



Serviço Público Federal
Ministério da Educação
Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL
CURSO DE DOUTORADO**

**ANÁLISE MORFOLÓGICA, FITOQUÍMICA E INTOXICAÇÃO EXPERIMENTAL DE
EXTRATO AQUOSO DAS FOLHAS NOVAS E ADULTAS DE *Tetrapteryx*
multiglandulosa CAV. (MALPIGHIACEAE) EM COELHAS DA RAÇA NOVA ZELÂNDIA**

Gilberto Gonçalves Facco

CAMPO GRANDE, MS
2015



Serviço Público Federal
Ministério da Educação
Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL
CURSO DE DOUTORADO**

**ANÁLISE MORFOLÓGICA, FITOQUÍMICA E INTOXICAÇÃO EXPERIMENTAL
DE EXTRATO AQUOSO DAS FOLHAS NOVAS E ADULTAS DE *Tetrapteryx
multiglandulosa* CAV. (MALPIGHIACEAE) EM COELHAS DA RAÇA NOVA
ZELÂNDIA**

Gilberto Gonçalves Facco

Orientador: Prof. Dr. Carlos Eurico dos Santos Fernandes

Dissertação apresentada à
Universidade Federal de Mato
Grosso do Sul, como requisito à
obtenção do título de Doutor em
Ciência Animal.
Área de concentração: Saúde
Animal.

CAMPO GRANDE, MS 2015

FOLHA DE APROVAÇÃO

Dedico este trabalho a todos que me ajudaram.

AGRADECIMENTOS

Ao professor Carlos Eurico, por ter-me aceito nesta importante etapa da minha vida, com sua dedicação e paciência.

À minha esposa Izilyanne Romanholi Facco pela paciência e imensa ajuda em todas as etapas deste projeto.

Aos meus pais pelos ensinamentos e pela vida.

As professoras Dra. Rosemary Matias, Eloty Justina Dias Schleder, Dra. Doroty Mesquita Dourado e ao Professor Marcos Barbosa Ferreira pelo companheirismo.

Aos meus amigos Rodrigo Postinguel, Sheila Sato, Karen, Karin Kuibida, Jéssica Müllher, Rosane, Thatianna Pedroso e Pedro por toda a ajuda.

“A verdadeira viagem de
descobrimento não consiste
em procurar novas paisagens,
mas em ter novos olhos”.

Marcel Proust

RESUMO

Tetrapteryx multiglandulosa coletadas no município de Batayporã, no Estado de Mato Grosso do Sul é responsáveis por abortos e mortes nesta região, este fato nos levou a caracterizar a morfoanatomia das folhas e caules desta Malpighiaceae, a fitoquímica das folhas e reproduzir experimentalmente a intoxicação por meio de gavagem utilizando extrato aquoso (200g L^{-1}) em coelhas da raça Nova Zelândia. Na morfoanatomia dos órgãos vegetativos observou-se a presença de células altas na epiderme adaxial, mesófilo dorsiventral, parênquima paliádico com uma camada de células e estômatos do tipo paracítico. Os testes fitoquímicos nos extratos aquoso e etanólico (200g L^{-1}) das folhas novas e velhas indicaram a presença de compostos fenólicos, taninos, flavonoides, saponinas, alcaloide e glicosídeos cardiotônicos. Experimentalmente, após a gavagem, coletaram-se, de cada coelha, amostras sanguíneas, após 24 horas, sete e 14 dias do experimento, para avaliação da bioquímica sérica sanguínea. Ao final deste período, todos os animais foram eutanasiados, necropsiados e fragmentos de coração e fígado foram coletados para histopatologia. Uma coelha do grupo G1 (folhas jovens) morreu 24 horas após a gavagem, apresentando atividades de CK e CK-MB elevadas comparando com dados de referência. O mesmo foi observado em todos os animais dos dois grupos. Alterações macroscópicas e microscópicas foram observadas em todos os animais. Estes achados corroboram os estudos de outros pesquisadores que estudaram a intoxicação por *Tetrapteryx* spp. e são compatíveis com plantas que contêm glicosídeos cardiotônicos. A planta utilizada revelou conter digoxina como um dos metabólitos secundários compatíveis com as lesões cardíacas observadas.

Palavras-chave: Plantas tóxicas, cardiotoxicidade, metabólitos secundários.

ABSTRACT

Tetrapteryx multiglandulosa collected in the city of Batayporã in the state of Mato Grosso do Sul is responsible for abortions and deaths in this region, this fact led us to characterize the morphoanatomy the leaves and stems of this Malpighiaceae, the phytochemical leaves and experimentally reproduce intoxication by gavage using aqueous extract (200 g L^{-1}) in rabbits of New Zealand race. In morphoanatomy of vegetative organs was observed the presence of high cells on the adaxial epidermis, mesophyll mesophyll palisade parenchyma with a layer of cells and stomata of paracitic type. Phytochemicals tests in aqueous and ethanol extracts (200 g L^{-1}) of the new and old leaves indicated the presence of phenolic compounds, tannins, flavonoids, saponins, alkaloid and cardiac glycosides. Experimentally, after gavage, is collected from each rabbit, blood samples after 24 hours, seven and 14 days of experiment for evaluation of blood serum biochemistry. After this period, all animals were euthanized, necropsied and heart and liver fragments were collected for histopathology. A rabbit G1 (young leaves) died 24 hours after the gavage, with elevated CK activity and CK-MB compared with reference data. The same was observed in all animals in both groups. Macroscopic and microscopic changes were observed in all animals. These findings corroborate the findings of other researchers who have studied the poisoning *Tetrapteryx* spp. and are compatible with plants containing cardiac glycosides. The herb was found to contain digoxin as one of the secondary metabolites consistent with cardiac lesions observed.

Keywords: Toxic plants, cardiotoxicity, secondary metabolites.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Artigo 1

Figura 1. Fotomicrografia de <i>Tetrapteryx multiglandulosa</i> em corte transversal do caule e da folha.....	24
Figura 2. Fotomicrografia dos testes histoquímicos de corte transversal do caule e da lâmina foliar de <i>Tetrapteryx multiglandulosa</i>	26
Figura 3. Cromatografia de camada delgada (CCD) de extratos aquosos das folhas novas e velhas e etanólicos das folhas novas e velhas de <i>Tetrapteryx multiglandulosa</i> e do padrão Digoxina (P).....	29

Artigo 2

Figura 1. Atividade enzimática de CK e CK-MB de coelhas consumindo extratos de folhas jovens e adultas de <i>T. multiglandulosa</i>	43
Figura 2. Fotografias de fígado de coelhas intoxicadas com extratos de folhas de <i>T. multiglandulosa</i>	44
Figura 3. Fotografia de cavidade abdominal de coelhas intoxicadas com extratos de folhas de <i>T. multiglandulosa</i>	44
Figura 4. Fotografia de coração de coelha intoxicada com extrato de folhas de <i>T. multiglandulosa</i>	45
Figura 5. Fotomicrografias de corte histológicos de fígado de coelha intoxicada por <i>T. multiglandulosa</i>	45
Figura 6. Fotomicrografias de corte histológicos de fígado de coelha intoxicada por <i>T. multiglandulosa</i>	46
Figura 7. Fotomicrografias de corte histológicos de coração de coelha intoxicada por <i>Tetrapteryx multiglandulosa</i>	47

LISTA DE TABELA

Tabela 1. Resultados dos testes histoquímicos realizados em folhas e caules de <i>Tetrapteryx multiglandulosa</i> coletadas no Mato Grosso do Sul.....	25
Tabela 2. Alterações histopatológicas observadas em coelhas da raça Nova Zelândia ao extrato aquoso.....	48

LISTA DE QUADRO

Quadro 1. Resultados obtidos com o estudo fitoquímico do extrato aquoso e etanólico das folhas (novas e adultas) de <i>T. multiglandulosa</i> coletadas no Mato Grosso do Sul.....	28
---	----

LISTA DE ABREVIações E SIGRAS

C - Carbono

CCD – Cromatografia em camada delgada

CEUA – Comitê de ética e experimentação animal

CK – Creatino quinase

CK-MB – Isoenzima MB de creatino quinase

FT – Fenóis totais

g - Grama

G1 – Grupo 1

G2 – Grupo 2

HCl – Ácido clorídrico

I – Índice

K – Quilograma

mL – Mililitro

MS – Mato Grosso do Sul

pH Potencial hidrogeniônico

SUMÁRIO

Resumo.....	8
Abstract.....	9
Lista de ilustrações.....	10
Lista de tabelas.....	11
Lista de quadro.....	12
Lista de abreviações e siglas.....	13
Introdução.....	15
Referências bibliográficas.....	17
Artigo 1. Análise morfológica das folhas e caules e fitoquímica de folhas de <i>T. multiglandulosa</i> CAV. no Mato Grosso do Sul.....	18
Resumo.....	18
Abstract.....	19
Introdução.....	20
Material e métodos.....	21
Resultados e discussão.....	23
Conclusão.....	29
Referências bibliográficas.....	29
Artigo 2. Intoxicação experimental de extrato aquoso das folhas novas e adultas de <i>Tetrapteryx multiglandulosa</i> CAV. (Malpighiaceae) em coelhas da raça Nova Zelândia.....	37
Resumo.....	37
Abstract.....	38
Introdução.....	38
Material e métodos.....	40
Resultados.....	42
Discussão.....	48
Conclusão.....	50

Referências bibliográficas.....	51
Anexo 1.....	55
Anexo 2.....	59

INTRODUÇÃO

Estudos referentes às plantas tóxicas são de grande relevância para o Estado de Mato Grosso do Sul, uma vez que estas representam motivo de perdas econômicas no setor agropecuário, não só pela intoxicação de animais, mas também pela perda de produtividade das pastagens. Em se tratando da toxicidade de plantas, estudos que visam avaliar a mesma em modelos experimentais são importantes para o Mato Grosso do Sul, visto que a região apresenta um dos maiores rebanhos bovinos do país, cuja taxa de mortalidade por intoxicação por plantas é o equivalente a 5% anual (BRUM, 2002).

Além disso, considerando a crescente procura da indústria farmacêutica por novas estruturas moleculares visando à produção de novos fármacos, as plantas possuem uma enorme diversidade de moléculas produzidas pelo metabolismo secundário e representam uma fonte praticamente inesgotável destas moléculas. A medicina tradicional é fonte de informações para a busca direcionada de atividades biológicas, porém não é suficiente para se esgotar todo o potencial farmacológico dos produtos naturais.

Nesta ótica, os estudos fitoquímicos biodirigidos *in vivo* (modelos experimentais) e *in vitro*, desde que metodologicamente estabelecidos para irem de encontro aos seus objetivos, são de fundamental importância. Para se obter sucesso nestes estudos, a interação entre as diversas áreas do conhecimento é fundamental. Dentre estas áreas, destacam-se a Botânica, a Química, a Farmacologia, a Toxicologia e a Biologia Molecular (YUNES e CALIXTO, 2001).

A *Tetrapteryx multiglandulosa* é uma espécie pouco estudada e seus princípios ativos são desconhecidos, mas parece evidente que uma classe de metabólitos secundários pode ser responsável pela causa de morte súbita, além de

lesões em animais adultos e fetos (CARVALHO et al., 2006). Sendo assim, faz-se necessário um estudo abrangendo análises que possam encontrar uma classe de metabólito secundário que esteja envolvida com a patogenia da intoxicação. Achados bibliográficos referentes a esta planta não citam e nem supõem qualquer tipo de substância suspeita de causar essa toxicidade (AGUILAR GUADARRAMA et al., 2007), os estudos mostram apenas relatos de mortes de bovinos e ovinos e as alterações clínicas e patológicas da intoxicação (TOKARNIA et al., 2002).

De acordo com estes dados, optou-se por realizar uma análise morfoanatômica e fitoquímica das folhas novas e adultas de *Tetrapteryx multiglandulosa*, e a partir desta identificar e confirmar a presença de glicosídeo cardiotônico e determinar o índice afrosimétrico, além de um estudo patobiológico com objetivo de caracterizar a intoxicação produzida por *T. multiglandulosa* em coelhas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aguilar-Guadarrama, A. B.; Ríos, M.Y. Terpenos y flavonóides glicosídicos de *Tetrapteryx heterophylla* (Griseb.) W.R. Anderson (Malpighiaceae). **Revista Cubana de Plantas Medicinales**, Havana, v.12: (3) 2007.

Brum, K. Intoxicação por *Vermonia rubricalis* em Bovinos no Mato Grosso do Sul. 2002. **Dissertação de Mestrado em Medicina Veterinária. Universidade Federal de Pelotas**. Rio Grande do Sul. Brasil. 2002.

Carvalho, M. N.; Alonso, L. A.; Cunha, T. G.; Ravedutti, j.; Barros, C. S. L.; Lemos, R. A. A. Intoxicação de bovinos por *Tetrapteryx multiglandulosa* (Malpighiaceae) em Mato Grosso do Sul. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. Rio de Janeiro, v. 26: (3)139-146. 2006.

Tokarnia, C. H.; Dobereiner, J. & Peixoto, P. V. **Poisonous plants affecting livestock in Brazil**, Rio de Janeiro, 2002.

Yunes, R. A.; Calixto, J. B. **Plantas medicinais sob a ótica da química medicinal moderna: métodos de estudo, fitoterápicos, biotecnologia, patente.** Chapecó: Argos, 523 p. 2001.

ARTIGO 1: A ser submetido à revista Caatinga (Texto redigido conforme exigências de formatação da revista)

ANÁLISE MORFOLÓGICA DAS FOLHAS E CAULES E FITOQUÍMICA DE FOLHAS DE *Tetrapteryx multiglandulosa* CAV. no MATO GROSSO DO SUL¹

Gilberto Gonçalves Facco^{2*}, Eloty Justina Dias Schleider³, Rosemary Matias³, Ricardo Antônio Amaral Lemos⁴, Carlos Eurico dos Santos Fernandes⁵.

RESUMO - O presente estudo teve como objetivo caracterizar a morfoanatomia das folhas e caules e a fitoquímica das folhas de *Tetrapteryx multiglandulosa* Cav., coletados no município de Batayporã no Mato Grosso do Sul em região de fronteira com o estado de São Paulo, responsáveis por surtos de abortamento e morte de bovinos nesta região. Na anatomia dos órgãos vegetativos observou-se a presença de células altas na epiderme adaxial, mesófilo dorsiventral, parênquima paliádico com uma camada de células e estômatos do tipo paracítico, características de espécies da família Malpighiaceae. Os testes fitoquímicos nos extratos aquoso e etanólico a 200g L⁻¹ das folhas novas e velhas indicaram a presença de compostos fenólicos, taninos, flavonoides, saponinas, alcaloide e glicosídeos cardiotônicos. Conclui-se que das classes de metabólitos secundários evidenciadas nas folhas e nos caules novos e velhos as saponinas e os glicosídeos cardiotônicos presentes representam grupos fitotóxicos em potencial e caracterizado pelos sinais clínicos observados nos animais deste surto.

Palavras-chave: Metabólitos secundários, Histoquímica, Índice afrosimétrico.

* Autor para correspondência.

¹Recebido em para publicação em.....; aceito em.....

²Programa de Pós Graduação em Ciência Animal, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FAMEZ), Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS), Av. Senador Filinto Muller 2443, Campo Grande, MS 79074 -460, Brasil. gilberto_facco@uniderp.edu.br

³Programa de Pós-Graduação em Meio Ambiente e Desenvolvimento Regional, Universidade Anhanguera-Uniderp.

⁴Lab. de Patologia Veterinária da FMVZ, UFMS, Campo Grande, MS.

⁵Lab. de Patologia, CCBS/UFMS, Campo Grande-MS.

**MORPHOLOGICAL ANALYSIS OF LEAVES AND STEMS AND
PHYTOCHEMISTRY *Tetrapteryx multiglandulosa* CAV LEAVES. IN MATO GROSSO
SUL**

ABSTRACT - This study aimed to characterize the morphoanatomy the leaves and stems and the leaves of the phytochemical *Tetrapteryx multiglandulosa* Cav, collected Batayporã municipality in Mato Grosso do Sul in the region bordering the state of São Paulo, responsible for outbreaks. abortion and death of cattle in this region. In anatomy of the vegetative organs was observed the presence of high cells on the adaxial epidermis, mesophyll palisade parenchyma with a layer of cells and stomata of paracitic type, characteristics of Malpighiaceae species of the family. Phytochemicals tests in aqueous and ethanol extracts 200g L⁻¹ of new and old leaves indicated the presence of phenolic compounds, tannins, flavonoids, saponins, alkaloid and cardiotonic glycosides. It follows that the classes of secondary metabolites evidenced in leaves and young and old stems saponins and glycosides present carditonic represent potential phytotoxic groups and characterized by clinical sign observed in animals of this outbreak.

Keywords: Secondary metabolites, Histochemistry, Afrosimetric index.

INTRODUÇÃO

A família Malpighiaceae possui aproximadamente 75 gêneros e 1300 espécies distribuídas nas regiões tropicais e subtropicais de ambos os hemisférios. No Brasil há 45 gêneros, com destaque na região Centro-Oeste (SOUZA; LORENZI, 2012). O estudo da família Malpighiaceae é dificultado, principalmente, devido ao grande número de representantes, aos problemas nomenclaturais e as complicações encontradas pelos taxinomistas para distinguir alguns gêneros, utilizando-se unicamente caracteres morfológicos. Estas questões decorrem, principalmente, da variabilidade morfológica exibida pelas plantas e das sinonímias das espécies (GATES, 1982; MAKINO-WATANABE et al., 1993; ANDERSON, 2001).

No Brasil, *Tetrapteryx multiglandulosa* Cav. (Malpighiaceae), nativa da Mata Atlântica (POTT et al., 2006), é conhecida por causar toxicidade em bovinos. É uma planta viçosa, com folhas de coloração verde bem evidente, inflorescência amarela sob a forma de panícula, que quando frutificam adquirem coloração marrom-avermelhada (TOKARNIA et al., 2000). Ocorre principalmente na região de Resende e Rio das Flores, Estado do Rio de Janeiro, e em alguns municípios do Estado de São Paulo, como Guaratinguetá e Lorena, sendo conhecida pelos nomes populares de “cipó-vermelho” e “cipó-ferro” (CARVALHO et al., 2009). Apesar de sua ocorrência predominante na região Sudeste, foram relatados casos de intoxicação no Mato Grosso do Sul (RIET CORREA; MEDEIROS, 2000; CARVALHO et al., 2006). Devido às perdas econômicas geradas a partir da morte de animais acometidos, chegando a inviabilizar a atividade pecuária em algumas propriedades, vários estudos foram realizados, identificando, então, como a causa destes problemas, algumas espécies do gênero *Tetrapteryx* spp.

