

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

**DETOXIFICAÇÃO RUMINAL REALIZADA POR BACTÉRIAS DEGRADADORAS DE
MONOFLUOROACETATO DE SÓDIO**

LAYZE CILMARA ALVES DA SILVA

PATOS – PB

ABRIL-2015



UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE
CENTRO DE SAUDE E TECNOLOGIA RURAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINARIA
CAMPUS DE PATOS-PB

DETOXIFICAÇÃO RUMINAL REALIZADA POR BACTÉRIAS DEGRADADORAS DE
MONOFLUOROACETATO DE SÓDIO

Tese apresentada ao Programa de Pós- Graduação em Medicina Veterinária da Universidade Federal de Campina Grande, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Medicina Veterinária.

Doutoranda: Layze Cilmar Alves da Silva

Orientador: Dr. Felício Garino Júnior

PATOS-PB

2015

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA DO CSRT DA UFCG

S586d

Silva, Layze Cilmara Alves da

Detoxificação ruminal realizada por bactérias degradadoras de monofluoroacetato de sódio / Layze Cilmara Alves da Silva. – Patos, 2015. 61f.

Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Universidade Federal de Campina Grande, Centro de Saúde e Tecnologia Rural, 2015.

“Orientação: Prof. Dr. Felício Garino Júnior”

Referências.

1. Detoxificação. 2. Monofluoroacetato de sódio. I. Título.

CDU 579.67

LAYZE CILMARA ALVES DA SILVA

**DETOXIFICAÇÃO RUMINAL REALIZADA POR BACTÉRIAS DEGRADADORAS DE
MONOFLUOROACETATO DE SÓDIO**

Tese aprovada em: 17/ 04/ 2015

Comissão Examinadora:

Prof. Dr. Felício Garino Júnior

Universidade Federal de Campina Grande- Campus de Patos- PB
Unidade Acadêmica de Medicina Veterinária

Prof. Dr. Sérgio Santos de Azevedo

Universidade Federal de Campina Grande- Campus de Patos- PB
Unidade Acadêmica de Medicina Veterinária

Prof. Dr. Clebert José Alves

Universidade Federal de Campina Grande- Campus de Patos- PB
Unidade Acadêmica de Medicina Veterinária

Prof. Dr. Ricardo Barbosa de Lucena

Universidade Federal da Paraíba- Areia- PB
Departamento de Ciências Veterinárias

Prof. Dr. Danilo Tancler Stipp

Universidade Federal da Paraíba- Areia- PB
Departamento de Ciências Veterinárias

"Somewhere over the rainbow, blue birds fly, and the dreams that you dreamed of Dreams really do come true."

Harold Arlen, E.Y. Harburg

AGRADECIMENTOS

A Deus, por permitir mais essa vitória em minha vida. “Em tudo somos atribulados, mas não angustiados; perplexos, mas não desanimados; abatidos, mas não destruídos... Pois o coração do homem planeja o seu futuro, mas é Deus quem o guia na sua caminhada”.

Aos meus pais Luiz Cardoso e Lucimar Teixeira, pelo amor e dedicação que sempre me estimularam. A educação que vocês me proporcionaram foi à base para mais essa conquista que estou vivenciando hoje. Obrigado por acreditarem em mim, amo vocês!

Ao meu esposo Magdiel Vieira, um companheiro sempre presente ao longo de alegrias e dificuldades, meu ombro amigo, tão cuidadoso e carinhoso. Obrigado por sua compreensão em muitos momentos que tive que estar ausente para realização deste trabalho, e por sua disposição a me ajudar sempre que necessário. Ainda viveremos muitas vitórias juntos!

Ao meu irmão Leomyr Sângelo, pela contribuição com as análises estatísticas. Fico muito feliz de poder ver o Biólogo exemplar que você se tornou. E que venha o seu doutorado para podermos comemorar também!

