



FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS
CURSO DE DOUTORADO



**TOXICIDADE DOS DIFERENTES ESTÁGIOS
VEGETATIVOS DE *Amorimia pubiflora* EM OVINOS**

STEPHANIE CARRELO DE LIMA

Campo Grande – MS
2018

STEPHANIE CARRELO DE LIMA

**TOXICIDADE DOS DIFERENTES ESTÁGIOS
VEGETATIVOS DE *Amorimia pubiflora* EM OVINOS**

Toxicity of the different vegetative stages of Amorimia pubiflora to sheep

STEPHANIE CARRELO DE LIMA

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Antônio Amaral de Lemos

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias como requisito para obtenção do título de Doutor em Ciências Veterinárias.

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Antônio Amaral de Lemos

Campo Grande – MS
2018

AGRADECIMENTOS

À Deus por todas as oportunidades que tive durante minha trajetória acadêmica, por todas as vitórias e também derrotas, pois elas são a base do aprendizado.

Aos meus pais e irmãos, que mesmo indiretamente colaboraram com toda a minha jornada.

Às minhas amigas Paula Velozo, Rayane Pupin, Juliana Paniago, Gleice Ayardes e Kelly Godoy, por toda ajuda e por tornarem todo o trabalho mais divertido.

Aos estagiários e residentes que colaboraram nos experimentos.

Aos técnicos do laboratório de Anatomia Patológica, Nickolly, Gerson, Rubiane e Jhonny pelos auxílios com as necropsias, processamento do material e amizade.

Ao meu orientador Professor Dr. Ricardo Lemos que sem dúvidas é uma das pessoas mais admiráveis que já conheci, tanto no aspecto pessoal como profissional.

Aos demais professores do Laboratório de Anatomia Patológica Professor Dr. Danilo Gomes, Professora Dr^a. Tessie Martins e Professor Dr. Claudio Barros. Agradeço especialmente ao professor Claudio por todas as correções realizadas na tradução do artigo gerado pela tese.

Às professoras Cássia Leal e Alda Izabel por todos os conselhos e conversas.

E também ao Fernando e ao Ricardo da secretaria de pós-graduação por sempre serem atenciosos e solucionarem os problemas burocráticos durante este doutorado.

Muito obrigada a todos que colaboraram direta ou indiretamente para que este trabalho acontecesse.

SUMÁRIO

RESUMO	5
CAPITULO 1	7
1. INTRODUÇÃO	7
2. OBJETIVOS	8
2.1. Objetivo geral	8
2.2. Objetivos específicos	9
3. REVISÃO DE LITERATURA	9
3.1. Plantas que causam morte súbita em animais de produção	9
3.2. Monofluoracetato.....	11
3.3. Alterações clínicas e patológicas causadas por plantas que contêm monofluoracetato.....	12
3.4. Diagnóstico.....	13
3.5. Tratamento.....	14
3.6. Métodos para prevenção de intoxicação por plantas que causam morte súbita.....	14
4. REFERÊNCIAS	16
 CAPITULO 2	 21
Artigo 1 - Toxicity of the different vegetative stages of <i>Amorimia pubiflora</i> to sheep	22
Abstract.....	22
Introduction.....	23
Material and methods.....	25
Results.....	26
Discussion.....	27
References.....	29
 CAPITULO 3	 33
Artigo 2 – Plantas tóxicas de interesse pecuário na região Centro-Oeste do Brasil	34
Resumo.....	34
Abstract.....	34
Introdução	34
Principais plantas de interesse pecuário no Centro-Oeste do Brasil	35
<i>Brachiaria</i> spp.	35
<i>Vernonia molissima</i> e <i>V. rubricaulis</i>	37
<i>Palicourea marcgravii</i> , <i>Amorimia pubiflora</i> e <i>Niedenzuella stannea</i> ..	38
<i>Senna occidentalis</i> e <i>S. obtusifolia</i>	39
<i>Enterolobium contortisiliquum</i>	40
<i>Stryphnodendron fissuratum</i> e <i>S. obovatum</i>	41
<i>Pteridium</i> spp.....	42
<i>Pterodon emarginatus</i>	43
<i>Tetrapteryx multiglandulosa</i>	44
<i>Simarouba versicolor</i>	45
<i>Crotalaria</i> spp.....	46
<i>Ipomoea carnea</i> subsp. <i>Fistulosa</i>	46

<i>Solanum glaucophyllum</i> (<i>Solanum malacoxylon</i>).....	47
<i>Stylosanthes</i> sp.....	48
Plantas do Centro-Oeste sem casos de intoxicação comprovados...	49
Tratamento, profilaxia e controle.....	49
Referências.....	49
CRONOGRAMA	55
ANEXOS	56
Projeto Aprovado	57
Autorizações Legais	69
Normas das Revistas	71
Toxicon.....	72
Ciência Animal.....	90

RESUMO

LIMA, S.C. Toxicidade dos diferentes estágios vegetativos de *Amorimia pubiflora* em ovinos. 2018. 95p. Tese de Doutorado –Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, MS, 2018.

Nesta tese são apresentados dois artigos sobre plantas tóxicas de interesse pecuário encontradas na região Centro-Oeste do Brasil. O primeiro artigo é um estudo experimental com *Amorimia pubiflora*, cujo objetivo foi determinar a quantidade de MFA presente em brotos, folhas maduras, folhas velhas e sementes desta planta, colhidas em diferentes épocas do ano e seu efeito tóxico em ovinos. Amostras de *Amorimia pubiflora* foram colhidas durante os meses de abril, agosto e dezembro de 2015 e março de 2016, separadas de acordo com o estágio vegetativo (brotos, sementes, folhas maduras e velhas), dessecadas em estufa e fornecidas em doses diárias equivalentes a 5 g/kg de folhas frescas a ovinos através de cânula ruminal. O experimento foi dividido em quatro etapas de acordo com a época de coleta da planta, de forma que em cada uma delas um ovino recebeu um estágio vegetativo da planta (brotos, folhas maduras e velhas). Apenas na segunda etapa do experimento foi possível coletar sementes de *A. pubiflora* e estas foram fornecidas a um ovino seguindo a mesma metodologia das folhas. A planta foi administrada até que os animais apresentassem sinais clínicos de intoxicação ou até o término da quantidade de planta. Alíquotas de folhas e sementes de *A. pubiflora* fornecidas aos ovinos foram enviadas para dosagem de monofluoracetato. Todos os estágios vegetativos da planta foram tóxicos durante o experimento, mas os maiores níveis de monofluoracetato foram detectados em sementes e brotos. Folhas maduras (colhidas em agosto e dezembro) e velhas (colhidas em dezembro) também causaram intoxicação fatal. Nossos resultados demonstram que *A. pubiflora* pode ser tóxica mesmo quando as concentrações de MFA são baixas, evidenciando que a simples presença desta substância é um fator de risco para a ocorrência da intoxicação. O objetivo do segundo artigo foi realizar uma revisão de literatura sobre as principais plantas de interesse pecuário encontradas nos Estados do Centro-Oeste brasileiro, evidenciando os aspectos epidemiológicos, patogenia, sinais clínicos, achados patológicos, medidas de controle e tratamento para cada espécie de planta. Dentre as plantas abordadas estão *Brachiaria* spp., *Vernonia rubricaulis* e *V. mollissima*, *Amorimia pubiflora*, *Palicourea marcgravii*, *Niederzuehlla stannea*, *Senna occidentalis* e *S. obtusifolia*, *Enterolobium contortisiliquum*, *Stryphnodendrum obovatum*, *S. fissuratum*, *Pteridium aquilinum*, *Pterodon emarginatus*, *Tetrapteryx multiglandulosa*, *Simarouba versicolor*, *Crotalaria* spp., *Ipomoea carnea* subsp. *Fistulosa*, *Solanum malacoxylon* e *Stylosanthes* sp.

Palavras-chave: *Amorimia pubiflora*, Monofluoracetato, Morte súbita, Ovinos, Plantas tóxicas.

ABSTRACT

In this doctoral thesis are presented two manuscripts about toxic plants poisonous to livestock found in Central-Western Brazil. The first manuscript is an experimental study with *Amorimia pubiflora*, whose the aim was to determine the amount of MFA present in seedlings, mature leaves, old leaves, and seeds of *Amorimia pubiflora* harvested at different times of the year and its toxic effect on sheep. Samples of *Amorimia pubiflora* were collected during the months of April, August and December of 2015 and March of 2016, separated according to the vegetative stage (seedlings, seeds, mature leaves, and old leaves), dried in a drying oven, and administered in daily doses equivalent to 5 g/kg of fresh leaves to sheep through ruminal cannula. The experiment was divided into four stages according to the time of collection of the plant so that in each of them a sheep received a different vegetative stage of the plant (seedlings, mature leaves, and old leaves). Only in the second stage of the experiment it was possible to collect *A. pubiflora* seeds and these were administered to one sheep using the same method used for the administration of the leaves. The plant was administered until the animals showed clinical signs of toxicosis or until the plant was not available anymore. Aliquots of leaves and seeds of *A. pubiflora* dosed to sheep were submitted for dosing of monofluoroacetate in a toxicology laboratory. All vegetative stages of the plant were toxic during the experiment, but higher levels of monofluoroacetate were detected in seeds and seedlings. Mature leaves (collected in August and December) and old leaves (collected in December) also caused fatal poisoning. The results of our study show that *A. pubiflora* is toxic to sheep even when MFA concentrations are low, demonstrating the presence of this substance is a risk factor for the occurrence of poisoning. The aim of the second manuscript was to do a literature review about main toxic plants poisonous to livestock found in Central-Western Brazil, evidencing the epidemiological aspects, pathogenesis, clinical signs, pathological findings, control measures, and treatment. Among the plants covered are *Brachiaria* spp., *Vernonia rubricaulis* e *V. mollissima*, *Amorimia pubiflora*, *Palicourea marcgravii*, *Niederzuehlla stannea*, *Senna occidentalis* e *S. obtusifolia*, *Enterolobium contortisiliquum*, *Stryphnodendrum obovatum*, *S. fissuratum*, *Pteridium aquilinum*, *Pterodon emarginatus*, *Tetrapteryx multiglandulosa*, *Simarouba versicolor*, *Crotalaria* spp., *Ipomoea carnea* subsp. *Fistulosa*, *Solanum malacoxylon* e *Stylosanthes* sp.

Keywords: *Amorimia pubiflora*, Monofluoroacetate, Sudden death, Sheep, Toxic plant

1. INTRODUÇÃO

Plantas tóxicas que causam morte súbita em animais de produção são encontradas principalmente em países como Austrália, África do Sul e Brasil ocasionando importantes prejuízos econômicos (LEE et al., 2014). O princípio tóxico detectado na maioria dessas plantas é o monofluoracetato (MFA), atualmente reconhecido e quantificado pela adaptação do método HPLC-APCI-MS por Lee et al. (2012), metodologia que anteriormente era aplicada apenas na identificação desse composto em alimentos.

A toxicidade do MFA é resultante da ação do seu metabólito ativo, o fluorocitrato, produzido por meio da “síntese letal”, que interrompe o Ciclo de Krebs e a produção de adenosina trifosfato (ATP). Este processo prejudica órgãos com maiores taxas metabólicas, como o coração (KREBS et al., 1994; SANTOS et al., 2014).

Na Austrália, plantas que contêm MFA pertencem aos gêneros *Gastrolobium* e *Oxylobium*, estão amplamente distribuídas pelo país, acometem bovinos, ovinos, caprinos e equinos e são consideradas importantes causas de perdas econômicas para pecuaristas (LEE et al., 2014). Na África do Sul, *Dichapetalum cymosum* também conhecida como “gifblaar” é considerada a terceira planta tóxica mais importante da região, responsável por 8% das mortes de bovinos intoxicados por plantas e micotoxinas (KELLERMAN et al., 2005).

No Brasil estima-se que 50% das mortes de bovinos causadas por plantas sejam devido à ingestão de espécies que contêm MFA. Dentre elas destacam-se plantas dos gêneros *Palicourea* e *Amorimia* por apresentarem ampla distribuição geográfica e boa palatabilidade. MFA foi identificado em *P. marcgravii*, *P. aeneofusca*, *P. amapaensis*, *P. grandiflora*, *P. aff. juruana*, *P. longiflora*, *P. aff. longiflora*, *P. macarthurorum*, *P. nigricans*, *P. vacillans*, *P. barraensis*, *A. amazonica*, *A. camporum*, *A. exotropa*, *A. pubiflora*, *A. rigida*, *A. septentrionalis*, *Arrabidea bilabiatum* e *Arrabidea jupurensis*. Apesar de causar quadros de morte súbita, MFA não foi encontrado em *Pseudocalymma elegans* (LEE et al., 2012; TOKARNIA et al., 2012; CARVALHO et al., 2016; LIMA et al., 2016; SANTOS-BARBOSA et al., 2017).

O diagnóstico presuntivo de intoxicações por MFA ou plantas com este princípio tóxico pode ser realizado com base no histórico, nos sinais clínicos apresentados pelos animais, na presença das plantas nas propriedades e nos achados de necropsia. A confirmação pode ser realizada através da observação de degeneração hidrópico-vacuolar nos túbulos contorcidos distais dos rins e da detecção do princípio em amostras biológicas, porém a confirmação por estes métodos é difícil, já que os animais acometidos nem sempre apresentam alterações tubulares e a meia-vida do MFA é curta no organismo, restringindo seu período de identificação em amostras biológicas (NOGUEIRA et al., 2011; TOKARNIA et al., 2012). Recentemente, a detecção de MFA na cera da orelha de bovinos intoxicados experimentalmente com *P. marcgravii* demonstrou-se um método diagnóstico promissor, pois além de ser menos invasivo, pode ser realizado em animais vivos e permite a identificação de animais que ingeriram a planta há pelo menos um mês (SHOKRY et al., 2017).

Experimentos realizados com plantas dos gêneros *Palicourea* e *Amorimia* demonstraram que há variação em sua toxicidade de acordo com a época do ano e com o estágio vegetativo em que se encontram (brotos, folhas maduras, folhas velhas e sementes) (TOKARNIA et al., 2012; BECKER et al., 2013), contudo não existem estudos que quantifiquem a variação do princípio tóxico nos diferentes estágios vegetativos da planta nas diferentes épocas do ano e seu efeito nos animais. Esse é um aspecto fundamental para a avaliação de risco de ocorrência da intoxicação espontânea, pois a partir do conhecimento das variações do MFA nos diferentes estágios vegetativos da planta e nos diferentes períodos do ano, é possível adotar medidas de manejo que evitem a introdução de animais em áreas com a presença da planta nos momentos em que esta é mais tóxica. Este tipo de estudo se torna ainda mais relevante pelo fato de poder ser aplicado a qualquer espécie de planta que contenha MFA.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

- Determinar a toxicidade dos diferentes estágios vegetativos de *Amorimia pubiflora* em ovinos

2.2. Objetivos específicos

- Quantificar o princípio ativo e determinar a dose tóxica dos diferentes estágios vegetativos de *A. pubiflora* em ovinos.
- Identificar épocas ou condições de maior risco de ocorrência de intoxicações por *A. pubiflora*.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1. Plantas que causam morte súbita em animais de produção

Plantas que causam morte súbita em animais de produção pertencem às famílias Fabaceae, Rubiaceae, Bignoniaceae, Malpighiaceae e Dichapetalaceae. São encontradas na Austrália, África do Sul e América do Sul, onde causam importantes perdas econômicas na pecuária. O princípio tóxico identificado em várias destas plantas é o monofluoracetato (MFA) (KELLERMAN et al., 2005; LEE et al., 2012; TOKARNIA et al., 2012; LEE et al., 2014).

Plantas da família Fabaceae, pertencentes aos gêneros *Gastrolobium* e *Oxylobium*, são encontradas, respectivamente, no sudoeste da Austrália e Austrália oriental. Casos de intoxicação são relatados em bovinos, ovinos, caprinos e equinos. Na África do Sul, a principal causa de morte súbita em animais de produção é a intoxicação por *Dichapetalum cymosum* (gifblaar), que pertence à família Dichapetalaceae (KELLERMAN et al., 2005; LEE et al., 2014).

No Brasil, mortes súbitas em rebanhos estão associadas ao consumo de plantas que pertencem às famílias Rubiaceae (gênero *Palicourea*), Bignoniaceae (*Arrabidaea bilabiata*, *A. japorensis* e *Pseudocalymma elgans*) e Malpighiaceae (*Mascagnia* spp., *Amorimia* spp. e *Niedenzuella stannea*) (TOKARNIA et al., 2012; CALDEIRA et al., 2016; CARVALHO et al., 2016; LIMA et al., 2016).

P. marcgravii apresenta alta toxicidade e ampla distribuição territorial. É conhecida como “cafezinho”, “erva de rato”, “café-bravo”, “erva-café”, “roxa”, “roxinha” e “vick” nas diversas regiões do Brasil em que está presente (TOKARNIA et al., 2012). Os surtos de intoxicação por esta planta ocorrem quando bovinos têm acesso às orlas de matas ou capoeiras onde a planta está presente e não estão

relacionados à escassez de alimentos, pois a planta é considerada bastante palatável (TOKARNIA et al., 2012).

A. bilabiata, *A. japurensis* e *Pseudocalymma elgans* estão restritas às regiões do Amazonas e Roraima (*A. bilabiata* e *A. japurensis*) e Rio de Janeiro (*Pseudocalymma elgans*). Apesar de causar quadros de morte súbita, em *P. elegans* ainda não foi detectada a presença de monofluoracetato (TOKARNIA et al., 2012; LIMA et al., 2016; SANTOS-BARBOSA et al., 2017).

Plantas dos gêneros *Amorimia* e *Mascagnia* são cipós ou arbustos distribuídos amplamente no Brasil e presentes em outros países da América do Sul como Peru, Bolívia, Colômbia e Guiana (ANDERSON, 2006). Algumas espécies de *Amorimia* associadas a surtos de morte súbita em animais de produção no Brasil como *A. amazonica*, *A. exotropa*, *A. pubiflora*, *A. rigida*, *Amorimia* sp. (complexo *Mascagnia rigida*; *Mascagnia* aff. *rigida*) e *A. septentrionalis* pertenciam ao gênero *Mascagnia* e foram reclassificadas com base em características morfológicas e moleculares. Ainda que pertençam ao mesmo gênero, não há relatos de intoxicação por *A. kariniana*, *A. maritima* e *A. velutina*, nem a detecção de monofluoracetato até o momento (LEE et al., 2012). *A. amazonica* também habita regiões do Peru e Bolívia, porém não há relatos de intoxicação nestes países (DUARTE et al., 2013).

Casos de morte súbita ocasionados por plantas do gênero *Amorimia* ocorrem principalmente no início do período chuvoso, época que propicia a brotação da planta em meio à pastagem ainda seca e conseqüentemente sua ingestão pelos animais. Casos de intoxicação por *A. exotropa* são descritos em qualquer época do ano, porém se concentram mais no período de maio a agosto, quando há escassez de forragem na região sul do Brasil. Experimentos utilizando *A. pubiflora* demonstraram que no período da seca, quando a planta se encontra no processo de brotação, frutificação e floração, sua dose tóxica é de 5 g/kg, enquanto que no final da época de chuvas, quando as folhas estão maduras, a dose tóxica é de 20 g/kg (TOKARNIA et al., 2012; DUARTE et al., 2013).

Niederzuehlla stannea, conhecida como “erva”, foi recentemente relatada como causa de morte súbita em propriedades próximas ao Rio Araguaia e seus afluentes na região leste de Mato Grosso. As mortes são relatadas durante o período seco, quando a pastagem e outras plantas invasoras estão prejudicadas e *N. stannea* encontra-se em fase de brotação (CALDEIRA et al., 2016). Esta planta

também é encontrada na Costa Rica, Panamá, Bolívia e Paraguai (ANDERSON, 2006).

3.2. Monofluoracetato

Monofluoracetato é um sal branco, inodoro, estável, solúvel em água, altamente tóxico para mamíferos inclusive o homem (OSWEILER, 1998). Este composto foi sintetizado pela primeira vez na Bélgica em 1896 e posteriormente descoberto como princípio tóxico de plantas (CHENOWETH, 1949; EISLER, 1995) e ao longo dos anos passou a ser conhecido como ácido monofluoracético, monofluoracetato de sódio, fluoracetato, composto 1080 ou “mão branca” (CLARKE, 1991).

Este composto age impedindo a respiração celular e consequentemente a produção energética das células. Fisiologicamente, a produção energética celular ocorre nas mitocôndrias através do Ciclo de Krebs. Este ciclo consiste basicamente da oxidação de glicose e outros açúcares, ácidos graxos e aminoácidos a CO_2 e H_2O com consequente produção de energia (ATP) (NELSON; COX, 2002). O fluorocitrato, metabólito tóxico deste composto, se liga a acetil-CoA formando fluoracetil-CoA. Também reage com o oxaloacetato formando o fluorocitrato e este por sua vez bloqueia a enzima aconitase impedindo a transformação de citrato em isocitrato (GONCHAROV et al., 2005).

Com a interrupção da transformação de citrato em isocitrato, este primeiro se acumula nos tecidos e no sangue exercendo papel importante na patogenia desta intoxicação (BUFFA; PETERS, 1949). O citrato tem efeito quelante sobre o cálcio gerando hipocalcemia e a principal consequência deste fato é o prolongamento do intervalo Q-T no ecocardiograma alteração associada ao risco de arritmias ventriculares (CHENOWETH; GILMAN, 1947).

Animais intoxicados também apresentam aumento da glicemia devido ao aumento dos níveis de cortisol. Este aumento de cortisol ocorre pela falta de metabolização hepática deste hormônio devido à diminuição da disponibilidade de ATP para os hepatócitos (BALLARD; HYDE, 1967).

Todas as espécies são susceptíveis à intoxicação por monofluoracetato, porém demonstram níveis de sensibilidade diferentes. Sabe-se que canídeos são os mais sensíveis, enquanto aves, anfíbios e o homem toleram doses maiores desta substância (CHENOWETH; GILMAN, 1947).