As intoxicações naturais por *Tetrapteryx multiglandulosa* causam abortos e mortalidade perinatal em bovinos e, experimentalmente também em ovinos e caprinos. Além disso, esta planta causa uma forma nervosa de doença, denominada de letárgica, com espongiose (*status spongiosus*) do sistema nervoso central e cardiomiopatia crônica, sem prévias alterações clínicas ou com manifestação de edemas de declive e morte (TOKARNIA et al., 1989; GAVA; BARROS, 2001; GAVA et al., 2001; MARQUES et al., 2003). Após ingestão da folha, os animais morrem após curso subagudo ou crônico, entretanto, ocasionalmente ocorre morte súbita. Além disso, há histórico de abortamento ou parto de animais débeis, que morreram após o parto (RIET CORREA et al., 2005; RIET CORREA, 2007; CARDINAL, 2009). Há predomínio de casos na época seca, quando há falta de pasto e a planta está em fase de brotação, portanto mais palatável (LAGO, 2007), porém nos casos

acompanhados na região sul capixaba um grande número de animais ingeriu a planta quando esta estava em fase de floração, em plena fase reprodutiva da planta (CARVALHO et al., 2009).

Embora a planta seja reconhecidamente importante do ponto de vista patológico para bovinos e ovinos, poucos estudos sobre os seus aspectos morfoanatômicos e fitoquímicos tem sido conduzidos no Brasil. Contudo, parece evidente que uma classe de metabólitos secundários pode ser responsável pela causa de lesões em fetos e bovinos adultos, ovinos e caprinos, além da morte súbita (CARVALHO et al., 2006). Sendo assim, faz-se necessário um estudo abrangendo análises que possam encontrar uma classe de metabólito secundário que esteja envolvido com a patogenia da intoxicação. Achados bibliográficos referentes a esta planta não citam e nem supõem qualquer tipo de substância suspeita de causar essa toxicidade (AGUILAR-GUADARRAMA et al., 2007), os estudos mostram apenas relatos de mortes de bovinos e ovinos e as alterações clínicas e patológicas da intoxicação (TOKARNIA et al., 2002).

Os objetivos deste estudo foram identificar a morfoanatomia das folhas e caules da *Tetrapteryx multiglandulosa*, seus componentes fitoquímicos, bem como determinar a presença de glicosídeo cardiotônico e saponinas.

MATERIAL E MÉTODOS

O material botânico de *Tetrapteryx multiglandulosa* foi colhido na Fazenda São Pedro, no município de Batayporã – MS, (latitude 27° 31' 71" sul e longitude 74° 55' 99" oeste), no dia 16 de Novembro de 2011 e transportado ao Laboratório de Morfologia Vegetal da Universidade Anhanguera-Uniderp, em Campo Grande – MS. Parte foi conservado em álcool 70% e a parte foi herborizada. Amostras em forma de exsiccatas foram depositadas no Herbário da Instituição, sob número 8022.

Análise Histoquímica

Os estudos morfoanatômicos das folhas e caules em material fixado foram realizados com cortes à mão livre, com auxílio de lâmina de tricotomia. Para a análise anatômica, os cortes foram clarificados em hipoclorito de sódio 20% (KRAUS; ARDUIN, 1997) e corados com Safranina e Azul de Astra 1% (KRAUS; ARDUIN, 1997) e montados em glicerina 50%, seguido da análise ao microscópio de luz.

Os testes histoquímicos foram realizados com aplicação de corantes e reagentes como segue: Lugol para identificar amido (ROTH, 1964); cloreto férrico para identificação de

compostos fenólicos e taninos (JOHANSEN, 1940); Sudan III para identificar material lipídico (JENSEN, 1962); azul de metileno para identificação de mucilagem (JOHANSEN, 1940); e Fehling para determinar a presença de açúcares redutores (PURVIS et al., 1962 In: KRAUS; ARDUIN, 1997). As amostras foram analisadas e fotodocumentadas em microscopia de campo claro (Olympus CH30 acoplado a câmara fotográfica Olympus PM-BP35).

Análise Fitoquímica das Folhas e caules

As folhas e caules de *T. multiglandulosa*, foram limpas, secas em estufa circuladora de ar a 40°C, trituradas e armazenadas em frascos hermeticamente vedados para posterior análise.

Para a abordagem fitoquímica foram preparados 100 mL de extrato etanólico e aquoso a 200g L⁻¹ (20 g da planta para 100 mL de solvente), deixando por 60 minutos em banho de ultrassom (Ultrasonic Cleaner[®]) seguido de maceração por 24 horas. Este procedimento foi repetido por dois dias consecutivos. Em seguida, os extratos aquosos e etanólicos, foram submetidos aos ensaios fitoquímicos para: compostos fenólicos, taninos, flavonoides, cumarinas livres, antocianinas, antraquinonas, glicosídeos cianogênicos, saponinas, esteróides e triterpenos, alcaloides e glicosídeos cardiotônicos, seguindo metodologia adaptada de Matos (2009).

Índice Afrosimétrico: Para estimar a quantidade de saponinas presentes no extrato aquoso utilizou-se o teste do índice de espuma (Índice afrosimétrico) adaptado conforme metodologia descrita por Michelin (2004). O índice de espuma é a determinação da maior diluição em que 1 g do extrato bruto aquoso será capaz de formar 1 cm de espuma (SIMÕES et al., 2004; MATOS, 2009).

Reações de caracterização de glicosídeos cardiotônicos: para avaliar a presença dos glicosídeos cardiotônicos foi empregada a reação com anel lactônico insaturado utilizando a Reação de Baljet, e a confirmação da presença de glicosídeos cardiotônicos exige necessariamente a comprovação da existência de núcleo esteroidal, lactona insaturada em C-17 e desóxi-açúcares, no qual se incluem as reações de Keller-Killiani e Liebermann-Burchard (SIMÕES et al., 2004). A reação de Keller-Kiliani é considerada como um ensaio particular dos desóxi-açúcares e dos heterosídeos facilmente hidrolisáveis (SIMÕES et al., 2004).

Para confirmar a presença do glicosídeo cardiotônico foi realizada análise em CCD (cromatografia em camada delgada) utilizando-se a digoxina solubilizada em clorofórmio como padrão (Laboratório Teuto[®]) solubilizada em clorofórmio. A solução foi aplicada em placas de sílica gel e eluídas com Hexano: Acetato de etila (3,5: 0,5 mL) e reveladas com ácido oxálico:ácido bórico:metanol seguidas de aquecimento por 2 minutos, em sequência as cromatoplasmas foram aspergidas com vanilina sulfúrica/ácido clorídrico (HCl) 10% e aquecidas. Após a revelação calculou-se o R_f (fator de retenção) da digoxina padrão e das amostras.

Determinação de fenóis totais: O teor de fenóis totais (FT) foi determinado pelo Método Folin-Ciocalteu's utilizando 100 mg do extrato bruto etanólico e aquoso de cada amostra. As absorbâncias foram medidas em espectrofotômetro na região de 750 nm, em cubetas de quartzo. A análise foi executada por interpolação da absorbância das amostras contra uma curva de calibração ($y = 0,0021x + 0,6691$; $R^2 = 0,9978$), construída com padrões de ácido gálico (EAG 10 a 300 $\mu\text{g mL}^{-1}$) (SOUSA et al., 2007).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A análise morfoanatômica do caule em corte transversal apresentou secção circular, epiderme uniestratificada, com cutícula espessa e tricomas malpighiáceos, felogênio em diferenciação. O córtex apresentou colênquima angular, parênquima com canais exógenos, cristais de oxalato de cálcio em forma de drusas e prismáticos, fibras sobre a região do floema, cilindro vascular contínuo e colateral. Internamente ao sistema vascular observa-se a medula formada por tecido parenquimático, que em alguns pontos, durante o crescimento, foi absorvida (Figuras 1a e b).

A lâmina foliar, em vista transversal, apresentou epiderme uniestratificada com glândulas, cutícula espessa, tricomas na superfície abaxial, mesófilo dorsiventral, com uma a duas camadas de parênquima paliçádico e três a quatro estratos de parênquima lacunoso, drusas e cristais prismáticos (Fig. 1e). Foi evidenciada nervura mediana plano-convexa formada por feixes colaterais em forma de arco aberto, envoltos por uma bainha de esclerênquima (Fig. 1c e d). Em vista frontal, as folhas apresentaram estômatos paracítico na superfície abaxial, células epidérmicas com contorno irregular e forma variada (Fig. 1f). As características das estruturas observadas estão de acordo com Mamede (1993) e Araújo (2008) que encontraram células altas na epiderme adaxial, mesófilo dorsiventral, parênquima paliçádico com uma camada de células e estômatos do tipo paracítico para espécies da família Malpighiaceae.

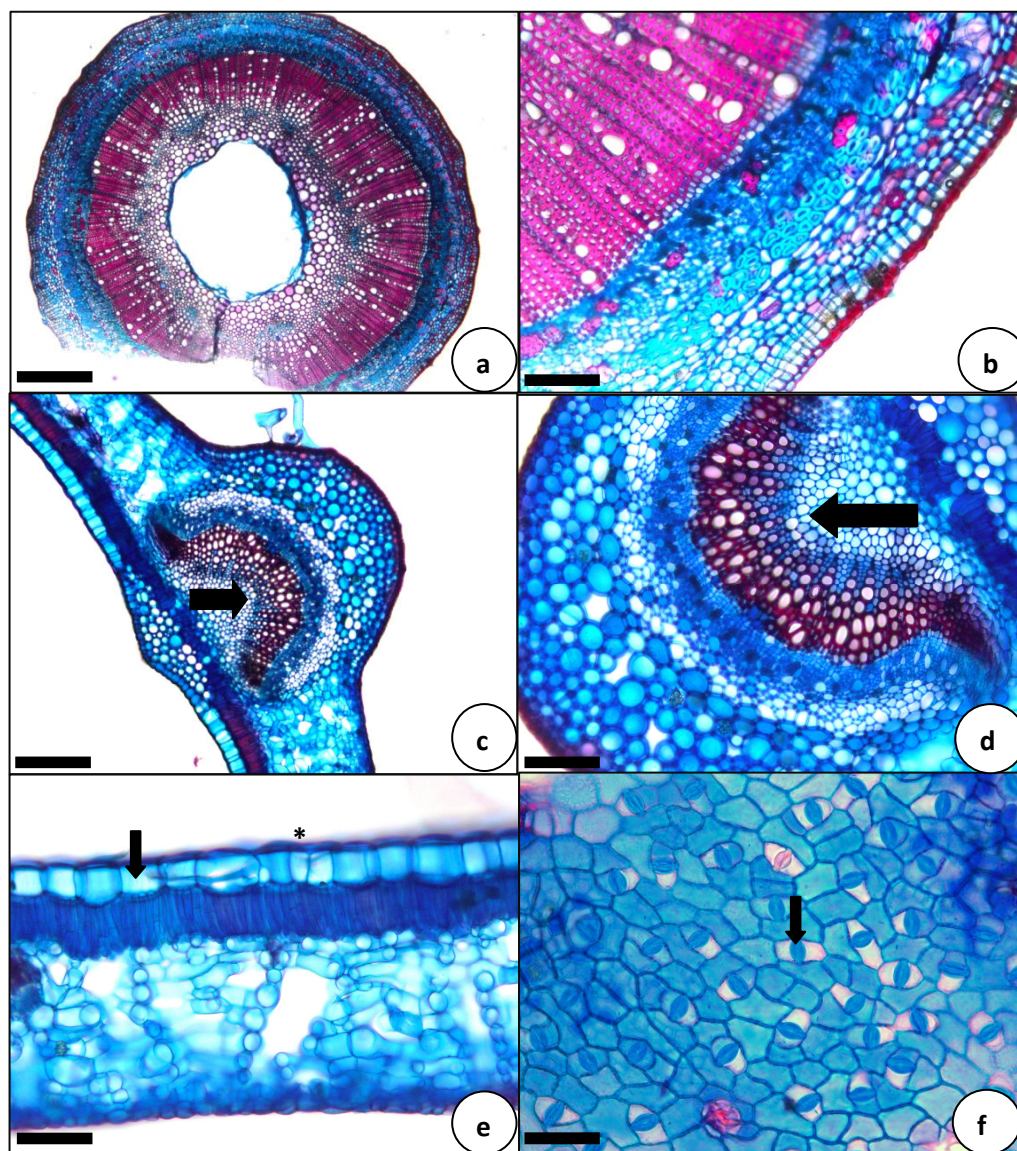


Figura 1. Fotomicrografia de *Tetraapterys multiglandulosa* em corte transversal do caule. Secção circular, epiderme uniestratificada, com cutícula espessa e tricomas malpighiáceos, felogênio em diferenciação (a e b). Nervura mediana plano-convexa formada por feixes colaterais em forma de arco aberto (seta), envoltos por uma bainha de esclerênquima em vista transversal de lâmina foliar (c e d). A lâmina foliar (e e f), em vista transversal apresenta epiderme uniestratificada (seta) e cutícula espessa (asterisco) (e). Em vista frontal as folhas apresentam estômatos paracítico (seta) na superfície abaxial, células epidérmicas com contorno irregular e forma variada (f). Barras – 200 μ m (a,c); 50 μ m (b, d, e, f).

Os resultados dos testes histoquímicos realizados nos órgãos estudados estão organizados na Tabela 1.

Tabela 1 – Resultados dos testes histoquímicos realizados em folhas e caules de *Tetrapteryx multiglandulosa* coletadas no Mato Grosso do Sul

Teste histoquímico	Caule	Folha
Compostos Fenólicos	+	+
Amido	+	+
Açúcares redutores	+	+
Mucilagens	+	+
Compostos lipídicos	+	+

(+): Resultado positivo; presença da substância; (-): Resultado negativo; ausência da substância.

Os testes histoquímicos, em caule de *T. multiglandulosa*, evidenciaram compostos fenólicos, especialmente no córtex e região dos vasos condutores; amido disperso no parênquima cortical, formando uma bainha amilífera envolvendo os vasos (Fig. 2a); açúcares redutores tanto na região cortical como nos vasos e medula; mucilagem no parênquima cortical (Fig. 2e); e substâncias lipídicas na cutícula e dispersas no córtex (Fig. 2c).

Nas folhas, os testes histoquímicos evidenciaram compostos fenólicos na região do floema e no mesófilo foliar (Fig. 2b); amido disperso no mesófilo foliar, especialmente no parênquima paliçádico; açúcares redutores amplamente distribuídos em todos os tecidos e glândulas foliares (Fig. 2d); mucilagem próximo ao floema, nas nervuras central e secundárias; substâncias lipídicas na cutícula e nas glândulas foliares. Resultados semelhantes foram encontrados por Santana et al. (2013), que detectaram em análises da folha de *Byrsonima coccolobifolia*, a presença de lipídeos e compostos fenólicos nas células do mesófilo foliar.

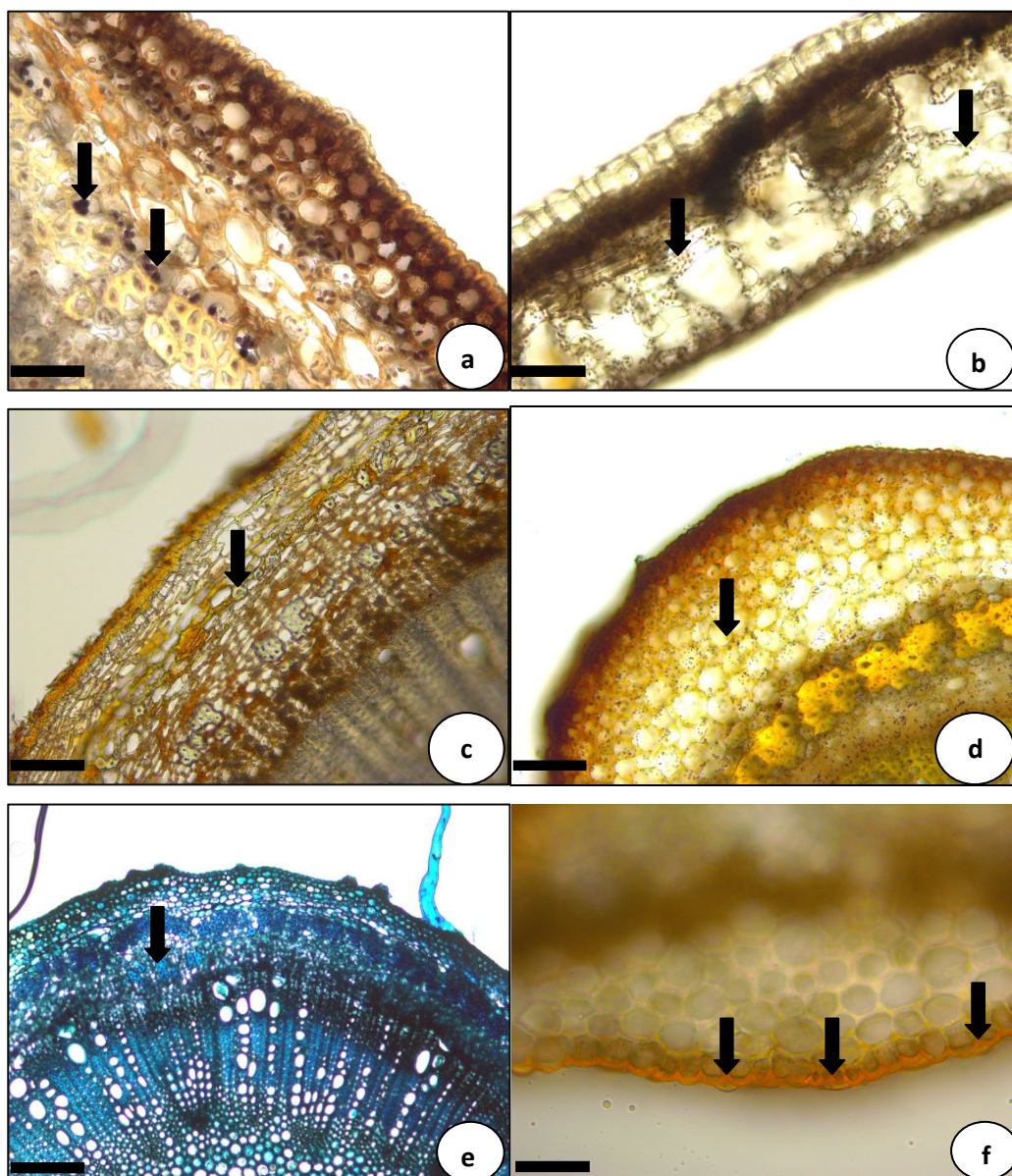


Figura 2. Fotomicrografia dos testes histoquímicos de corte transversal do caule e da lâmina foliar de *Tetrapteryx multiglandulosa*: Amido - Lugol (setas) disperso no parênquima cortical, formando uma bainha amilífera envolvendo os vasos (a). Compostos fenólicos – Cloreto férrico (seta) na região do floema e no mesófilo foliar (b). Substâncias lipídicas – Sudam III, na cutícula e dispersas no córtex do caule (setas), na cutícula e glândulas foliares, na folha (c). Açúcares redutores – Fehling - amplamente distribuídos em todos os tecidos e glândulas foliares (d). Mucilagem – Azul de metileno - no parênquima cortical do caule (seta) (e). Glândula – Sudam III, na borda da folha (seta) (f). Barra – 50 µm (a, b, c, d, e, f).