A toda minha família, pelas orações e enorme amor, vocês são parte de mim, verdadeiras dádivas de Deus. Em especial agradeço ao meu avô Joel Alves *in memoriam*, que com o pouco que tinha sempre investiu nos meus estudos e queria muito ver a neta doutora. Esta vitória dedico ao senhor Vô!

Aos amigos George, Elaine, Débora, Samuel, Rafaela e Luzia sempre presentes ao longo deste período de estudo e trabalho.

Ao professor Dr. Felício Garino Júnior, por ser meu orientador, fazendo parte da realização desse trabalho. Sou grata por sua amizade e ensinamentos que me fizeram crescer profissionalmente, o senhor sempre será o meu pai da microbiologia!

Ao professor Dr. Franklin Riet-Corrêa, pela confiança de me incluir em seu grupo de pesquisa, por ser esse grande profissional, que por apenas alguns momentos em seu convívio, me ensinou tanto sobre o estudo científico, me auxiliando na finalização deste trabalho.

A professora Dra. Rosane Maria Trindade de Medeiros, pelo auxílio na parte burocrática do financiamento do projeto e por sua amizade.

Ao professor Dr. Sérgio Santos Azevedo, por ser um coordenador presente, disposto a ajudar, por sua amizade e confiança em minha capacidade profissional.

Aos amigos Danielle, Radmácyo e Laio, foram dias árduos de trabalho que passamos juntos, muito estresse envolvido, ansiedade para que a pesquisa demonstrasse resultados positivos, “sem vocês eu não teria conseguido”, muito obrigado pelo tempo que dedicaram ao meu projeto, sempre serei grata pela amizade que construímos ao longo dessa jornada!

Aos amigos do Laboratório de Microbiologia: Danielle, Rodrigo, Meire, Silvia, Prof. Felício e Ednaldo, são anos de convívio com vocês, que nos tornaram uma família, agradeço a Deus pela vida de cada um!

Ao senhor José “Seu Zé”, que com tanto carinho e dedicação me ajudou a cuidar dos animais dos experimentos.

A Jonas secretário da coordenação de Pós- Graduação em Medicina Veterinária da UFCG- CSTR, por sua disposição em ajudar sempre que necessário e por sua amizade.

Aos membros da banca examinadora, por aceitarem o convite de prontidão e por suas valiosas considerações.

Ao Programa de Pós- Graduação em Medicina Veterinária da UFCG- CSTR, pela oportunidade, de continuação dos meus estudos.

Ao INCT e a CAPES pela assistência financeira.

Aos animais, agradeço a lealdade, companheirismo e doação.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram, para que esse trabalho fosse realizado.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	10
LISTA DE QUADROS	11
RESUMO	12
ABSTRAT	13
INTRODUÇÃO	14
Referências	15
CAPÍTULO I- Detoxificação bacteriana de toxinas de plantas e micotoxinas no rúmen	16
Abstrat	18
Resumo	19
Introdução	19
Detoxificação ruminal de compostos tóxicos de plantas realizada por bactérias ruminais	20
Principais bactérias ruminais detoxificadoras de compostos tóxicos de plantas	20
Detoxificação ruminal de micotoxinas	25
Principais bactérias ruminais detoxificadoras de micotoxinas	25
Bactérias ruminais modificadas geneticamente	27
Conclusão	27
Referências bibliográficas	27
CAPÍTULO II- Indução da resistência à intoxicação por <i>Amorimia septentrionalis</i> em caprinos, mediante utilização de bactérias degradadoras de monofluoroacetato de sódio isoladas de plantas e solos	35
Abstrat	37

Resumo	38
Introdução	39
Material e métodos.....	39
Resultados.....	41
Discussão	42
Conclusão.....	43
Referências bibliográficas.....	44

CAPÍTULO III- Transferência da resistência à intoxicação por *Amorimia septentrionalis* em caprinos mediante transfaunação de conteúdo ruminal proveniente de caprinos inoculados com bactérias degradadoras de monofluoroacetato de sódio