A identificação e dosagem de monofluoracetato em amostras de plantas é possível através de técnicas de análise como cromatografia em camada delgada, espectroscopia por ressonância magnética nuclear flúor19 (^{19}F NMR), HPLC-APCI-MS e cromatografia gasosa - espectrometria de massa (GC – MS) (OLIVEIRA, 1963; BARON et al., 1987; LEE et al., 2012; SANTOS-BARBOSA et al., 2017).

Lee et al. (2012) quantificaram o monofluoracetato presente em amostras de *Amorimia*, *Mascagnia* e *Palicourea* através da técnica HPLC-APCI-MS e verificaram que há maior teor de monofluoracetato em amostras de *Palicourea* spp. quando comparadas às de *Amorimia* spp. Relataram ainda que existe variação no teor de monofluoracetato em amostras de uma mesma planta colhidas em diferentes localizações.

3.3. Alterações clínicas e patológicas causadas por plantas que contêm monofluoracetato

Os sinais clínicos observados em animais que ingerem plantas que contêm monofluoracetato têm início ou agravam-se quando os animais são submetidos a esforço físico. Estes consistem em tremores musculares generalizados, respiração irregular, taquicardia, veias jugulares ingurgitadas e pulsantes, incoordenação motora, decúbito e morte em poucos minutos. Em outros casos, não são observados sinais clínicos e os animais são encontrados mortos (PAVARINI et al., 2011; TOKARNIA et al., 2012; DUARTE et al., 2013; ALBUQUERQUE et al., 2014).

Animais intoxicados por plantas do gênero *Palicourea* geralmente não apresentam lesões macroscópicas ou estas são pouco específicas, como congestão de grandes vasos, da mucosa intestinal e edema pulmonar. A lesão histológica considerada altamente sugestiva de intoxicação por esta planta é a degeneração hidrópico-vacuolar dos túbulos uriníferos contornados distais com picnose nuclear, observada em até 50% dos casos (TOKARNIA et al., 2012).

Alterações macroscópicas podem não ocorrer em intoxicações por *Amorimia* spp, mas em alguns casos são vistas lesões compatíveis com insuficiência cardíaca, caracterizadas por mucosas cianóticas, petéquias e equimoses no epicárdio, ingurgitamento jugular, hidropericárdio, coágulos no interior do ventrículo esquerdo, edema pulmonar, congestão hepática e do trato gastrointestinal (PAVARINI et al., 2011; DUARTE et al., 2013). Na intoxicação natural por *A. exotropa*, Bandinelli et al. (2014) descreveram áreas brancas a avermelhadas no miocárdio, principalmente no músculo papilar.

Anteriormente, a única lesão descrita no exame histopatológico de animais intoxicados por espécies de *Amorimia* era a degeneração hidrópico-vacuolar das células epiteliais dos túbulos contornados dos rins (TOKARNIA et al., 2012), porém estudos recentes demonstraram que necrose de coagulação dos cardiomiócitos acompanhada ou não de infiltrado inflamatório mononuclear e fibrose intersticial são lesões encontradas no coração (PAVARINI et al., 2011; DUARTE et al., 2013; ALBUQUERQUE et al., 2014; BANDINELLI et al., 2014). Nestes casos a imuno-histoquímica tem sido associada à histopatologia para detectar lesões cardíacas através da ausência de marcação citoplasmática para o anticorpo anti-troponina C (BANDINELLI et al., 2014).

3.4. Diagnóstico

Casos em que não há histórico prévio ou quando os animais são encontrados mortos podem ficar sem diagnóstico, já que informações epidemiológicas são indispensáveis nestes casos. Na maioria dos casos não são observadas alterações macroscópicas durante as necropsias e alterações microscópicas, como a degeneração hidrópico-vacuolar das células epiteliais dos túbulos contornados dos rins, ocorrem em até 50% dos casos (TOKARNIA et al., 2012). Desta forma, os surtos em que os animais são encontrados mortos sem a observação de morte súbita após exercício e sem estas lesões, frequentemente permanecem sem diagnóstico. A autólise também pode dificultar a interpretação destas lesões degenerativas nos rins. Outros estudos descrevem a ocorrência de lesões cardíacas que às vezes não são visíveis macro e microscopicamente e, nestes casos, a imuno-histoquímica é uma ferramenta bastante utilizada

juntamente com a histopatologia para detecção precisa da extensão das lesões (BANDINELLI et al., 2014).

Shokry et al. (2017) obtiveram sucesso na detecção de monofluoracetato na cera da orelha de bovinos intoxicados experimentalmente por *P. marcgravii*. Este método permite a detecção desta substância até um mês após o consumo e permite realizar a pesquisa de monofluoracetato em amostra biológica de animais vivos.

A presença das plantas nas pastagens com evidência de consumo pelos animais e o histórico de morte súbita são conclusivos para o diagnóstico de intoxicação por estas plantas (TOKARNIA et al., 2012).

3.5. Tratamento

O tratamento de animais intoxicados por plantas que contêm MFA é bastante difícil, uma vez que esta substância age rapidamente no organismo e na maioria das vezes os animais são encontrados mortos (TOKARNIA et al., 2012). Estudos em cobaias e pequenos animais demonstraram que gluconato de cálcio, tiosulfato de magnésio, etanol, monoacetato de glicerol e acetamida podem agir como antídotos na intoxicação por MFA (HUTCHENS et al., 1949; CHENOWETH et al., 1951; PEREIRA ; PEREIRA, 2005; COLLICCHIO-ZUANAZE et al., 2005; PEIXOTO et al., 2011).

A acetamida foi testada em ovinos e caprinos experimentalmente intoxicados por *Pseudocalymma elegans* e em bovinos intoxicados por *Palicourea. marcgravii* e monofluoracetato no Brasil. Em todos os casos esta substância demonstrou-se eficaz na proteção dos animais quando administrada na dose de 2g/kg, por via oral, ao mesmo tempo ou logo após a ingestão das plantas, entretanto, seu efeito não é duradouro (HELAYEL et al., 2011; PEIXOTO et al., 2012). Seu uso é considerado inviável a campo por alguns fatores como: dificuldade na observação dos sinais clínicos para o tratamento, alto custo e difícil aquisição (PEIXOTO et al., 2012).

3.6. Métodos para prevenção de intoxicação por plantas que causam morte súbita

Devido às dificuldades encontradas no controle e tratamento das intoxicações por estas plantas, métodos alternativos como a aversão alimentar

condicionada estão sendo estudados (BARBOSA et al., 2008; OLIVEIRA et al., 2014). Os modelos de aversão condicionada se baseiam na administração de cloreto de lítio após a ingestão espontânea da planta pelos animais, que associam o mal-estar causado por esta substância ao sabor da planta e passam a evitar seu consumo (RALPHS et al., 2001). Esta técnica reduziu drasticamente ou evitou que ovinos e caprinos consumissem *Palicourea* spp. e *Amorimia* spp. em condições experimentais (BARBOSA et al., 2008; OLIVEIRA et al., 2014). Apesar dos resultados promissores, a técnica se torna inviável quando se tem uma grande quantidade de animais ou quando há necessidade de os mesmos ingerirem plantas tóxicas devido à falta de alimento. Outro fator que pode contribuir para o insucesso da técnica é a facilitação social, ou seja, a introdução de animais não condicionados no rebanho pode fazer com que os já condicionados passem a consumir a planta novamente (RALPHS, 1997; KIMBALL et al., 2002).

Outra metodologia alternativa é a indução de resistência através da administração de doses não tóxicas de MFA ou de plantas que causam morte súbita. Em ruminantes, acredita-se que o fornecimento de doses não letais de MFA ou de plantas com este princípio tóxico possa auxiliar a proliferação de bactérias que degradam MFA naturalmente presentes no rúmen (CAMBOIM et al., 2012; DUARTE et al., 2013; OLIVEIRA et al., 2013).

O fornecimento de doses crescentes não tóxicas de *Palicourea aneofusca*, *Amorimia septentrionalis* e *Amorimia pubiflora* a caprinos e ovinos foi capaz de tornar estes animais resistentes a doses tóxicas destas plantas (DUARTE et al., 2013; OLIVEIRA et al., 2013; BECKER et al., 2016). No caso das espécies de *Amorimia* houve transferência da resistência através da transfaunação ruminal (DUARTE et al., 2013; BECKER et al., 2016). Por outro lado, a tentativa de indução de resistência com doses não letais de MFA não obteve sucesso. Apesar disso, este estudo demonstrou a existência de animais naturalmente resistentes à intoxicação por esta substância (SANTOS et al., 2014)

A inoculação intrarruminal de bactérias com capacidade de degradar MFA isoladas do rúmen de caprinos (*Ancylobacter dichloromethanicus* e *Pigmentiphaga kullae*) e do solo e das folhas de plantas que contêm MFA (*Ralstonia* sp., *Burkholderia* sp., *Paenibacillus* sp. e *Cupriavidus* sp.) foi capaz de induzir resistência à intoxicação por *Amorimia septentrionalis* em caprinos, porém a

manutenção da resistência adquirida só é possível com a contínua ingestão das bactérias (PESSOA et al., 2015; SILVA et al., 2016).

Na Austrália, cepas de *Butyrivibrio fibrisolvens* foram modificadas para atividade dehalogenase através da introdução de um gene (plasmídeo pBHf). As cepas de *Butyrivibrio fibrisolvens* geneticamente modificadas foram fornecidas a ovinos e, após o estabelecimento desta população bacteriana, os animais receberam MFA. Os animais que receberam as bactérias não desenvolveram sinais clínicos ou apresentaram sinais leves de intoxicação quando comparados ao grupo controle (GREGG et al., 1998).

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBUQUERQUE, S.S.C.; ROCHA, B.P.; ALMEIDA, V.M. et al. Fibrose cardíaca associada à intoxicação por *Amorimia septentrionalis* em bovinos. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.34, n.5, p.433-437, 2014.

ANDERSON, W. R. Eight Segregates from the Neotropical Genus *Mascagnia* (Malpighiaceae). **Novon**, v.16, p.168-204, 2006.

BALLARD, C. L.; HYDE, P. M. Effect of insulin on blood glucose and corticosterone levels in sodium fluoroacetate induced diabetes. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, v. 124, n. 1, p. 317-320, 1967.

BANDINELLI M.B.; BASSUINO D.M.; FREDO, G. et al. Identificação e distribuição de lesões cardíacas em bovinos intoxicados por *Amorimia exotropa*. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.34, n. 9, p. 837-844, 2014.

BARBOSA, R.R.; SILVA, I.P.; SOTO-BLANCO, B. Development of conditioned taste aversion to *Mascagnia rigida* in goats. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.28, n.12, p. 571-574, 2008.

BARON, M. L.; BOTHROYD, C.M.; ROGERS, G.R. et al. Detection and measurement of fluoroacetate in plant extracts by ¹⁹F-NMR. **Phytochemistry**, v. 26. n. 8, p. 2293-2295, 1987.

BECKER, M.; CALDEIRA, F.H.B.; CARNEIRO, F.M. et al. Importância da intoxicação por *Amorimia pubiflora* (Malpighiaceae) em bovinos em Mato Grosso: reprodução experimental da intoxicação em ovinos e bovinos. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.33, n.9, p.1049-1056, 2013.

BECKER, M.; CARNEIRO, F. M.; OLIVEIRA, L. P. D. et al. Induction and transfer of resistance to poisoning by *Amorimia pubiflora* in sheep with non-toxic dosis of the plant and ruminal content. **Ciência Rural**, n.46, p.674-80, 2016.

BUFFA, P.; PETERS, R. A. Formation of citrate *in vivo* induced by fluoroacetate poisoning. **Nature**, v. 163, p. 914, 1949.

CAMBOIM, E.K.A.; ALMEIDA, A.P.; TADRA-SFEIR, M.Z. et al. Isolation of sodium fluoroacetate degrading bacteria from caprine rumen in Brazil. **Scientific World Journal**, v.2012, p.178 254, 2012.

CALDEIRA, F.B.; DIAS, G.B; ARRUDA, F.P. et al. Sudden death associated with *Niederzuehlla stannea* (Malpighiaceae) in cattle in the State of Mato Grosso, Brazil: importance and epidemiological aspects. **Pesquisa. Veterinária Brasileira**, v.36, p.147-149, 2016.

CARVALHO, F.K.; COOK, D.; LEE, S.T. et al. Determination of toxicity in rabbits and corresponding detection of monofluoroacetate in four *Palicourea* (Rubiaceae) species from the Amazonas state, Brazil. **Toxicon**, v.109, p. 42-44, 2016.

CHENOWETH M.B. Monofluoroacetic acid and related compounds. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v.1, p.383-424, 1949.

CHENOWETH, M. B.; KANDEL, A.; JOHNSON, L.B. et al. Factors influencing fluoroacetate poisoning- practical treatment with glycerol monoacetate. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 102, p. 31-49, 1951.

CHENOWETH, M.B.; GILMAN, A. Studies on the pharmacology of fluoroacetate. I. Species responses to fluoroacetate. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 87, 90-103, 1947.

CLARKE D.D. Fluoroacetate and fluorocitrate: Mechanism of action. **Neurochemical Research**, v.16, n.9, p.1055-1058, 1991.

COLLICCHIO-ZUANAZE, R. C.; SAKATE, M. Aspectos clínicos e terapêuticos da intoxicação por fluoroacetato de sódio em animais domésticos: revisão. **Veterinária Notícias**, v. 11, n. 2, p. 81-89, 2005.

DUARTE, A.L.L.; MEDEIROS, R.M.T.; CARVALHO, F.K.L. et al. Induction and transfer of resistance to poisoning by *Amorimia* (Mascagnia) *septentrionalis* in goats. **Journal of Applied Toxicology**, v.34, n.2, p.220-223, 2013.

EISLER, R. Sodium monofluoroacetate (1080) hazards to fish, wildlife, and invertebrates: A synoptic review. Patuxent Environmental Science Center, U.S. National Biological Service Biological Report, 1995. 52 p.

GONCHAROV, N. V.; JENKINS, R. O.; RADILOV, A. S. Toxicology of fluoroacetate: a review, with possible directions for therapy research. **Journal of Applied Toxicology**, v. 26, n. 2, p. 148-161, 2005.

GREGG, K.; HAMDORF B.; HENDERSON K. et al. Genetically modified ruminal bacteria protect sheep from fluoroacetate poisoning. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 64, n. 9, p. 3496-3498, 1998.

HELAYEL, M.A.; CALDAS, S.A.; PEIXOTO, T.C. et al. O antagonismo com acetamida em experimentos com ovinos, caprinos e coelhos indica monofluoroacetato como princípio tóxico de *Pseudocalymma elegans* Bignoniaceae. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 31, n.10, p. 867-74, 2011.

HUTCHENS, J.; WAGNER, H.; PODOLSKY, B. et al. The effect of ethanol and various metabolites on fluoroacetate poisoning. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutic**, v. 95, p. 62-70, 1949.

KELLERMAN, T. S.; COETZER, J. A.W.; NAUDE, T. W.; BOTHA, C. J. Cardiovascular system. In: Plant Poisonings and Mycotoxicoses of Livestock in Southern Africa, 2005, p 146–153.

KIMBALL B.A.; PROVENZA F.D.; BURRITT E.A. Importance of alternative foods on the persistence of flavor aversions: implications for applied flavor avoidance learning. **Applied Animal Behaviour Science**, v. 76, p.249-258, 2002.

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

LEE, S. T.; COOK, D.; PFISTER, J. A. et al. Monofluoroacetate-containing plants that are potentially toxic to livestock. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.62, p.7345–7354, 2014.

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

LIMA, E. F.; MEDEIROS, R.M.T.; COOK, D. et al. Studies in regard to the classification and putative toxicity of *Fridericia japurensis* (*Arrabidaea japurensis*) in Brazil. **Toxicon**, v.115, p.22-27, 2016.

NELSON, D. L.; COX, M. O Ciclo do Ácido Cítrico. In: NELSON, D. L.; COX, M. (Org.). *Lehninger – Princípios de Bioquímica*, 2002. p. 441-464.

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

OLIVEIRA, M. M. Chromatographic isolation of monofluoroacetic acid from *Palicourea marcgravii* St. Hil. **Experientia**, v. 19, p. 586, 1963.

OLIVEIRA, M.D.; RIET-CORREA, F.; CARVALHO, F.K.L. et al. Indução de resistência à intoxicação por *Palicourea aeneofusca* (Rubiaceae) mediante

administração de doses sucessivas não tóxicas. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.3, n.6, p.731-734, 2013.

OLIVEIRA, M.D.; RIET-CORREA, F.; SILVA, G.B. et al. Aversão alimentar condicionada para o controle da intoxicação por *Palicourea aeneofusca*. **Ciência Rural**, v. 44, n. 7, p. 1246-1248, 2014.

OSWEILER, G.D. Raticidas. In: OSWEILER, G.D. (Org) Toxicologia Veterinária, 1998, p. 315-317.

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

PEIXOTO, T.C.; NOGUEIRA, V.A.; CALDAS, S.A. et al. Efeito protetor da acetamida em bovinos indica monofluoroacetato como princípio tóxico de *Palicourea marcgravii* (Rubiaceae). **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.32, n.4, p. 219-328, 2012.

PEIXOTO, T.C.; OLIVEIRA, L.I.; CALDAS, S.A. et al. Efeito protetor da acetamida sobre as intoxicações experimentais em ratos por monofluoroacetato de sódio e por algumas plantas brasileiras que causam morte súbita. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.31, n.11, p. 938-52, 2011.

PEREIRA, N. A.; PEREIRA, S. M. N. Contribuição ao estudo de plantas tóxicas e seus antagonistas: erva-de-rato, a Rubiaceae, *Palicourea marcgravii*. **Revista Brasileira de Farmácia**, v. 86, n. 3, p. 109-11, 2005.

PESSOA, D.A.N.; SILVA, L.C.A.; LOPES, J.R.G. et al. Resistência à intoxicação por *Amorimia septentrionalis* em caprinos, induzida pela inoculação ruminal das bactérias *Pigmentiphaga kullae* e *Ancylobacter dichloromethanicus*. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.35, n.2, p.115-128, 2015.

RALPHS M.H. Long term retention of aversions to tall larkspur in naive and native cattle. **Journal of Range Management**. v. 50, p. 367-370, 1997.

RALPHS M.H. Plant toxicants and livestock: prevention and management. In: HUI Y.H., SMITH R.A. & SPOERKE JR D.G. (Org.). Foodborne Disease Handbook, 2001, p.441-470.

SANTOS, A.C.; RIET-CORREA, F.; HECKLER, R.F. et al. Administração repetida de doses não tóxicas de monofluoroacetato de sódio não protege contra a intoxicação por este composto em ovinos. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.34, n.7, p.649-654, 2014.

SANTOS-BARBOSA, J. M.; LEE, S.T.; COOK, D. et al. A Gas Chromatography–Mass Spectrometry Method for the Detection and Quantitation of Monofluoroacetate in Plants Toxic to Livestock. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.65, n.7, p.1428-1433, 2017.

SHOKRY, E.; SANTOS, F.C.; CUNHA, P.H.J. et al. Earwax: A clue to discover fluoroacetate intoxication in cattle. **Toxicon**, v.137, p.54–57, 2017.

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

TOKARNIA, C.H., BRITO, M. DE F., BARBOSA, J.D. et al. Plantas Toxicas do Brasil para as Animais de Produção, 2012.

ARTIGO 1 - Toxicity of the different vegetative stages of *Amorimia pubiflora* to sheep

Stephanie C. Lima, Kelly C.S. Godoy, Stephen T. Lee, Jim Pfister, Alda I Souza, Claudio S. L. de Barros, Ricardo A. A. de Lemos

(Artigo submetido para revista **Toxicon**)

Toxicity of the different vegetative stages of *Amorimia pubiflora* to sheep

Stephanie C. Lima^a, Kelly C.S. Godoy^b, Stephen T. Lee^c, Jim Pfister^c, Alda I Souza^d, Claudio S. L. de Barros^e, Ricardo A. A. de Lemos^e

^aPrograma de pós-graduação em Ciências Veterinárias, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FAMEZ), Universidade Federal do Mato Grosso do Sul (UFMS), Av. Senador Felinto Muller, 2443, Campo Grande, MS, 79070-900, Brazil. Electronic address: stephanie_k_lima@hotmail.com

^bPrograma de pós-graduação em Ciências Veterinárias, FAMEZ, UFMS, Av. Senador Felinto Muller, 2443, Campo Grande, MS, 79070-900, Brazil. Electronic address: k.c.s.godoy@gmail.com

^cPoisonous Plant Research Laboratory, Agricultural Research Service, United States Department of Agriculture, 1150 E. 1400 N., Logan, UT 84341, USA.

^dLaboratório de Patologia Clínica Veterinária, FAMES, UFMS, Av. Senador Felinto Muller, 2443, Campo Grande, MS, 79070-900, Campo Grande, MS, Brasil.

^eLaboratório de Patologia Veterinária (LAP) FAMEZ, UFMS, Av. Senador Felinto Muller, 2443, Campo Grande, MS, 79070-900, Campo Grande, MS, Brasil.

ABSTRACT

Toxic plants containing monofluoroacetate (MFA) cause sudden death in production animals in Australia, South Africa and Brazil causing economic losses to producers. This objective of this study was to determine the amount of MFA present in seedlings, mature leaves, old leaves, and seeds of *Amorimia pubiflora* harvested at different times of the year and to determine their toxic effect on sheep. Samples of *Amorimia pubiflora* were collected during the months of April, August and December of 2015 and March of 2016, separated according to the vegetative stage (seedlings, seeds, mature leaves, and old leaves), dried in a drying oven, and administered in daily doses of 5 g/kg body weight of fresh leaves to sheep through ruminal cannulae. The experiment was divided into four stages according to the time of collection of the plant so that in each stage one sheep received a different vegetative stage of the plant (seedlings, mature leaves, and old leaves). Only in the second stage of the experiment was it possible to collect *A. pubiflora* seeds and these were administered using the same method used for the administration of the leaves. The sheep were dosed with the plant until the animals showed clinical signs of toxicosis or until the plant was unavailable. Aliquots of leaves and seeds of *A. pubiflora* dosed to sheep were analyzed for MFA concentration. The seeds and seedlings had higher concentrations of MFA than the mature (collected in August and December) and old leaves (collected in December). However, all vegetative stages of the plant were

toxic and caused fatal poisoning. The results of our study showed that *A. pubiflora* is toxic to sheep even when MFA concentrations are low, demonstrating the presence of this substance is a risk factor for the occurrence of poisoning. Knowing the toxic principle and its variations allows us to determine the pathogenesis of plant toxicosis as well as the conditions of occurrence, possible treatments, control, and prophylaxis, contributing significantly to the reduction of economic losses in farms due to plant poisoning.