Os metabólitos secundários são substâncias de defesa das plantas, sendo expressos de forma qualitativa e quantitativamente, diferentes de órgão para órgão e de espécie para espécie (TAIZ; ZEIGER, 2004). Seus níveis são determinados por influência ambiental e controle genético (CASTRO et al., 2009).

Os compostos fenólicos são metabólitos secundários quimicamente heterogêneos, incluem uma grande diversidade de compostos, como os flavonoides, os taninos, e os ácidos

benzoicos e cinâmicos. Os idioblastos e as células epiteliais que delimitam cavidades são estruturas de secreção destas substâncias, que estão presentes em quase todos os vegetais predominam nos vacúolos, no citoplasma ou impregnados à parede celular. Segundo Pfluger e Zambryski (2001) os compostos fenólicos podem funcionar como uma barreira simplástica, a qual impulsiona uma mudança morfológica, favorecendo o surgimento dos embriões somáticos da planta. Em órgãos completamente diferenciados a presença dos compostos fenólicos está relacionada com os mecanismos de defesa da planta, como proteção contra a herbivoria, ataque de patógenos e microrganismos, dessecação, entre outros (APEZZATO-DA-GLÓRIA; CARMELLO-GUERREIRO, 2006).

Não foram encontrados trabalhos que citam a toxicidade de plantas pela presença de compostos fenólicos, normalmente os fenóis comuns nas plantas não são considerados tóxicos, com exceção dos fenóis poliméricos denominados de taninos, que possuem capacidade de complexar proteínas em soluções aquosas (SIMOES et al., 2004). Tokarnia et al. (2000), observaram a presença destes compostos em lesões por intoxicação natural em bovinos por *Mascagnia pubiflora* e *Thilola glaucocarpa*. Entretanto com a sintomatologia diferente observada nas toxicoses causadas por *T. multiglandulosa* sinais que normalmente ocorrem repentinamente acarretando a morte dentro de poucos dias (HENRIQUES, 2014). Este quadro clínico não foi relatado para animais intoxicados com *T. multiglandulosa* (GAVA et al., 2001).

Os taninos são substâncias polifenólicas que apresentam atividade antioxidante decorrente da inativação de radicais livres. A síntese dos taninos está relacionada aos processos de crescimento e diferenciação celular e a degradação destas substâncias favorece a divisão celular evitando a oxidação do material vegetal. São biossintetizados diretamente do metabolismo do carbono e armazenados nos vacúolos das plantas (CASTRO et al., 2009).

O amido é um polissacarídeo e principal açúcar de reserva dos vegetais, em células embriogênicas é utilizado para fornecer energia para a atividade mitótica e, posteriormente para o desenvolvimento dos embriões (NOGUEIRA et al., 2008). Segundo Torres (2013), células com grão de amido indicam alta atividade metabólica energética, sendo utilizados para iniciar e manter o desenvolvimento, sendo também viável para aquisição de competência embriogênica.

Os resultados obtidos com o estudo fitoquímico do extrato aquoso e etanólico das folhas (novas e adultas) de *T. multiglandulosa* estão apresentados no Quadro 1 e confirmam a histoquímica realizada.

Quadro 1: Resultados obtidos com o estudo fitoquímico do extrato aquoso e etanólico das folhas (novas e adultas) de *T. multiglandulosa* coletadas no Mato Grosso do Sul

Metabólitos Secundários	Extrato aquoso de <i>T. multiglandulosa</i> (200g L ⁻¹)		Extrato etanólico de <i>T. multiglandulosa</i> (200g L ⁻¹)	
	Folhas novas	Folhas adultas	Folhas novas	Folhas adultas
Compostos fenólicos	+++	+++	+++	+++
Taninos	+	+	+++	+++
Flavonóides	+/-	+/-	+++	+++
Antocianinas	++	++	-	-
Antraquinonas livres	+	+	-	-
Cumarinas	+	+	-	-
Esteróides	-	-	+	+
Triterpenos	-	-	-	-
Saponinas	+	+	-	-
Glic. Cianogênicos	-	-	-	-
Glic. Cardiotônicos**	++	+	++	+
Alcalóides	+	+	+	+
FT (mg de equivalentes de ácido gálico/g)	77,6 ± 0,04	74,5 ± 0,03	87,8 ± 0,04	80,1 ± 0,03

*Análise não efetuada com o extrato aquoso. **Análise efetuada apenas com o extrato seco para determinação do índice de saponificação. Testes: + (menor intensidade) ++ (média intensidade) +++ (maior intensidade) (-) Negativo; FT= fenóis totais.

A presença dos metabólitos secundários varia em quantidade e qualidade e pode estar na dependência de fatores bióticos e abióticos como idade do órgão da planta, temperatura, intensidade luminosa, disponibilidade de nutrientes, atividade microbiana da rizosfera e composição dos solos em que se encontram as raízes, entre outros (FERREIRA; ÁQUILA, 2000). Em relação aos fatores fisiológicos como: fotossíntese, comportamento estomatal, mobilização de reservas, expansão foliar e crescimento, estes são alterados por situações de estresse ambiental, levando a modificações na rota biossintética do vegetal. Essas alterações no metabolismo secundário induzem à produção de substâncias de defesa como respostas às mudanças de seu habitat (SALISBURY; ROSS, 1991). Com base nestas informações e nos dados obtidos neste estudo, as estruturas encontrados nas folhas e caules de *T.*

multiglandulosa e a presença de saponinas e glicosídeos cardiotônicos (Quadro 1) sugerem adaptações fisiológicas e anatômicas como estratégia de sobrevivência dessa planta as condições ambientais da região sulmatogrossense e conseqüentemente pode-se relacionar com os casos de intoxicação de animais na região.

Neste trabalho qualitativamente não houve diferença nos tipos de metabólitos secundários detectados nos extratos aquosos e etanólicos das folhas novas em relação às folhas adultas. Quantitativamente, as folhas novas apresentaram teores mais elevados de compostos fenólicos para o extrato aquoso e etanólico em relação às folhas adultas (Quadro 1).

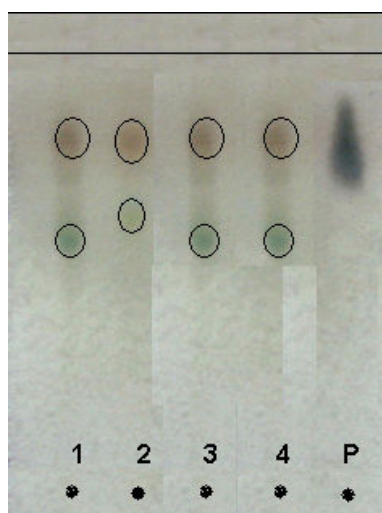


Figura 3: Cromatografia de camada delgada (CCD) de extratos aquosos das folhas novas (1) e velhas (2) e etanólicos das folhas novas (3) e velhas (4) de *T. multiglandulosa* e do padrão Digoxina (P).

A análise de CCD (Figura 1) dos extratos aquosos e etanólicos das folhas novas e adultas apresentaram, em comparação com o padrão Digoxina (R_f : 0,81) a mesma substância com R_f próximos o que indica que uma das saponinas presentes trata-se da digoxina, a classe de saponinas não havia sido ainda relatada para esta espécie. No trabalho de Melo et al. (1999) a análise fitoquímica das folhas (brotos e maduras) frescas, foram detectados os heterosídeos antrasênicos, saponínicos, flavônicos, taninos (hidrolisáveis e condensados), alcalóides (terciários e quaternários), esteroides, cumarinas e especificamente os glicosídeos cardiotônicos, sem relatar a da classe de cardiotônicos.

O valor determinado para o Índice Afrosimétrico não seguiu o mesmo padrão dos compostos fenólicos. As folhas adultas apresentaram maior índice ($I = 1428,6$) do que as folhas novas ($I = 1111,1$). Não foi encontrado um valor padrão para o índice de saponificação

relacionado com atividade antimicrobiana e especificamente para fungos, porém estes valores são considerados acima dos padrões descritos pela ANVISA (BRASIL, 2009), que aponta que para humanos, em drogas vegetais utilizadas como chá, o índice de espuma deve ser abaixo de 100. Os resultados indicam, portanto, que esta planta independente da idade da folha pode ser tóxica para o homem, herbívoros e insetos (MARQUI et al., 2008).

A família Malpighiaceae é comumente relacionada com terpenoides e óleos essenciais, alcaloides, substâncias fenólicas, polifenóis e quinonas, flavonoides, flavonóis e flavonas, cumarinas e taninos (SOUZA; LORENZI, 2012). Especificamente, para as folhas de *T. multiglandulosa* Melo et al. (2001) apontam a presença de flavonoides, taninos condensados, alcaloides quaternários e esteroides. No presente estudo também se comprovou a presença destes compostos secundários.

Rodriguez et al. (2008) em seus estudos detectaram no extrato aquoso de folhas e caules de *T. styloptera* os monoterpenoides, alcaloides e saponinas e no extrato etanólico dessas partes aéreas foram encontrados triterpenos, monoterpenoides e alcaloides. E na espécie *T. mucronata*, foram relatados os monoterpenoides e alcaloides. Estes metabólitos estão de acordo com os achados no estudo, revelando que pode ser recorrente)característica) na família.

Coelho e Spiller (2008) e Carlini et al. (2002) confirmaram a presença de glicosídeos cardiotônicos em outra espécie de Malpighiaceae *Heteropterys aphrodisiaca*. Nascimento e Habermehl (1995) isolaram das folhas um glicosídeo de *Mascagnia* (*M. publiflora*), quimicamente positivos para açúcares desoxi e para núcleo esteroidal. Em uma triagem fitoquímica preliminar, Melo e Dantas-Barros (1999), também conseguiram isolar glicosídeos cardiotônicos de *Tetrapteryx multiglandulosa* de folhas jovens e maduras. A presença de glicosídeos cardiotônicos em outras pesquisas com outros gêneros de Malpighiaceae reforçam os nossos achados, identificando que este composto metabólico causa é importante se não o principal composto relacionado à lesão cardíaca nos animais (CARVALHO et al., 2006).

CONCLUSÕES

As análises morfoanatômicas das folhas e caules *T. multiglandulosa* reforçam as características desta planta, tais como a presença de tricomas e cristais de oxalato, bem como glândulas na borda das folhas. Os testes histoquímicos evidenciam a presença de compostos fenólicos, amido, açúcares redutores, mucilagem e compostos lipídicos.

As folhas de *T. multiglandulosa* obtidas em Mato Grosso do Sul, em local com histórico de surtos de mortalidade e abortos em bovinos, apresentam glicosídeos cardiotônicos nos seus compostos secundários.

AGRADECIMENTOS: Ao Laboratório de Pesquisa em Produtos Naturais da Universidade Anhanguera/Uniderp, pela realização das análises morfoanatômicas, histoquímicas e fitoquímicas destes experimentos.

REFERÊNCIAS

ANDERSON, C. The identity of two water-dispersed species of *Heteropterys* (Malpighiaceae): *H. leona* and *H. platyptera*. **Contributions from the University of Michigan Herbarium**, Michigan, v. 23: 35-47, 2001.

AGUILAR-GUADARRAMA, A. B.; RÍOS, M.Y. Terpenos y flavonóides glicosídicos de *Tetrapteryx heterophylla* (Griseb.) W.R. Anderson (Malpighiaceae). **Revista Cubana de Plantas Medicinales**, Havana, v.12: (3), 2007.

APPEZZATO-DA-GLÓRIA, B.; CARMELLO-GUERREIRO, S. M. **Anatomia Vegetal**; Viçosa – Editora UFV, 438p. 2006.

ARAÚJO, J. S.; Anatomia foliar de 16 espécies de Malpighiaceae ocorrentes no cerrado (MG). Dissertação de Mestrado em Botânica. **Universidade Federal de Viçosa**. Minas Gerais. Brasil. 2008.

BORELLA, J. C.; CARVALHO, D. M. A. Avaliação comparativa da qualidade de extratos de *Calendula officinalis* L. (Asteraceae) comercializados em farmácias de manipulação em Ribeirão Preto - SP. **Revista Brasileira de Farmácia**, Rio de Janeiro, v.92, n.1, p.13-18, 2011.

BRASIL, 2009. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução RDC no. 38**, de 22 de Junho de 2009. **Determina a atualização e revisão periódica da Farmacopéia Brasileira**. DOU. Poder Executivo, Brasília, DF, 22 jun. 2009.

- 450 CARDINAL, S. G. **Lesões perinatais em ovinos causadas pela ingestão de *Tetrapteryx***
 451 ***multiglandulosa* (Malpighiaceae) em diferentes dias de gestação.** Dissertação de mestrado.
 452 UFMS. 2009.
- 453
- 454 CARLINI, E. A.; GALVÃO, S. M. P.; MARQUES, L. C.; OLIVEIRA, M. G. M.
 455 *Heteropteryx aphrodisiaca* (extract BST0298): a Brazilian plant that improves memory in
 456 aged rats. **J. Ethnopharmacol**, Ireland 79:305–311. 2002.
- 457
- 458 CARVALHO, G. D.; NUNES, L. C.; BRAGANÇA, H. B. N.; PORFÍRIO, L. C. Principais
 459 plantas tóxicas causadoras de morte súbita em bovinos no Estado do Espírito Santo – **Brasil.**
 460 **Arch. Zootec.**, Córdoba, 58:87-98. 2009.
- 461
- 462 CARVALHO, M. N.; ALONSO, L. A.; CUNHA, T. G.; RAVEDUTTI, J.; BARROS, C. S. L. &
 463 LEMOS, R. A. A. Intoxicação de bovinos por *Tetrapteryx multiglandulosa* (Malpighiaceae) em Mato
 464 Grosso do Sul. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro 26: (3)139-146. 2006.
- 465
- 466 CASTRO, E. et al. Calogênese e teores de fenóis e taninos totais em barbatimão
 467 (*Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville). **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 33, n.
 468 2, p. 385-390, mar./abr., 2009.
- 469
- 470 COELHO, M. F. B.; SPILLER, C. Fenologia de *Heteropteryx aphrodisiaca* O. Mach. –
 471 Malpighiaceae, em Mato Grosso. **Rev. Bras. Pl. Med.**, Botucatu, v.10, n.1, p.1-7, 2008.
- 472 FERREIRA, A. G.; ÁQUILA, M. E. A. Alelopatia: uma área emergente da ecofisiologia.
 473 **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, Campinas, v. 12, n. especial, p. 175-204, 2000.
- 474 GATES, B. Banisteriopsis, *Diplopteryx* (Malpighiaceae). **Flora Neotropica**, New York, 30:1-
 475 237, 1982.
- 476
- 477 GAVA A.; BARROS C. S. L. Field observations of *Ateleia glazioviana* poisoning in cattle in
 478 southern Brazil. **Vet. Human Toxicol**, São Paulo, v. 43:37-41. 2001.
- 479

- 480 GAVA A.; BARROS C.S.L.; PILATI C.; BARROS S.S. & MORI A. M. Intoxicação por
 481 *Ateleia glazioviana* (Leg. Papilionoideae) em bovinos. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. Rio
 482 de Janeiro, 21:49-59. 2001.
- 483
- 484 GOBBO-NETO, L.; LOPES, N. P. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de
 485 metabólitos secundários. **Química Nova**, São Paulo, vol. 30, No. 2, 374-381, 2007.
- 486
- 487 HENRIQUES, J. M. G. C. L. **Taxa de sucesso de tratamento em intoxicação por taninos**
 488 **em ruminantes**. 2014. 66f. Mestrado Integrado em Medicina Veterinária, Faculdade de
 489 Medicina Veterinária. Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias. Lisboa, 2014.
- 490
- 491 JENSEN, W. A. **Botanical histochemistry**. H. H. Friman & Co. San Francisco 1962.
- 492
- 493 JOHANSEN, D. A. **Plant Microtechnique**. Mc Graw Hill Book, New York. 1940.
- 494
- 495 KRAUS, J. E., ARDUIN, M. **Manual básico de métodos em morfologia vegetal**. Edur,
 496 Seropédica, Brasil, 198p. 1997.
- 497
- 498 LAGO, E. P. do. **Intoxicação experimental em ovinos por *M. rigida* (A. Juss.) Griseb.**
 499 **(Malpighiaceae): Estudos fitoquímico, fitoanatômico e aspectos clínicos, laboratoriais e**
 500 **ecocardiográficos**. Belo Horizonte, UFMG. 65p. 2007.
- 501
- 502 MAMEDE, M. C. H. Anatomia dos órgãos vegetativos de *Camarea* (Malpighiaceae). **Acta**
 503 **Botânica Brasilica**, Belo Horizonte, v.7: 3-19, 1993
- 504
- 505 MARQUES, A.P.; RIET-CORREA, M.; SOARES, M. P.; ORTOLANI, E. L. &
 506 GIULIODORI, M. J. Mortes súbitas em bovinos associadas à carência de cobre. **Pesquisa**
 507 **Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 23(1):21-32. 2003.
- 508
- 509 MAKINO-WATANABE, H., MELHEM, T., BARTH, O. M. Morfologia dos grãos de pólen
 510 de espécies de *Banisteriopsis* C. B. Robinson ex small (Malpighiaceae). **Revista Brasileira**
 511 **de Botânica**, São Paulo, v.16:47-67, 1993.
- 512

- 513 MARQUI, S. R.; LEMOS, R. B.; SANTOS, L. A.; CASTRO-GAMBOA, I.; CAVALHEIRO,
514 A. J.; BOLZANI, V. S.; SILVA, D. H. S. Saponinas antifúngicas de *Swartzia langsdorffii*.
515 **Química Nova**, São Paulo, v. 31, nº 4, p. 828-831, 2008.
- 516
- 517 MATOS, J. F. A. Introdução a Fitoquímica Experimental. 2 ed. Fortaleza: UFC. p. 141, 2009.
- 518
- 519 MELO, M. M.; DANTAS-BARROS, A. M. Triagem fitoquímica preliminar de *Tetrapteryx*
520 *multiglandulosa* A. Juss. (Malpighiaceae). **Revista Brasileira de Toxicologia**, São Paulo
521 12(2): 55-62, dez. 1999.
- 522
- 523 MELO M. M.; VASCONCELOS A. C.; DANTAS G. C.; SERAKIDES R.; ALZAMORA
524 FILHO F. Experimental intoxication of pregnant goats with *Tetrapteryx multiglandulosa* A.
525 Juss. (Malpighiaceae). **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.** Belo Horizonte, v.53:58-65. 2001.
- 526
- 527 MICHELIN, D. C. Análise fitoquímica e ensaios biológicos da raiz de *Operculina*
528 *macrocarpa* (L.) urb. (convolvulaceae). Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) -
529 Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas. **Universidade Estadual Paulista**
530 **“Júlio de Mesquita Filho”** Araraquara, São Paulo, 2004.
- 531
- 532 NASCIMENTO, M. S.; HABERMEHL, G. G. Two naphtho-pyrone glycosides
533 from *Mascagnia rigida*. **Fitoterapia**, v.46, p.539-542, 1995.
- 534
- 535 NOGUEIRA, R. C. et al. Curva de crescimento e análises bioquímicas de calos de Murici-
536 pequeno (*Byrsonima intermédia* A. Juss.). **Revista de Plantas Medicinais**, Botucatu, v.10,
537 n.1, p.44-48, 2008.
- 538
- 539 PFLUGER, J.; ZAMBRYSKI, P. C. Cell growth: the Power of symplastic isolation. **Current**
540 **Biology**, 11: R436-439, 2001.
- 541
- 542 POTT, A.; POTT, V. J.; SOUZA, T. W. Plantas daninhas de pastagem na região dos
543 Cerrados. Campo Grande: **Embrapa Gado de Corte**. 336p. 2006.
- 544
- 545 RIET-CORREA, F. Plantas tóxicas e micotoxinas que afetam a reprodução em ruminantes e
546 equinos no Brasil. **Biológico**, São Paulo. 69:(2)63-68. 2007.