Resumo	49
Abstrat.....	50
Introdução	50
Material e métodos.....	51
Resultados.....	52
Discussão	53
Conclusão.....	55
Referências bibliográficas.....	55

CONCLUSÃO

61

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Tempo de administração e quantidade de *Amorimia septentrionalis* ingerida pelos caprinos controles (Grupo 2) 18

Tabela 2. Valores médios e desvio padrão de cálcio e fósforo séricos de 16 caprinos pertencentes aos grupos 1 e 2 do experimento, submetidos à administração de *Amorimia septentrionalis* por via oral durante 8 dias 19

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Tempo para início dos sinais clínicos da intoxicação por *Amorimia septentrionalis* em caprinos inoculados com as bactérias degradadoras de monofluoroacetato de sódio *Paenibacillus* sp. e *Cupriavidus* sp. (Grupo 1) e caprinos controle (Grupo 3)^a18

Quando 2. Dose de planta ingerida até o início dos sinais clínicos da intoxicação por *Amorimia septentrionalis* em caprinos inoculados com as bactérias degradadoras de monofluoroacetato de sódio *Paenibacillus* sp. e *Cupriavidus* sp. (Grupo 1) e caprinos controle (Grupo 3)18

RESUMO

Esta tese inclui três artigos sobre detoxificação ruminal realizada por bactérias. A presença destes microrganismos detoxificadores proporciona aos ruminantes a possibilidade de ingerir plantas tóxicas e micotoxinas sem que ocorra intoxicação. O primeiro capítulo é uma revisão bibliográfica, na qual, são apresentadas bactérias ruminais que realizam detoxificação de toxinas vegetais e micotoxinas e poderiam ser utilizadas como alternativa para o controle das intoxicações por essas substâncias. No segundo capítulo é descrita a indução da resistência à intoxicação por *Amorimia septentrionalis* em caprinos, mediante utilização de bactérias degradadoras de monofluoroacetato de sódio isoladas de plantas e solos do Brasil. Neste estudo observou-se que a inoculação simultânea de *Paenibacillus* sp. e *Cupriavidus* sp. bem como de *Ralstonia* sp. e *Burkholderia* sp. aumentam a resistência à intoxicação por *Amorimia septentrionalis* em caprinos susceptíveis a intoxicação por esta planta. No terceiro capítulo foi estudada a possibilidade da resistência à intoxicação conferida por *A. septentrionalis* em caprinos inoculados com as bactérias degradadoras de MFA, *Ancylobacter dichloromethanicus* e *Pigmentiphaga kullae*, ser transferida, por transfaunação ruminal, para outros caprinos suscetíveis, sendo comprovado que a transfaunação de líquido ruminal de caprinos previamente inoculados com bactérias degradadoras de MFA induz resistência à intoxicação por *A. septentrionalis* em outros caprinos susceptíveis.

Palavras- chave: *Amorimia septentrionalis*, monofluoroacetato de sódio, plantas tóxicas, detoxificação, *Paenibacillus* sp., *Cupriavidus* sp., *Ralstonia* sp., *Burkholderia* sp., *Ancylobacter dichloromethanicus*, *Pigmentiphaga kullae*.

ABSTRACT

This thesis includes three items of detoxification performed by rumen bacteria. The presence of these microorganisms performing detoxification possibility of ruminants ingest toxic plants and mycotoxins without poisoning occurs. The first chapter is a literature review, in which are presented ruminal bacteria that carry out detoxification of plant toxins and mycotoxins and could be used as an alternative for the control of poisoning by these substances. In the second chapter describes the induction of resistance to poisoning *Amorimia septentrionalis* in goats by using degrading bacteria isolated sodium monofluoroacetate plants and soils of Brazil. In this study it was observed that the simultaneous inoculation of *Paenibacillus* sp. and *Cupriavidus* sp. and *Ralstonia* sp. and *Burkholderia* sp. increase resistance to poisoning *Amorimia Septentrionalis* in goats susceptible to poisoning by this plant. The third chapter was to determine whether the resistance to *A. septentrionalis* poisoning in goats conferred by the intra-ruminal inoculation of the MFA- degrading bacteria *Ancylobacter dichloromethanicus* and *Pigmentiphaga kullae* can be transferred to susceptible goats by transfaunation of rumen content., being proven that the transfer of ruminal fluid goats previously inoculated with MFA-degrading bacteria induces resistance to poisoning by *A. septentrionalis* in other susceptible goats.