Keywords: Toxic plants, Monofluoracetate, *Amorimia pubiflora*, Sudden Death, Sheep.

INTRODUCTION

Toxic plants that cause sudden death in farm animals are found mainly in countries such as Australia, South Africa and Brazil, causing significant economic losses (Lee et al., 2014). The toxic principle detected in most of these plants is monofluoracetate (MFA). MFA can be detected and quantified by the HPLC-APCI-MS method reported by Lee et al. (2012), a method that was previously used for the analysis of sodium monofluoroacetate in food and adapted for MFA analysis in plants material.

The toxicity of MFA is the result of the action of its active metabolite, fluorocitrate, produced by the "lethal synthesis", which interrupts the Krebs cycle and the production of adenosine triphosphate (ATP), damaging organs with higher metabolic rates, such as the heart (Krebs et al., 1994, Santos et al., 2014).

In Australia, plants that contain MFA belong to the genera *Gastrolobium* and *Oxylobium*, are widely distributed throughout the country, and affect cattle, sheep, goats, and horses; these plants are considered important causes of economic losses for farmers (Lee et al., 2014). In South Africa, *Dichapetalum cymosum*, also known as "gifblaar", is considered the third most important toxic plant in the area, accounting for 8% of cattle deaths caused by plants and mycotoxins (Kellerman et al., 2005).

In Brazil, it is estimated that 50% of cattle deaths caused by plants are due to the ingestion of species that contain MFA. Among these, plants of the genera *Palicourea* and *Amorimia* stand out as the most important ones since they have a wide geographical distribution and are palatable. MFA was detected in *P.*

marcgravii, *P. aenefusca*, *P. amapaensis*, *P. grandiflora*, *P. aff. Juruana*, *P. longiflora*, *P. aff. longiflora*, *P. macarthurorum*, *P. nigricans*, *P. vacillans*, *P. barraensis*, *A. amazonica*, *A. camporum*, *A. exotropica*, *A. pubiflora*, *A. rigida*, *A. septentrionalis* and *Tanaecium bilabiatum*. *Pseudocalymma elegans* has been reported to cause sudden death but MFA was not found in this toxic plant (Lee et al., 2012, Tokarnia et al., 2012).

The presumptive diagnosis of poisoning by MFA or plants with this toxic principle is based on the history, clinical signs, presence of plants in the farm, and necropsy findings. Confirmation can be made by histopathology if hydropic-vacuolar degeneration in the distal convoluted tubules of the kidneys is present, and by detecting the toxic principle in biological samples. However, confirmation by these methods is difficult since the kidneys from these affected animals do not always have these microscopic changes and the half-life of MFA is short in the organism which limits its identification period in biological samples (Nogueira et al., 2011; Tokarnia et al., 2012). Recently, the detection of MFA in the ear wax of experimentally poisoned cattle with *P. marcgravii* has been shown to be a promising diagnostic method. It is less invasive and can be performed in live animals allowing the identification of animals that have ingested the plant at least 1 month ago (Shokry et al., 2017).

Experiments with plants of the genera *Palicourea* and *Amorimia* showed that there is variation in their toxicity according to the time of the year and the vegetative stage (seedlings, mature leaves, old leaves, and seeds) (Tokarnia et al., 2012 Becker et al. 2013), however, to date there are no studies that measured the variation of the toxic principle in the different vegetative stages of the plant at different times of the year and its toxic effect on animals. This is a fundamental aspect for the evaluation of the risk of the occurrence of natural poisoning in farm animals. Based on information on the variations of the MFA in the different vegetative stages of the plant and in the different periods of the year, it is possible to implement management measures that would prevent the introduction of animals in areas where the plant is present during the time of the year when it is more toxic. This type of study is even more relevant because it can be used for any plant species containing MFA that causes “sudden death” in large animals.

The objective of this study was to determine the amount of MFA present in seedlings, mature leaves, old leaves, and seeds of *Amorimia pubiflora* collected at different times of the year and to determine their toxic effect on sheep.

MATERIAL AND METHODS

Samples of *A. pubiflora* used in this study were collected at a farm which is lat 20° 24 '32.56"S, 56° 20' 31.85"O in the county of Miranda, Mato Grosso do Sul, Brazil, and botanically identified at the Federal University of Mato Grosso do Sul, Brazil, where outbreaks of poisoning by the plant were reported by the owner. The plants were botanically identified as *A. pubiflora* at the Federal University of Mato Grosso do Sul. To standardize the plant sampling, areas with high plant density were fenced to prevent access of cattle. The sampling areas were plowed with a sickle, then the vegetation was allowed to regrow for 60 days. After this period, plants were sampled every 4 months.

The experimental study was conducted in four periods according to the time of plant sampling (04/2015, 08/2015, 12/2015 and 03/2016). All the procedures described below were repeated in each of these periods. The time between plant sampling and the beginning of the experiments ranged from 14 to 35 days.

At each sampling, leaves were separated into seedlings (light green, small, soft leaves located in the most apical portion of the plant), mature leaves (light green, medium size leaves, slightly more fibrous than the seedling leaves, located in the intermediate portion of the plant), and old leaves (dark green, large, fibrous leaves located in the basal portion of the plant). When present, the seeds were also collected. All plant and seed samples were stored in plastic bags, packed in styrofoam boxes with bags of ice, and transported to the Federal University of Mato Grosso do Sul (UFMS) in Campo Grande, MS, Brazil, where they were dried in an drying oven at 55 ° C for 72 hours. Subsequently, desiccated (dry) leaves and seeds were ground in a 2 mm sieve mill and stored in sealed plastic bags. For the calculation of water loss, 1 kg of fresh leaves of each category or seeds were weighed prior to and after desiccation (drying) and the percentage of weight reduction was used in the calculation of the doses to be administered to experimental sheep.

Aliquots of the desiccated plant were shipped to the United States Department of Agriculture Agricultural Research Service, Poisonous Plant Research Laboratory, Logan, UT, USA for analysis of monofluoroacetate.(Lee et al., 2012).

All sheep used in this study were naïve originated from areas with no plants that cause sudden death. These were adult, mixed breed animals, weighing between 23 and 51 kg, that received anthelmintics before the experimental study started (Ripercol®). Animals were kept in 2.0 m² individual stalls with screens, and ground floor, and were fed ovine commercial ration (equivalent to 1% of the body weight), corn silage, mineral salt, and water *ad libitum*. Each animal was subjected to a thorough physical examination prior to receiving the plant. A second physical examination was performed when the animal started showing clinical signs of toxicosis.

To assess the toxicity of each stage of the plant, the desiccated plant was administered to one sheep in daily doses equivalent to 5 g/kg of fresh leaves via a ruminal cannula. Administration of the plant was stopped if the animal showed clinical signs of toxicosis or when the plant samples were not available anymore.

Sheep that died were necropsied and samples from all organs were collected and fixed in 10% buffered formalin. Formalin-fixed samples were trimmed and routinely processed for histopathology.

The research proposal/experimental study was approved by the Committee on Animal Research and Ethics (CEUA) of UFMS and filed under No. 537/2013.

RESULTS

All the vegetative stages of the plant were toxic to sheep during the experimental period. The seeds and seedlings were more toxic than the other parts of the plant. The concentrations of monofluoroacetate in *Amorimia pubiflora* according to the vegetative stages and periods of the year, dose of the plant administered to each ovine, and clinical outcome are shown in Table 1.

At all stages, sheep fed mature and old leaves received the largest number of doses. This is due to the greater availability of mature and old leaves of *A. pubiflora* present in the areas that were fenced for collection, which were always more numerous than the number of seedlings. Only in August 2015 were seeds

collected, which proved to be the most toxic part of the plant with a higher concentration of MFA compared to the leaves and a lethal dose of 5 g / kg.

With the exception of sheep 4, all the animals that were dosed seedlings died regardless of the period of the year. Among the sheep that were dosed old leaves, only sheep 10 died. All animals that showed clinical signs of poisoning succumbed to death. Clinical disease lasted between 2.5 and 96 h. Major clinical signs were apathy, anorexia, sternal recumbency, muscle tremors, incoordination, and falls.

Gross lesions at necropsy included mild cyanosis of the oral mucosa, engorged (congested) of large caliber blood vessels, mild hydropericardium, and mild to moderate pulmonary edema. No significant microscopic lesions were found in any of the poisoned animals.

DISCUSSION

Amorimia pubiflora was toxic to sheep during all times of the year and at all vegetative stages. The plant was more toxic in December (i.e., summer) when all vegetative stages of the plant caused fatal toxicosis in the experimental animals. The concentration of the toxic principle was higher in the seedlings and seeds, except in August (i.e., late winter/early spring) when the concentration of MFA was higher in the mature leaves. Other authors (Tokarnia et al., 2012, Becker et al., 2013) state that *A. pubiflora* seedlings and seeds are more toxic than other parts of the plant based on the amount of the plant that is necessary to cause fatal poisoning. To date, there are no studies comparing the concentration of the toxic principle in the different vegetative stages.

In the present study, the only time plant seedlings were not toxic was in August. However, in comparing MFA levels found in these seedlings to those in mature and old leaves sampled in December, which caused fatal intoxication, the seedlings collected in August contained 1.5 and 1.3 times more MFA than the mature leaves and old leaves from December, respectively. The fact that sheep did not show any clinical signs of toxicosis after ingesting the seedlings collected in August suggests that other factors besides the concentration of the active principle may be involved in the occurrence of intoxication by this plant. One of these factors is the variation in the individual susceptibility of sheep to MFA, which has already

been demonstrated in experimental studies using plants that contain this same toxic compound (Becker et al., 2013, Oliveira et al. 2013; Barbosa et al. 2015) or the toxic substance itself isolated from the plant (Peixoto et al., 2010, Santos et al., 2014). The lower susceptibility/increased resistance of some animals to MFA is has been attributed to their specific ruminal flora or to the ingestion of bacteria which are able to degrade this toxic substance (Duarte et al. 2013; Oliveira et al. 2013; Pessoa et al. 2015; Silva et al. 2016; Becker et al.2016).

With regard to the results of MFA dosing from plant samples collected in August, we can attribute the larger number of cases of natural poisoning reported in the State of Mato Grosso do Sul, Brazil, between August and September to shortage of forage, and not high concentrations of the toxic principle in the plant. During this period there is lack of forage in pastures and the presence of *A. pubiflora* seedlings also (Tokarnia et al., 2012) which favor the ingestion of the immature stage of the poisonous plant by grazing animals. This observation is essential for the successful control of plant poisoning in farm animals. Adequate management of the diet of grazing cattle on pasture during this period may reduce the risk of toxicosis.

It should be emphasized that in the present study the plant samples were always collected in the same area so that the same plants were sampled several times during the year, favoring budding. This sampling method may not provide reliable results on the variation of MFA contents found in *A. pubiflora* throughout the year under natural conditions. However, in our study, concentrations of MFA that were found in young leaves collected in December are similar to those found in previous studies in which these leaves were evaluated in November in the State of Mato Grosso, Brazil (Becker et al., 2013). Despite the similar concentration of the toxic principle, in our study 20g/kg/body weight of plant had to be dosed to sheep to cause fatal poisoning whereas Becker et al. (2013) reported that 1.5g/kg/body weight caused clinical disease in sheep, and 2 g / kg / body weight caused the death of experimental animals. These data reinforce the fact previously discussed that the amount of the toxic principle in the plant is not the only factor that determines the occurrence of toxicosis. To date, other factors that would determine a lethal dose are unknown.

All sheep that showed clinical signs, even the sheep that received the plant for a longer period of time (18 days), died suddenly and did not have any significant

gross or microscopic lesions. Previous publications mention that even in cases of chronic toxicosis by the plant that death is preceded by an acute, brief terminal stage typical of sudden death which is a disease of peracute clinical course without predictive signs (Schons et al., 2011). In contrast, gross and microscopic lesions are described in chronic cases of MFA toxicosis or by plants that contain this active principle such as *A. sepium*, *A. exotropa*, and *A. septentrionalis* (Schultz et al. 1982; Schons et al. 2011; Soares et al. 2011; Albuquerque et al. 2014) but not in chronic cases of *A. pubiflora* poisoning.

Our results demonstrate that *A. pubiflora* is toxic even when MFA concentrations in the plant are low which demonstrates that the presence of this substance in any plant part or at any plant growth stage would be a risk factor for the occurrence of toxicosis. These findings confirm the importance of the laboratory identification of the active principle of plants that are toxic to farm animals and of their variation of this substance throughout the year in each stage and part of the plant. Information on which toxic principle is present in a plant and the variations in the amounts of this compound in each part and stage of a plant will assist us in the investigation of the pathogenesis of the intoxication, as well as conditions in which intoxication occurs, possible treatment of plant poisoning cases, control, and prophylaxis, contributing significantly to the reduction of economic losses in livestock due to plant poisoning.

REFERENCES

- Albuquerque, S.S.C., Rocha, B.P., Almeida, V.M., Oliveira, J.S., Riet-Correa, F., Lee, S.T., Evêncio Neto, J., Mendonça, F.S., 2014. Fibrose cardíaca associada à intoxicação por *Amorimia septentrionalis* em bovinos. *Pesq. Vet. Bras.* 34(5), 433-437.
- Barbosa, E.F.G., Cardoso, S.P., Cabral Filho, S.L.S., Borges, J.R.J., Lima, E.M.M., Riet-Correa, F., Castro, M.B., 2015. Sinais clínicos e patologia da intoxicação crônica experimental de caprinos por *Palicourea marcgravii*. *Pesq. Vet. Bras.* 35(3), 209-215.

Becker, M., Caldeira, F.H.B., Carneiro, F.M., Oliveira, L.P., Tokarnia, C.H., Riet-Correa, F., Lee, S.T., Colodel, E.M., 2013. Importância da intoxicação por *Amorimia pubiflora* (Malpighiaceae) em bovinos em Mato Grosso: reprodução experimental da intoxicação em ovinos e bovinos. *Pesq. Vet. Bras.* 33 (9), 1049-1056.

Becker, M., Carneiro, F. M., Oliveira, L. P. D., Silva, M. I. V. D., Riet-Correa, F., Lee, S. T., Colodel, E. M., 2016. Induction and transfer of resistance to poisoning by *Amorimia pubiflora* in sheep with non-toxic doses of the plant and ruminal content. *Cienc Rural.* 46, 674-80.

Duarte, A.L.L., Medeiros, R.M.T., Carvalho, F.K.L., Lee, S.T., Cook, D., Pfister, J.A., Costa, V.M.M., Riet-Correa F., 2013. Induction and transfer of resistance to poisoning by *Amorimia* (Mascagnia) *septrionalis* in goats. *J. Appl. Toxicol.* 34(2), 220-223.

Kellerman, T. S.; Coetzer, J. A.W.; Naude, T. W.; Botha, C. J., 2005. *Plant Poisonings and Mycotoxicoses of Livestock in Southern Africa*, 2nd ed.; Oxford University Press: Cape Town, South Africa.

Krebs, H.C., Kemmerling, W., Habermehl, G., 1994. Qualitative and quantitative determination of fluoroacetic acid in *Arrabidaea bilabiata* and *Palicourea marcgravii* by F-NMR spectroscopy. *Toxicon.* 32, 909-913.

Lee, S. T., Cook, D., Pfister, J. A., Allen, J. G., Colegate, S. M., Riet-Correa, F., Taylor, C. M., 2014. Monofluoroacetate-containing plants that are potentially toxic to livestock. *J Agric Food Chem.* 62, 7345–7354.

Lee, S.T., Cook, D., Riet-Correa, F., Pfister, J.A., Anderson, W.R., Lima, F.G., Gardner, D.R., 2012. Detection of monofluoroacetate in *Palicourea* and *Amorimia* species. *Toxicon.* 60, 791-796.

Nogueira, V.A.; Peixoto, T.C.; França, T.N.; Caldas, S.A.; Peixoto, P.V., 2011. Intoxicação por monofluoroacetato em animais. *Pesq. Vet. Bras.* 31(10), 823-838.

Oliveira, M.D., Riet-Correa, F., Carvalho, F.K.L., Silva, G.B., Pereira, W.S., Medeiros, R. M.T., 2013. Indução de resistência à intoxicação por *Palicourea aeneofusca* (Rubiaceae) mediante administração de doses sucessivas não tóxicas. *Pesq. Vet. Bras.* 33(6), 731-734.

Peixoto, T.C., Nogueira, V.A., Coelho, C.D., Veiga, C.C.P., Peixoto, P.V., Brito, M.F., 2010. Avaliações clínico-patológicas e laboratoriais da intoxicação experimental por monofluoroacetato de sódio em ovinos. *Pesq. Vet. Bras.* 30(12), 1021-1030.

Pessoa, D.A.N., Silva, L.C.A., Lopes, J.R.G., Macêdo, M.M.S., Garino Junior, F., Azevedo, S.S., Riet-Correa, F., 2015. Resistência à intoxicação por *Amorimia septentrionalis* em caprinos, induzida pela inoculação ruminal das bactérias *Pigmentiphaga kullae* e *Ancylobacter dichloromethanicus*. *Pesq. Vet. Bras.* 35(2), 115-128.

Santos, A.C., Riet-Correa, F., Heckler, R.F., Lima, S.C., Silva, M.L., Rezende, R., Carvalho, N.M., Lemos, R.A.A., 2014. Administração repetida de doses não tóxicas de monofluoroacetato de sódio não protege contra a intoxicação por este composto em ovinos. *Pesq. Vet. Bras.* 34(7), 649-654.

Schons, S.V., Mello, T.L., Riet-Correa, F., Schild, A.L., 2011. Poisoning by *Amorimia (Mascagnia) septium* in sheep in northern Brazil. *Toxicon.* 57, 781-786.

Schultz, R.A., Coetzer, J.A., Kellerman, T.S., Naudé T.W., 1982. Observations on the clinical, cardiac and histopathological effects of fluoroacetate in sheep. *Onderstepoort J. Vet. Res.* 49(4), 237-245.

Shokry, E., Santos, F.C., Cunha, P.H.J., Fioravanti, M.C.S., Noronha, A.D.F., Pereira, N.Z., Filho, N.R., 2017. Earwax: A clue to discover fluoroacetate intoxication in cattle. *Toxicon.* 137: 54–57.

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

Soares, M.P., Pavarini, S.P., Adrien, M.L., Quevedo, P.S., Schild, A.L., Peixoto, P.V., Farias da Cruz, C.S., Driemeier D., 2011. *Amorimia exotropa* poisoning as a presumptive cause of myocardial fibrosis in cattle. *J. Vet. Diagn. Invest.* 23(6), 1223-1229.

Tokarnia, C.H., Brito, M. de F., Barbosa, J.D., Peixoto, P.V., Dobereiner, J., 2012. *Plantas Tóxicas do Brasil para as Animais de Produção*, 2nd ed. Editora Helianthus, Rio de Janeiro.

Table 1: Concentration of monofluoroacetate in *Amorimia pubiflora* according to the vegetative stage, time of year, dose (amount) of the plant administered to each experimental sheep and clinical outcome during the study.

Sheep	Weight (kg)	Vegetative stage of the plant	Total dose of plant administered to sheep (g / kg)	MFA concentration (µg / mg)	Total dose of MFA administered to sheep (mg)	Clinical outcome
Plant collected in April 2015						
01	33.4	seedling	20	0.140	93.52	Died
02	37.0	mature	50	0.120	222.0	Did not die
03	45.0	old	105	0.067	31.65	Did not die
Plant collected in August 2015						
04	23.0	seedling	10	0.012	2.88	Did not die
05	29.8	mature	15	0.018	7.95	Died
06	51.1	old	15	0.007	5.38	Did not die
07	43.6	seeds	5	0.100	21.0	Died
Plant collected in December 2015						
08	33.5	seedling	10	0.140	46.90	Died
09	27.5	mature	40	0.008	9.13	Died
10	46.5	old	90	0.009	39.33	Died
Plant collected in March 2016						
11	32.0	seedling	10	0.220	70.40	Died
12	44.5	mature	45	0.021	42.05	Did not die
13	39.5	old	175	0.021	145.16	Did not die

ARTIGO 2 - Plantas tóxicas de interesse pecuário na região centro-oeste

Ricardo Antônio A. de Lemos e Stephanie Carrelo de Lima

(Artigo publicado na revista **Ciência Animal**)

PLANTAS TÓXICAS DE INTERESSE PECUÁRIO NA REGIÃO CENTRO-OESTE DO BRASIL

PLANTS POISONOUS TO LIVESTOCK IN CENTRAL-WESTERN BRAZIL

Ricardo Antônio Amaral de Lemos¹, Stephanie Carrelo de Lima²

¹ Professor do Curso de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS), Campo Grande, MS, Brasil, e-mail: ricardo.lemos@ufms.br

² Aluna do Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS), Campo Grande, MS, Brasil, e-mail: stephanie_k.lima@hotmail.com

RESUMO

Diversas plantas são conhecidas por causar intoxicação em animais de produção no Centro-Oeste do Brasil. Nesta revisão nós discutimos os aspectos epidemiológicos, patogenia, sinais clínicos, achados patológicos, medidas de controle e tratamento das principais plantas que causam intoxicações.

Palavras-chave: Intoxicação. Patologia. Bovinos. Ovinos.