- 547
548 RIET-CORREA, G; TERRA, F. F.; SCHILD, A. L.; RIET-CORREA, F. & BARROS, S. S.
549 Intoxicação experimental por *Tetrapteryx multiglandulosa* (Malpighiaceae) em ovinos.
550 **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 25(2):91-96, 2005.
551
552 RIET-CORREA, F.; MEDEIROS, R. M. T. Intoxicações por plantas em ruminantes no Brasil
553 e no Uruguai: importância econômica, controle e riscos para a saúde pública. **Pesquisa**
554 **Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, 21:(1)38-42. 2000.
555
556 RODRÍGUEZ, M.; HASEGAWA, M.; GONZÁLEZ-MÚJICA, F.; MOTTA, N.; CASTILLO
557 A.; CASTILLO, J.; MORA, E. Z.; KIBY, L. S.; GONZÁLEZ, A.; CAMEJO, D. Antidiabetic
558 and antiradical activities of plants from Venezuelan Amazon. **Ver. bras. farmacogn.** vol 18,
559 n. 3, 2008.
560
561 ROTH, I. **Microtecnica Vegetal**. Universidade Central da Venezuela, Caracas, 1964.
562
563 SALISBURY, F.B. & ROSS, C.W. **Plant Physiology**. Belmont: Wadsworth, 682p, 1991.
564
565 SANTANA, M. M.; SILVA, K. L. F.; SILVA, D. S. DA; CHAGAS, D. B. DAS. Anatomia e
566 histoquímica de folhas e elaióforos de *Byrsonima coccolobifolia* (malpighiaceae). **64º**
567 **Congresso Nacional de Botânica**, Belo Horizonte, 2013.
568
569 SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMAN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.;
570 PETROVICK. **Farmacognosia da Planta ao medicamento**. 5ª ed. 2004.
571
572 SOUSA, C. M. M. S.; SILVA, H. R.; VEIERA-JR, G. M.; AYRES, M. C. C.;
573 CHARLLYTON, L. S. C.; DELTON, S. A.; CAVALCANTE, L. C. D.; BARROS, E. D. S.;
574 ARAUJO, P. B. M.; BRANDRÃO, M. S.; CHAVES, M. H. Fenóis totais e atividade
575 antioxidante de cinco plantas medicinais. **Química Nova**, São Paulo, v. 30, n. 2, p. 351-355,
576 2007.
577

- 578 SOUZA, V. C.; LORENZI, H. Botânica Sistemática: guia ilustrado para identificação das
579 famílias de Fanerógamas nativas e exóticas no Brasil, baseado em APG III. 3ª ed. Nova
580 Odessa – SP: **Instituto Plantarum**, 2012.
- 581
- 582 TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. Porto Alegre, RS: Artmed, 719 p. 2004.
- 583
- 584 TORRES; L. F. Avaliação do potencial embriogênico de suspensões celulares de *Coffea*
585 *arábica*. 2013. 111f. Dissertação em Biotecnologia vegetal, área de concentração em Biologia
586 Molecular – **Universidade Federal de Lavras**, 2013.
- 587
- 588 TOKARNIA, C. H.; DOBEREINER, J. & PEIXOTO, P. V. **Poisonous plants affecting**
589 **livestock in Brazil**. Rio de Janeiro, 2002.
- 590
- 591 TOKARNIA, C. H.; DOBEREINER, J. & PEIXOTO, P. V. **Plantas tóxicas do Brasil**.
592 Helianthus, Rio de Janeiro. 320p. 2000.
- 593
- 594 TOKARNIA C. H., PEIXOTO P. V., DÖBEREINER J., CONSORTE L. B., GAVA A.
595 *Tetrapteryx* spp (Malpighiaceae), a causa de mortandades em bovinos caracterizadas por
596 alterações cardíacas. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. Rio de Janeiro, 9:23-44. 1989.
- 597

ARTIGO 2: A ser submetido à revista Toxicon (Texto redigido conforme exigências de formatação da revista)

INTOXICAÇÃO EXPERIMENTAL DE EXTRATO AQUOSO DAS FOLHAS NOVAS E ADULTAS DE *Tetrapteryx multiglandulosa* CAV. (MALPIGHIACEAE) EM COELHAS DA RAÇA NOVA ZELÂNDIA

Gilberto Gonçalves Facco^a, Jéssica de A. Isaias Muller^b, Rosemary Matias^c, Marcos Barbosa-Ferreira^c, Newton M. Carvalho^d, Ricardo Antônio Amaral de Lemos^d, Carlos Eurico dos Santos Fernandes^e.

^aAluno de Pós Graduação (Doutorado) FAMEZ-UFMS (Universidade Federal de Mato Grosso do Sul), Campo Grande, Brasil.

^bMestranda do Programa de Pós-Graduação em Doenças Infecciosas e Parasitárias da UFMS.

^cGrupo de Pesquisa em Produtos Naturais da Universidade Anhanguera/Uniderp, Campo Grande, Brasil.

^dLab. de Patologia Veterinária da FAMEZ, UFMS, Campo Grande, MS.

^eLab. de Patologia, CCBS/UFMS, Campo Grande-MS.

1. RESUMO

O presente trabalho teve como objetivo caracterizar a intoxicação produzida por *T. multiglandulosa* em coelhas. Foram utilizados extratos aquosos a 200g L⁻¹ de folhas jovens e folhas adultas, administrados respectivamente por gavagem a cinco coelhas jovens da raça Nova Zelândia, pesando entre 1,9 a 2,0 kg (G1) e seis coelhas jovens com as mesmas características (G2). Após a gavagem, coletaram-se, de cada coelha, amostras sanguíneas, após 24 horas, sete e 14 dias do experimento, para avaliação da bioquímica sérica sanguínea. Ao final deste período, todos os animais foram eutanasiados e necropsiados quando se coletaram fragmentos de órgãos para exame histopatológico. Uma coelha do grupo G1 morreu 24 horas após a gavagem, apresentando atividades de CK e CK-MB elevados comparando com dados de referência. O mesmo foi observado em todos os animais dos dois grupos. Macroscopicamente observaram-se congestão, ascite e hepatomegalia. Os achados microscópicos estavam restritos ao fígado, apresentando áreas de degeneração hidrópica, precipitação proteica e congestão e, no coração separação das fibras miocárdicas e pontos de calcificação distrófica. Estes achados corroboram os estudos de outros pesquisadores que estudaram a intoxicação por *Tetrapteryx* spp. e são compatíveis com plantas que contêm glicosídeos cardiotônicos. A planta utilizada revelou conter digoxina como um dos metabólitos secundários compatíveis com as lesões cardíacas observadas.

Palavras chave: Cardiomiopatia; histopatologia; intoxicações por digitálicos; plantas tóxicas.

ABSTRACT: This study aimed to characterize the intoxication produced by *T. multiglandulosa* (Malpighiaceae) in rabbits. Aqueous extracts 200g L⁻¹ of young leaves and mature leaves, respectively, were administered by gavage to five New Zealand breed young rabbits, weighing from 1.9 to 2.0 kg (G1) and six young rabbits with the same characteristics were used (G2). After gavage, each rabbit had blood samples collected after 24 hours, seven and 14 days for evaluation of blood serum biochemistry. At the end, all animals were euthanized and necropsied having the fragments of the organs collected for histopathological examination. One rabbit from G1 died 24 hours after gavage, with elevated AST and CK activities compared with reference data. The same was observed in all animals in both groups. Macroscopically were observed vascular congestion, ascites, and hepatomegaly. Microscopic findings were observed in the liver, showing areas of hepatocyte ballooning, protein precipitation and vascular congestion, in the heart were observed separation of myocardial fibers and dystrophic calcifications. These findings corroborate the studies of other researchers who have studied the *Tetrapteryx* spp. poisoning and are compatible with plants containing cardiac glycosides. The herb was found to contain digoxin as one of the secondary metabolites consistent with cardiac lesions observed.

Keywords: Cardiomyopathy; digitalis intoxication; histopathology; toxic plants.

2. INTRODUÇÃO

A *Tetrapteryx multiglandulosa* (Malpighiaceae), é um cipó originária da Mata Atlântica, comum nas bordas de florestas, encostas de morros e mata ciliar (POTT et al., 2006; SOUZA and LORENZI, 2012). Ocorre principalmente na região de Resende e Rio das Flores, Estado do Rio de Janeiro, e em alguns municípios do estado de São Paulo, como Guaratinguetá e Lorena, sendo conhecida pelos nomes populares de “cipó-vermelho” e “cipó-ferro” (CARVALHO et al., 2009). Esses autores relatam que, apesar de sua ocorrência predominante na região Sudeste brasileira, sua presença e casos de intoxicações foram relatados em Mato Grosso do Sul, no município de Batayporã. Devido às perdas econômicas geradas a partir da morte dos animais acometidos, chegando a inviabilizar a atividade pecuária em algumas propriedades, vários estudos foram realizados, identificando-se, como a causa destas intoxicações, algumas espécies do gênero *Tetrapteryx* ssp. (RIET CORREA and MEDEIROS 2000).

81 As intoxicações por *T. multiglandulosa* causam abortos e mortalidade
82 perinatal em bovinos e, experimentalmente, também em ovinos e caprinos. Além
83 disso, esta planta causa uma forma nervosa de doença, denominada forma
84 letárgica, com espongiose (*status spongiosus*) do sistema nervoso central e
85 cardiomiopatia com mortes súbitas, sem prévias alterações clínicas ou, em outros
86 casos, com manifestação de edemas de declive, seguido de morte (TOKARNIA et
87 al., 1989, GAVA and BARROS 2001, GAVA et al., 2001, MARQUES et al., 2003).

88 A *T. multiglandulosa* é pouco estudada e seus princípios ativos são
89 desconhecidos, mas parece que uma classe de metabólitos secundários pode ser
90 responsável pela causa de lesões em fetos e adultos de bovinos, ovinos e caprinos,
91 além da morte súbita (CARVALHO et al., 2006). Dados da literatura referentes a
92 esta planta não elucidaram qualquer tipo de substância suspeita de causar essa
93 toxicidade (AGUILAR-GUADARRAMA et al., 2007), os estudos mostram apenas
94 relatos de mortes de bovinos e ovinos e as alterações clínicas e patológicas da
95 intoxicação (TOKARNIA et al., 2002).

96 Assim, no presente estudo, com testes *in vivo* em coelhas, para se caracterizar
97 as lesões da intoxicação relacionadas à planta e sugerir o uso desses animais como
98 modelo experimental para o estudo de plantas cardiotóxicas.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Local da colheita do material

O material botânico (folhas novas e adultas) de *T. multiglandulosa* foi colhido na Fazenda São Pedro, no município de Batayporã–MS, (latitude 27° 31' 71" sul e longitude 74° 95' 99" oeste), no dia 16 de Novembro de 2011, coincidindo com o período de chuva da região e enviado ao Laboratório de Morfologia Vegetal da Universidade Anhanguera-Uniderp, em Campo Grande–MS, e depositadas no Herbário da Instituição, sob o número 8022.

3.2 Estudo Químico/Extração

O material botânico da espécie em estudo após secagem e trituração foi submetido à extração alcoólica, via maceração, com o uso de um sonificador. O solvente foi evaporado e o extrato bruto etanólico foi dissolvido em água destilada e submetido à partição com hexano e acetato de etila, a fração do extrato aquoso foi submetido aos bioensaios. Considerou-se folhas novas aquelas situadas próximo à ponta do ramo (apical), com aparência verde claro, menores em tamanho e crescimento. Já as folhas adultas foram consideradas as maiores, com coloração verde escura, localizadas na distal do ramo, medindo em média 11.0 x 5.0 cm.

3.3 Ensaios biológicos

Os experimentos foram conduzidos no laboratório de Produtos Naturais da Anhanguera-Uniderp, no campus III (Agrárias). Foram utilizadas 11 coelhas (*Oryctolagus cuniculus*) da raça Nova Zelândia, adultas, pesando de 1,9 a 2,0 kg. Os animais provenientes de um criador particular, as quais foram separadas em dois grupos experimentais. Cinco animais compondo o grupo G1 (N=5) recebendo extrato

aquoso de folhas jovens de *T. multiglandulosa* a 200g L⁻¹ e outro grupo experimental (G2), composto por seis animais (N=6) recebendo extrato aquoso a 200g L⁻¹ de folhas adultas de *T. multiglandulosa*. Optou-se por utilizar os dados bioquímicos de literatura (PINELLI et al., 2002; BORBOLETA et al., 2011; ZAYERZADEH et al., 2012) referentes a coelhas controle com o intuito de se reduzir o número de animais a serem sacrificados ao final do experimento, minimizando o sofrimento animal conforme a Lei Federal 6.638 que estabelece normas para a prática didático-científica da vivisseção de animais (Brasil, 1979).

Os animais receberam 50 mL do extrato aquoso por meio de agulha de gavage para coelhos (Marca Insight® Modelo IC 815) em uma dose única no período matutino. Todos os animais foram mantidos em baias de alvenaria separados por grupo experimental à temperatura ambiente, tendo livre acesso à água e ração (Nuvital®). Os animais foram inspecionados visualmente por um período de 14 dias, procurando-se observar alterações de comportamento, consumo de ração e água e possíveis mortes durante o período experimental. Após a inspeção clínica os animais eram exercitados por um período de 10 minutos para avaliar possíveis alterações fisiológicas causadas pelos tratamentos.

Colheu-se sangue às 24 horas, e aos sete e 14 dias, após a gavage por venopunção da jugular esquerda, para análise da creatino quinase (CK) e a isoenzima MB de creatino quinase (CK-MB) em ambos os grupos.

Após o período de 14 dias, as coelhas foram eutanasiadas por aprofundamento anestésico com Zoletil® 50 mg (0,1 mLKg, Virbac Saúde Animal). Em seguida foi feita a necropsia com retirada do coração e fígado, os quais foram avaliados macroscopicamente e fixados em formol tamponado a 10% para posterior processamento histológico.

Todos os procedimentos experimentais foram aprovados pelo Comitê de ética e Experimentação e Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, protocolo Nº 385/2012.

3.4 Análise histopatológica.

Os fragmentos dos órgãos foram processados no laboratório de Histologia da CCBS (Centro de Ciências Biológicas e da Saúde), UFMS pelas técnicas de rotina histológica com aparelho histotécnico (Marca LUPE® Modelo PT05) para inclusão em parafina e corte em micrótomo rotativo (Marca LEICA® Modelo RM2255), com 5µm de espessura. Esses fragmentos foram corados pelo método de hematoxilina-eosina (HE), sendo montados em lâmina de vidro de microscopia, com resina. Os órgãos foram analisados microscopicamente e as alterações descritas de acordo com a intensidade (análise qualitativa). Para essas análises foi usado microscópio de luz de campo claro. As imagens foram digitalmente capturadas e armazenadas para a subsequente análise. Essas análises foram realizadas no laboratório de Anatomia Patológica da FAMEZ/UFMS e no laboratório de Patologia Geral do CCBS/UFMS.

3.5 Análise Estatística

A análise de variância não paramétrica "Mann Whitney test" ($P < 0,05$) foi usada para comparação da análise bioquímica sérica entre os grupos experimentais.

4. RESULTADOS

As alterações clínicas observadas nas coelhas, após a gavagem, foram apatia e prostração, fraqueza, movimentos somente quando estimuladas, apresentavam

cansaço após movimentação e diminuição da ingestão de água e ração. Não se observaram alterações neurológicas em nenhum dos animais dos dois grupos no período experimental. Uma coelha do grupo experimental G2 morreu em 24 horas após a gavagem. Não houve mais óbitos no período experimental.

A bioquímica sérica não revelou diferença estatística significativa ($P>0,05$) entre as coelhas pertencentes aos diferentes grupos. A coelha que morreu 24 horas pós gavagem apresentou atividade enzimática de CK (9480 UI/L) e CK-MB (2060 UI/L). As atividades de CK e CK-MB de todos os animais estiveram sempre acima dos valores de referência (CK: < 275 UI/L, segundo Thall, 2007, e CK-MB: 435 ± 211 UI/L, segundo Borboleta et al., 2011), nos animais dos dois grupos, variando bastante em cada indivíduo (Fig.1).

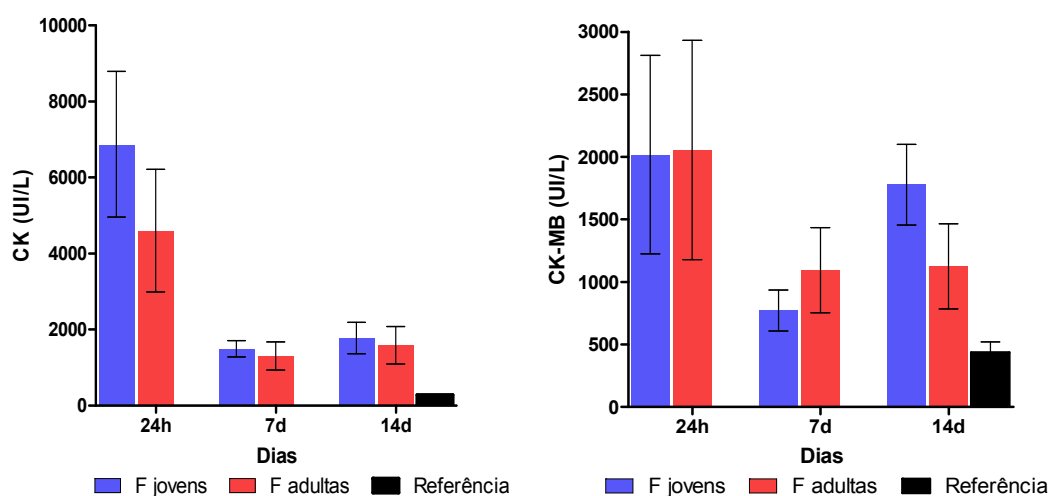


Figura 1. Atividade enzimática de CK e CK-MB de coelhas consumindo extratos de folhas jovens e adultas de *T. multiglandulosa*. São apresentadas as médias e seus respectivos erros padrões.