Keywords: *Amorimia septentrionalis*, monofluoroacetato de sódio, toxic plants, detoxification, *Paenibacillus* sp., *Cupriavidus* sp., *Ralstonia* sp., *Burkholderia* sp. *Ancylobacter dichloromethanicus*, *Pigmentiphaga kullae*.

INTRODUÇÃO

No Brasil, o número de plantas conhecidas como tóxicas para ruminantes e equinos é de 141 espécies e 89 gêneros. Estima-se que anualmente intoxicações causadas por essas plantas ocasionem cerca de 38.559 mortes em bovinos, 399.800 a 445.309 mortes em ovinos e 52.675 a 63.292 em caprinos (PESSOA et al., 2013). Um dos mais importantes grupos de plantas tóxicas no Brasil é o das que causam morte súbita associada ao exercício. Integram esse grupo plantas das famílias *Rubiaceae*, *Bignoniaceae*, e *Malpighiaceae* (TOKARNIA et al., 2012) sendo destacadas no Brasil *Amorimia* spp., juntamente com *Palicourea* spp. e *Arrabidaea* spp., que são responsáveis por causar cerca de 50% das mortes por plantas tóxicas em bovinos, gerando prejuízos econômicos em todo país (PESSOA et al., 2013). Estas plantas contêm monofluoroacetato de sódio (MFA) (LEE et al., 2012), intoxicações causadas por esse composto não possuem tratamento eficaz (BARBOSA et al., 2003) no entanto sua detoxificação mediada por bactérias vêm sendo estudada como uma alternativa inovadora para controle de intoxicações por plantas, principalmente as que possuem MFA (GREGG et al., 1998).

Esta Tese é composta por três artigos formatados de acordo com o que estabelece a NORMA N° 01/2011 de 03 de junho de 2011 do Programa de Pós- Graduação em Medicina Veterinária da UFCG, Campus de Patos- PB. O primeiro capítulo é composto por uma revisão de literatura submetida à publicação na revista Pesquisa Veterinária Brasileira, que objetivou a apresentação de uma revisão atualizada de bactérias ruminais que realizam detoxificação de toxinas vegetais e micotoxinas e poderiam ser utilizadas como alternativa para o controle das intoxicações por essas substâncias. No segundo capítulo é apresentado um artigo científico enviado ao periódico Pesquisa Veterinária Brasileira, este teve como objetivo avaliar a eficácia da utilização de bactérias degradadoras de MFA, isoladas de plantas e solos brasileiros, na detoxificação ruminal do MFA presente em *A. septentrionalis*, indicando uma possível forma de controle para a intoxicação ocasionada por essa planta. O terceiro capítulo contém um artigo científico submetido e aceito para publicação no periódico Ciência Rural, cujo objetivo foi determinar se a resistência à intoxicação por *Amorimia septentrionalis* em caprinos conferida pela inoculação das bactérias degradadoras de MFA *Ancylobacter dichloromethanicus* e *Pigmentiphaga kullae* pode ser transferida para caprinos que nunca tiveram contato com plantas que contêm MFA através de transfaunação de conteúdo ruminal.

REFERÊNCIAS

BARBOSA J. D.; OLIVEIRA C. M. C.; TOKARNIA C. H.; RIET-CORREA F. Comparação da sensibilidade de bovinos e búfalos à intoxicação por *Palicourea marcgravii* (Rubiaceae). *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v. 23, n. 4, p. 167-172, 2003.