ABSTRACT

Several plants are known to cause poisoning in production animals in Central-Western Brazil. In this review, we discuss the epidemiological aspects, pathogenesis, clinical signs, pathological findings, control measures, and treatment of poisoning by the main plants implicated in such poisoning.

Keywords: Poisoning. Pathology. Cattle. Sheep.

INTRODUÇÃO

Intoxicações por plantas em animais de produção são apontadas como causas importantes de prejuízos econômicos na pecuária em diversas regiões do Brasil. No Centro-Oeste, as principais plantas tóxicas relacionadas à morbidade e letalidade de animais de produção são *Brachiaria spp.*, *Vernonia rubricaulis* e *V. mollissima*, *Amorimia pubiflora*, *Palicourea marcgravii*, *Niedenzuella stannea*, *Senna occidentalis* e *S. obtusifolia*, *Enterolobium contortisiliquum*, *Stryphnodendrum obovatum*, *S. fissuratum*, *Pteridium aquilinum*, *Pterodon emarginatus*, *Tetrapteryx multiglandulosa*, *Simarouba versicolor*, *Crotalaria spp.*,

Ipomoea carnea subsp. *fistulosa* *Solanum malacoxylon* e *Stylosanthes* sp. (Furlan et al., 2012; Sant'Ana et al., 2014; Souza et al., 2015).

PRINCIPAIS PLANTAS DE INTERESSE PECUÁRIO NO CENTRO-OESTE DO BRASIL

***Brachiaria* spp.**

Forrageiras do gênero *Brachiaria* estão amplamente distribuídas no Centro-Oeste, entretanto podem ser causa de prejuízos econômicos para os produtores por causarem fotossensibilização hepatógena e emagrecimento em bovinos, ovinos e caprinos (Tokarnia et al., 2012).

Além dos prejuízos econômicos causados pela morte de animais, estimou-se que um frigorífico em Mato Grosso do Sul pode perder cerca de R\$ 100.000,00 em um ano pela condenação de fígados de bovinos que apresentam fibrose devido à ingestão de *Brachiaria* spp (Faccin et al., 2015).

A intoxicação depende de alguns fatores, como teor de protodioscina (princípio tóxico) nas pastagens, espécie animal, idade, ingestão prévia da forrageira e resistência genética (Brum et al., 2007; Tokarnia et al., 2012; Mustafa et al., 2012; Faccin et al., 2014; Pupin et al., 2016).

Além de lesões características de fotossensibilização, bovinos, ovinos e caprinos apresentam secreção ocular bilateral, anorexia, letargia, icterícia e procura por locais sombreados (Brum et al., 2007; Souza et al., 2010; Tokarnia et al., 2012; Mustafa et al., 2012; Faccin et al., 2014; Pupin et al., 2016; Rosa et al., 2016). Ovinos de pele pigmentada podem apresentar perda de peso e icterícia, sem a presença de lesões cutâneas (Faccin et al., 2014). Ocasionalmente bovinos e ovinos podem apresentar sinais clínicos de origem neurológica devido à encefalopatia hepática (Souza et al., 2010). O aumento das concentrações de gama glutamiltransferase (GGT) e aspartato aminotransferase (AST), assim como de bilirrubina direta ou indireta está relacionado à intoxicação por *Brachiaria* spp., entretanto não aponta a gravidade da intoxicação (Brum et al., 2007; Souza et al., 2010; Tokarnia et al., 2012; Faccin et al., 2014; Pupin et al., 2016).

Dermatite, icterícia, fígado aumentado ou diminuído de tamanho, amarelado ou acastanhado, firme, com padrão lobular evidenciado, manchas brancacentas e depressões na superfície, rins acastanhados e urina escurecida podem ser

encontrados na necrosia (Brum et al., 2007; Souza et al., 2010 Tokarnia et al., 2012; Faccin et al., 2014; Pupin et al., 2016).

As lesões características observadas no exame histológico são encontradas no fígado e consistem na presença de cristais birrefringentes ou imagens negativas destes cristais dentro de ductos biliares, macrófagos e/ou hepatócitos e macrófagos espumosos, que são encontrados ao redor de veias centrolobulares ou distribuídos aleatoriamente, por vezes substituindo grandes áreas do parênquima. Vacuolização, necrose individual de hepatócitos, bilestase, colangite e pericolangite linfoplasmocítica, e em casos mais crônicos, graus variados de fibrose, principalmente periportal e hiperplasia de ductos biliares também são observadas (Brum et al., 2007; Souza et al., 2010; Tokarnia et al., 2012; Mustafa et al., 2012; Faccin et al., 2014; Pupin et al., 2016). A presença de macrófagos espumosos, hiperplasia de ductos biliares, fibrose, colangite e pericolangite linfoplasmocítica no fígado também é observada em animais que pastejam *Brachiaria* spp., mas não apresentam sinais clínicos de intoxicação, conforme a avaliação histológica de fígados de animais de abatedouro (Faccin et al., 2015).

O diagnóstico da intoxicação por *Brachiaria* spp. se baseia principalmente em dados epidemiológicos como o tipo de pastagem, idade dos animais acometidos e introdução de animais criados em outras pastagens, sinais clínicos e achados patológicos (Tokarnia et al., 2012). No Centro-Oeste os diagnósticos diferenciais incluem outras plantas que causam fotossensibilização hepatógena (Tokarnia et al., 2012) e dermatofilose que acomete predominantemente bezerros (Bacha et al., 2014).

O tratamento desta intoxicação é sintomático e os animais doentes devem ser retirados das pastagens de *Brachiaria* spp., mantidos na sombra, já que a exposição solar exacerba os sinais clínicos, com comida e água até a regressão dos sinais clínicos (Tokarnia et al., 2012). Recomenda-se a criação de ruminantes em pastagens de *B. brizantha* e *B. ruziziensis*, que geralmente apresentam concentrações de protodioscina menores, entretanto casos de intoxicação ainda podem ocorrer (Tokarnia et al., 2012; Faccin et al., 2014). Outra medida que se mostrou eficaz experimentalmente em ovinos é a utilização de reprodutores e matrizes resistentes à intoxicação por *Brachiaria* spp., embora em condições práticas isto seja de difícil execução (Pupin et al., 2016).

Vernonia mollissima* e *V. rubricaulis

Surtos de intoxicação por espécies de *Vernonia* são relatados apenas em Mato Grosso do Sul (Brum et al., 2002; Souza et al., 2015). Um surto de intoxicação por *V. molíssima*, que ocorreu em 1971, foi relatado em bovinos e desde então, apenas surtos de intoxicação por *V. rubricaulis* são diagnosticados, geralmente, entre os meses de agosto e dezembro (Brum et al., 2002).

V. rubricaulis habita regiões sujeitas a alagação temporária, como a do Pantanal (Tokarnia et al., 2012). Como os brotos da planta são mais tóxicos, as principais condições para ocorrência de surtos são as que causam a brotação da planta como roçadas, geadas, desmatamento e queimadas, entretanto superlotação de piquetes, introdução de animais que nunca ingeriram a planta e escassez de pastagem também podem favorecer o consumo da planta (Brum et al., 2002; Tokarnia et al., 2012; Souza et al., 2015). As duas espécies de *Vernonia* causam quadro clínico-patológico semelhante (Tokarnia et al., 2012).

Os casos de intoxicação natural relatados ocorreram apenas em bovinos, que geralmente apresentam agressividade, seguida por apatia, salivação, gemidos, incoordenação, retração do abdômen, fezes ressecadas com muco e estrias de sangue, focinho seco, tremores musculares, andar a esmo, olhar fixo, bradipneia e bradicardia.

Na necropsia o fígado está aumentado de tamanho e apresenta aspecto de noz moscada. Áreas hemorrágicas são observadas nas serosas de órgãos abdominais e torácicos, e ocasionalmente, o lúmen contém sangue (Brum et al., 2002; Tokarnia et al., 2012; Souza et al., 2015).

No exame histopatológico há necrose hepática aguda associada à hemorragia que pode variar de centrolobular a massiva. Nos túbulos uriníferos pode haver vacuolização e necrose de coagulação do epitélio. O diagnóstico é realizado com base em aspectos epidemiológicos, clínicos e patológicos (Brum et al., 2002; Tokarnia et al., 2012; Souza et al., 2015).

As intoxicações por *V. mollissima* e *V. rubricaulis* devem ser diferenciadas entre si e de outras causas de insuficiência hepática aguda, como intoxicação por *Cestrum laevigatum* e *Trema micranta* (Brum et al., 2002). Insuficiência cardíaca congestiva direita também é considerada um diagnóstico diferencial devido ao aspecto de noz moscada do fígado (Tokarnia et al., 2012). Devido à ocorrência de

sinais clínicos como incoordenação, tremores musculares e andar a esmo deve-se incluir doenças que acometem o sistema nervoso central no diagnóstico diferencial.

Palicourea marcgravii*, *Amorimia pubiflora* e *Niedenzuella stannea

Este grupo de plantas é o de maior importância econômica, já que causa 50% das mortes de bovinos intoxicados por plantas no Brasil (Tokarnia et al., 2012). *Palicourea marcgravii*, *Amorimia pubiflora* e *Niedenzuella stannea* são encontradas em Mato Grosso, enquanto apenas *Amorimia pubiflora* é encontrada em Mato Grosso do Sul (Becker et al., 2013; Souza et al., 2015; Caldeira et al., 2016).

P. marcgravii é conhecida como “cafezinho”, “erva de rato”, “café-bravo”, “erva-café”, “roxa”, “roxinha” e “vick” nas diversas regiões do Brasil em que está presente (Tokarnia et al., 2012). Os surtos de intoxicação por esta planta ocorrem quando bovinos têm acesso à orlas de matas ou capoeiras onde a planta está presente e não estão relacionados à escassez de alimentos, pois a planta é considerada bastante palatável (Tokarnia et al., 2012).

Intoxicações por *A. pubiflora*, também referida como “cipó prata”, “corona” ou “erva”, são relatadas em Mato Grosso do Sul, geralmente no final do período seco e início do período chuvoso, quando a planta está em brotação (Souza et al., 2015). Em Mato Grosso, casos de intoxicação por esta planta ocorrem durante todo o ano, mas aumentam no começo das chuvas (Becker et al., 2013).

Niedenzuella stannea, conhecida como “erva”, foi recentemente relatada como causa de morte súbita em propriedades próximas ao Rio Araguaia e seus afluentes na região leste de Mato Grosso. As mortes são relatadas durante o período seco, quando a pastagem e outras plantas invasoras estão prejudicadas e *N. stannea* encontra-se em fase de brotação (Caldeira et al., 2016).

O quadro clínico-patológico apresentado pelos animais intoxicados por estas três plantas é semelhante, pois elas possuem como princípio tóxico o monofluoracetato, uma substância que bloqueia o Ciclo de Krebs impedindo a geração de ATP celular (Tokarnia et al., 2012; Arruda et al., 2017). O principal efeito é falha cardíaca aguda, caracterizada por morte súbita (Tokarnia et al., 2012).

Os sinais clínicos são precipitados pela movimentação dos animais geralmente durante manejos no mangueiro ou durante o embarque (Tokarnia et al., 2012; Becker et al., 2013; Souza et al., 2015; Caldeira et al., 2016), e consistem em

taquicardia acentuada, respiração profunda, perda de equilíbrio, ataxia, tremores musculares, relutância em movimentar-se, andar rígido, queda, decúbito, movimentos de pedalagem e opistótono. A morte ocorre pouco tempo após a apresentação dos sinais clínicos ou em alguns casos, os animais são encontrados mortos sem sinais clínicos prévios (Tokarnia et al., 2012; Becker et al., 2013; Caldeira et al., 2016).

As alterações encontradas na necropsia são ingurgitamento de grandes vasos, edema pulmonar acentuado, petéquias, equimoses e sufusões no pericárdio, epicárdio e pleura. Na histopatologia há degeneração hidrópico-vacuolar e necrose das células dos túbulos renais (Tokarnia et al., 2012; Becker et al., 2013; Arruda et al., 2017).

O diagnóstico da intoxicação é realizado através da observação das plantas nas pastagens, evidência de consumo das mesmas e sinais clínicos, já que as alterações macro e microscópicas podem estar ausentes em muitos casos (Tokarnia et al., 2012).

***Senna occidentalis* e *S. obtusifolia* (fedegoso)**

O quadro clínico e patológico causado pelas duas espécies é semelhante (Tokarnia et al., 2012; Carvalho et al., 2014; Furlan et al., 2014c). Apesar de serem tóxicas para outras espécies como suínos, equinos e javalis (Tokarnia et al., 2012), no Centro-Oeste apenas surtos de intoxicação em bovinos são descritos (Carvalho et al., 2014; Furlan et al., 2014c).

Os surtos em bovinos ocorrem quando há associação entre alguns fatores, como piquetes severamente infestados pelas plantas, baixa disponibilidade de forragem ou forragem de má qualidade e alta lotação (Carvalho et al., 2014; Furlan et al., 2014c) ou contaminação de ração pelas sementes destas plantas (Carmo et al., 2011), entretanto esta condição nunca foi relatada no Centro-Oeste.

Os sinais clínicos observados em bovinos intoxicados são fraqueza muscular, tremores, instabilidade dos membros posteriores com arrastar das pinças, andar cambaleante, mioglobínúria, fezes ressecadas e decúbito. Após o decúbito os animais permanecem alerta e com reflexos, porém na maioria das vezes não se recuperam e morrem (Tokarnia et al., 2012; Carvalho et al., 2014; Furlan et al., 2014c).

Na necropsia as principais lesões são áreas pálidas em músculos estriados esqueléticos, com maior intensidade na musculatura dos membros pélvicos. As áreas pálidas geralmente estão intercaladas com áreas de coloração normal. Em alguns casos há áreas pálidas também no miocárdio e mioglobínúria (Tokarnia et al., 2012; Carvalho et al., 2014; Furlan et al., 2014c). Ocasionalmente bovinos apresentam fígado com aspecto de noz-moscada devido à necrose hepática aguda (Furlan et al., 2014c), enquanto em equinos esta é a principal lesão (Tokarnia et al., 2012).

No exame histopatológico as miofibras apresentam necrose segmentar acompanhada ou não de infiltrado inflamatório mononuclear (Carvalho et al., 2014; Furlan et al., 2014c). Ocasionalmente, pode haver necrose de cardiomiócitos, hepatócitos e epitélio dos túbulos uriníferos (Tokarnia et al., 2012; Carvalho et al., 2014; Furlan et al., 2014c).

O diagnóstico é realizado associando-se a presença da planta com evidências de consumo à fraqueza muscular apresentada pelos animais e aos achados de necropsia e histopatologia (Tokarnia et al., 2012; Carvalho et al., 2014; Furlan et al., 2014c). As intoxicações por *S. occidentalis* e *S. obtusifolia* devem ser diferenciadas entre si e de outras doenças que causam necrose muscular, como deficiência de vitamina E/selênio e intoxicação por antibióticos ionóforos (Tokarnia et al., 2012; Carvalho et al., 2014; Furlan et al., 2014c). Além disso, afecções que cursem com distúrbios neuro-musculares devem ser descartadas, como o botulismo (Tokarnia et al. 2012; Carvalho et al., 2014).

***Enterolobium contortisiliquum* (timbaúba, tamboril, ximbuva, orelha de macaco)**

No Centro-Oeste, casos de intoxicação natural pela planta ocorrem de agosto a novembro quando os frutos que caem no solo são ingeridos pelos animais (Grecco et al., 2002; Mendonça et al., 2009; Souza et al., 2015).

Os frutos contêm várias saponinas, entretanto não se sabe qual o papel delas na intoxicação (Tokarnia et al., 2012). Grande quantidade de carboidratos não fibrosos foram encontrados nos frutos e são responsáveis pelo quadro de acidose ruminal verificada experimentalmente (Bacha et al., 2017).

A ingestão espontânea dos frutos de *E. contortisiliquum* está associada à distúrbios digestivos, fotossensibilização e aborto (Grecco et al., 2002; Mendonça et al., 2009). Provavelmente, o quadro clínico apresentado está relacionado à quantidade de frutos ingeridos e à sobrevivência dos animais após apresentarem distúrbios digestivos.

Experimentalmente ficou evidente que a administração de altas doses de frutos causa distúrbios digestivos em ovinos (Bacha et al., 2017; Pupin et al., 2017) e que bovinos que sobrevivem após apresentarem distúrbios digestivos podem desenvolver fotossensibilização hepatógena (Leal et al., 2017). Os efeitos abortivos da planta ainda não foram reproduzidos experimentalmente (Pupin et al., 2017).

O diagnóstico se baseia em dados epidemiológicos como a presença de árvores de *E. contortisiliquum*, período de queda dos frutos, quadro clínico e patológico (Grecco et al., 2002; Mendonça et al., 2009; Tokarnia et al., 2012). O diagnóstico diferencial deve ser realizado com outras causas de fotossensibilização e/ou aborto e causas infecciosas de aborto (Mendonça et al., 2009; Tokarnia et al., 2012).

***Stryphnodendron fissuratum* e *S. obovatum* (rosquinha)**

Casos de intoxicação natural ocorrem em Mato Grosso, Goiás e Mato Grosso do Sul quando bovinos têm acesso à frutos das árvores que caem no solo entre os meses de julho e setembro (Ferreira et al., 2009). No Sudeste de Goiás casos de abortos em bovinos, em várias fases da gestação, são atribuídos à ingestão de *Stryphnodendron obovatum* (Sant'Ana et al., 2014).

Os sinais clínicos consistem em depressão, anorexia, agressividade, icterícia, sialorreia, incoordenação, motora, dismetria, retração abdominal, inquietação, fezes pastosas enegrecidas ou ressequidas com muco e estrias de sangue, diarreia, edema de barbela e fotossensibilização (Ferreira et al., 2009).

Os achados de necropsia há edema subcutâneo e líquido em cavidades naturais, hemorragias nas serosas de vísceras abdominais e torácicas, úlceras na mucosa do abomaso e rúmen, fígado vermelho-acastanhado e aumentado de tamanho e rins escuros (Ferreira et al., 2009).

No exame histopatológico observam-se lesões degenerativas e necróticas no epitélio tubular dos rins e hepatócitos, bilestase no fígado, vacuolização e

formação de pústulas na mucosa ruminal, necrose das mucosas do abomaso e intestinos (Ferreira et al., 2009).

O diagnóstico é realizado através da análise de dados epidemiológicos como a presença de árvores de *Stryphnodendron fissuratum* ou *S. obovatum*, período de queda dos frutos, quadro clínico e patológico (Ferreira et al., 2009). O diagnóstico diferencial deve ser realizado com outras causas de fotossensibilização e/ou aborto, plantas nefrotóxicas e causas infecciosas de aborto (Ferreira et al., 2009).

***Pteridium* spp.**

Duas espécies pertencentes ao gênero *Pteridium* são descritas como tóxicas no Brasil, *Pteridium arachnoideum* e *Pteridium caudatum*. A intoxicação está relacionada principalmente à escassez de forragem em áreas severamente invadidas por *Pteridium* spp. e fatores que propiciam sua brotação, como queimadas, roçadas, geadas (Tokarnia et al., 2012).

Estas plantas possuem dois princípios tóxicos. Um deles tem ação radiomimética e está associado à ocorrência de três síndromes clínicas em ruminantes (diátese hemorrágica, hematúria enzoótica e carcinomas no trato digestivo superior). O outro é uma tiaminase tóxica principalmente para equinos (Tokarnia et al., 2012).

Recentemente, casos de intoxicação por estas plantas foram relatados na região norte de Mato Grosso, caracterizados por diátese hemorrágica e hematúria enzoótica (Furlan et al., 2014a; Furlan et al., 2014b).

A diátese hemorrágica acomete bovinos de qualquer idade e ocorre após ingestão da planta por poucas semanas ou meses (Tokarnia et al., 2012). Os sinais clínicos se iniciam aproximadamente 3 a 8 semanas após início da ingestão da planta e são caracterizados por fraqueza, incoordenação motora, febre alta (41 a 42°C), mucosas hipocoradas e com petéquias, epistaxe, melena, sangue com aspecto aquoso, tempo de coagulação aumentado, taquipnéia, taquicardia, decúbito e morte. Na necropsia observam-se hemorragias disseminadas. A principal alteração histológica é observada na medula óssea e consiste em acentuada aplasia com hemorragia (Tokarnia et al., 2012; Furlan et al., 2014b).

Os sinais clínicos apresentados por bovinos com hematúria enzoótica se iniciam após ingestão de pequenas doses da planta por um ano ou mais (Tokarnia

et al., 2012). Os animais desenvolvem alterações neoplásicas e não neoplásicas no epitélio vesical e apresentam hematúria intermitente, anemia e emagrecimento. Na necropsia a bexiga pode conter sangue e coágulos, apresentar mucosa espessada e com nódulos de vários tamanhos e aspectos. Na histopatologia notam-se diversos tipos de neoplasmas, tanto de origem epitelial quanto mesenquimal, assim como alterações não neoplásicas no epitélio de transição como, por exemplo, hiperplasia, displasia, cistite cística, metaplasia glandular e proliferação vascular (Tokarnia et al., 2012; Furlan et al., 2014a).

***Pterodon emarginatus* (sucupira, faveiro, sucupira-branca e sucupira-lisa)**

Surtos de intoxicação em bovinos foram relatados na época da seca em Mato Grosso, Mato Grosso do Sul e Goiás em bovinos após ingestão de folhas e frutos de árvores que caíram devido à fortes ventos ou derrubada para aproveitamento de madeira (Cruz et al., 2012; Sant'Ana et al., 2012).

Os sinais clínicos apresentados pelos bovinos em casos naturais são desidratação, alteração de comportamento com apatia ou agressividade, andar cambaleante, incoordenação dos membros pélvicos, cegueira, inquietação, fezes ressecadas e fotossensibilização, com icterícia e urina vermelho-escura.

Na necropsia o parênquima hepático apresenta áreas vermelho-escuras intercaladas com áreas claras. No tecido subcutâneo, serosas e pleura há graus variados de hemorragia. Fezes ressecadas contendo muco e sangue podem ser encontradas na ampola retal. Em casos de fotossensibilização, além de lesões de pele, o fígado apresenta-se difusamente alaranjado, com vesícula biliar repleta e os rins estão escurecidos. Microscopicamente, no fígado há necrose de coagulação massiva com congestão e hemorragia (Cruz et al., 2012; Sant'Ana et al., 2012).