Os achados macroscópicos mais evidentes à necropsia foram observados no fígado. O órgão estava de aumentado de tamanho, difusamente avermelhado, com

áreas pálidas evidentes e em alguns lobos exibindo impressão dos ossos das costelas.

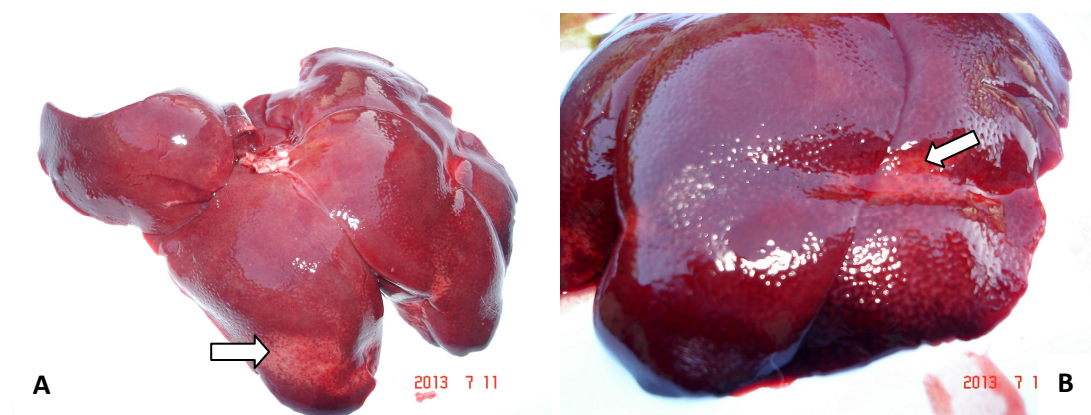


Figura 2 Fotografias de fígado de coelhas intoxicadas com extratos de folhas de *T. multiglandulosa*. (A) à esquerda observa-se coloração pardacenta em região distal de lobo hepático (seta). (B) à direita observa-se congestão com impressão de costelas (seta).

Na cavidade abdominal, visualizou-se ascite em quase todos os animais (Fig. 3A), porém, em um dos animais (G1) observou-se a presença de hemoperitônio (Fig. 3B).

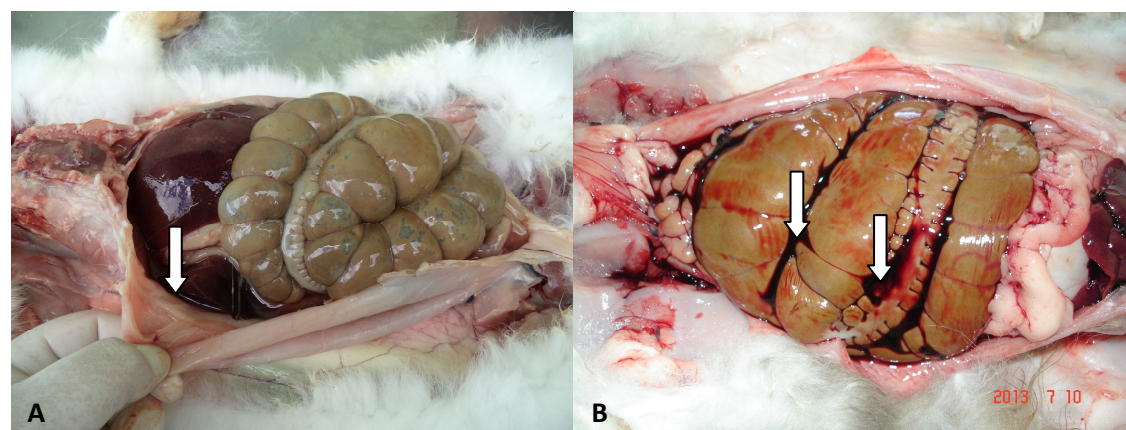


Figura 3 Fotografia de cavidade abdominal de coelhas intoxicadas com extratos de folhas de *T. multiglandulosa*. A) ascite (seta). B) hemoperitônio (setas).

A superfície epicárdica apresentou congestão em vasos sanguíneos na superfície (Fig. 4).

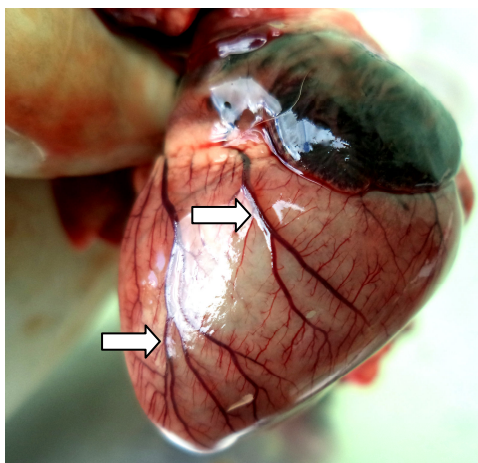


Figura 4 Fotografia de coração de coelha intoxicada com extrato de folhas de *T. multiglandulosa*, apresentando congestão de vasos coronarianos (setas).

Microscopicamente, nas amostras de fígado, observaram-se precipitação proteica de coloração eosinofílica e aspecto amorfo dentro das veias centrolobulares (Fig. 5A). O parênquima hepático apresentava áreas focais de infiltrado inflamatório mononuclear (Fig. 5B).

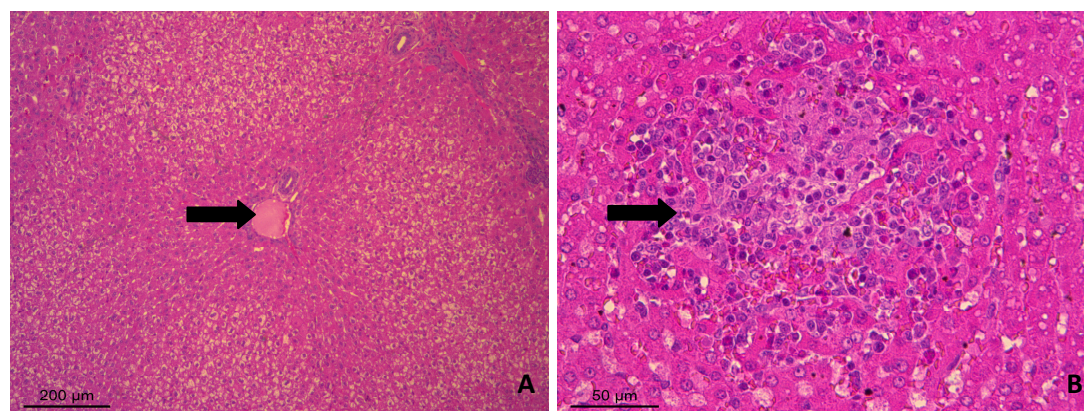


Figura 5. Fotomicrografias de corte histológicos de fígado de coelha intoxicada por *T. multiglandulosa*. A) exibindo precipitação proteica (seta) e B) infiltrado mononuclear (seta). Coloração de Hematoxilina e Eosina.

Observaram-se, ainda, lise dos hepatócitos e acentuada degeneração
 hidrópica na região centrolobular ou zona 2 (Fig. 6A). Os ductos biliares
 apresentavam espessamento da parede, com áreas de necrose e infiltrado
 inflamatório mononuclear e visível hiperplasia epitelial reacional (Fig.6B). Havia
 acentuada congestão centrolobular (Fig. 6C) e áreas de esteatose (Fig. 6D).

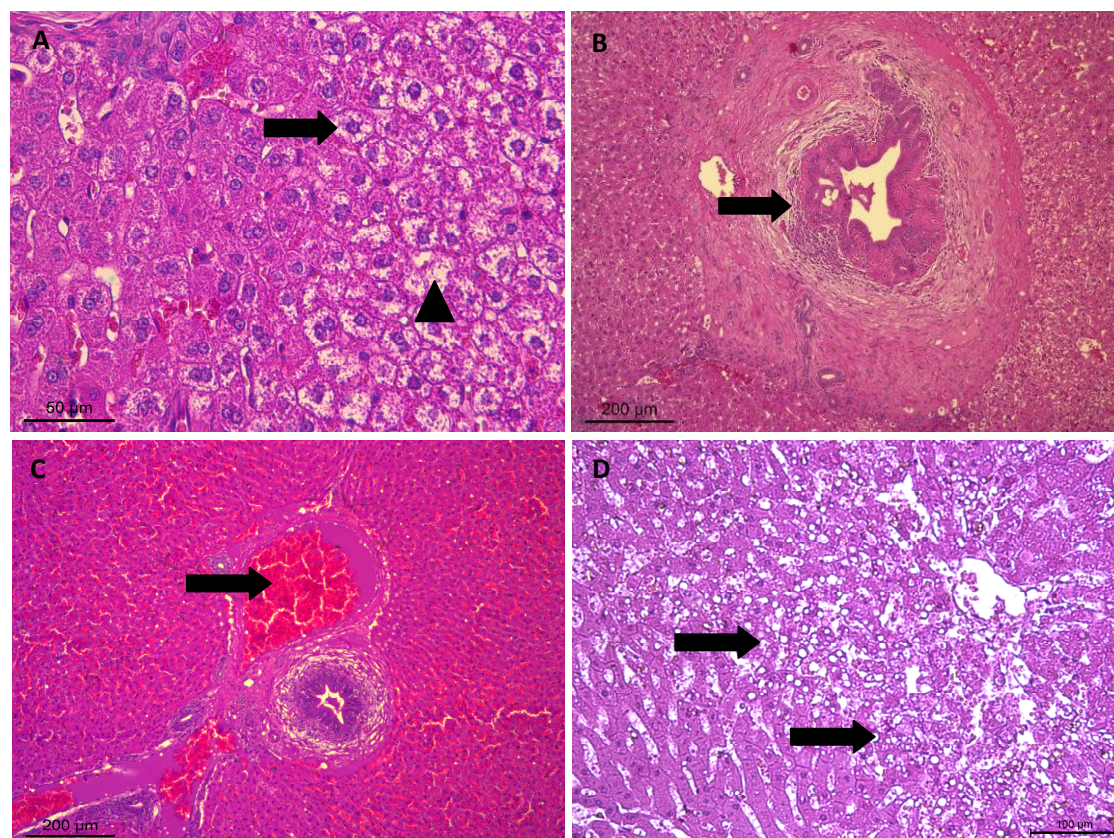


Figura 6. Fotomicrografia de fígado de coelhas intoxicadas com extrato de folhas de *T. multiglandulosa*. A) Degeneração hidrópica (seta), lise de hepatócitos (cabeça da seta). B) Espessamento e necrose da parede ductal (seta). C) Acentuada congestão em vaso sanguíneo e necrose e espessamento de parede ductal da tríade portal (seta). D) Hepatócitos apresentando vacuolização citoplasmática (esteatose) distribuída irregularmente pelo parênquima hepático (setas) Coloração de Hematoxilina e Eosina.

As amostras de coração apresentavam microscopicamente áreas multifocais de calcificação distrófica em alguns animais, com coloração acentuadamente basofílica, associadas a escasso infiltrado inflamatório mononuclear, representado predominantemente por macrófagos. O miocárdio apresentava em alguns animais áreas de necrose coagulativa de aspecto acentuadamente eosinofílico e separação entre as fibras e feixes das fibras miocárdicas, com degeneração dos cardiomiócitos. Observou-se também congestão vascular (hiperemia passiva) em vasos de grande e médio calibre em todos os animais dos dois grupos experimentais.

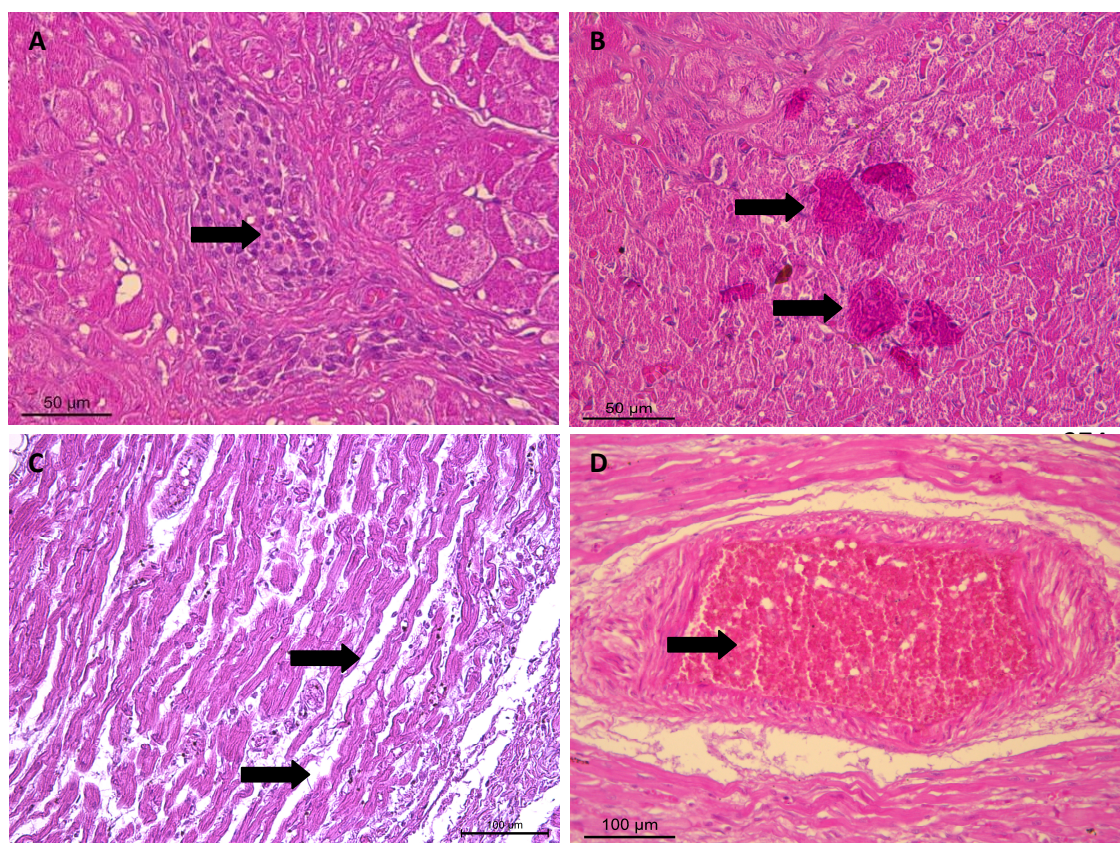


Figura 7. Fotomicrografias de corte histológicos de coração de coelho intoxicado por *Tetrapterys multiglandulosa*. Figura 7a exibe área focal de infiltrado inflamatório mononuclear (seta). Figura 7b apresentando área de necrose eosinofílica (setas). Figura 7c exibindo áreas do miocárdio com separação das miofibrilas (setas). Figura 7d congestão vascular (seta). Coloração de Hematoxilina e Eosina.

Tabela 2. Alterações histopatológicas observadas em coelhas da raça Nova Zelândia submetidas ao extrato aquoso (20%) via oral de *Tetrapteryx multiglandulosa* em folhas jovens e adultas provenientes da região de Batayporã, MS

Órgão		Folhas Jovens					Folhas adultas					
		1	2	3	4	5*	1	2	3	4	5	6*
Fígado	Congestão centrolobular	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P
	Infiltrado inflamatório (área focal)	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P
	Degeneração hidrópica	P	P	P	P	P	P	P	P	A	P	P
	Hiperplasia epitelial de ducto biliar	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P
	Espessamento de parede ductal	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P
	Necrose	A	A	A	A	A	P	A	P	A	A	A
	Esteatose	A	A	A	P	A	P	A	P	A	P	A
	Congestão vascular	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P
	Infiltrado inflamatório (área focal)	P	P	A	A	A	A	A	A	A	A	A
Coração	Necrose	P	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
	Separação das fibras	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P

* número de animais; (P), presença da lesão, (A), ausência da lesão.

294

295 6. DISCUSSÃO

296 Os achados clínicos observados neste experimento são muito semelhantes aos
 297 observados em intoxicação por *T. multiglandulosa*, experimental em ovinos (RIET-
 298 CORREA et al., 2005) e bovinos (TOKARNIA et al., 1989) e em intoxicação natural
 299 em bovinos (CARVALHO et al., 2006). Em intoxicação experimental com ovinos
 300 consumindo *T. multiglandulosa* e *Ateleia glazioviana*, Almeida et al. (2008),
 301 observaram quadros clínicos e patológicos similares para as duas plantas. A *Ateleia*

glazioviana contém como princípio ativo tóxico glicosídeos cardiotônicos e, em função da semelhança dos sinais de intoxicação, há suspeitas de que as duas plantas possuam o mesmo agente toxicante.

Nos exames bioquímicos séricos a ausência de diferença estatística significativa entre os animais dos dois grupos, revelou que a capacidade toxicante das folhas jovens é similar à das adultas. Essas atividades enzimáticas elevadas quando comparadas aos valores de referência de CK (< 275 UI/L), segundo Thall (2007), e CK-MB (435 ± 211 UI/L), segundo Borboleta et al., 2011, indicam lesão celular. Os resultados desta pesquisa são semelhantes aos encontrados por Melo et al. (2008), que, após administração da *Mascagnia rígida*, também uma Malpighiaceae, relataram aumento da concentração sérica de CK-MB em camundongos. De forma semelhante, Cobucci et al. (2009), relataram valores elevados de CK-MB em coelhos após a administração de extrato solúvel em água de *M. rígida*, que possuem ação tóxica sobre os cardiomiócitos.

Esta enzima é mais sensível que a creatina quinase (CK) e lactato desidrogenase para detectar alterações do miocárdio (FOURIE et al., 1989) e é utilizada rotineiramente em patologia clínica para avaliar a função cardíaca, seu aumento indica lesões cardíacas (GONZÁLEZ and SILVA, 2006; BAPTISTELLA, 2009), como as que ocorreram no presente trabalho.

As alterações macroscópicas das amostras de tecido hepático e cardíaco avaliados também foram relatadas na literatura para bovinos intoxicados tanto com *T. multiglandulosa* como por *A. glazioviana* (RIET-CORREA et al., 2005; CARVALHO et al., 2006; MIRI et al., 2012). A presença de hidroperitônio (ascite) também foi relatada por estes pesquisadores além de Tokarnia et al., 1989,

estudando bovinos. Gava et al. (2001), também observaram a presença de derrames em cavidades orgânicas em intoxicação natural por *A. glazioviana* em bovinos.