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

LEE, S.T., et al. Detection of monofluoroacetate in *Palicourea* and *Amorimia* species. *Toxicon*, v.60, n.5, p.791-796, 2012. doi: 10.1016/j.toxicon.2012.05.029.

PESSOA C.R.M., et al. Importância econômica, epidemiologia e controle das intoxicações por plantas no Brasil. *Pesquisa Veterinária Brasileira*. v.33, n.6, p. 752-758,2013.

TOKARNIA, C.H. et al. *Plantas tóxicas do Brasil para animais de produção*. 2.ed. Rio de Janeiro: Helianthus, 2012. 566p.

CAPÍTULO I

Detoxificação bacteriana de toxinas de plantas e micotoxinas no rúmen

O presente trabalho foi formatado segundo as normas da revista Pesquisa Veterinária Brasileira de acordo com o que estabelece a NORMA N° 01/2011 de 03 de junho de 2011, do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária da Universidade Federal de Campina Grande, Centro de Saúde e Tecnologia Rural – Campus de Patos – PB.

Detoxificação bacteriana de toxinas de plantas e micotoxinas no rúmen ¹

Layze Cilmara Alves da Silva², Danielle Aluska do Nascimento Pessoa², Felício Garino Júnior²,
Franklin Riet-Correa^{*2}

ABSTRACT.- Silva L.C.A., Pessoa D.A.N., Garino F.Jr., Riet-Correa F. [**Bacterial detoxification of plant toxins and mycotoxins in the rumen**]. Detoxificação bacteriana de toxinas de plantas e micotoxinas no rúmen. Pesquisa Veterinária Brasileira 00(0):00-00. Unidade Acadêmica de Medicina Veterinária (UAMV), Centro de Saúde e Tecnologia Rural (CSTR), Universidade Federal de Campina Grande (UFCG), Av. Universitária s/n, Bairro Santa Cecília, Patos, PB, 58700-970, Brasil. *Autor para correspondência: franklin.pq@cnpq.edu.br

Several rumen bacteria have the ability to detoxify toxic substances especially plant toxins and mycotoxins. The main rumen bacteria reported to detoxify plant toxins are: *Synergistes jonesi*, which degrades mimosine; *Oxalobacter formigenes*, important in metabolism and detoxification of oxalate; *Peptococcus heliotrinreducans*, capable of causing reductive cleavage of heliotrine, a pyrrolizidine alkaloid; *Pigmentiphaga kullae* and *Ancylobacter dichloromethanicus*, which degrade sodium monofluoroacetate; *Selenomonas ruminantium*, *Veillonella parvula*, and *Wollinella succinogenes* which detoxify nitrite; *Denitrobacterium detoxificans*, *Megasphaera elsdenii*, *Ramibacterium* and *Selenomonas* sp. that degrade nitrotoxinas; and *Streptococcus gallolyticus*, *Streptococcus caprinus* and *Selenomonas ruminantium*, that detoxify tannins. The bacteria that detoxify mycotoxins are: *Butyrivibrio fibrisolvens*, *Bacillus licheniformis*, *Eubacterium* sp. and *Lactobacillus* sp. The use of these rumen bacteria or bacteria genetically modified to detoxify toxins are becoming alternatives to reduce the morbidity and mortality caused by the consumption of toxic plants and mycotoxins in ruminants.

INDEX TERMS: Poisoning, rumen bacteria, genetically modified bacteria, toxic plants, detoxification.

¹ Recebido em...

Aceito para publicação em...