Os aspectos epidemiológicos, clínicos e patológicos são essenciais na formulação do diagnóstico, como informações sobre a disponibilidade da planta aos animais e achados de necropsia (Cruz et al., 2012; Sant'Ana et al., 2012).

O diagnóstico diferencial inclui plantas que causam fotossensibilização, plantas que causam necrose hepática aguda e causas de aborto, já que alguns produtores e médicos veterinários relatam que vacas prenhes abortam após a ingestão da planta (Cruz et al., 2012; Sant'Ana et al., 2012). Doenças que afetam o

sistema nervoso central também devem ser consideradas. Não há tratamento para intoxicação por *P. emarginatus*.

***Tetrapteryx multiglandulosa* (cipó-vermelho, cipó-ferro)**

Esta planta é encontrada em Mato Grosso do Sul e Estados do sudeste, como Rio de Janeiro e São Paulo e seu consumo está associado a casos de insuficiência cardíaca crônica e abortos em bovinos (casos espontâneos), ovinos e coelhos (casos experimentais) (Tokarnia et al., 2012).

Os sinais clínicos apresentados são graus variados de edema subcutâneo na região ventral do corpo, ingurgitamento da jugular, pulso venoso positivo, cansaço após movimentação, letargia, emagrecimento, dispneia, aumento de volume abdominal e arritmia cardíaca (Carvalho et al., 2006). A evolução geralmente é crônica, entretanto há casos de evolução superaguda (Tokarnia et al., 2012).

Na necropsia, o coração encontra-se globoso, com as câmaras dilatadas e no miocárdio há áreas firmes e brancas (fibrose). Fígado em noz-moscada, edema pulmonar, ascite, hidrotórax e hidropericárdio podem ocorrer como consequência da insuficiência cardíaca crônica (Carvalho et al., 2006). Em fetos de bovinos intoxicados naturalmente, apenas áreas brancas e firmes no miocárdio e fígado em noz-moscada foram observados (Carvalho et al., 2006).

O exame histopatológico revela lesões degenerativas e necróticas em cardiomiócitos associadas à fibrose. No fígado há congestão centrolobular e por vezes fibrose, nos pulmões, edema e células da falha cardíaca, e ocasionalmente, *status spongiosus* no cérebro (Carvalho et al., 2006).

O diagnóstico é feito através dos dados epidemiológicos, clínicos e patológicos. Os diagnósticos diferenciais incluem outras causas de insuficiência cardíaca crônica em bovinos, como endocardite de tricúspide, pericardite constrictiva e leucose bovina, intoxicação por antibióticos ionóforos, deficiência de vitamina E e selênio (Carvalho et al., 2006; Tokarnia et al., 2012) e em bezerros infecção pelo vírus da diarreia viral bovina (Pinto et al., 2010). Quando o quadro é superagudo, deve-se diferenciar de plantas que causam morte súbita (Carvalho et al., 2006; Tokarnia et al., 2012).

Não há tratamento para intoxicação por esta planta. A recomendação é retirar os bovinos do piquete que contém a planta, mantê-los em repouso e erradicar a planta (Carvalho et al., 2006; Tokarnia et al., 2012).

***Simarouba versicolor* (pé de perdiz, caraíba, pau-paíba, mata-cachorro)**

Simarouba versicolor é uma árvore encontrada desde a região nordeste até São Paulo e em algumas áreas nos Estados do Pará e Mato Grosso do Sul (Tokarnia et al., 2012). Apesar da ampla área de ocorrência da planta, apenas um surto de intoxicação espontânea foi relatado no Brasil, em uma propriedade de Mato Grosso do Sul. Os bovinos estavam em piquetes com baixa disponibilidade de forragem e tiveram acesso à árvores de *Simarouba versicolor* com aproximadamente um metro de altura, em fase de brotação (Carvalho et al., 2013).

Os bovinos podem ser encontrados mortos sem que sinais clínicos sejam observados ou podem apresentar apatia, tremores musculares, incoordenação, inapetência, relutância em caminhar e diarreia com sangue. Os animais podem cair em decúbito lateral e morrerem após serem movimentados. No exame histopatológico observam-se necrose do tecido linfoide (baço, placas de Peyer, linfonodos), enterite necrosante e congestão e hemorragia generalizados (Carvalho et al., 2013).

O diagnóstico consiste na avaliação de dados epidemiológicos e clínico-patológicos e diferenciação de intoxicação por outras plantas que causam quadro patológico semelhante, como *Riedeliella graciliflora* e *Polygala klotzschii* que também causam necrose de tecido linfoide e enterite (Carvalho et al., 2013). Intoxicação por *P. klotzschii* foi descrita em Mato Grosso do Sul apenas na década de 70, enquanto intoxicação por *R. graciliflora* nunca foi relatada no Estado (Tokarnia et al., 2012). Outras doenças devem ser incluídas no diagnóstico diferencial, como enterotoxemia e eimeriose que cursam com diarreia hemorrágica e também doenças do sistema nervoso central devido aos sinais clínicos apresentados.

***Crotalaria* spp. (chocalho, guizo-de-cascavel, xique-xique)**

Plantas do gênero *Crotalaria* estão amplamente distribuídas pelo Brasil (Tokarnia et al., 2012). Estas contêm alcaloides pirrolizidínicos em todas as suas porções, mas principalmente nas sementes, que causam comprometimento pulmonar ou hepático, de acordo com a espécie da planta (Tokarnia et al., 2012).

A ingestão da planta ocorre quando há pastagens severamente invadidas e baixa disponibilidade de forragem ou quando os animais ingerem ração contaminada com sementes da planta (Ubiali et al., 2011; Tokarnia et al., 2012; Souza et al., 2015).

Três quadros clínico-patológicos são observados e caracterizam-se (1) por lesões no trato respiratório, como edema pulmonar, fibrose intersticial, espessamento alveolar e enfisema (2) cirrose hepática, decorrente da ingestão crônica da planta (3) necrose hepática aguda. Em alguns casos pode ocorrer encefalopatia hepática (Tokarnia et al., 2012).

O diagnóstico é realizado com base em aspectos epidemiológicos e clínico-patológicos. Como diagnósticos diferenciais devem ser consideradas outras causas de lesões hepáticas agudas e crônicas, como plantas e aflatoxina, doenças do sistema nervoso e fotossensibilização (Tokarnia et al., 2012).

***Ipomoea carnea* subsp. *Fistulosa* (algodão-bravo, algodão do Pantanal)**

Ipomoea fistulosa é encontrada em locais sujeitos à inundação temporária na Amazônia, Nordeste e Pantanal de Mato Grosso e Mato Grosso do Sul (Tokarnia et al., 2012). A planta tem grande importância na região Nordeste, entretanto um surto de intoxicação em bovinos foi relatado no Pantanal Matogrossense em 2006 (Antoniassi et al., 2007).

Os princípios tóxicos da planta são swainsonina, 2-epi-lentiginosina e calisteginas B1, B2, B3 e C1, que impedem a metabolização de substratos que contêm açúcar, causando o acúmulo de oligossacarídeos no citoplasma de neurônios e outras células (Tokarnia et al., 2012).

As condições de ocorrência de intoxicações por *I. fistulosa* são privação alimentar e acesso à planta, que geralmente permanece verde durante todo o ano e desenvolvimento de “vício” por alguns animais, ou seja, ingestão sem necessidade de privação alimentar (Antoniassi et al., 2007; Tokarnia et al., 2012).

Grandes quantidades da planta devem ser ingeridas por várias semanas para que os sinais clínicos se manifestem (Tokarnia et al., 2012).

Os bovinos apresentam sinais clínicos de origem neurológica e emagrecimento (Antoniassi et al., 2007). Não há alterações significativas na necropsia. As alterações microscópicas observadas são vacuolização e tumefação de neurônios do sistema nervoso central e periférico e vacuolização do citoplasma de hepatócitos, células acinares do pâncreas, células foliculares da tireóide e células dos túbulos renais (Antoniassi et al., 2007; Tokarnia et al., 2012).

Para o diagnóstico definitivo deve-se levar em consideração a epidemiologia, os sinais clínicos e principalmente as alterações histopatológicas. O diagnóstico diferencial inclui outras plantas que causam doença do armazenamento e causas infecciosas de alterações neurológicas em bovinos (Tokarnia et al., 2012).

***Solanum glaucophyllum* (*Solanum malacoxylon*) (espichadeira)**

Esta planta é encontrada em Mato Grosso, Mato Grosso do Sul e Rio Grande do Sul em ambientes que passam por inundação temporária, como a região do Pantanal. Causa uma doença conhecida como calcinose enzoótica (Tokarnia et al., 2012). Em Mato Grosso, Goiás, Minas Gerais, Tocantins e Distrito Federal quadros clínicos e patológicos compatíveis com calcinose enzoótica são diagnosticados em bovinos, ovinos e caprinos, entretanto nenhuma planta já conhecida como calcinogênica foi encontrada (Guedes et al., 2012).

Casos de intoxicação natural por *Solanum glaucophyllum* são descritos em bovinos e búfalos em Mato Grosso e em bovinos em Mato Grosso do Sul (Santos et al., 2011; Souza et al., 2015). Duas condições de ocorrência diferentes são relatadas nas intoxicações por *Solanum glaucophyllum*. Uma delas é a ingestão das folhas da planta que caem ao chão juntamente com a pastagem, relatada na época da seca, de julho a setembro, quando a planta sofre desfolhamento. A outra, descrita na intoxicação de búfalos é a ocorrência da doença no período chuvoso (Santos et al., 2011; Tokarnia et al., 2012).

O princípio tóxico da planta é um glicosídeo esteroidal que contém a forma hormonal ativa da vitamina D (Tokarnia et al., 2012). Os sinais clínicos descritos em bovinos e búfalos são emagrecimento, andar rígido, pelos ásperos, dorso arqueado, abdômen retraído, claudicação e apoio nas pinças dos cascos. Por

vezes os animais pastejam ajoelhados. Em bovinos, a auscultação evidenciou sopro e arritmia cardíacos (Santos et al., 2011; Tokarnia et al., 2012).

Na necropsia notam-se mineralização de grandes vasos como aorta e artéria pulmonar e endocárdio. Áreas brancas na medular dos rins (mineralização), áreas de enfisema e ossificação nos pulmões, erosões e ulcerações nas cartilagens articulares e ossos compactos e pesados (Santos et al., 2011; Tokarnia et al., 2012).

No exame histológico as fibras elásticas das artérias contêm depósitos granulares e placas mineralizadas. Nos pulmões há edema, mineralização de septos alveolares e interlobulares e calcificação distrófica de cartilagens. Nos ossos há osteopetrose, nas tireoides, hiperplasia de células parafoliculares e nas paratireoides, atrofia das células principais (Santos et al., 2011; Tokarnia et al., 2012).

O diagnóstico fundamenta-se na epidemiologia e aspectos clínico-patológicos. Os principais diagnósticos diferenciais na região Centro-Oeste são tuberculose e hipervitaminose D.

***Stylosanthes* sp.**

Estas leguminosas são utilizadas em consórcio com pastagens em locais de clima tropical que possuem grande quantidade de lignina (Tokarnia et al., 2012). Quando ingeridas em excesso, favorecem a formação de estruturas sólidas (fitobezoares) no trato gastrointestinal de ruminantes e equídeos, que têm ação obstrutiva (Tokarnia et al., 2012; Ubiali et al., 2013).

Os sinais clínicos apresentados são de cólica abdominal, episódios de diarreia ou diminuição da produção fecal, desidratação, hipomotilidade gastrointestinal, aumento do volume abdominal e morte. Na necropsia de bovinos, o fitobezoares são encontrados no abomaso e no duodeno, geralmente mais próximo ao piloro. A mucosa intestinal no local de obstrução apresenta-se enegrecida ou avermelhada, há acúmulo de ingesta nos estômagos e ausência de conteúdo em segmentos posteriores. Alguns animais podem apresentar peritonite devido à ruptura intestinal. O diagnóstico é realizado com base em aspectos epidemiológicos, clínicos e achados macroscópicos. O diagnóstico diferencial inclui

outras plantas que causam fitobezoares e obstruções por enterólitos (Tokarnia et al., 2012; Ubiali et al., 2013).

PLANTAS DO CENTRO-OESTE SEM CASOS DE INTOXICAÇÃO COMPROVADOS

Amaranthus spp., *Brachiaria radicans*, *Trema micranta*, *Cestrum laevigatum* e *Solanun fastigiatum* são plantas que também são encontradas no Centro-Oeste, entretanto casos de intoxicação ainda não foram descritos na região.

TRATAMENTO, PROFILAXIA E CONTROLE

De forma geral não existe tratamento eficaz e aplicável à campo para animais de produção intoxicados por plantas. Como medidas preventivas recomenda-se não introduzi-los em pastagens invadidas por plantas tóxicas, evitar que passem por privação alimentar, manter lotação adequada nos piquetes, evitar o acesso dos animais aos frutos de árvores como *E. contortisiliquum*, *S. fissuratum* e *S. obovatum*, assim como a folhas de *P. emarginatus* e *S. versicolor*. A erradicação das plantas das pastagens é a melhor medida de controle, entretanto a suscetibilidade das plantas aos métodos utilizados para erradicação é variável (Tokarnia et al., 2012).

REFERÊNCIAS

Antoniassi NAB, Ferreira EV, Santos CEP, Arruda LP, Campos JLE, Nakazato L et al. Intoxicação espontânea por *Ipomoea carnea* subsp. *Fistulosa* (Convolvulaceae) em bovinos no Pantanal Matogrossense. Pesq. Vet. Bras. 2007;27(10):415-18.

Arruda FP, Caldeira FHB, Marcolong-Pereira C, Lee ST, Cook D, Riet-Correa F et al. Experimental poisoning by *Niederzuehlla stannea* in cattle and corresponding detection of monofluoroacetate Intoxicação experimental por *Niederzuehlla stannea* em bovinos e correspondente detecção de monofluoroacetato. Ciênc. Rural. 2017;47(3).

Bacha FB, Faccin TC, Lima SC, Leal CRB, Lemos RAA. Dermatofilose em bezerros da raça Nelore no Mato Grosso do Sul. *Semina: Ciências Agrárias*. 2014;35(4):1947-54.

Bacha FB, Pupin RC, Leal PV, Carvalho NM, Franco GL, Ítavo CCBF et al. Experimental intoxication by *Enterolobium contortisiliquum* in sheep. *Pesq. Vet. Bras.* 2017; 37(1):23-30.

Becker M, Caldeira FHB, Carneiro FM, Oliveira LP, Tokarnia CH, Riet-Correa F et al. Importância da intoxicação por *Amorimia pubiflora* (Malpighiaceae) em bovinos em Mato Grosso: reprodução experimental da intoxicação em ovinos e bovinos. *Pesq. Vet. Bras.* 2013;33(9):1049-56.

Brum KB, Haraguchi M, Lemos RAA, Riet-Correa F, Fioravante MCS. Crystal-associated cholangiopathy in sheep grazing *Brachiaria decumbens* containing the saponin protodioscin. *Pesq. Vet. Bras.* 2007;27:39-42.

Brum KB, Purisco E, Lemos RAA, Riet-Correa F. Intoxicação por *Vernonia rubricaulis* em bovinos no Mato Grosso do Sul. 2002. *Pesq. Vet. Bras.* 2002;22:119-28.

Caldeira FB, Dias GB, Arruda FP, Lourenço FM, Bezerra KS, Riet-Correa F et al. Sudden death associated with *Niederzuehlla stannea* (Malpighiaceae) in cattle in the State of Mato Grosso, Brazil: importance and epidemiological aspects. *Pesq. Vet. Bras.* 2016; 36(Supl.2):147-49.

Carmo PMS, Irigoyen LF, Lucena RB, Figuera RA, Kommers GD, Barros CSL. Spontaneous coffee senna poisoning in cattle: report on 16 outbreaks. *Pesq. Vet. Bras.* 2011;31(2):139-46.

Carvalho AQ, Carvalho NM, Vieira GP, Santos AC, Franco GL, Pott A et al. Intoxicação espontânea por *Senna obtusifolia* em bovinos no Pantanal Sul-Mato-Grossense. *Pesq. Vet. Bras.* 2014;34 (2):147-52.

Carvalho NM, Alonso LA, Cunha TG, Ravedutti J, Barros CSL, Lemos RAA. Intoxicação de bovinos por *Tetraperys multiglandulosa* (Malpighiaceae) em Mato Grosso do Sul. *Pesq. Vet. Bras.* 2006;26(3):139-46.

Carvalho NM, Bacha FB, Santos AC, Carvalho AQ, Faccin TC, Pott A et al. Spontaneous and experimental intoxication of cattle by *Simarouba versicolor* A. St.-Hill (Simaroubaceae). *Toxicon.* 2013;64:55-59.

Cruz RAS, Oliveira LP, Caldeira FHB, Mendonça FS, Bacha FB, Pott A et al. Intoxicação espontânea e experimental por *Pterodon emarginatus* (Fabaceae Faboideae) em bovinos e experimental em ovinos. *Pesq. Vet. Bras.* 2012; 32(11):1087-94.

Faccin TC, Brumatti RC, Lima SC, Madureira RC, Fernandes CES, Kommers GD et al. Perdas econômicas pela condenação em matadouro frigorífico de fígados de bovino por fibrose causada por ingestão de *Braquiaria* spp. *Pesq. Vet. Bras.* 2015;35(6):547-51.

Faccin TC, Riet-Correa F, Rodrigues FS, Santos AC, Melo GKA, Silva JA et al. Poisoning by *Brachiaria brizantha* in flocks of naïve and experienced sheep. *Toxicon.* 2014;82:1-8.

Ferreira EV, Boabaid FM, Arruda LP, Lemos RAA, Souza MA, Nakazato L et al. Intoxicação por *Stryphnodendron fissuratum* (Mimosoideae) em bovinos. *Pesq. Vet. Bras.* 2009;29(11):951-57.

Furlan FH, Costa FL, Torres Júnior SCS, Kerber FL, Damasceno ES, Salino A et al. Perfil de propriedades rurais com pastos invadidos por *Pteridium arachnoideum* na região norte de Mato Grosso e prevalência de hematúria enzoótica bovina. *Pesq. Vet. Bras.* 2014a;34(8):753-59.

Furlan FH, Colodel E M, Lemos RAA, Castro MB, Mendonca FS, Riet Correa F. Poisonous Plants Affecting Cattle in Central-Western Brazil. International Journal of Poisonous Plant Research. 2012;2:1-13.

Furlan FH, Mendes ERS, Ducatti KR, Marcon GC, Dombrosky T, Amorim TM et al. Intoxicação aguda por *Pteridium arachnoideum* e *Pteridium caudatum* em bovinos e distribuição das plantas em Mato Grosso. Pesq. Vet. Bras. 2014b; 34(4):343-48.

Furlan FH, Zanata C, Damasceno ES, Oliveira LP, Silva LA, Colodel EM et al. Toxic myopathy and acute hepatic necrosis in cattle caused by ingestion of *Senna obtusifolia* (sicklepod; coffee senna) in Brazil. Toxicon. 2014c;92:24-30.

Grecco FB, Dantas AFM, Riet-Correa F, Leite CGD, Raposo JB. Cattle intoxication from *Enterolobium contortisiliquum* pods. Vet. Hum. Toxicol. 2002;44:160-62.

Guedes KMR, Colodel EM, Castro MB, Souza MA, Arruda LP, Dianezi DM et al. Calcinose enzoótica em ruminantes no Brasil Central. Pesq. Vet. Bras. 2011;31(8):643-48.

Leal PV, Pupin RC, Lima SC, Melo GKA, Araújo MA, Gomes DC et al. Ingestion of the pods of *Enterolobium contortisiliquum* causes hepatogenous photosensitization in cattle. Toxicon. 2017;131:6-10.

Mendonça FS, Evêncio-Neto J, Baratella-Evêncio L, Doria RGS, Freitas SH, Pelegrini LF et al. Natural and experimental poisoning of cattle by *Enterolobium contortisiliquum* pods (Fabaceae Mimosoideae) in Central-Western Brazil. Acta Veterinária. 2009;78:621-25.

Mustafa VS, Moscardini ARC, Borges JRJ, Reckziegel GC, Riet-Correa F, Castro M.B. Intoxicação natural por *Brachiaria* spp. em ovinos no Brasil Central. Pesq. Vet. Bras. 2012;32:1272-80.

Pinto AP, Santos BS, Driemeier D, Sales GCMM, Antoniassi NAB, Schmid RF et al. Infecção intrauterina em bezerros pelo Vírus da Diarreia Viral Bovina. In: VI Encontro Nacional de Diagnóstico Veterinário, 2010, Campo Grande. Anais...Campo Grande: Endivet, 2010. (Resumo 49)

Pupin RC, Leal PV, Lima SC, Melo GKA, Pott A, Araújo MA et al. Enterolobium contortisiliquum is a cause of acute ruminal acidosis in sheep. Toxicon. 2017;126:90-95.

Pupin RC, Melo GKA, Heckler RF, Faccin TC, Ítavo CCBF, Fernandes CE et al. Identification of lamb flocks susceptible and resistant against *Brachiaria* poisoning. Pesq. Vet. Bras. 2016;36(5):383-88.

Rosa FB, Rubin MIB, Martins TB, Lemos RAA, Gomes DC, Pupin RC et al. Spontaneous poisoning by *Brachiaria decumbens* in goats. Pesq. Vet. Bras. 2016;36(5):389-96.

Sant'Ana JF, Perin JN, Bilego UO, Rabelo RE, Vulcani VAS, Paula EMN. Intoxicação espontânea por *Pterodon emarginatus* (Fabaceae) em bovinos no Estado de Goiás. Pesq. Vet. Bras. 2012;32(6):485-89.