Os achados histopatológicos deste experimento concentraram-se no fígado e no coração, corroborando os achados de Carvalho et al. (2006), que também observaram congestão, vacuolização dos hepatócitos, lise dos hepatócitos, edema do espaço de Disse e proliferação biliar. Por sua vez, Gava et al. (2001), observaram a presença de necrose na região centrolobular do fígado. As lesões cardíacas observadas microscopicamente no presente trabalho, são similares aos achados por Tokarnia et al. (1989), Gava et al. (2001) e Almeida et al. (2008) estudando a intoxicação por *T. multiglandulosa* em bovinos.

Os achados clínicos, laboratoriais, necroscópicos e histopatológicos causados pela *T. multiglandulosa* em coelhas, no presente trabalho, coincidem com aqueles observados em bovinos e ovinos relatados por diferentes autores, além disso, a presença desses achados observada nos casos de intoxicação por plantas como a *Nerium oleander* (FURTADO et al., 2012) e *Digitalis purpurea* (GUERRA et al., 2002; MATOS, 2007), que possuem glicosídeos cardiotoxícos, permite sugerir que um princípio ativo do mesmo grupo pode estar presente na *T. multiglandulosa* estudada no presente trabalho, em função da coincidência estreita das lesões e alterações clínicas.

7. CONCLUSÃO

O experimento com coelhos demonstrou a susceptibilidade desta espécie à intoxicação, causando insuficiência cardíaca e hepática.

Esses resultados revelaram que o coelho se adequa como modelo experimental para estudar a intoxicação por *Tetrapteryx multiglandulosa*, reproduzindo sinais clínicos e patologia semelhantes às que ocorrem na intoxicação espontânea em bovinos e ovinos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aguilar-Guadarrama, A.B.; Ríos, M.Y. **Terpenos y flavonóides glicosídicos de *Tetrapteryx heterophylla* (Griseb.) W.R. Anderson (Malpighiaceae).** Revista Cubana de Plantas Medicinales. 12: (3), 2007.

Almeida, M.B.; Priebe, A.P.S.; Riet-Correa, B.; Riet-Correa, G.; Fiss, L.; Raffi, M. B.; Schild, A.L. **Evolução e reversibilidade das lesões neurológicas em ovinos intoxicados experimentalmente por *Ateleia glazoviana* e *Tetrapteryx multiglandulosa*.** Pesq. Vet. Bras. v.28, n.3, Rio de Janeiro, 2008.

Babtistella, M.F. **Atividade sérica das enzimas aspartato aminotransferase, creatinoquinase e lactato desidrogenase em equinos submetidos a diferentes intensidades de exercícios.** Anuário da Produção de Iniciação Científica Discente. Vol. XII, n.13, p.33-42, 2009.

Borboleta, L.R.; Labarrère, A.F.C.; Ribeiro, F.O.; Paes-Leme, P.R.O.; Paes, N.M.; Ocarino. **Perfil bioquímico sanguíneo na intoxicação experimental com extrato de *Mascagnia rígida* (A. Juss.) Griseb. (Malpighiaceae) em coelhos.** Arq. Bras. Med. Vet. Zootec., Belo Horizonte, v.63, n.5, p.1113-1123, 2011.

Brasil. Lei nº 6.638. Estabelece normas para a prática didático-científica da vivissecação de animais e determina outras providências. Diário Oficial da União. 1979, 10 maio.

Carvalho, G.D.; Nunes, L.C.; Bragança, H.B.N. & Porfírio, L.C. **Principais plantas tóxicas causadoras de morte súbita em bovinos no Estado do Espírito Santo –** Brasil Arch. Zootec. 58:87-98. 2009.

- 376 Carvalho, M. N.; Alonso, L.A.; Cunha, T.G.; Ravedutti, j.; Barros, C.S.L. & Lemos, R.
 377 A. A. **Intoxicação de bovinos por *Tetrapteryx multiglandulosa* (Malpighiaceae)**
 378 **em Mato Grosso do Sul.** Pesq. Vet. Bras. Rio de Janeiro, 26: (3)139-146. 2006.
- 379 Cobucci, G.C.; Melo, M.M.; Labarrère, C.R. **Disfunção cardíaca na intoxicação**
 380 **experimental com extrato aquoso de *Mascagnia rígida*.** In: SEMANA DE
 381 INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UFMG, 18., 2009. Belo Horizonte. *Anais...* Belo
 382 Horizonte: UFMG, 2009.
- 383 Fourie, N.; Schultz, R.A.; Prozesky, L; Kellerman, T.S; Labuschagne, L. **Clinical**
 384 **pathological changes in gousiekte, a plant-induced cardiotoxicosis of**
 385 **ruminants.** Onderstepoort. J. Vet. Res. 56:73-80, 1989.
- 386 Furtado, F.M.V.; Carneiro, M.S. de S.; Araújo, A.A. de; Gadelha, C. R. **Intoxicações**
 387 **causadas pela ingestão de espécies vegetais em ruminantes.** Ciência Animal
 388 22(3):47-56, 2012.
- 389
- 390 Gava, A.; Barros, C.S.L. **Field observations of *Ateleia glazioviana* poisoning in**
 391 **cattle in southern Brazil.** Vet. Human. Toxicol. 43:37-41. 2001.
- 392 Gava, A.; Barros C.S.L.; Pilati C.; Barros S.S. & Mori A.M. **Intoxicação por *Ateleia***
 393 ***glazioviana* (Leg. Papilionoideae) em bovinos.** Pesq. Vet. Bras. Rio de Janeiro,
 394 21:49-59. 2001.
- 395 González, F.H.D.; Silva, S.C. **Perfil Bioquímico no Exercício.** In: **Introdução à**
 396 **Bioquímica Clínica Veterinária.** Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande
 397 do Sul. 2006.
- 398 Guerra, C. R. S. B.; Guerra, C. A. L.; Coelho, W. M. D.; Mangold, M. A.; Caris, C. C.
 399 P. **Plantas tóxicas de interesse na medicina veterinária.** Ciências Agrárias, v.2,
 400 n.1, p.54-58, 2002.
- 401 Marques, A.P.; Riet-Correa, M.; Soares, M.P.; Ortolani, E.L. & Giuliadori, M.J..
 402 **Mortes súbitas em bovinos associadas à carência de cobre.** Pesq. Vet. Bras. Rio
 403 de Janeiro, 23(1):21-32, 2003.

- 404 Matos, F.J.A. **Plantas Medicinais: guia de seleção e emprego das plantas**
 405 **usadas em fitoterapia no Nordeste do Brasil.** 3ª Edição, Fortaleza: Imprensa
 406 Universitária, 2007.
- 407 Melo, M.M.; Verçosa Júnior, D.; Pinto, M.C.L. **Intoxicação experimental com**
 408 **extratos de *Mascagnia rígida* (Malpighiaceae) em camundongos.** Arq. Bras.
 409 Med. Vet. Zootec., Belo Horizonte, v. 60, p.631-640, 2008.
- 410 Miri, F.; Ribas, B.N.; Rossato, C.K. **Intoxicação por *Ateleia glazioviana* como**
 411 **causa de insuficiência cardíaca em bovinos.** XVII Seminário Interinstitucional de
 412 Ensino, Pesquisa e Extensão. UNICRUZ-RS, 2012.
- 413 Pinelli, A.; Trivulzio, S.; Tomasoni, L.; Bertoline, B.; Brenna, S.; Bonacina, E. **Cardiac**
 414 **necrosis markers associated witc low nitrit oxide levels in the plasma of**
 415 **rabbits after treatment with vasopressin: protective effects of nitroglycerin**
 416 **administration.** Pharm. Research, vol. 45, n.6, 2002.
- 417 Pott, A.; Pott, V.J. & Souza, T.W. **Plantas daninhas de pastagem na região dos**
 418 **Cerrados.** Campo Grande: Embrapa Gado de Corte. 336p. 2006.
- 419 Riet-Correa, F.; Medeiros, R.M.T. **Intoxicações por plantas em ruminantes no**
 420 **Brasil e no Uruguai: importância econômica, controle e riscos para a saúde**
 421 **pública.** Pesq. Vet. Bras. Rio de Janeiro, 21:(1)38-42. 2000.
- 422 Riet-Correa, G; Terra, F.F.; Schild, A.L.; Riet-Correa, F.; Barros, S.S. de.
 423 **Intoxicação experimental por *Tetrapteryx multiglandulosa* (Malpighiaceae) em**
 424 **ovinos.** Pesq. Vet. Bras. Rio de Janeiro, 25(2):91-96. 2005.
- 425 Souza, V.C.; Lorenzi, H. **Botânica Sistemática: guia ilustrado para identificação**
 426 **das famílias de Fanerógamas nativas e exóticas no Brasil, baseado em APG III.**
 427 3ª ed. Nova Odessa – SP: Instituto Plantarum, 2012.
- 428 Thall, M.A. Hematologia e **Bioquímica Clínica Veterinária**, Ed. Roca, pág. 434.
 429 2007.
- 430 Tokarnia, C.H., Peixoto, P.V., Döbereiner J., Consorte, L.B. & Gava, A. ***Tetrapteryx***
 431 **spp (Malpighiaceae), a causa de mortandades em bovinos caracterizadas por**

- 432 **alterações cardíacas.** Pesquisa Veterinária Brasileira. Rio de Janeiro, 9:23-44.
433 1989.
- 434 Tokarnia, C.H.; Dobereiner, J.; Peixoto, P.V. **Poisonous plants affecting livestock**
435 **in Brazil.** Rio de Janeiro, 2002.
- 436 Zayerzadeh, E.; Koohi, M.K.; Mirakabadi, A.Z.; Fardipoor, A.; Kassaian, S.E.;
437 Rabbani, S.; Anvari, M.S. **Amelioration of cardio-respiratory perturbations**
438 **following *Mesobuthus eupeus* envenmation in anesthetized rabbits with**
439 **commercial polyvalent F(ab')₂ antivenom.** Toxicon. 59, 249-256, 2012.

INSTRUÇÕES AOS AUTORES

ORGANIZAÇÃO DO TRABALHO CIENTÍFICO

- **Digitação:** o texto deve ser composto em programa Word (DOC ou RTF) ou compatível e os gráficos em programas compatíveis com o Windows, como Excel, e formato de imagens: Figuras (GIF) e Fotos (JPEG). Deve ter no máximo de 20 páginas, A4, digitado em espaço 1,5, fonte Times New Roman, estilo normal, tamanho doze e parágrafo recuado por 1 cm. Todas as margens deverão ter 2,5 cm. Páginas e linhas devem ser numeradas; os números de páginas devem ser colocados na margem inferior, à direita e as linhas numeradas de forma contínua. Se forem necessárias outras orientações, entre em contato com o Comitê Editorial ou consulte o último número da Revista Caatinga. As notas devem apresentar até 12 páginas, incluindo tabelas e figuras. As revisões são publicadas a convite da Revista. O manuscrito não deverá ultrapassar 2,0 MB.

- **Estrutura:** o artigo científico deverá ser organizado em título, nome do(s) autor(es), resumo, palavras-chave, título em inglês, abstract, keywords, introdução, material e métodos, resultados e discussão, conclusão, agradecimentos (opcional), e referências.

- **Título:** deve ser escrito em maiúsculo, negrito, centralizado na página, no **máximo com 15 palavras**, não deve ter subtítulo e abreviações. Com a chamada de rodapé numérica, extraída do título, devem constar informações sobre a natureza do trabalho (se extraído de tese/dissertação) e referências às instituições colaboradoras. O nome científico deve ser indicado no título apenas se a espécie for desconhecida.

Os títulos das demais seções da estrutura (resumo, abstract, introdução, material e métodos, resultados e discussão, conclusão, agradecimentos e referências) deverão ser escritos em letra maiúscula, negrito e justificado à esquerda.

- **Autores(es):** nomes completos (sem abreviaturas), em letra maiúscula, um após o outro, separados por vírgula e centralizados na linha. Como nota de rodapé na primeira página, indicar, para cada autor, afiliação completa (departamento, centro, instituição, cidade, país), endereço completo e e-mail do autor correspondente. Este deve ser indicado por um “*”. Só serão aceitos, no máximo, cinco autores. Caso ultrapasse esse limite, os autores precisam comprovar que a pesquisa foi desenvolvida em regiões diferentes.

Na primeira versão do artigo submetido, os nomes dos autores e a nota de rodapé com os endereços deverão ser omitidos.

Para a inserção do(s) nome(s) do(s) autor(es) e do(s) endereço(s) na **versão final do artigo** deve observar o padrão no último número da Revista Caatinga (<http://caatinga.ufersa.edu.br/index.php/sistema>).

- **Resumo e Abstract:** no **mínimo 100** e no **máximo 250 palavras**.

- **Palavras-chave e Keywords:** em negrito, com a primeira letra maiúscula. Devem ter, no mínimo, três e, no máximo, cinco palavras, não constantes no Título/Title e separadas por ponto (consultar modelo de artigo).

Obs. Em se tratando de artigo escrito em idioma estrangeiro (Inglês ou Espanhol), o título, resumo e palavras-chave deverão, também, constar em Português, mas com a sequência alterada, vindo primeiro no idioma estrangeiro.

- **Introdução:** no **máximo, 550 palavras**, contendo citações atuais que apresentem relação com o assunto abordado na pesquisa.

- **Citações de autores no texto:** devem ser observadas as normas da ABNT, NBR 10520 de agosto/2002.

Ex: Torres (2008) ou (TORRES, 2008); com dois autores, usar Torres e Marcos Filho (2002) ou (TORRES; MARCOS FILHO, 2002); com mais de três autores, usar Torres et al. (2002) ou (TORRES et al., 2002).

- **Tabelas:** serão numeradas consecutivamente com algarismos arábicos na parte superior. **Não usar linhas verticais.** As linhas horizontais devem ser usadas para separar o título do cabeçalho e este do conteúdo, além de uma no final da tabela. Cada dado deve ocupar uma célula distinta. Não usar negrito ou letra maiúscula no cabeçalho. Recomenda-se que as tabelas apresentem 8,2 cm de largura, não sendo superior a 17 cm (consulte o modelo de artigo), acessando a página da Revista Caatinga (<http://periodico.caatinga.ufersa.edu.br/index.php/sistema>).

- **Figuras:** gráficos, fotografias ou desenhos levarão a denominação geral de **Figura** sucedida de numeração arábica crescente e legenda na parte inferior. Para a preparação dos gráficos deve-se utilizar “softwares” compatíveis com “Microsoft Windows”. A resolução deve ter qualidade máxima com pelo menos 300 dpi. As figuras devem apresentar 8,5 cm de largura, não sendo superior a 17 cm. A fonte empregada deve ser a Times New Roman, corpo 10 e não usar negrito na identificação dos eixos. As linhas dos eixos devem apresentar uma espessura de 1,5 mm de cor preta. A Revista Caatinga reserva-se ao direito de não aceitar tabelas e/ou figuras com o papel na forma “paisagem” ou que apresentem mais de 17 cm de largura. **Tabelas e Figuras devem ser inseridas logo após à sua primeira citação.**

- **Equações:** devem ser digitadas usando o editor de equações do Word, com a fonte Times New Roman. As equações devem receber uma numeração arábica crescente. As equações devem apresentar o seguinte padrão de tamanho:

Inteiro = 12 pt

Subscrito/sobrescrito = 8 pt

Sub-subscrito/sobrescrito = 5 pt

Símbolo = 18 pt

Subsímbolo = 14 pt

Estas definições são encontradas no editor de equação no Word.

- **Agradecimentos:** logo após as conclusões poderão vir os agradecimentos a pessoas ou instituições, indicando, de forma clara, as razões pelas quais os faz.

• **Referências:** devem ser digitadas em espaço 1,5 cm e separadas entre si pelo mesmo espaço (1,5 cm). Precisam ser apresentadas em ordem alfabética de autores, Justificar (Ctrl + J) - NBR 6023 de agosto/2002 da ABNT. **UM PERCENTUAL DE 60% DO TOTAL DAS REFERÊNCIAS DEVERÁ SER ORIUNDO DE PERIÓDICOS CIENTÍFICOS INDEXADOS COM DATA DE PUBLICAÇÃO INFERIOR A 10 ANOS.**

O título do periódico não deve ser abreviado e recomenda-se um total de 20 a 30 referências. **EVITE CITAR RESUMOS E TRABALHOS APRESENTADOS E PUBLICADOS EM CONGRESSOS E SIMILARES.**

REGRAS DE ENTRADA DE AUTOR

Até 3 (três) autores

Mencionam-se todos os nomes, na ordem em que aparecem na publicação, separados por ponto e vírgula.

Ex: TORRES, S. B.; PAIVA, E. P. PEDRO, A. R. Teste de deterioração controlada para avaliação da qualidade fisiológica de sementes de jiló. **Revista Caatinga**, Mossoró, v. 0, n. 0, p. 00-00, 2010.

Acima de 3 (três) autores

Menciona-se apenas o primeiro nome, acrescentando-se a expressão **et al.**

Ex: BAKKE, I. A. et al. Water and sodium chloride effects on *Mimosa tenuiflora* (Willd.) poiret seed germination. **Revista Caatinga**, Mossoró, v. 19, n. 3, p. 261-267, 2006.

Grau de parentesco

HOLANDA NETO, J. P. **Método de enxertia em cajueiro-anão-precoce sob condições de campo em Mossoró-RN.** 1995. 26 f. Monografia (Graduação em Agronomia) – Escola Superior de Agricultura de Mossoró, Mossoró, 1995.

COSTA SOBRINHO, João da Silva. Cultura do melão. **Cuiabá:** Prefeitura de Cuiabá, 2005.

MODELOS DE REFERÊNCIAS:

a) Artigos de Periódicos: Elementos essenciais:

AUTOR. Título do artigo. **Título do periódico**, Local de publicação (cidade), n.º do volume, n.º do fascículo, páginas inicial-final, mês (abreviado), ano.

Ex: BAKKE, I. A. et al. Water and sodium chloride effects on *Mimosa tenuiflora* (Willd.) poiret seed germination. **Revista Caatinga**, Mossoró, v. 19, n. 3, p. 261-267, set. 2006.

b) Livros ou Folhetos, no todo: Devem ser referenciados da seguinte forma:

AUTOR. **Título:** subtítulo. Edição. Local (cidade) de publicação: Editora, data. Número de páginas ou volumes. (nome e número da série)

Ex: RESENDE, M. et al. **Pedologia:** base para distinção de ambientes. 2. ed. Viçosa, MG: NEPUT, 1997. 367 p.

OLIVEIRA, A. I.; LEONARDOS, O. H. **Geologia do Brasil.** 3. ed. Mossoró: ESAM, 1978. 813 p. (Coleção mossoroense, 72).

c) Livros ou Folhetos, em parte (Capítulo de Livro):

AUTOR DO CAPÍTULO. Título do capítulo. In: AUTOR DO LIVRO. **Título:** subtítulo do livro. Número de edição. Local de publicação (cidade): Editora, data. Indicação de volume, capítulo ou páginas inicial-final da parte.