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

RESUMO- Diversas bactérias ruminais que possuem a capacidade de detoxificar substâncias tóxicas, são importantes aliadas na degradação e transformação em compostos não tóxicos de substâncias que causam intoxicações, principalmente encontradas em plantas e em alimentos contendo toxinas de fungos. As principais bactérias ruminais relatadas como detoxificadoras de princípios tóxicos de plantas são: *Synergistes jonesi*, que degrada mimosina; *Oxalobacter formigenes*, importante no metabolismo e detoxificação do oxalato; *Peptococcus heliotrinreducans*, capaz de provocar clivagem redutora da molécula heliotrine, presente nos alcalóides pirrolizidínicos; *Pigmentiphaga kullae* e *Ancylobacter dichloromethanicus*, degradadoras de monofluoroacetato de sódio; *Selenomonas ruminantium*, *Veillonella parvula* e *Wollinella succinogenes* que estão associadas à detoxificação de nitritos no organismo animal; *Denitrobacterium detoxificans*, *Megasphaera elsdenii*, *Ramibacterium* e *Selenomonas sp.* degradadoras de nitrotoxinas; *Streptococcus gallolyticus*, *Streptococcus caprinus* e *Selenomonas ruminantium*, detoxificadoras de taninos. As bactérias descritas detoxificando micotoxinas são: *Butyrivibrio fibrisolvens*, *Licheniformis bacillus*, *Eubacterium sp.* e *Lactobacillus sp.* A utilização de bactérias ruminais ou bactérias geneticamente modificadas são alternativas importantes para diminuir os índices de morbidade e mortalidade causados pelo consumo de plantas tóxicas e micotoxinas nos ruminantes.

TERMOS DE IDEXAÇÃO: Intoxicação, bactérias ruminais, bactérias geneticamente modificadas, plantas tóxicas, detoxificação.

INTRODUÇÃO

A presença de bactérias ruminais capazes de detoxificar compostos tóxicos proporcionam aos ruminantes a possibilidade de ingerir plantas tóxicas e micotoxinas sem que ocorra intoxicação (Hofmann 1989). Esta técnica tem sido estudada como alternativa para controle de intoxicações (Hespell 1985, Russel & Wilson 1988, Gregg et al. 1998, Camboim et al. 2012, Duarte et al. 2014, Pessoa 2014, Silva 2015) e redução de perdas econômicas (Pessoa et al. 2013). A função das bactérias ruminais de processar alimentos antes da sua passagem através dos demais órgãos do aparelho digestivo, torna os ruminantes normalmente mais resistentes às toxinas das plantas que os não ruminantes, devido à degradação ou inativação das toxinas de plantas (Quirk et al. 1998) ou micotoxinas (Schatzmayer et al. 2006) no rúmen. O objetivo deste trabalho é apresentar uma revisão atualizada de bactérias ruminais que realizam detoxificação de toxinas vegetais e micotoxinas e poderiam ser utilizadas como alternativa para o controle das intoxicações por essas substâncias.

DETOXIFICAÇÃO RUMINAL DE COMPOSTOS TÓXICOS DE PLANTAS REALIZADA POR BACTÉRIAS RUMINAIS

No Brasil, o número de plantas conhecidas como tóxicas para ruminantes e equinos é de 141 espécies e 89 gêneros. Estima-se que anualmente intoxicações causadas por essas plantas ocasionem cerca de 38.559 mortes em bovinos, 399.800 a 445.309 mortes em ovinos e 52.675 a 63.292 em caprinos. A detoxificação bacteriana dos compostos tóxicos vêm sendo estudada como uma alternativa inovadora para controle de algumas dessas intoxicações (Pessoa et al. 2013).

Diversas pesquisas têm sido realizadas principalmente sobre a detoxificação ruminal do monofluoroacetato de sódio (MFA) presente em plantas que causam morte súbita em animais, com sinais clínicos desencadeados pelo exercício e que são responsáveis por causar cerca de 50% das mortes por plantas tóxicas em bovinos no Brasil (Camboim et al. 2012, Duarte et al. 2014, Pessoa et al. 2013, Pessoa 2014, Silva 2015).