Sant'Ana FJF, Reis Júnior JL, Freitas Neto AP, Moreira Júnior CA, Vulcani AS, Rabelo RE et al. Plantas tóxicas para ruminantes do Sudoeste de Goiás. Cienc. Rural. 2014;44(5):865-71.

Santos CEP, Pescador CA, Ubiali DG, Colodel EM, Souza MA, Silva JA et al. Intoxicação natural por *Solanum glaucophyllum* (Solanaceae) em búfalos no Pantanal Matogrossense. Pesq. Vet. Bras. 2011;31(12):1053-58.

Souza RIC, Riet-Correa F, Brum KB, Fernandes CE, Barbosa-Ferreira M, Lemos RAA. Intoxicação por *Brachiaria* spp. em bovinos no Mato Grosso do Sul. Pesq. Vet. Bras. 2010;30:1036-42.

Souza RIC, Santos AC, Ribas NKS, Colodel EM, Leal PV, Pupin RC et al. Doenças tóxicas de bovinos em Mato Grosso do Sul. Semina: Ciências Agrárias. 2015;36(3):155-68.

Tokarnia CH, Brito MF, Barbosa JD, Peixoto PV, Döbereiner J. Plantas Tóxicas do Brasil para Animais de Produção. 2ª ed. Rio de Janeiro: Helianthus; 2012. 586p.

Ubiali DG, Boabaid FM, Borges NA, Caldeira FHB, Lodi LR, Pescador CA et al. Intoxicação aguda com sementes de *Crotalaria spectabilis* (Leg. Papilionoideae) em suínos. Pesq. Vet. Bras. 2011;31(4):313-18.

Ubiali DG, Silva RGF, Oliveira LP, Moraes LG, Caldeira FHB, Pescador CA et al. Obstrução intestinal em bovinos associada ao consumo de *Stylosanthes* sp. (Fabaceae Papilionoideae). Pesq. Vet. Bras. 2013;33(2):148-54.

CRONOGRAMA

Ano	2016		2017		2018	
Atividades						
Etapas já executadas						
Revisão bibliográfica	X	X	X	X	X	
Coleta da planta na propriedade	X					
Dosagem de monofluoracetato	X	X				
Administração da planta aos ovinos	X					
Realização de necropsias	X					
Realização de cortes histológicos	X					
Redação da tese e artigos científicos			X	X	X	
Etapas a executar						
Imuno-histoquímica						
Coleta da planta no canteiro experimental						
Defesa da Tese						X

As atividades não executadas até o momento não farão mais parte da tese.

ANEXO 1 - Projeto Aprovado

TÍTULO: Tecnologias para o diagnóstico e controle da intoxicação por *Amorimia pubiflora* em animais de produção em Mato Grosso do Sul

Resumo do Projeto

Visando o desenvolvimento de tecnologias para diagnóstico e controle de intoxicações por *Amorimia pubiflora* em Mato Grosso do Sul, serão realizados três subprojetos. Em dois deles serão utilizados ovinos como modelo experimental e no terceiro, será realizada uma comparação entre a concentração do princípio tóxico em amostras de *A. pubiflora* retiradas de diferentes locais. O subprojeto 1 visa quantificar o princípio ativo e determinar a dose tóxica nos diferentes estágios vegetativos de *A. pubiflora* em ovinos. O subprojeto 2, tem como objetivo tornar ovinos resistentes à intoxicação por monofluoracetato pela administração de doses não letais crescentes de monofluoracetato através de cânula ruminal. No subprojeto 3 será realizada a comparação da concentração de monofluoracetato em folhas de *A. pubiflora* cultivadas em diferentes locais.

Palavras-chave: Monofluoracetato; Ovinos; Plantas tóxicas.

INTRODUÇÃO (motivação para o estudo, contexto teórico e relevância das questões, caracterizar a inovação da proposta)

Em Mato Grosso do Sul, de 1994 a 2008, as mortes de bovinos causadas por plantas tóxicas correspondiam a 2,84% dos diagnósticos realizados no Estado (Lemos et al. 2009) e de 2008 a 2012 este número aumentou para 5,68% (Souza, 2013).

Dentre as principais plantas tóxicas associadas à morte de bovinos no Estado estão *Brachiaria* spp. (27,88%), *Vernonia rubricaulis* (25%), *Amorimia pubiflora* (11,54%), *Senna occidentalis* e *S. obtusifolia* (8,65%), *Enterolobium contortisiliquum* e polpa cítrica (3,85% cada), *Stylosanthes* spp. (2,88%), *Tetrapteryx multiglandulosa* (1,92%), *Manihot* spp., *Simarouba versicolor*, *Crotalaria* spp., *Pterodon emarginatus* e *Solanum malacoxylon* (0,96% cada) (Souza, 2013).

Amorimia pubiflora aparece como a terceira planta tóxica que mais causou morte de bovinos no período estudado, porém se considerarmos que capins do gênero *Brachiaria* spp. são forrageiras e não plantas exclusivamente tóxicas como as demais, *A. pubiflora* passa a ser a segunda planta tóxica de maior importância para bovinocultura no Estado.

Provavelmente a porcentagem de 11,54% de casos de intoxicação por *A. pubiflora* apresentada no estudo de Souza (2013) está subestimada, pois em visitas a propriedades e também nas fichas epidemiológicas do Laboratório de Anatomia Patológica, vários proprietários mencionam a ocorrência de morte súbita após a movimentação de animais e também a presença da planta em suas propriedades, porém não buscam auxílio diagnóstico devido a já considerarem a planta como causa das mortes. Em uma propriedade localizada no município de Miranda em Mato Grosso do Sul, o proprietário relatou que em 2009, noventa bovinos foram encontrados mortos após permanecerem em

um piquete com *A. pubiflora*. Em outro episódio, em um assentamento rural no município de Bodoquena, os produtores no ano de 2000, relataram a ocorrência de mortes súbitas após exercício em 70 ovinos, 20 bovinos e um equino. Embora não tenham sido realizadas necropsias, em visitas às propriedades observou-se que havia grande quantidade da planta com evidência de seu consumo pelos animais.

No Estado vizinho, Mato Grosso, um proprietário relatou que de um total de 1000 bovinos 80 morreram em 2009, 41 em 2010 e 61 em 2011 devido à ingestão de *A. pubiflora*. Outro produtor informou que de 110 bovinos 60 morreram após permanecerem durante 15 dias em um piquete com a planta (Becker et al. 2013). Apesar de ser uma importante causa de mortalidade em bovinos em Mato Grosso e em Mato Grosso do Sul, em nosso Estado apenas um estudo foi realizado com esta planta, antes do princípio tóxico ser conhecido (Tokarnia & Döbereiner, 1973). Assim novos estudos com esse enfoque são necessários para elucidar aspectos ainda não esclarecidos da epidemiologia em Mato Grosso do Sul, possibilitando a adoção de medidas mais eficientes para o controle da intoxicação.

Em 2012, pesquisadores do Toxic Plant Laboratory, Agricultural Research Service, United States Department of Agriculture, Logan, UT, USA conseguiram detectar e quantificar o monofluoracetato nas folhas de plantas responsáveis por quadros de morte súbita associada ao exercício (MSAE) através do método HPLC-APCI-MS (Lee et al. 2012). Foram realizadas análises em duas amostras de *A. pubiflora* provenientes de Mato Grosso, a primeira em amostras de herbário e a segunda em folhas colhidas durante um surto, e a concentração de princípio tóxico encontrada foi, respectivamente, de 0.006% (Lee et al. 2012) e 0,015% (Becker et al. 2013). Essa variação do princípio tóxico pode ser atribuída à ausência de um procedimento padrão para coleta e análise de amostras.

Experimentos demonstraram que a planta em fase de brotação é mais tóxica e que a maioria dos casos espontâneos ocorre nos meses de seca, o que coincide com a fase de brotação da planta (Tokarnia et al. 2012), porém não existem estudos que comparem a reprodução experimental da intoxicação com a planta em seus diferentes estágios vegetativos simultaneamente com a dosagem do monofluoracetato. Outro aspecto ainda não estudado é a estimativa da quantidade total de princípio tóxico ingerido pelos animais através da ingestão da planta. Esta metodologia permitirá determinar períodos de maior risco de ocorrência da intoxicação e preconizar medidas de prevenção da intoxicação evitando a introdução de animais em áreas de ocorrência da planta nos períodos em que a mesma é mais tóxica.

Em Mato Grosso do Sul, amostras de folhas de *A. pubiflora* provenientes de uma propriedade onde ocorreram casos de intoxicação em bovinos foram administradas a ovelhas e alíquotas foram enviadas ao Toxic Plant Laboratory, Agricultural Research Service, United States Department of Agriculture, Logan, UT, USA para determinar a concentração do princípio tóxico presente. Folhas jovens da planta foram administradas a dois ovinos nas doses de 5g/kg e 20 g/kg e ambos morreram. Considerando a concentração de monofluoracetato detectada nas folhas, os ovinos ingeriram 3,2 e 0,87 mg/kg do princípio tóxico presente nas folhas, respectivamente. Estes resultados estão de acordo com a literatura, tanto no que diz respeito à dose de folhas administradas, quanto na quantidade de monofluoracetato necessárias para causar intoxicação. Por outro lado, três ovinos que receberam folhas maduras nas doses de 70 g/kg, 20 g/kg e 5 g/kg com níveis de monofluoracetato de 6,3 mg/kg, 3,6 mg/kg e 0,87 mg/kg respectivamente, não apresentaram sinais clínicos. Não foram encontrados relatos específicos sobre a ocorrência de variação na resistência individual a *A. pubiflora*, no entanto este fato já foi descrito na intoxicação experimental pelo monofluoracetato (Santos et al. 2014).

Outro fato relevante é a variação nas doses tóxicas da planta entre os Estados de Mato Grosso e Mato Grosso do Sul. Trabalhos realizados naquele Estado demonstram que doses de 1,5 g/kg de folhas jovens de *A. pubiflora* causaram sinais clínicos da intoxicação e doses acima de 2 g/kg levaram a morte. No caso das folhas maduras, 10 g/kg foram suficientes para causar sinais clínicos, enquanto 20 g/kg causaram morte. Este é outro aspecto não estudado, a possibilidade de a concentração de monofluoracetato ser variável de acordo com o local no qual a planta vegeta, ou seja, não se sabe se a uma muda da mesma planta terá toxicidade semelhante quando transplantada para um solo diferente. Não existem relatos de estudos comparando o efeito tóxico e também a concentração do monofluoracetato de plantas colhidas em diferentes locais.

Plantas do gênero *Amorimia* possuem sistema radicular profundo, o que dificulta tanto o controle por herbicidas como por erradicação manual. Ações que permitam a rebrota da planta como roçadas e queimadas, acabam predispondo à intoxicação já que os brotos são considerados mais tóxicos. Devido a esta dificuldade no controle, métodos como a indução de resistência nos animais estão em desenvolvimento. Sabe-se que algumas bactérias que são capazes de degradar o monofluoracetato estão presentes no rúmen de animais, solo e plantas. Experimentos que visam o desenvolvimento de resistência buscam aumentar a quantidade dessas bactérias que já habitam o rúmen através da administração de doses crescentes não tóxicas de plantas que contém monofluoracetato como *Palicourea* spp. e *Amorimia* spp. O resultado de experimentos

realizados com estas duas plantas foi favorável em ovinos e caprinos (Duarte et al. 2013; Oliveira et al. 2013). Outro resultado positivo foi obtido através da inoculação intrarruminal de *Ancylobacter dichloromethanicus* e *Pigmentiphaga kullae*, que são bactérias capazes de hidrolizar o monofluoracetato (Pessoa et al. 2015). No entanto, a aplicação desta tecnologia em condições de campo, enfrenta sérias dificuldades. Inicialmente há a necessidade da produção das bactérias em escala industrial em formulações que possam ser administradas aos bovinos, e mesmo após superar essa etapa, ocorrem outras limitações, pois para que os animais tenham resistência duradoura a ingestão de plantas deve ser constante de modo que sempre haja substrato para manutenção de um número suficiente de bactérias que degradam o monofluoracetato.

Outra alternativa para o controle da intoxicação é a indução da resistência através da administração de repetidas doses não letais crescentes da planta. Alguns estudos têm obtido sucesso na indução da resistência utilizando esta metodologia (Duarte et al. 2013; Oliveira et al. 2013), porém essa forma de indução de resistência é de difícil aplicação prática, pois necessita a administração de repetidas doses em todos os animais a serem introduzidos na área com a planta. Por outro lado, a tentativa de indução de resistência com doses não letais de monofluoracetato não obteve sucesso (Santos et al. 2014). Neste experimento realizado por Santos et al. (2014) e nos demais trabalhos encontrados na literatura utilizando o monofluoracetato, o composto foi administrado por via oral (Humphreys, 1988; Peixoto et al. 2010). Como não se tem conhecimento sobre a quantidade deste princípio que pode ser absorvida pelos animais antes que o mesmo chegue ao rúmen, estudos que eliminem a possibilidade desta absorção prévia devem ser desenvolvidos para que se possa determinar se doses crescentes não letais de monofluoracetato administradas direto no rúmen estimulam a proliferação de bactérias ruminais capazes de degradar este composto e causar resistência nos animais. Apesar de não ter obtido êxito na indução de resistência, o estudo de Santos et al. (2014) demonstrou a existência de animais naturalmente resistentes à intoxicação, uma alternativa promissora para a redução de perdas, através da seleção destes. A principal dificuldade para a adoção desta medida de controle é a ausência de uma metodologia de identificação dos animais resistentes, pois os modelos experimentais anteriormente usados baseavam-se na administração de doses tóxicas da planta sem determinar a concentração do princípio ativo. O modelo experimental proposto associando a administração da planta com a determinação da concentração do princípio ativo permitirá identificar os níveis de resistência

Outra dificuldade encontrada no que se refere a plantas do gênero *Amorimia* é o diagnóstico das intoxicações. Casos em que não há histórico prévio ou quando os animais são encontrados mortos, podem ficar sem diagnóstico, já que informações epidemiológicas são indispensáveis nestes casos. Na maioria dos casos não são observadas alterações macroscópicas durante as necropsias e alterações microscópicas como a degeneração hidrópico-vacuolar das células epiteliais dos túbulos contornados dos rins ocorre em até 50% dos casos (Tokarnia et al. 2012). Desta forma, os surtos em que os animais são encontrados mortos sem a observação de morte súbita após exercício e sem estas lesões, frequentemente permanecem sem diagnóstico. A autópsia também pode dificultar a interpretação destas lesões degenerativas nos rins. Outros estudos descrevem a ocorrência de lesões cardíacas que às vezes não são visíveis macro e microscopicamente e nestes casos, a imuno-histoquímica é uma ferramenta bastante utilizada juntamente com a histopatologia para detecção precisa da extensão das lesões (Bandinelli et al. 2014).

Os ovinos são sensíveis a intoxicações por monofluoraceto (Humphreys, 1988; Peixoto et al. 2010; Santos et al. 2014) e são frequentemente utilizados como modelo experimental para estudos da intoxicação (Schons et al. 2011; Becker et al. 2013). Esta espécie animal oferece diversas vantagens para realização de experimentos em relação aos bovinos, pois além do menor custo, são mais fáceis de manejar, requerem menores investimentos com alimentos e com instalações para alojamento.

Devido à importância da bovinocultura para a economia de Mato Grosso do Sul, a grande ocorrência de casos de intoxicação por *A. pubiflora* torna-se uma importante causa de prejuízos para este setor. Assim, estudos que busquem facilitar o diagnóstico, esclarecer aspectos epidemiológicos e estabelecer formas de prevenção e controle para intoxicações por esta planta são de grande valia tanto para produtores, quanto para a economia do Estado, e justificam a aprovação da presente proposta.

OBJETIVOS (questões e hipóteses)

- Quantificar o princípio ativo e determinar a dose tóxica dos diferentes estágios vegetativos de *A. pubiflora* em ovinos;
- Induzir resistência à intoxicação por monofluoracetato em ovinos por meio da administração de doses não letais deste composto através de cânula ruminal;
- Comparar a concentração de monofluoracetato em amostras de *A. pubiflora* cultivadas em diferentes locais;

- Identificar épocas ou condições de maior risco de ocorrência de intoxicações por *A. pubiflora*;
- Utilizar a imuno-histoquímica como ferramenta auxiliar no diagnóstico de intoxicações por *A. pubiflora*.

METODOLOGIA (local de estudo, delineamento e coleta de dados, análise de dados)

Para atingir os objetivos propostos serão realizados três subprojetos descritos abaixo.

Subprojeto 1 - Quantificação do princípio ativo, determinação da dose tóxica nos diferentes estágios vegetativos de *A. pubiflora* em ovinos.

O experimento será realizado em um período de 12 meses e dividido em quatro etapas. Cada etapa consistirá da coleta da planta, dessecação, administração da mesma a ovinos e envio de alíquotas para dosagem de monofluoracetato. As amostras de *A. pubiflora* serão colhidas em uma propriedade do município de Miranda/MS, onde ocorreram surtos de intoxicação. Para padronizar as amostras a serem utilizadas no experimento, áreas com elevada densidade da planta dentro de um mesmo piquete serão cercadas com gaiolas teladas para evitar o acesso de animais. Posteriormente estas áreas serão roçadas e deixadas em repouso por um período de 60 dias objetivando a brotação da planta. Após este período, as folhas serão colhidas e separadas em brotos (folhas verde claras, pequenas, macias, localizadas na porção mais apical da planta), folhas verdes (folhas verde claras, de tamanho médio, um pouco mais fibrosas que os brotos, localizadas na porção intermediária da planta) e folhas maduras (folhas verdes escuras, grandes, fibrosas, localizadas na porção basal da planta). Após a colheita, as três categorias serão acondicionadas em caixa de isopor com gelo reciclável e transportadas à Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, onde serão dessecadas em estufa de ventilação forçada a 55°C por 72 horas. Para o cálculo da perda de água, 1 kg de folhas frescas de cada categoria será pesado após a dessecação e a porcentagem de redução do peso será usada no cálculo das doses que serão administradas aos ovinos. Em cada etapa, doses diárias de folhas dessecadas correspondentes à dose de 5g/kg de peso vivo de folhas frescas, serão administradas através de cânulas ruminais a três ovinos até a manifestação de sinais clínicos de intoxicação ou até atingir 60g/kg. Este valor é três vezes superior a maior quantidade de planta necessária para causar intoxicação considerando estudos anteriores (Tokarnia et al. 2012). Os ovinos serão provenientes de áreas sem a ocorrência da intoxicação por plantas do gênero *Amorimia*, sem raça definida, fêmeas, com 24 de idade

e pesos entre 30 e 50 kg, previamente vermifugados (Ripercol®). Os animais serão mantidos em baias individuais, teladas, de 2,0 m² e piso de chão, alimentados ração comercial para a espécie (equivalente a 1% do PV), com feno de tifton e água à vontade. Para cada ovino será atribuído um número de identificação, os quais serão submetidos ao exame clínico completo antes da administração da planta, com realização de novo exame clínico se os animais apresentarem sinais clínicos da intoxicação. Caso ocorram mortes, os ovinos serão necropsiados imediatamente após a morte, com a coleta de todos os órgãos fixados em formol tamponado a 10%. Após a fixação, os fragmentos serão clivados, desidratados em álcool etílico absoluto, diafanizados em xilol, incluídos em parafina e cortados em micrótomo à espessura de 5µm e os cortes corados pela hematoxilina-eosina (HE) para exame histopatológico. Fragmentos de coração emblocados em parafina serão submetidos à técnica de imuno-histoquímica anti-troponina C humana, seguindo a metodologia proposta por Pavarini et al. (2012). Alíquotas da planta dessecada administradas aos ovinos serão enviadas ao Toxic Plant Laboratory, Agricultural Research Service, United States Department of Agriculture, Logan, UT, USA para dosagem do monofluoracetato através do método HPLC-APCI-MS (Lee et al. 2012).

Subprojeto 2 - Indução de resistência pela administração de doses não letais de monofluoracetato em ovinos através de cânula ruminal.

Serão utilizados 10 ovinos divididos aleatoriamente em dois grupos. Os ovinos serão provenientes de áreas sem a ocorrência da intoxicação por plantas do gênero *Amorimia*, sem raça definida, fêmeas, com 24 meses de idade e pesos entre 30 – 50 kg, previamente vermifugados (Ripercol®). Os animais serão mantidos em baias individuais, teladas, com área de 2,0 m² e piso de chão, alimentados ração comercial para a espécie (equivalente a 1% do PV), com feno de tifton e água à vontade. Para cada ovino será atribuído um número de identificação, os quais serão submetidos ao exame clínico completo antes da administração do monofluoracetato, com realização de novo exame clínico se os animais apresentarem sinais clínicos da intoxicação. O monofluoracetato utilizado será o SigmaAldrichCo., com grau de pureza >95%, diluído no momento da administração com 10mL de água destilada.

O Grupo 1 (G1) será constituído por cinco ovinos que receberão doses crescentes não letais de monofluoracetato através de cânula ruminal por cinco períodos: 0,05 mg/kg por 5 dias; 0,08 mg/kg por 4 dias; 0,08 mg/kg por 4 dias; 0,1 mg/kg por 3 dias e 0,1 mg/kg por 3 dias. Entre cada período terá um intervalo de 15 dias sem a administração, visando eliminar o efeito acumulativo do monofluoracetato. Quinze dias após a última administração os ovinos serão desafiados com dose única de 1 mg/kg do monofluoracetato e

movimentados por 10 minutos. As doses administradas aos ovinos foram estabelecidas com base naquelas descritas por Humphreys (1998) e a metodologia adaptada de Duarte et al. (2012). O Grupo 2 (G2) será constituído por cinco ovinos (grupo controle positivo) que receberão dose única de 1 mg/kg de monofluoracetato através de cânula ruminal.