Ex: BALMER, E.; PEREIRA, O. A. P. Doenças do milho. In: PATERNIANI, E.; VIEGAS, G. P. (Ed.). **Melhoramento e produção do milho.** Campinas: Fundação Cargill, 1987. v. 2, cap. 14, p. 595-634.

d) Dissertações e Teses: (somente serão permitidas citações recentes, PUBLICADAS NOS ÚLTIMOS TRÊS ANOS QUE ANTECEDEM A REDAÇÃO DO ARTIGO). Referenciam-se da seguinte maneira:

AUTOR. **Título:** subtítulo. Ano de apresentação. Número de folhas ou volumes. Categoria (grau e área de concentração) - Instituição, local.

Ex: OLIVEIRA, F. N. **Avaliação do potencial fisiológico de sementes de girassol (*Helianthus annuus* L.).** 2011. 81 f. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia: Área de Concentração em Tecnologia de Sementes) – Universidade Federal Rural do Semi-Árido, Mossoró, 2011.

e) Artigos de Anais ou Resumos: (DEVEM SER EVITADOS)

NOME DO CONGRESSO, n.º, ano, local de realização (cidade). Título... subtítulo. Local de publicação (cidade): Editora, data de publicação. Número de páginas ou volumes.

Ex: BALLONI, A. E.; KAGEYAMA, P. Y.; CORRADINI, I. Efeito do tamanho da semente de *Eucalyptus grandis* sobre o vigor das mudas no viveiro e no campo. In: CONGRESSO FLORESTAL BRASILEIRO, 3., 1978, Manaus. **Anais...** Manaus: UFAM, 1978. p. 41-43.

f) Literatura não publicada, mimeografada, datilografada etc.:

Ex: GURGEL, J. J. S. **Relatório anual de pesca e piscicultura do DNOCS**. Fortaleza: DNOCS, 1989. 27 p. Datilografado.

g) Literatura cuja autoria é uma ou mais pessoas jurídicas:

Ex: ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: informação e documentação – referências – elaboração. Rio de Janeiro, 2002. 24 p.

h) Literatura sem autoria expressa:

Ex: NOVAS Técnicas – Revestimento de sementes facilita o plantio. **Globo Rural**, São Paulo, v. 9, n. 107, p. 7-9, jun. 1994.

i) Documento cartográfico:

Ex: INSTITUTO GEOGRÁFICO E CARTOGRÁFICO (São Paulo, SP). **Regiões de governo do Estado de São Paulo**. São Paulo, 1994. 1 atlas. Escala 1:2.000.

J) Em meio eletrônico (CD e Internet): Os documentos /informações de **acesso exclusivo por computador** (on line) compõem-se dos seguintes elementos essenciais para sua referência:

AUTOR. Denominação ou título e subtítulo (se houver) do serviço ou produto, indicação de responsabilidade, endereço eletrônico entre os sinais < > precedido da expressão – Disponível em: – e a data de acesso precedida da expressão – Acesso em:.

Ex: BRASIL. Ministério da Agricultura e do abastecimento. **SNPC – Lista de Cultivares protegidas**. Disponível em: <<http://agricultura.gov.br/scpn/list/200.htm>>. Acesso em: 08 set. 2008.

GUNCHIO, M. R. A educação à distância e a biblioteca universitária. In: SEMINÁRIO DE BIBLIOTECAS UNIVERSITÁRIAS, 10., 1998, Fortaleza. **Anais...** Fortaleza: Tec Treina, 1998. 1 CD-ROM.

UNIDADES E SÍMBOLOS DO SISTEMA INTERNACIONAL ADOTADOS PELA REVISTA CAATINGA

Grandezas básicas	Unidades	Símbolos	Exemplos
Comprimento	metro	m	
Massa quilograma	quilograma	kg	
Tempo	segundo	s	
Corrente elétrica	amper	A	
Temperatura termodinâmica	Kelvin	K	
Quantidade de substância	mol	mol	
Unidades derivadas			
Velocidade	---	m s ⁻¹	343 m s ⁻¹
Aceleração	---	m s ⁻²	9,8 m s ⁻²
Volume	Metro cúbico, litro	M ³ , L*	1 m ³ , 1 000 L*
Frequência	Hertz	Hz	10 Hz
Massa específica	---	Kg m ⁻³	1.000 kg m ⁻³
Força	newton	N	15 N
Pressão	pascal	pa	1,013.10 ⁵ Pa
Energia	joule	J	4 J
Potência	watt	W	500 W
Calor específico	---	J (kg °C) ⁻¹	4186 J (kg °C) ⁻¹
Calor latente	---	J kg ⁻¹	2,26.10 ⁶ J kg ⁻¹
Carga elétrica	coulomb	C	1 C
Potencial elétrico	volt	V	25 V
Resistência elétrica	ohm	Ω	29Ω
Intensidade de energia	Watts/metros quadrado	W m ⁻²	1.372 W m ⁻²

Concentração	Mol/metro cúbico	Mol m ⁻³	500 mol m ⁻³
Condutância elétrica	siemens	S	300 S
Condutividade elétrica	desiemens/metro	dS m ⁻¹	5 dS m ⁻¹
Temperatura	Grau Celsius	°C	25 °C
Ângulo	Grau	°	30°
Porcentagem	---	%	45%

Números mencionados em sequência devem ser separados por **ponto e vírgula (;)**. Ex: 2,5; 4,8; 5,3



TOXICON

An Interdisciplinary Journal on the Toxins Derived from Animals, Plants and Microorganisms

AUTHOR INFORMATION PACK

TABLE OF CONTENTS

•	Description	p.1
•	Audience	p.2
•	Impact Factor	p.2
•	Abstracting and Indexing	p.2
•	Editorial Board	p.3
•	Guide for Authors	p.5



ISSN: 0041-0101

DESCRIPTION

Toxicon's "aims and scope" are laid down in the journal as:

To publish:

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

And

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

Toxicon strives to publish articles that are current and of broad interest and importance to the toxinology research community. Emphasis will be placed upon articles that further the understanding and knowledge of toxinology.

Types of paper

Full-Length Research Papers: Articles containing the results of original research on problems related to toxins derived from animals, plants and microorganisms.

Short Communications: Short communications differ from full manuscripts only in that the research study does not lend itself to an extended presentation. Even though brief, the Short communication should represent a complete, coherent and self contained study. The quality of Short Communications is expected to be as good as that of full articles, and both full articles and Short communications will be refereed in an identical manner. The form is identical to that for a full article except that the report should not be divided into Introduction, Materials and Methods, Results and Discussion. An abstract of not more than 75 words should be provided. The Short Communication may not be longer than five double-spaced typewritten pages (not including references, tables and figures) and should include not more than two tables of two figures or one of each.

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

Announcements: *Toxicon* will only accept for publication announcements of great interest to toxinologists, such as notices of appropriate meetings and symposia and activities of the International Society of Toxinology.

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

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

Clinical reports: *Toxicon* will publish clinical reports on poisoning where a new therapeutic principle has been proposed or a decidedly superior clinical result has been established. Please observe the following: [Clinical Reports Guidelines](#)

Classic Toxins: The main aim of these articles is to educate and inform both the experienced scientist and new scientists entering the field of toxinology. These articles should serve as a reference guide for anyone using toxins. Please contact Dr. Ed Rowan with your suggestions for inclusion in the 'classic toxins' feature.

AUDIENCE

Toxicologists, toxinologists, molecular biologists and chemists.

IMPACT FACTOR

2013: 2.581 © Thomson Reuters Journal Citation Reports 2014

ABSTRACTING AND INDEXING

BIOSIS
Elsevier BIOBASE
Cambridge Scientific Abstracts
Chemical Abstracts
Current Contents/BIOMED Database
Current Contents/Life Sciences
Current Contents/SciSearch Database
Current Contents/Science Citation Index
MEDLINE®
EMBASE
PASCAL/CNRS
Research Alert
Scopus
EMBiology

EDITORIAL BOARD

Editor-in-Chief

Alan L. Harvey, Strathclyde Institute for Drug Research (SIDR), Strathclyde Institute of Pharmacy and Biomedical Sciences (SIPBS), University of Strathclyde, The John Arbuthnott Building, 27 Taylor Street, Glasgow, G4 0NR, UK, Fax: 44 141 552 8376

Honorary Editors

Philip Rosenberg

Review Editor

Peter N. Strong, Sheffield, England, UK

Mini-Review Editors

Yara Cury, Lab. de Fisiopatologia, Instituto Butantan, Av. Vital Brazil, 1500, 05503-900, São Paulo, Brazil

Raymond S. Norton, Medicinal Chemistry and Drug Action, Inst. of Pharmaceutical Sciences, Fac. of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, Monash University, Parkville Campus, 381 Royal Parade, Parkville, VIC 3052, Victoria, Australia

Classic Toxins Review Editor

Edward G. Rowan, Dept. of Physiology and Pharmacology, Strathclyde Inst. of Pharmacy and Biomedical Sciences, University of Strathclyde, Sir John Arbuthnott Building, 27 Taylor Street, Glasgow, G4 0NR, Scotland, UK

Editorial Council

K. Aktories, Freiburg, Germany

I. Asuzu, Nsukka, Nigeria

G.L. Boyer, Syracuse, New York, USA

B.W. Brooks, Waco, Texas, USA

J.J. Calvete, Valencia, Spain

C.R. Carlini, Porto Alegre RS, Brazil

E.E. Creppy, Bordeaux Cedex, France

F. Ducancel, Gif-Sur-Yvette, France

M. Edery, Paris Cedex 05, France

J.W. Fox, Charlottesville, Virginia, USA

P. Gopalakrishnakone, Singapore

J.M. Gutiérrez, San José, Costa Rica

R.A. Harrison, Liverpool, UK

W.C. Hodgson, Clayton, Victoria, Australia

R.J. Huxtable, Tucson, Arizona, USA

G.K. Isbister, Callaghan, New South Wales, Australia

M. Ismail, Cairo, Egypt

E. Kalapothakis, Belo Horizonte, MG, Brazil

W.R. Kem, Gainesville, Florida, USA

G.F. King, St. Lucia, Queensland, Australia

R.M. Kini, Singapore, Singapore

I. Krizaj, Ljubljana, Slovenia

M. Lazdunski, Valbonne, France

R.J. Lewis, St Lucia, Queensland, Australia

F.S. Markland Jr., Los Angeles, California, USA

M.-F. Martin-Eauclaire, Marseille, France

D. Mebs, Frankfurt, Germany

E. Moczydlowski, Albuquerque, New Mexico, USA

C. Montecucco, Padova, Italy

B.A. Neilan, Sydney, New South Wales, Australia

G.M. Nicholson, Sydney, Australia

B.M. Olivera, Salt Lake City, Utah, USA

S. Pflugmacher, Berlin, Germany

M.A. Poli, Ft. Detrick, Maryland, USA

L.D. Possani, Cuernavaca, Mexico

S.M.T. Serrano, Sao Paulo, Brazil

W.T. Shier, Minneapolis, Minnesota, USA

K. Sivonen, Helsinki, Finland

T. Tamiya, Tokyo, Japan

A. Tubaro, Trieste, Italy

J. Tytgat, Leuven, Belgium

D.A. Warrell, Oxford, UK

J. White, North Adelaide, South Australia, Australia

Y. Zhang, Yunnan, China

R.B. Zingali, Rio de Janeiro, Brazil

International Society on Toxinology

Secretary-Treasurer

Professor Julian White, Toxinology Department, Women's & Children's Hospital; North Adelaide SA 5006, Australia; www.toxinology.org; Phone: +(61)(0)8-8161 7000, Fax: +(61)(0)8-81618024

GUIDE FOR AUTHORS

Your Paper Your Way

We now differentiate between the requirements for new and revised submissions. You may choose to submit your manuscript as a single Word or PDF file to be used in the refereeing process. Only when your paper is at the revision stage, will you be requested to put your paper in to a 'correct format' for acceptance and provide the items required for the publication of your article.

To find out more, please visit the Preparation section below.

INTRODUCTION

Official Journal of The International Society on Toxinology (<http://www.toxinology.org/>), *Toxicon*'s "aims and scope" are laid down in the journal as:

To publish:

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

And

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

Toxicon strives to publish articles that are current and of broad interest and importance to the toxinology research community. Emphasis will be placed upon articles that further the understanding and knowledge of toxinology.

Types of paper

Full-Length Research Papers: Articles containing the results of original research on problems related to toxins derived from animals, plants and microorganisms.

Short Communications: Short communications differ from full manuscripts only in that the research study does not lend itself to an extended presentation. Even though brief, the Short communication should represent a complete, coherent and self contained study. The quality of Short Communications is expected to be as good as that of full articles, and both full articles and Short communications will be refereed in an identical manner. The form is identical to that for a full article except that the report should not be divided into Introduction, Materials and Methods, Results and Discussion. An abstract of not more than 75 words should be provided. The Short Communication may not be longer than five double-spaced typewritten pages (not including references, tables and figures) and should include not more than two tables of two figures or one of each.

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

Announcements: *Toxicon* will only accept for publication announcements of great interest to toxinologists, such as notices of appropriate meetings and symposia and activities of the International Society of Toxinology.

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

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

Clinical reports: *Toxicon* will publish clinical reports on poisoning where a new therapeutic principle has been proposed or a decidedly superior clinical result has been established. Please observe the following: [Clinical Reports Guidelines](#)

Classic Toxins: The main aim of these articles is to educate and inform both the experienced scientist and new scientists entering the field of toxinology. These articles should serve as a reference guide for anyone using toxins. Please contact Dr. Ed Rowan with your suggestions for inclusion in the 'classic toxins' feature.

BEFORE YOU BEGIN

Ethics in publishing

For information on Ethics in publishing and Ethical guidelines for journal publication see <http://www.elsevier.com/publishingethics> and <http://www.elsevier.com/journal-authors/ethics>.

Conflict of Interest

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

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

Submission declaration and verification

Submission of an article implies that the work described has not been published previously (except in the form of an abstract or as part of a published lecture or academic thesis or as an electronic preprint, see <http://www.elsevier.com/sharingpolicy>), that it is not under consideration for publication elsewhere, that its publication is approved by all authors and tacitly or explicitly by the responsible authorities where the work was carried out, and that, if accepted, it will not be published elsewhere in the same form, in English or in any other language, including electronically without the written consent of the copyright-holder. To verify originality, your article may be checked by the originality detection service CrossCheck <http://www.elsevier.com/editors/plagdetect>.

Changes to authorship

This policy concerns the addition, deletion, or rearrangement of author names in the authorship of accepted manuscripts:

Before the accepted manuscript is published in an online issue: Requests to add or remove an author, or to rearrange the author names, must be sent to the Journal Manager from the corresponding author of the accepted manuscript and must include: (a) the reason the name should be added or removed, or the author names rearranged and (b) written confirmation (e-mail, fax, letter) from all authors that they agree with the addition, removal or rearrangement. In the case of addition or removal of authors, this includes confirmation from the author being added or removed. Requests that are not sent by the corresponding author will be forwarded by the Journal Manager to the corresponding author, who must follow the procedure as described above. Note that: (1) Journal Managers will inform the Journal Editors of any such requests and (2) publication of the accepted manuscript in an online issue is suspended until authorship has been agreed.

After the accepted manuscript is published in an online issue: Any requests to add, delete, or rearrange author names in an article published in an online issue will follow the same policies as noted above and result in a corrigendum.

Copyright

Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete a 'Journal Publishing Agreement' (for more information on this and copyright, see <http://www.elsevier.com/copyright>). An e-mail will be sent to the corresponding author confirming receipt of the manuscript together with a 'Journal Publishing Agreement' form or a link to the online version of this agreement.

Subscribers may reproduce tables of contents or prepare lists of articles including abstracts for internal circulation within their institutions. Permission of the Publisher is required for resale or distribution outside the institution and for all other derivative works, including compilations and translations (please consult <http://www.elsevier.com/permissions>). If excerpts from other copyrighted works are included, the author(s) must obtain written permission from the copyright owners and credit the source(s) in the article. Elsevier has preprinted forms for use by authors in these cases: please consult <http://www.elsevier.com/permissions>.

For open access articles: Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete an 'Exclusive License Agreement' (for more information see <http://www.elsevier.com/OAauthoragreement>). Permitted third party reuse of open access articles is determined by the author's choice of user license (see <http://www.elsevier.com/openaccesslicenses>).

Author rights

As an author you (or your employer or institution) have certain rights to reuse your work. For more information see <http://www.elsevier.com/copyright>.

Role of the funding source

You are requested to identify who provided financial support for the conduct of the research and/or preparation of the article and to briefly describe the role of the sponsor(s), if any, in study design; in the collection, analysis and interpretation of data; in the writing of the report; and in the decision to submit the article for publication. If the funding source(s) had no such involvement then this should be stated.

Funding Body Agreements and Policies

Elsevier has established agreements and developed policies to allow authors whose articles appear in journals published by Elsevier, to comply with potential manuscript archiving requirements as specified as conditions of their grant awards. To learn more about existing agreements and policies please visit <http://www.elsevier.com/fundingbodies>.

US National Institutes of Health (NIH) voluntary posting ("Public Access") policy:

Elsevier facilitates author response to the NIH voluntary posting request (referred to as the NIH "Public Access Policy"; see <http://www.nih.gov/about/publicaccess/index.htm>) by posting the peer-reviewed author's manuscript directly to PubMed Central on request from the author, 12 months after formal publication. Upon notification from Elsevier of acceptance, we will ask you to confirm via e-mail (by e-mailing us at NIHauthorrequest@elsevier.com) that your work has received NIH funding and that you intend to respond to the NIH policy request, along with your NIH award number to facilitate processing. Upon such confirmation, Elsevier will submit to PubMed Central on your behalf a version of your manuscript that will include peer-review comments, for posting 12 months after formal publication. This will ensure that you will have responded fully to the NIH request policy. There will be no need for you to post your manuscript directly with PubMed Central, and any such posting is prohibited.

Open access

This journal offers authors a choice in publishing their research:

Open access

- Articles are freely available to both subscribers and the wider public with permitted reuse
- An open access publication fee is payable by authors or on their behalf e.g. by their research funder or institution

Subscription

- Articles are made available to subscribers as well as developing countries and patient groups through our universal access programs (<http://www.elsevier.com/access>).
- No open access publication fee payable by authors.

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

For open access articles, permitted third party (re)use is defined by the following Creative Commons user licenses:

Creative Commons Attribution (CC BY)

Lets others distribute and copy the article, create extracts, abstracts, and other revised versions, adaptations or derivative works of or from an article (such as a translation), include in a collective work (such as an anthology), text or data mine the article, even for commercial purposes, as long as they credit the author(s), do not represent the author as endorsing their adaptation of the article, and do not modify the article in such a way as to damage the author's honor or reputation.

Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs (CC BY-NC-ND)

For non-commercial purposes, lets others distribute and copy the article, and to include in a collective work (such as an anthology), as long as they credit the author(s) and provided they do not alter or modify the article.

The open access publication fee for this journal is **USD 3000**, excluding taxes. Learn more about Elsevier's pricing policy: <http://www.elsevier.com/openaccesspricing>.

