estação, cansaço, taquipneia, taquicardia e pulso venoso positivo. Os bovinos que foram forçados a se movimentar apresentaram instabilidade, tremores musculares e queda repentina seguida de vocalizações, movimentos de pedalagem e morte súbita em cerca de 5 a 7 minutos.	Edema pulmonar, coração com aspecto globular com áreas esbranquiçadas, petéquias e equimoses no epicárdio, miocárdio e músculos papilares.	Aumento da eosinofilia do citoplasma dos cardiomiócitos, núcleos picnóticos, cariorrexia, cariólise, perda das estriações, edema intersticial, infiltrado inflamatório intersticial mononuclear e áreas multifocais de fibrose cardíaca. DHV e necrose das células epiteliais em túbulos contorcidos.

Tabela adaptada de Pinto (2007) e Peixoto (2010).

Anexo 3. Toxicidade do MFA para as diferentes espécies de animal de produção.

Espécie	DL₅₀ (mg.kg)
Bovino jovem	0,22
Bovino adulto	0,39
Ovinos	0,25-0,50
Caprinos	0,6
Equinos	0,35-0,55

Tabela adaptada de Moraes, 1993.