Os ovinos que morrerem serão necropsiados imediatamente após a morte, com a coleta de todos os órgãos fixados em formol tamponado a 10%. Após a fixação, os fragmentos serão clivados, desidratados em álcool etílico absoluto, diafanizados em xilol, incluídos em parafina e cortados em micrótomo à espessura de 5µm e os cortes corados pela hematoxilina-eosina (HE) para exame histopatológico. Fragmentos de coração emblocados em parafina serão submetidos à técnica de imuno-histoquímica anti-troponina C humana, seguindo a metodologia proposta por Pavarini et al. (2012). Os dados serão avaliados por meio de análises de variância (Teste Exato de Fisher) e as médias de tempo de latência dos primeiros sinais clínicos serão comparadas pelo teste não-paramétrico de Friedman ($P < 0,05$).

Subprojeto 3 - Comparação da concentração de monofluoracetato em folhas de *A. pubiflora* cultivadas em diferentes locais.

A concentração de monofluoracetato em amostras de *A. pubiflora* colhidas no momento da realização do Subprojeto 1 será comparada à concentração deste princípio em amostras de *A. pubiflora* desta mesma propriedade transplantadas para o canteiro experimental de plantas tóxicas da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul. As plantas da propriedade e do canteiro experimental serão colhidas no mesmo dia seguindo a mesma metodologia do Subprojeto 1, exceto pelo uso de gaiolas e amostras serão encaminhadas ao Toxic Plant Laboratory, Agricultural Research Service, United States Department of Agriculture, Logan, UT, USA para dosagem do monofluoracetato através do método HPLCAPCI-MS (Lee et al. 2012).

LITERATURA CITADA

- Bandinelli M.B, Bassuino D.M, Fredo G, Mari C, Driemeier D, Sonne L, Pavarini S.P. 2014. Identificação e distribuição de lesões cardíacas em bovinos intoxicados por *Amorimia exotropa*. Pesq. Vet. Bras. 34(9):837-844.
- Becker M., Caldeira F.H.B., Carneiro F.M., Oliveira L.P., Tokarnia C.H., Riet-Correa F., Lee S.T. & Colodel E.M. 2013. Importância da intoxicação por *Amorimia pubiflora* (Malpighiaceae) em bovinos em Mato Grosso: reprodução experimental da intoxicação em ovinos e bovinos. Pesq. Vet. Bras. 33(9):1049-1056.

Duarte A.L., Medeiros R.M.T. & Riet-Correa F. 2013. Intoxicação por *Amorimia* spp. em ruminantes. *Ciência Rural* 43(7):1294-1301.

Humphreys D.J. 1988. *Veterinary Toxicology*. 3rd ed. Bailliere Tindall, London. 356p.

Lee S.T., Dook D., Riet-Correa F., Pfister J.A., Anderson W.R., Lima F.G., Gardner D. 2012. Detection of monofluoroacetate in *Palecourea* and *Amorimia* species. *Toxicon* 60:791-796.

Lemos, R.A.A.; Guimarães, E.B.; Carvalho, N.M.; Nogueira, A.P.A.; Santos, B.S.; Souza, R.I.C.; Cardinal, S.G.; Kassab, H.O. 2009. Plant Poisonings in Mato Grosso do Sul. In: 8th International Symposium on Poisonous Plants, Paraíba, Brasil. *Anais...* p.68-72.

Oliveira M.D., Riet-Correa F., Carvalho F.K.L., Silva G.B., Pereira W.S. & Medeiros R. M.T. 2013. Indução de resistência à intoxicação por *Palicourea aeneofusca* (Rubiaceae) mediante administração de doses sucessivas não tóxicas. *Pesq. Vet. Bras.* 33(6):731-734.

Pavarini S.P., Soares M.P., Bandarra P.M., Gomes D.C., Bandinelli M.B., Cruz C.E.F. & Driemeier D. 2011. Mortes subitas em bovinos causadas por *Amorimia exotropa* (Malpighiaceae) no Rio Grande do Sul. *Pesq. Vet. Bras.* 31:291-296.

Peixoto T.C., Nogueira V.A., Coelho C.D., Veiga C.C.P., Peixoto P.V. & Brito M.F. 2010. Avaliações clínico-patológicas e laboratoriais da intoxicação experimental por monofluoroacetato de sódio em ovinos. *Pesq. Vet. Bras.* 30(12): 1021-1030.

Pessoa, D.A.N., Silva, L.C.A., Lopes, J.R.G., Macêdo, M.M.S., Garino Jr, F., Azevedo, S.S., Riet-Correa, F. 2015. Resistência à intoxicação por *Amorimia septentrionalis* em caprinos, induzida pela inoculação ruminal das bactérias *Pigmentiphaga kullae* e *Ancylobacter dichloromethanicus*. *Pesq. Vet. Bras.* 35(2):115-128.

Santos A.C., Riet-Correa F., Heckler R.F., Lima S.C., Silva M.L., Rezende R., Carvalho N.M. & Lemos R.A.A. 2014. Falha na administração repetida de doses não tóxicas de monofluoroacetato de sódio na prevenção da intoxicação por esta substância em ovinos. *Pesq. Vet. Bras.* 34(7):649-654.

Shons, S.V., Mello, T. L., Riet-Correa, F., Schild, A.L. 2011. Poisoning by *Amorimia* (*Mascagnia*) *sepium* in sheep in northern Brazil. *Toxicon*, 57: 781-786.

Souza, R. I. C. Estudo retrospectivo de doenças tóxicas e neurológicas em bovinos no estado de Mato Grosso do Sul. 2013. 86f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, MS, 2013.

Tokarnia, C. H.; Brito M.F.; Barbosa, J.D.; Peixoto, P.V.; Dobereiner, J. 2012. *Plantas Tóxicas do Brasil para Animais de produção*. 2 ed. Rio de Janeiro: Helianthus. 586p.

Tokarnia, C. H & Döbereiner, J. Intoxicação por *Mascagnia pubiflora* em bovinos no Estado de Mato Grosso. *Pesq. Agropec. Bras, Sér. Vet.*, 8: 61-68, 1973.

EQUIPE (nomes completos, CPF, afiliação, e-mail; adicionalmente incluir pessoal técnico, estudantes de graduação e bolsistas, se houver)

Nomes	CPF	Afiliação	e-mail
Ricardo Antônio Amaral de Lemos	414816310-04	UFMS	ricardo.lemos@umfs.br
Stephanie Carrelo de Lima	031.420.991-31	UFMS	stephanie_k_lima@hotmail.com

CRONOGRAMA DE EXECUÇÃO DO PROJETO (incluir apenas atividades do projeto, como: coleta de dados, análises de dados, redação de relatórios e do trabalho final, e entrega para avaliação da banca. Projetos de teses de doutorado devem prever término da coleta de dados até quinto semestre letivo).

Ano	2016		2017		2018		2019	
Atividades	1ºsem	2ºsem	3ºsem	4ºsem	5º sem	6º sem	7ºsem	8º sem
Revisão bibliográfica	X	X	X	X	X	X	X	X
Coleta da planta na propriedade	X	X	X	X				
Coleta da planta no canteiro experimental	X	X	X	X				
Dosagem do monofluoroacetato presente na planta	X	X	X	X	X			
Administração da planta aos ovinos	X	X	X	X				
Realização de necropsias	X	X	X	X				
Avaliação dos cortes histológicos	X	X	X	X				
Avaliação da imuno-histoquímica	X	X	X	X				
Análise estatística dos dados					X			
Redação da tese e artigos científicos						X	X	X

ORÇAMENTO (incluir descrição, unidade de medida, valor unitário, quantidade necessária ao projeto, e valor total. Apontar quais itens estão disponíveis e quais demandam financiamento a ser solicitado. Justificar a finalidade de cada item para o projeto).

1. MATERIAL PERMANENTE

2. MATERIAL DE CONSUMO

Especificação	Quantidade	Unidade	Custo Unitário	Custo Total	Justificativa
Anticorpo monoclonal anti-troponina C cardíaca humana	1	Unidade(s)	R\$3.000,00	R\$3.000,00	Anticorpo utilizado na realização de exames de imuno-histoquímica
Kit HRP (Dako)	1	Unidade(s)	R\$4.000,00	R\$4.000,00	Kit utilizado nos exames de imuno-histoquímica
Proteinase K (ready to use)	1	Unidade(s)	R\$1.400,00	R\$1.400,00	Reagente usado nos exames de imuno-histoquímica.
Câmara úmida com aderência para imuno-histoquímica	1	Unidade(s)	R\$600,00	R\$600,00	Câmara utilizada para a realização de exames de imuno-histoquímica.
Lâminas positivadas para Imuno-histoquímica	10	Unidade(s)	R\$150,00	R\$1.500,00	Lâminas utilizadas para a realização de exame de imuno-histoquímica.
Kit de coloração de Tricômio de Masson	2	Unidade(s)	R\$280,00	R\$560,00	Kit de coloração especial próprio para tecido cardíaco.
Ovinos	10	Unidade(s)	R\$ 300,00	R\$3000,00	Unidades experimentais
TOTAL				R\$ 14060,00	

3. DIÁRIAS

4. PASSAGENS

5. SERVIÇOS DE TERCEIROS

6. OUTROS

INSTITUIÇÕES PARTICIPANTES (listar as instituições de apoio ao estudo, inclusive aquelas de afiliação dos membros da equipe do projeto; citar o tipo de participação de cada uma)

Fundect – apoio financeiro. Em 2015 foi encaminhado um projeto à Fundect (Chamada FUNDECT N° 10/2015 - UNIVERSAL-MS), porém este ainda encontra-se sob avaliação.

Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS) – infraestrutura, corpo docente, animais experimentais.

INOVAÇÃO (Descrever a inovação científica da proposta)

Espera-se obter uma metodologia padronizada e adequada para determinar o princípio tóxico de *A. pubiflora*, assim como as concentrações deste princípio necessárias para causar intoxicação em animais de produção. Essas informações representam um importante avanço no conhecimento sobre a intoxicação por *A. pubiflora*, pois até o momento não há uma metodologia padronizada de análise que avalie os níveis do princípio ativo em diferentes épocas do ano e em diferentes estágios vegetativos e associe estes níveis à ocorrência de intoxicações em animais. Esse conhecimento permitirá o desenvolvimento de novas estratégias de prevenção da intoxicação baseadas na análise de risco, evitando a introdução dos animais em áreas de ocorrência da planta nos períodos em que ela é mais tóxica ou evitando a adoção de medidas de manejo de pastagem que favoreçam o aumento da concentração de monofluoracetato na planta.

A padronização da metodologia para determinação do princípio ativo da planta, também possibilita avaliar se a planta cultivada sob diferentes condições mantém seu princípio tóxico. A identificação das variações na concentração de monofluoracetato em amostras de plantas cultivadas em diferentes locais indicará que medidas de manejo do solo podem reduzir o efeito tóxico da planta. Outro importante avanço para a compreensão da patogenia da intoxicação é a avaliação da ocorrência de adaptação ao consumo de doses crescentes do princípio ativo da planta. Essas possibilidades são importantes para reduzir os prejuízos causados pelas intoxicações por *A. pubiflora*, pois medidas tradicionalmente adotadas apresentam resultados limitados.

Adicionalmente, a implantação da técnica de imuno-histoquímica como rotina para o diagnóstico de possíveis mortes súbitas em animais de produção possibilitará a elucidação de mortalidades de bovinos cuja etiologia ainda não está esclarecida.

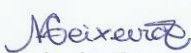
ANEXO 2 – Autorizações legais



Universidade Federal de Mato Grosso do Sul
Comissão de Ética no Uso de Animais /CEUA

C E R T I F I C A D O

Certificamos que o Protocolo nº 537/2013 do Pesquisador Ricardo Antônio Amaral de Lemos, referente ao projeto de pesquisa "Tecnologias para determinação do princípio tóxico e controle na intoxicação por *Amorimia pubiflora* em animais de produção", está de acordo com os princípios éticos adotados pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), com a legislação vigente e demais disposições da ética em investigação que envolvem diretamente os animais e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS/CEUA/UFMS, em reunião ordinária do dia 20 de setembro de 2013.


Maria Araújo Teixeira
Coordenadora da CEUA/UFMS

Campo Grande, 23 de setembro de 2013.

Comissão de Ética no Uso de Animais/CEUA
<http://www.propp.ufms.br/ceua>
ceua@propp.ufms.br
fone (67) 3345-7184

ANEXO 3 – Normas das revistas

TOXICON

DESCRIPTION

Toxicon's "aims and scope" are 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 toxins 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. articles on the translational application of toxins, for example as drugs and insecticides epidemiological studies on envenoming or poisoning, so long as they highlight a previously unrecognised medical problem or provide insight into the prevention or medical treatment of envenoming or poisoning. Retrospective surveys of hospital records, especially those lacking species identification, will not be considered for publication. Properly designed prospective community-based surveys are strongly encouraged. articles describing well- known activities of venoms, such as antibacterial, anticancer, and analgesic activities of arachnid venoms, without any attempt to define the mechanism of action or purify the active component, will not be considered for publication in *Toxicon*. review articles on problems related to **toxinology**.

To encourage the exchange of ideas, sections of the journal may be devoted to Short Communications, Letters to the Editor and activities of the affiliated societies.

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 relevant meetings and symposia and activities of the International Society of Toxinology, The Brazilian Society of Toxinology, and the North American Society of Toxinology.

Reviews and mini-Reviews: *Toxicon* will publish reviews and mini-reviews on topics of interest to toxinologists. Suggestions for reviews or mini-reviews can be made at any time to the Editor-in-Chief or the relevant Associate Editor. In addition, articles of significant broad interest to toxinologists that 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 opinion to the attention of one of the Editor-in-Chief.

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

AUDIENCE

Toxicologists, toxinologists, molecular biologists and chemists.

IMPACT FACTOR

2017: 2.352 © Clarivate Analytics Journal Citation Reports 2018

ABSTRACTING AND INDEXING

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

EDITORIAL BOARD

Editor-in-Chief

Glenn King, Inst. for Molecular Bioscience, Division of Chemistry & Structural Biology, University of Queensland, St. Lucia, 4072, Queensland, Australia, Fax: +61 7 3346-2101

<https://twitter.com/VenomsLab?lang=en>

Honorary Editor-in-Chief

Alan L. Harvey, Strathclyde Inst. of Pharmacy and Biomedical Sciences (SIPBS), University of Strathclyde, The John Arbuthnott Building, 27 Taylor Street, G4 0NR, Glasgow, Scotland, UK, Fax: +44 141 5528376

Associate Editors

Jose Maria Gutiérrez, Inst. Clodomiro Picado, Fac. de Microbiología, Universidad de Costa Rica, San José, Costa Rica

Brett A. Neilan, School of Environmental and Life Sciences, The University of Newcastle, University Drive, Callaghan, NSW 2038, New South Wales, Australia

Ornella Rossetto, Dept. of Biomedical Sciences, Università degli Studi di Padova, Via Ugo Bassi 58/B, I-35121, Padova, Italy

Denise Tambourgi, Immunochemistry Laboratory, Av. Vital Brazil, 1500, Instituto Butantan, 05503-900, São Paulo, Brazil

Kevin Welch, Poisonous Plant Research Lab, U.S. Department of Agriculture (USDA), 1150 E 1400 N, Logan, Utah, UT 84341, USA

Editorial Council

Klaus Aktories, Inst. of Pharmacology and Toxicology, Albert-Ludwigs-Universität Freiburg, Freiburg, Germany

Isaac Asuzu, Dept. of Veterinary Pharmacology and Physiology, University of Nigeria, Nsukka, Nigeria

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

Bryan W. Brooks, Dept. of Environmental Science, Baylor University, Waco, Texas, USA

Juan Calvete, Lab. de Proteinómica Estructural, Instituto de Biomedicina de Valencia, C.S.I.C., Valencia, Spain **Célia**

R. Carlini, Dept. de Biofísica e Centro de Biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre RS, Brazil

Edmond E. Creppy, Toxicologie et Hygiène, Université Victor Segalen Bordeaux 2, Bordeaux Cedex, France

Frederic Ducancel, Lab. d'Ingénierie des Anticorps pour la Santé, Commissariat à l'Énergie Atomique (CEA), Gif-Sur-Yvette, France

Marc Edery, Molécules de communication et adaptation des micro-organismes, Museum National d'Histoire Naturelle, Paris Cedex 05, France

Jay Fox, Dept. of Microbiology, Virginia Commonwealth University, Charlottesville, Virginia, USA

Ponnampalam Gopalakrishnakone, Dept. of Anatomy, National University of Singapore, Singapore

Robert Harrison, Sch. of Tropical Medicine and Hygiene, University of Liverpool, Liverpool, UK **Wayne**

Hodgson, Dept. of Pharmacology, Monash University, Clayton, Victoria, Australia

R.J. Huxtable, Tucson, Arizona, USA

Geoff Isbister, Fac. of Health, The University of Newcastle, Callaghan, New South Wales, Australia

M. Ismail, Dept. of Clinical Pharmacy, Ain Shams University, Cairo, Egypt

Evanguedes Kalapothakis, Dept. de Biologia Geral, Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Belo Horizonte, MG, Brazil

William Kem, Dept. of Pharmacology & Therapeutics, University of Florida, Gainesville, Florida, USA

R. Manjunatha Kini, Dept. of Biological Sciences, National University of Singapore, Singapore, Singapore

Igor Krizaj, Fac. of Chem. & Chem. Technology, University of Ljubljana, Ljubljana, Slovenia

Michel Lazdunski, UMR 6097, Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), Valbonne, France

Richard Lewis, Inst. for Molecular Bioscience, University of Queensland, St Lucia, Queensland, Australia

Francis Markland Jr., School of Medicine, University of Southern California, Los Angeles, California, USA

Marie-France Martin-Eauclaire, IFR Jean-Roche, Université de la Méditerranée, Marseille, France **Dietrich**

Mebs, Zentrum der Rechtsmedizin, Goethe-Universität Frankfurt, Frankfurt, Germany

Edward Moczydlowski, Nanobiology, Sandia National Laboratories, Albuquerque, New Mexico, USA

Cesare Montecucco, Dept. of Biomedical Sciences, Università degli Studi di Padova, Padova, Italy

G.M. Nicholson, Sydney, Australia

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

Stephan Pflugmacher, Dept. of Inland Fisheries, Leibniz Institute of Freshwater Ecology, Berlin, Germany **Mark A.**

Poli, Div. of Integrated Toxicology, United States Army Medical Research Inst. of Infectious Diseases (USAMRIID), Ft. Detrick, Maryland, USA

Lourival D. Possani, Instituto de Biotecnologia, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), Cuernavaca, Mexico

Solange M.T. Serrano, Lab. Especial de Toxinologia Aplicada, Instituto Butantan, Sao Paulo, Brazil

W.T. Shier, Minneapolis, Minnesota, USA

Kaarina Sivonen, Dept. of Applied Chemistry and Microbiology, University of Helsinki, Helsinki, Finland

Toru Tamiya, Dept. of Chemistry, Sophia University, Tokyo, Japan

Aurelia Tubaro, Dipart. dei Materiali e delle Risorse Naturali (DMRN), Università di Trieste, Trieste, Italy

Jan Tytgat, Lab. of Toxicology, KU Leuven, Leuven, Belgium

David Warrell, Nuffield Dept. of Clinical Medicine, John Radcliffe Hospital, Oxford, UK

Julian White, Dept. of Toxinology, Women's and Children's Hospital, North Adelaide, South Australia, Australia

Yun Zhang, Kunming Institute of Zoology, Chinese Academy of Sciences (CAS), Kunming, 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 articles on the translational application of toxins, for example as drugs and insecticides epidemiological studies on envenoming or poisoning, so long as they highlight a previously unrecognised medical problem or provide insight into the prevention or medical treatment of envenoming or poisoning. Retrospective surveys of hospital records, especially those lacking species identification, will not be considered for publication. Properly designed prospective community- based surveys are strongly encouraged. articles describing well-known activities of venoms, such as antibacterial, anticancer, and analgesic activities of arachnid venoms, without any attempt to define the mechanism of action or purify the active component, will not be considered for publication in *Toxicon*. 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.

Correspondence: 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 'Correspondence' which should be followed by a title for the communication. Names of authors and affiliations should be at the end of the letter.

Reviews and Short 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*.

There is another category of review articles which aims 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 this review article feature.

Case 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: [Case Reports Guidelines](#).

Submission checklist

You can use this list to carry out a final check of your submission before you send it to the journal for review. Please check the relevant section in this Guide for Authors for more details.

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:

Manuscript:

- Include keywords
- All figures (include relevant captions)
- All tables (including titles, description, footnotes)
- Ensure all figure and table citations in the text match the files provided
- Indicate clearly if color should be used for any figures in print *Graphical Abstracts / Highlights files* (where applicable) *Supplemental files* (where applicable)

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)
- A competing interests statement is provided, even if the authors have no competing interests to declare
- Journal policies detailed in this guide have been reviewed

- Referee suggestions and contact details provided, based on journal requirements

For further information, visit our [Support Center](#).

BEFORE YOU BEGIN

Ethics in publishing

Please see our information pages on [Ethics in publishing](#) and [Ethical guidelines for journal publication](#).

Human and animal rights

If the work involves the use of human subjects, the author should ensure that the work described has been carried out in accordance with [The Code of Ethics of the World Medical Association](#) (Declaration of Helsinki) for experiments involving humans; [Uniform Requirements for manuscripts submitted to Biomedical journals](#). Authors should include a statement in the manuscript that informed consent was obtained for experimentation with human subjects. The privacy rights of human subjects must always be observed.

All animal experiments should comply with the [ARRIVE guidelines](#) and should be carried out in accordance with the U.K. Animals (Scientific Procedures) Act, 1986 and associated guidelines, [EU Directive 2010/63/EU for animal experiments](#), 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. For all experiments involving humans or animals, details of the appropriate ethics committee approval(s) must be provided

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, a published lecture or academic thesis, see '[Multiple, redundant or concurrent publication](#)' for more information), 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 [Crossref Similarity Check](#).

Preprints

Please note that [preprints](#) can be shared anywhere at any time, in line with Elsevier's [sharing policy](#). Sharing your preprints e.g. on a preprint server will not count as prior publication (see '[Multiple, redundant or concurrent publication](#)' for more information).