Language (usage and editing services)

Please write your text in good English (American or British usage is accepted, but not a mixture of these). Authors who feel their English language manuscript may require editing to eliminate possible grammatical or spelling errors and to conform to correct scientific English may wish to use the English Language Editing service available from Elsevier's WebShop (<http://webshop.elsevier.com/languageediting/>) or visit our customer support site (<http://support.elsevier.com>) for more information.

Submission

Our online submission system guides you stepwise through the process of entering your article details and uploading your files. The system converts your article files to a single PDF file used in the peer-review process. Editable files (e.g., Word, LaTeX) are required to typeset your article for final publication. All correspondence, including notification of the Editor's decision and requests for revision, is sent by e-mail.

Referees

The Editors welcome submissions by the authors of the names and addresses of up to five individuals who could expertly review the paper, and who are not from the same institutions as the authors. The Editors reserve the right to use these or other reviewers.

PREPARATION

NEW SUBMISSIONS

Submission to this journal proceeds totally online and you will be guided stepwise through the creation and uploading of your files. The system automatically converts your files to a single PDF file, which is used in the peer-review process.

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

References

There are no strict requirements on reference formatting at submission. References can be in any style or format as long as the style is consistent. Where applicable, author(s) name(s), journal title/book title, chapter title/article title, year of publication, volume number/book chapter and the pagination

must be present. Use of DOI is highly encouraged. The reference style used by the journal will be applied to the accepted article by Elsevier at the proof stage. Note that missing data will be highlighted at proof stage for the author to correct.

Formatting requirements

There are no strict formatting requirements but all manuscripts must contain the essential elements needed to convey your manuscript, for example Abstract, Keywords, Introduction, Materials and Methods, Results, Conclusions, Artwork and Tables with Captions.

If your article includes any Videos and/or other Supplementary material, this should be included in your initial submission for peer review purposes.

Divide the article into clearly defined sections.

Please ensure the text of your paper is double-spaced and has consecutive line numbering– this is an essential peer review requirement.

Figures and tables embedded in text

Please ensure the figures and the tables included in the single file are placed next to the relevant text in the manuscript, rather than at the bottom or the top of the file.

REVISED SUBMISSIONS

Use of word processing software

Regardless of the file format of the original submission, at revision you must provide us with an editable file of the entire article. Keep the layout of the text as simple as possible. Most formatting codes will be removed and replaced on processing the article. The electronic text should be prepared in a way very similar to that of conventional manuscripts (see also the Guide to Publishing with Elsevier: <http://www.elsevier.com/guidepublication>). See also the section on Electronic artwork.

To avoid unnecessary errors you are strongly advised to use the 'spell-check' and 'grammar-check' functions of your word processor.

Article structure

Subdivision - numbered sections

Divide your article into clearly defined and numbered sections. Subsections should be numbered 1.1 (then 1.1.1, 1.1.2, ...), 1.2, etc. (the abstract is not included in section numbering). Use this numbering also for internal cross-referencing: do not just refer to 'the text'. Any subsection may be given a brief heading. Each heading should appear on its own separate line.

Introduction

State the objectives of the work and provide an adequate background, avoiding a detailed literature survey or a summary of the results.

Material and methods

Provide sufficient detail to allow the work to be reproduced. Methods already published should be indicated by a reference: only relevant modifications should be described.

Experimental

Provide sufficient detail to allow the work to be reproduced. Methods already published should be indicated by a reference: only relevant modifications should be described.

Experimental procedures

All animal experiments should be carried out in accordance with the U.K. Animals (Scientific Procedures) Act, 1986 and associated guidelines, the European Communities Council Directive of 24 November 1986 (86/609/EEC) or the National Institutes of Health guide for the care and use of Laboratory animals (NIH Publications No. 8023, revised 1978) and the authors should clearly indicate in the manuscript that such guidelines have been followed. **All animal studies need to ensure they comply with the ARRIVE guidelines. More information can be found at <http://www.nc3rs.org.uk/page.asp?id=1357>.**

Theory/calculation

A Theory section should extend, not repeat, the background to the article already dealt with in the Introduction and lay the foundation for further work. In contrast, a Calculation section represents a practical development from a theoretical basis.

Results

Results should be clear and concise.

Discussion

This should explore the significance of the results of the work, not repeat them. A combined Results and Discussion section is often appropriate. Avoid extensive citations and discussion of published literature.

Conclusions

The main conclusions of the study may be presented in a short Conclusions section, which may stand alone or form a subsection of a Discussion or Results and Discussion section.

Appendices

If there is more than one appendix, they should be identified as A, B, etc. Formulae and equations in appendices should be given separate numbering: Eq. (A.1), Eq. (A.2), etc.; in a subsequent appendix, Eq. (B.1) and so on. Similarly for tables and figures: Table A.1; Fig. A.1, etc.

Essential title page information

- **Title.** Concise and informative. Titles are often used in information-retrieval systems. Avoid abbreviations and formulae where possible.
- **Author names and affiliations.** Please clearly indicate the given name(s) and family name(s) of each author and check that all names are accurately spelled. Present the authors' affiliation addresses (where the actual work was done) below the names. Indicate all affiliations with a lower-case superscript letter immediately after the author's name and in front of the appropriate address. Provide the full postal address of each affiliation, including the country name and, if available, the e-mail address of each author.
- **Corresponding author.** Clearly indicate who will handle correspondence at all stages of refereeing and publication, also post-publication. **Ensure that the e-mail address is given and that contact details are kept up to date by the corresponding author.**
- **Present/permanent address.** If an author has moved since the work described in the article was done, or was visiting at the time, a 'Present address' (or 'Permanent address') may be indicated as a footnote to that author's name. The address at which the author actually did the work must be retained as the main, affiliation address. Superscript Arabic numerals are used for such footnotes.

Abstract

A concise and factual abstract is required. The abstract should state briefly the purpose of the research, the principal results and major conclusions. An abstract is often presented separately from the article, so it must be able to stand alone. For this reason, References should be avoided, but if essential, then cite the author(s) and year(s). Also, non-standard or uncommon abbreviations should be avoided, but if essential they must be defined at their first mention in the abstract itself.

Graphical abstract

Although a graphical abstract is optional, its use is encouraged as it draws more attention to the online article. The graphical abstract should summarize the contents of the article in a concise, pictorial form designed to capture the attention of a wide readership. Graphical abstracts should be submitted as a separate file in the online submission system. Image size: Please provide an image with a minimum of 531 × 1328 pixels (h × w) or proportionally more. The image should be readable at a size of 5 × 13 cm using a regular screen resolution of 96 dpi. Preferred file types: TIFF, EPS, PDF or MS Office files. See <http://www.elsevier.com/graphicalabstracts> for examples.

Authors can make use of Elsevier's Illustration and Enhancement service to ensure the best presentation of their images and in accordance with all technical requirements: [Illustration Service](#).

Highlights

Highlights are mandatory for this journal. They consist of a short collection of bullet points that convey the core findings of the article and should be submitted in a separate file in the online submission system. Please use 'Highlights' in the file name and include 3 to 5 bullet points (maximum 125 characters including spaces, or, maximum 20 words per bullet point). See <http://www.elsevier.com/highlights> for examples.

Keywords

Immediately after the abstract, provide a maximum of 6 keywords, using American spelling and avoiding general and plural terms and multiple concepts (avoid, for example, 'and', 'of'). Be sparing with abbreviations: only abbreviations firmly established in the field may be eligible. These keywords will be used for indexing purposes.

Abbreviations

Define abbreviations that are not standard in this field in a footnote to be placed on the first page of the article. Such abbreviations that are unavoidable in the abstract must be defined at their first mention there, as well as in the footnote. Ensure consistency of abbreviations throughout the article.

Acknowledgements

Collate acknowledgements in a separate section at the end of the article before the references and do not, therefore, include them on the title page, as a footnote to the title or otherwise. List here those individuals who provided help during the research (e.g., providing language help, writing assistance or proof reading the article, etc.).

Math formulae

Please submit math equations as editable text and not as images. Present simple formulae in line with normal text where possible and use the solidus (/) instead of a horizontal line for small fractional terms, e.g., X/Y. In principle, variables are to be presented in italics. Powers of e are often more conveniently denoted by exp. Number consecutively any equations that have to be displayed separately from the text (if referred to explicitly in the text).

Footnotes

Footnotes should be used sparingly. Number them consecutively throughout the article. Many word processors build footnotes into the text, and this feature may be used. Should this not be the case, indicate the position of footnotes in the text and present the footnotes themselves separately at the end of the article.

Artwork

Electronic artwork

General points

- Make sure you use uniform lettering and sizing of your original artwork.
 - Preferred fonts: Arial (or Helvetica), Times New Roman (or Times), Symbol, Courier.
 - Number the illustrations according to their sequence in the text.
 - Use a logical naming convention for your artwork files.
 - Indicate per figure if it is a single, 1.5 or 2-column fitting image.
 - For Word submissions only, you may still provide figures and their captions, and tables within a single file at the revision stage.
 - Please note that individual figure files larger than 10 MB must be provided in separate source files.
- A detailed guide on electronic artwork is available on our website:

<http://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

You are urged to visit this site; some excerpts from the detailed information are given here.

Formats

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

EPS (or PDF): Vector drawings. Embed the font or save the text as 'graphics'.

TIFF (or JPG): Color or grayscale photographs (halftones): always use a minimum of 300 dpi.

TIFF (or JPG): Bitmapped line drawings: use a minimum of 1000 dpi.

TIFF (or JPG): Combinations bitmapped line/half-tone (color or grayscale): a minimum of 500 dpi is required.

Please do not:

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

Color artwork

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

Please note: Because of technical complications that can arise by converting color figures to 'gray scale' (for the printed version should you not opt for color in print) please submit in addition usable black and white versions of all the color illustrations.

Figure captions

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

Tables

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

References

Citation in text

Please ensure that every reference cited in the text is also present in the reference list (and vice versa). Any references cited in the abstract must be given in full. Unpublished results and personal communications are not recommended in the reference list, but may be mentioned in the text. If these references are included in the reference list they should follow the standard reference style of the journal and should include a substitution of the publication date with either 'Unpublished results' or 'Personal communication'. Citation of a reference as 'in press' implies that the item has been accepted for publication.

Reference links

Increased discoverability of research and high quality peer review are ensured by online links to the sources cited. In order to allow us to create links to abstracting and indexing services, such as Scopus, CrossRef and PubMed, please ensure that data provided in the references are correct. Please note that incorrect surnames, journal/book titles, publication year and pagination may prevent link creation. When copying references, please be careful as they may already contain errors. Use of the DOI is encouraged.

Web references

As a minimum, the full URL should be given and the date when the reference was last accessed. Any further information, if known (DOI, author names, dates, reference to a source publication, etc.), should also be given. Web references can be listed separately (e.g., after the reference list) under a different heading if desired, or can be included in the reference list.

References in a special issue

Please ensure that the words 'this issue' are added to any references in the list (and any citations in the text) to other articles in the same Special Issue.

Reference management software

Most Elsevier journals have a standard template available in key reference management packages. This covers packages using the Citation Style Language, such as Mendeley (<http://www.mendeley.com/features/reference-manager>) and also others like EndNote (<http://www.endnote.com/support/enstyles.asp>) and Reference Manager (<http://refman.com/support/rmstyles.asp>). Using plug-ins to word processing packages which are available from the above sites, authors only need to select the appropriate journal template when preparing their article and the list of references and citations to these will be formatted according to the journal style as described in this Guide. The process of including templates in these packages is constantly ongoing. If the journal you are looking for does not have a template available yet, please see the list of sample references and citations provided in this Guide to help you format these according to the journal style.

If you manage your research with Mendeley Desktop, you can easily install the reference style for this journal by clicking the link below:

<http://open.mendeley.com/use-citation-style/toxicon>

When preparing your manuscript, you will then be able to select this style using the Mendeley plug-ins for Microsoft Word or LibreOffice. For more information about the Citation Style Language, visit <http://citationstyles.org>.

Reference formatting

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

Reference style

Text: All citations in the text should refer to:

1. *Single author:* the author's name (without initials, unless there is ambiguity) and the year of publication;
2. *Two authors:* both authors' names and the year of publication;
3. *Three or more authors:* first author's name followed by 'et al.' and the year of publication.

Citations may be made directly (or parenthetically). Groups of references should be listed first alphabetically, then chronologically.

Examples: 'as demonstrated (Allan, 2000a, 2000b, 1999; Allan and Jones, 1999). Kramer et al. (2010) have recently shown'

List: References should be arranged first alphabetically and then further sorted chronologically if necessary. More than one reference from the same author(s) in the same year must be identified by the letters 'a', 'b', 'c', etc., placed after the year of publication.

Examples:

Reference to a journal publication:

Van der Geer, J., Hanraads, J.A.J., Lupton, R.A., 2010. The art of writing a scientific article. *J. Sci. Commun.* 163, 51–59.

Reference to a book:

Strunk Jr., W., White, E.B., 2000. *The Elements of Style*, fourth ed. Longman, New York.

Reference to a chapter in an edited book:

Mettam, G.R., Adams, L.B., 2009. How to prepare an electronic version of your article, in: Jones, B.S., Smith, R.Z. (Eds.), *Introduction to the Electronic Age*. E-Publishing Inc., New York, pp. 281–304.

Journal abbreviations source

Journal names should be abbreviated according to the List of Title Word Abbreviations: <http://www.issn.org/services/online-services/access-to-the-ltwa/>.

Video data

Elsevier accepts video material and animation sequences to support and enhance your scientific research. Authors who have video or animation files that they wish to submit with their article are strongly encouraged to include links to these within the body of the article. This can be done in the same way as a figure or table by referring to the video or animation content and noting in the body text where it should be placed. All submitted files should be properly labeled so that they directly relate to the video file's content. In order to ensure that your video or animation material is directly usable, please provide the files in one of our recommended file formats with a preferred maximum size of 150 MB. Video and animation files supplied will be published online in the electronic version of your article in Elsevier Web products, including ScienceDirect: <http://www.sciencedirect.com>. Please supply 'stills' with your files: you can choose any frame from the video or animation or make a separate image. These will be used instead of standard icons and will personalize the link to your video data. For more detailed instructions please visit our video instruction pages at <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>. Note: since video and animation cannot be embedded in the print version of the journal, please provide text for both the electronic and the print version for the portions of the article that refer to this content.

AudioSlides

The journal encourages authors to create an AudioSlides presentation with their published article. AudioSlides are brief, webinar-style presentations that are shown next to the online article on ScienceDirect. This gives authors the opportunity to summarize their research in their own words and to help readers understand what the paper is about. More information and examples are available at <http://www.elsevier.com/audioslides>. Authors of this journal will automatically receive an invitation e-mail to create an AudioSlides presentation after acceptance of their paper.

Supplementary material

Elsevier accepts electronic supplementary material to support and enhance your scientific research. Supplementary files offer the author additional possibilities to publish supporting applications, high-resolution images, background datasets, sound clips and more. Supplementary files supplied will be published online alongside the electronic version of your article in Elsevier Web products, including ScienceDirect: <http://www.sciencedirect.com>. In order to ensure that your submitted material is directly usable, please provide the data in one of our recommended file formats. Authors should submit the material in electronic format together with the article and supply a concise and descriptive caption for each file. For more detailed instructions please visit our artwork instruction pages at <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

Database linking

Elsevier encourages authors to connect articles with external databases, giving readers access to relevant databases that help to build a better understanding of the described research. Please refer to relevant database identifiers using the following format in your article: Database: xxxx (e.g., TAIR: AT1G01020; CCDC: 734053; PDB: 1XFN). See <http://www.elsevier.com/databaselinking> for more information and a full list of supported databases.

Submission checklist

The following list will be useful during the final checking of an article prior to sending it to the journal for review. Please consult this Guide for Authors for further details of any item.

Ensure that the following items are present:

One author has been designated as the corresponding author with contact details:

- E-mail address
- Full postal address

All necessary files have been uploaded, and contain:

- Keywords
- All figure captions
- All tables (including title, description, footnotes)

Further considerations

- Manuscript has been 'spell-checked' and 'grammar-checked'
- All references mentioned in the Reference list are cited in the text, and vice versa
- Permission has been obtained for use of copyrighted material from other sources (including the Internet)

Printed version of figures (if applicable) in color or black-and-white

- Indicate clearly whether or not color or black-and-white in print is required.
- For reproduction in black-and-white, please supply black-and-white versions of the figures for printing purposes.

For any further information please visit our customer support site at <http://support.elsevier.com>.

AFTER ACCEPTANCE

Use of the Digital Object Identifier

The Digital Object Identifier (DOI) may be used to cite and link to electronic documents. The DOI consists of a unique alpha-numeric character string which is assigned to a document by the publisher upon the initial electronic publication. The assigned DOI never changes. Therefore, it is an ideal medium for citing a document, particularly 'Articles in press' because they have not yet received their full bibliographic information. Example of a correctly given DOI (in URL format; here an article in the journal *Physics Letters B*):

<http://dx.doi.org/10.1016/j.physletb.2010.09.059>

When you use a DOI to create links to documents on the web, the DOIs are guaranteed never to change.

Online proof correction

Corresponding authors will receive an e-mail with a link to our online proofing system, allowing annotation and correction of proofs online. The environment is similar to MS Word: in addition to editing text, you can also comment on figures/tables and answer questions from the Copy Editor. Web-based proofing provides a faster and less error-prone process by allowing you to directly type your corrections, eliminating the potential introduction of errors.

If preferred, you can still choose to annotate and upload your edits on the PDF version. All instructions for proofing will be given in the e-mail we send to authors, including alternative methods to the online version and PDF.

We will do everything possible to get your article published quickly and accurately. Please use this proof only for checking the typesetting, editing, completeness and correctness of the text, tables and figures. Significant changes to the article as accepted for publication will only be considered at this stage with permission from the Editor. It is important to ensure that all corrections are sent back to us in one communication. Please check carefully before replying, as inclusion of any subsequent corrections cannot be guaranteed. Proofreading is solely your responsibility.

Offprints

The corresponding author, at no cost, will be provided with a PDF file of the article via e-mail (the PDF file is a watermarked version of the published article and includes a cover sheet with the journal cover image and a disclaimer outlining the terms and conditions of use). For an extra charge, paper offprints can be ordered via the offprint order form which is sent once the article is accepted for publication. Both corresponding and co-authors may order offprints at any time via Elsevier's WebShop (<http://webshop.elsevier.com/myarticleservices/offprints>). Authors requiring printed copies of multiple articles may use Elsevier WebShop's 'Create Your Own Book' service to collate multiple articles within a single cover (<http://webshop.elsevier.com/myarticleservices/booklets>).

AUTHOR INQUIRIES

You can track your submitted article at <http://www.elsevier.com/track-submission>. You can track your accepted article at <http://www.elsevier.com/trackarticle>. You are also welcome to contact Customer Support via <http://support.elsevier.com>.

© Copyright 2014 Elsevier | <http://www.elsevier.com>