Changes to authorship

Authors are expected to consider carefully the list and order of authors **before** submitting their manuscript and provide the definitive list of authors at the time of the original submission. Any addition, deletion or rearrangement of author names in the authorship list should be made only **before** the manuscript has been accepted and only if approved by the journal Editor. To request such a change, the Editor must receive the following from the **corresponding author**: (a) the reason for the change in author list and (b) written confirmation (e-mail, 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.

Only in exceptional circumstances will the Editor consider the addition, deletion or rearrangement of authors **after** the manuscript has been accepted. While the Editor considers the request, publication of the manuscript will be suspended. If the manuscript has already been published in an online issue, any requests approved by the Editor will result in a corrigendum.

Article transfer service

This journal is part of our Article Transfer Service. This means that if the Editor feels your article is more suitable in one of our other participating journals, then you may be asked to consider transferring the article to one of those. If you agree, your article will be transferred automatically on your behalf with no need to reformat. Please note that your article will be reviewed again by the new journal. [More information](#).

Copyright

Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete a 'Journal Publishing Agreement' (see [more information](#) on this). 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. 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.

For gold open access articles: Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete an 'Exclusive License Agreement' ([more information](#)). Permitted third party reuse of gold open access articles is determined by the author's choice of [user license](#).

Author rights

As an author you (or your employer or institution) have certain rights to reuse your work. [More information](#).

Elsevier supports responsible sharing

Find out how you can [share your research](#) published in Elsevier journals.

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 a number of agreements with funding bodies which allow authors to comply with their funder's open access policies. Some funding bodies will reimburse the author for the gold open access publication fee. Details of [existing agreements](#) are available online.

Open access

This journal offers authors a choice in publishing their research:

Subscription

- Articles are made available to subscribers as well as developing countries and patient groups through our [universal access programs](#).
- No open access publication fee payable by authors.
- The Author is entitled to post the [accepted manuscript](#) in their institution's repository and make this public after an embargo period (known as green Open Access). The [published journal article](#) cannot be shared publicly, for example on ResearchGate or Academia.edu, to ensure the sustainability of peer-reviewed research in journal publications. The embargo period for this journal can be found below. **Gold open access**
- Articles are freely available to both subscribers and the wider public with permitted reuse.
- A gold open access publication fee is payable by authors or on their behalf, e.g. by their research funder or institution.

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

For gold 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 gold open access publication fee for this journal is **USD 3300**, excluding taxes. Learn more about Elsevier's pricing policy: <https://www.elsevier.com/openaccesspricing>.

Green open access

Authors can share their research in a variety of different ways and Elsevier has a number of green open access options available. We recommend authors see our [green open access page](#) for further information. Authors can also self-archive their manuscripts immediately and enable public access from their institution's repository after an embargo period. This is the version that has been accepted for publication and which typically includes author-incorporated changes suggested during submission, peer review and in editor-author communications. Embargo period: For subscription articles, an appropriate amount of time is needed for journals to deliver value to subscribing customers before an article becomes freely available to the public. This is the embargo period and it begins from the date the article is formally published online in its final and fully citable form. [Find out more](#).

This journal has an embargo period of 12 months.

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.

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 article number or 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. The corresponding caption should be placed directly below the figure or table.

Peer review

This journal operates a single blind review process. All contributions will be initially assessed by the editor for suitability for the journal. Papers deemed suitable are then typically sent to a minimum of two independent expert reviewers to assess the scientific quality of the paper. The Editor is responsible for the final decision regarding acceptance or rejection of articles. The Editor's decision is final. [More information on types of peer](#)

review.

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](#)). 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 details to allow the work to be reproduced by an independent researcher. Methods that are already published should be summarized, and indicated by a reference. If quoting directly from a previously published method, use quotation marks and also cite the source. Any modifications to existing methods should also be described.

Experimental

Provide sufficient details to allow the work to be reproduced by an independent researcher. Methods that are already published should be summarized, and indicated by a reference. If quoting directly from a previously published method, use quotation marks and also cite the source. Any modifications to existing methods should also 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](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. You can add your name between parentheses in your own script behind the English transliteration. 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. This responsibility includes answering any future queries about Methodology and Materials. **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. You can view [Example Graphical Abstracts](#) on our information site.

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

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.).

Formatting of funding sources

List funding sources in this standard way to facilitate compliance to funder's requirements:

Funding: This work was supported by the National Institutes of Health [grant numbers xxxx, yyyy]; the Bill & Melinda Gates Foundation, Seattle, WA [grant number zzzz]; and the United States Institutes of Peace [grant number aaaa].

It is not necessary to include detailed descriptions on the program or type of grants and awards. When funding is from a block grant or other resources available to a university, college, or other research institution, submit the name of the institute or organization that provided the funding.

If no funding has been provided for the research, please include the following sentence:

This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sectors.

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.

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. [Further information on the preparation of electronic artwork.](#)

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 and shading in table cells.

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 highly encouraged.

A DOI is guaranteed never to change, so you can use it as a permanent link to any electronic article. An example of a citation using DOI for an article not yet in an issue is: VanDecar J.C., Russo R.M., James D.E., Ambeh W.B., Franke M. (2003). Aseismic continuation of the Lesser Antilles slab beneath northeastern Venezuela. *Journal of Geophysical Research*, <https://doi.org/10.1029/2001JB000884>. Please note the format of such citations should be in the same style as all other references in the paper.

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.

Data references

This journal encourages you to cite underlying or relevant datasets in your manuscript by citing them in your text and including a data reference in your Reference List. Data references should include the following elements: author name(s), dataset title, data repository, version (where available), year, and global persistent identifier. Add [dataset] immediately before the reference so we can properly identify it as a data reference. The [dataset] identifier will not appear in your published article.

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 their reference template available in many of the most popular reference management software products. These include all products that support [Citation Style Language styles](#), such as [Mendeley](#) and [Zotero](#), as well as [EndNote](#). Using the word processor plug-ins from these products, authors only need to select the appropriate journal template when preparing their article, after which citations and bibliographies will be automatically formatted in the journal's style. If no template is yet available for this journal, please follow the format of the sample references and citations as shown in this Guide. If you use reference management software, please ensure that you remove all field codes before submitting the electronic manuscript. [More information on how to remove field codes](#).

Users of Mendeley Desktop can easily install the reference style for this journal by clicking the following link:

<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.

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 article number or 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 can be listed either first alphabetically, then chronologically, or vice versa.

Examples: 'as demonstrated (Allan, 2000a, 2000b, 1999; Allan and Jones, 1999).... Or, as demonstrated (Jones, 1999; Allan, 2000) 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. <https://doi.org/10.1016/j.Sc.2010.00372>.

Reference to a journal publication with an article number:

Van der Geer, J., Hanraads, J.A.J., Lupton, R.A., 2018. The art of writing a scientific article. *Heliyon*. 19, e00205. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2018.e00205>.

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.

Reference to a website:

Cancer Research UK, 1975. Cancer statistics reports for the UK.

<http://www.cancerresearchuk.org/aboutcancer/statistics/cancerstatsreport/> (accessed 13 March 2003).

Reference to a dataset:

[dataset] Oguro, M., Imahiro, S., Saito, S., Nakashizuka, T., 2015. Mortality data for Japanese oak wilt disease and surrounding forest compositions. *Mendeley Data*, v1. <https://doi.org/10.17632/xwj98nb39r.1>.

Journal abbreviations source

Journal names should be abbreviated according to the [List of Title Word Abbreviations](#).

Taxonomy and toxin nomenclature

Authors should ensure that they are using the most up-to-date taxonomic description of any animal or plant described in their manuscript. For some taxa, up-to-date taxonomic information is readily available online (e.g., for spiders at www.wsc.nmbe.ch). For new, unidentified, or potentially cryptic species, a voucher specimen should be deposited in a natural history museum, or other facility, as appropriate.

Authors are encouraged to use rational nomenclature for all toxins described in their manuscript. *Ad hoc* naming schemes only serve to introduce confusion and make it difficult to compare toxins and establish evolutionary relationships. Suggested nomenclature has been published for spider toxins (King et al., *Toxicon* 52, 264–276, 2008; PMID 18619481), centipede toxins (Undheim et al., *Mol. Biol. Evol.* 31, 2124–2148, 2014; PMID 24847043), sea anemone toxins (Oliveira et al., *Toxicon* 60, 539–550, 2012; PMID 22683676), and some classes of scorpion toxins (Tytgat et al., *Trends Pharmacol. Sci.* 20, 444–447, 1999; PMID 10542442).

Video

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 file in one of our recommended file formats with a preferred maximum size of 150 MB per file, 1 GB in total. Video and animation files supplied will be published online in the electronic version of your article in Elsevier Web products, including [ScienceDirect](#). 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](#). 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](#). Authors of this journal will automatically receive an invitation e-mail to create an AudioSlides presentation after acceptance of their paper.

Data visualization

Include interactive data visualizations in your publication and let your readers interact and engage more closely with your research. Follow the instructions [here](#) to find out about available data visualization options and how to include them with your article.

Supplementary material

Supplementary material such as applications, images and sound clips, can be published with your article to enhance it. Submitted supplementary items are published exactly as they are received (Excel or PowerPoint files will appear as such online). Please submit your material together with the article and supply a concise, descriptive caption for each supplementary file. If you wish to make changes to supplementary material during any stage of the process, please make sure to provide an updated file. Do not annotate any corrections on a previous version. Please switch off the 'Track Changes' option in Microsoft Office files as these will appear in the published version.

Research data

This journal encourages and enables you to share data that supports your research publication where appropriate, and enables you to interlink the data with your published articles. Research data refers to the results of observations or experimentation that validate research findings. To facilitate reproducibility and data reuse, this journal also encourages you to share your software, code, models, algorithms, protocols, methods and other useful materials related to the project.

Below are a number of ways in which you can associate data with your article or make a statement about the availability of your data when submitting your manuscript. If you are sharing data in one of these ways, you are encouraged to cite the data in your manuscript and reference list. Please refer to the "References" section for more information about data citation. For more information on depositing, sharing and using research data and other relevant research materials, visit the [research data](#) page.

Data linking

If you have made your research data available in a data repository, you can link your article directly to the dataset. Elsevier collaborates with a number of repositories to link articles on ScienceDirect with relevant repositories, giving readers access to underlying data that gives them a better understanding of the research described.

There are different ways to link your datasets to your article. When available, you can directly link your dataset to your article by providing the relevant information in the submission system. For more information, visit the [database linking page](#).

For [supported data repositories](#) a repository banner will automatically appear next to your published article on ScienceDirect.

In addition, you can link to relevant data or entities through identifiers within the text of your manuscript, using the following format: Database: xxxx (e.g., TAIR: AT1G01020; CCDC: 734053; PDB: 1XFN).

Mendeley Data

This journal supports Mendeley Data, enabling you to deposit any research data (including raw and processed data, video, code, software, algorithms, protocols, and methods) associated with your manuscript in a free-to-use, open access repository. Before submitting your article, you can deposit the relevant datasets to *Mendeley Data*. Please include the DOI of the deposited dataset(s) in your main manuscript file. The datasets will be listed and directly accessible to readers next to your published article online.

For more information, visit the [Mendeley Data for journals page](#).

Data in Brief

You have the option of converting any or all parts of your supplementary or additional raw data into one or multiple data articles, a new kind of article that houses and describes your data. Data articles ensure that your data is actively reviewed, curated, formatted, indexed, given a DOI and publicly available to all upon publication. You are encouraged to submit your article for *Data in Brief* as an additional item directly alongside the revised version of your manuscript. If your research article is accepted, your data article will automatically be transferred over to *Data in Brief* where it will be editorially reviewed and published in the open access data journal, *Data in Brief*. Please note an open access fee of 500 USD is payable for publication in *Data in Brief*. Full details can be found on the [Data in Brief website](#). Please use [this template](#) to write your Data in Brief.

MethodsX

You have the option of converting relevant protocols and methods into one or multiple MethodsX articles, a new kind of article that describes the details of customized research methods. Many researchers spend a significant amount of time on developing methods to fit their specific needs or setting, but often without getting credit for this part of their work. MethodsX, an open access journal, now publishes this information in order to make it searchable, peer reviewed, citable and reproducible. Authors are encouraged to submit their MethodsX article as an additional item directly alongside the revised version of their manuscript. If your research article is accepted, your methods article will automatically be transferred over to MethodsX where it will be editorially reviewed. Please note an open access fee is payable for publication in MethodsX. Full details can be found on the MethodsX website. Please use [this template](#) to prepare your MethodsX article.

Data statement

To foster transparency, we encourage you to state the availability of your data in your submission. This may be a requirement of your funding body or institution. If your data is unavailable to access or unsuitable to post, you will have the opportunity to indicate why during the submission process, for example by stating that the research data is confidential. The statement will appear with your published article on ScienceDirect. For more information, visit the [Data Statement page](#).

AFTER ACCEPTANCE

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](#). 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.

AUTHOR INQUIRIES

Visit the [Elsevier Support Center](#) to find the answers you need. Here you will find everything from Frequently Asked Questions to ways to get in touch.

You can also [check the status of your submitted article](#) or find out [when your accepted article will be published](#).

Ciência Animal

DOCUMENTOS PARA SUBMISSÃO

Manuscrito completo em Word	-	Enviar manuscrito completo em formato .DOC ou .RFT
Tabelas / Tables	-	Arquivos em EXCEL ou JPG/TIF com resolução de 300DPI
Imagens	-	Imagens em 300 DPI formato JPG ou TIFF
Declaração de Direitos Autorais	Modelo de documento	

INSTRUÇÃO AOS AUTORES

1) TIPOS DE TRABALHOS ACEITOS

- **Artigo:** oriundo de resultado de pesquisa, contendo Título, Introdução, Materiais e Métodos, Resultados, Discussão, Conclusão e Referências. O texto deve ser elaborado entre 10 e 15 páginas e conter até 5 ilustrações, em português ou inglês.
- **Artigos de revisão:** são submetidos em resposta a convite do Corpo Editorial (CE) da Revista Acadêmica. Em casos excepcionais, os autores poderão consultar o CE sobre a possibilidade de submissão sem convite. O texto deve ser elaborado entre 15 e 20 páginas.
- **Nota técnica:** a estrutura deverá conter - Título, Resumo, Introdução, Metodologia, Resultados, Discussão e Referências. O texto deve ser elaborado entre 5 e 7 páginas e conter até três ilustrações.
- **Comunicações curtas (prévias):** relatos contendo dados inéditos e relevantes como resultados preliminares de uma pesquisa original. Máximo de cinco páginas, obedecendo estrutura normativa da **Nota técnica**.

2) DIREITOS AUTORAIS

Para a publicação do artigo, os autores deverão preencher, assinar e anexar, no momento da submissão, a Declaração de Cessão de Direitos Autorais e de Conflito de Interesses, as quais encontram-se disponíveis no processo de submissão online da Editora Champagnat.

3) PREPARAÇÃO DOS MANUSCRITOS

Configurações do Programa de Edição de Texto

Os trabalhos devem ser submetidos somente online, na área de [Submissão](#), em Português ou Inglês. Devem ser digitados no Microsoft Word: fonte Arial tamanho 12 pt (em todo o manuscrito), margens 2,5 cm, justificado, espaçamento entre linhas 1,5, formato A4, com numeração de páginas, incluindo as referências.

Cabeçalho

a) O título do artigo será em Português e logo abaixo o título em Inglês (Letras maiúsculas, negrito, fonte Arial, tamanho 12, centralizado). Não esquecer de mencionar a espécie animal trabalhada e evitar construções como "Efeito de", "Contribuição ao", "Influência de".

b) Logo abaixo do título deve-se registrar o nome completo de todos os autores, indicando as seguintes informações:

Vínculo institucional (nome da Universidade, empresa e similares);

Cidade;

Estado;

País;

E-mail.

Resumo em Português e em Inglês (abstract)

a) Quantidade de palavras: mínimo - 150 e máximo - 350 (parágrafo único).

b) Os conteúdos do Resumo e do Abstract não devem diferir um do outro. O Abstract é a tradução do Resumo. O resumo deverá incluir, sequencialmente: Objetivos, Material e Método (sucinto), Resultados e Conclusões. Não inserir bibliografia alguma.

c) Palavras-chave e Keywords são descritores que identificam o conteúdo do artigo. O número de palavras-chaves é de no mínimo três e no máximo cinco, separadas por ponto.

Corpo do texto

a) **Introdução:** descrição concisa do estado da arte em relação ao tema pesquisado, abordando-se a revisão bibliográfica pertinente. Ao final da Introdução, inserir os objetivos do estudo.

b) **Material e Método:** devem ser incluídas, de forma resumida e objetiva, informações que possibilitem outros pesquisadores repetirem o estudo. Referenciar as técnicas padronizadas, os procedimentos metodológicos e materiais utilizados. Se for o caso, inserir ao final de “**Material e Método**” o item “**Análise estatística**” isolado, com o intento de vislumbrar a metodologia estatística empregada para se chegar aos resultados.

c) **Resultados:** devem oferecer uma descrição sintética das novas descobertas. Neste item serão inseridas as tabelas, gráficos e similares, sem interpretações e comparações.

d) **Discussão:** interpretar e comparar os resultados, relacionando-os aos conhecimentos existentes (uso de publicação de outros pesquisadores) e salientando, principalmente, achados inéditos da pesquisa e a causa/consequência de tal descoberta. O item Discussão pode ser apresentado junto com Resultados.

e) **Conclusão:** é a síntese conclusiva, embasada nos resultados e na discussão, na qual expressa-se a relação intrínseca entre o título e os objetivos. Não há citação bibliográfica.

f) **Referências:** inserir somente as utilizadas no texto. Devem ser organizadas em ordem alfabética, considerando o sobrenome dos autores. Não numerá-las. Evitar referências de Internet, livros, teses e dissertações. A apresentação deve ser feita em concordância com as **Normas de Vancouver:** [International Committee of Medical Journal Editors \(ICMJE\) Recommendations](#), [The NLM Style Guide for Authors, Editors, and Publishers](#).

Exemplos de referências

Artigos de periódicos

Bala AN, Garba AE, Yazah AJ. Bacterial and parasitic zoonoses encountered at slaughter in Maiduguri abattoir, north-eastern Nigeria. *Vet World*. 2011;4(10):437-43.

* Citar até 06 autores. Caso este número ultrapasse, inserir a expressão et al. (et al. com ponto) após o último autor.

Livro (um autor)

Jordan CF. Nutrient cycling in tropical forest ecosystems. New York: John Wiley; 1985. 190 p.

Livro (mais que 06 autores)

Iverson C, Flanagan A, Fontanarosa PB, Glass RM, Glitman P, Lantz JC et al. American Medical Association manual of style. 9th ed. Baltimore (MD): Williams & Wilkins; 1998. p.85-9.

Capítulos de livros com autoria

Rose AH. Yeast, a microorganism for all species: a theoretical look at its mode of action. In: Lyons TP. (Ed). *Biotechnology in the feed industry*. Nicholasville: Alltech Technical Publications. 1997; 113-8.

Dissertações ou teses

Socher LG. Dinâmica e biomassa aérea de um trecho de Floresta Ombrófila Mista Aluvial no município de Araucária, Paraná. 2004. 87 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Florestal) – Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2004.

Trabalho apresentado em Congressos, Simpósios e similares

Duarte KF. Níveis de energia e programas de alimentação sobre o desempenho e características de carcaça de frangos de corte de 42 a 57 dias de idade. In: Conferência Apinco de Ciência e Tecnologia Avícola, 25., 2004, Santos. Anais... Campinas: Apinco, 2004. (Resumo 29).

Citações

Um autor

- a) De acordo com Jordan (1985), a ciclagem do K ...
- b) A ciclagem do K ... (Jordan, 1985).

Dois autores

- a) Segundo Magalhães e Blum (1999)...
- b) Qualquer que seja o motivo que tenha provocado as diferenças... (Magalhães e Blum, 1999).

Três ou mais autores

- a) Conforme Floss et al. (1999), os estudos ...
- b) Os estudos sobre ... (Floss et al., 1999).

Tabelas

Tabelas serão inseridas no item Resultados, em local mais próximo da citação.

4) OUTRAS CONSIDERAÇÕES

- a) As ilustrações (figuras, gráficos, quadros e tabelas) devem ser inseridas no corpo do texto, identificadas e numeradas consecutivamente em algarismos arábicos;
- b) A Revista Acadêmica adota o sistema de publicação em **FLUXO CONTÍNUO**, isto é, o artigo que for aprovado será inserido no site logo após receber o aceite, sem a necessidade de esperar pela aprovação de outros artigos em curso para o fechamento de edições específicas.
- c) **NÃO HAVERÁ CUSTO FINANCEIRO** aos autores, em nenhuma das etapas do processo (desde a submissão até a publicação);
- d) Abreviações poderão ser empregadas somente após uma primeira menção completa;
- e) Afirmações, Opiniões e Conceitos expressados nos artigos são de total responsabilidade dos autores;
- f) A publicação será somente em versão eletrônica;
- g) A criação e a utilização de animais em atividades de ensino e pesquisa científica, em todo o território brasileiro, obedece aos critérios estabelecidos na Lei nº. 11.794, de 8 de outubro de 2008. Caso a pesquisa remeta à utilização de animais, para fins de publicação, será necessário mencionar o número do protocolo com a aprovação concedida pelo Comitê de Ética da Instituição em questão. Também é indispensável, durante o processo de submissão, anexar cópia do Certificado de aprovação do projeto da pesquisa que originou o artigo, expedido pelo CEUA (Comitê de Ética no Uso de Animais).

5) SERVIÇOS EDITORIAIS (LANGUAGE-EDITING SERVICES)

Uma vez aprovado para publicação, o manuscrito deverá estar, obrigatoriamente, acompanhado de declaração de tradução (seja do *abstract*, seja de todo o texto em inglês). Os pesquisadores deverão assumir os custos da revisão.

Sugestão de sites:

[American Journal Experts](#)

[Editage](#)

[Elsevier](#)

***Observação:** O documento comprobatório dessa correção/revisão deverá ser indexado no momento da submissão ou enviado ao e-mail: revistaacademica@pucpr.br