Principais bactérias ruminais detoxificadoras de compostos tóxicos de plantas

Synergistes jonessi

Synergistes jonessi é uma bactéria Gram-negativa que não possui motilidade e apresenta-se em forma de hastes ovais que medem aproximadamente 0,6-0,8 µm de diâmetro e 1,2- 1,8 µm de comprimento. É estritamente anaeróbica, não esporulada, sendo habitante do rúmen de animais. Seu nome é uma homenagem ao cientista australiano Raymond J. Jones que identificou a atividade desse microrganismo na detoxificação do composto 3-hidroxi-4 (IH)-piridona e determinou sua aplicabilidade para evitar a intoxicação por *Leucaena leucocephala* em ruminantes (Allison et al. 1992a).

O composto 3- hidroxi- 4(1H) - piridona é produzido pela degradação do aminoácido mimosina que está presente em *L. leucocephala*, comumente conhecida como Leucena, que pode ser tóxica para ovinos, bovinos, caprinos, equinos, suínos e aves (Kudo et al. 1984, Hammond et al. 1989). Jones & Megarrity (1986) identificaram cabras havaianas resistentes a essa toxina, e verificaram a possibilidade de ampliar essa resistência a outros animais, mediante a transferência de *S. jonessi* de um animal resistente aos demais susceptíveis, obtendo como resultado a detoxificação ruminal do composto. Isolados do rúmen de uma cabra resistente proveniente da Indonésia, inoculados em cabras australianas

também forneceram proteção contra a mimosina (Craig & Blythe 1994). Rincón et al. (1998) verificaram *in vitro* a degradação de dihydroxypyridines de Leucena por *S. jonesii*.

Oxalobacter formigenes

Oxalobacter formigenes é uma beta-proteobactéria Gram-negativa anaeróbica estrita (Kuhner et al. 1996) que apresenta motilidade e não é formadora de esporos. É importante no metabolismo e detoxificação de oxalato (Stewart et al. 2004) presente em vários gêneros de plantas como Halogeton, Sarcobatos, Rumex e Rheum, estas, quando ingeridas em quantidades tóxicas podem ocasionar nefrose tubular em ovinos e bovinos devido ao acúmulo de oxalatos e a absorção destes no intestino, ocorrendo sua precipitação no lúmen, nas paredes dos vasos ou nos túbulos renais onde causam obstrução e necrose celular epitelial. A morbidade na intoxicação por oxalatos ocorre não somente por causa da doença renal, mas também pela disfunção neuromuscular, resultado da hipocalcemia produzida pela quelação de cálcio sérico (Zachary & Mc Gavin 2013).

A presença da bactéria *O. formigenes* pode degradar os oxalatos, impedindo a formação de cálculos de oxalato de cálcio no rim (Siva et al. 2009, Cheeke 1998). Ruminantes que ingerem quantidades gradualmente crescentes de plantas contendo oxalato podem adaptar-se e desenvolver uma tolerância aos níveis da toxina que seria letal para um animal não-adaptado (Allison & Reddy 1984).

Peptococcus heliotrinreducans

Peptococcus heliotrinreducans tem seu nome derivado de um alcalóide pirrolizidínico o “heliotrine” e do latim, *reducans*, (reduzindo), referindo-se a capacidade do organismo para provocar clivagem redutora da molécula heliotrine. É uma bactéria Gram-positiva, anaeróbica estrita, não-móvel, e não esporulada, apresenta-se em forma de cocos- bacilos que medem de 0,5 a 0,6 µm de diâmetro (Lanigan 1976).

Os alcalóides pirrolizidínicos (AP) estão presentes em plantas como *Senecio jacobaea* e *Crotalaria retusa* que causam intoxicações em equinos, caprinos, ovinos e bovinos. Estudos têm demonstrado a biotransformação na detoxificação de alcaloides ingeridos de *S. jacobaea* antes da sua absorção sistêmica (Craig et al. 1986, Wachenheim et al. 1991). Esse processo de detoxificação envolve a hidrólise do éster, liberando a estrutura do ácido dicarboxílico do bicíclico, heterocíclico de base necina, diminuindo significativamente e podendo eliminar a toxicidade do composto (Lanigan

1971, Lanigan 1976). Este mesmo autor relata a ligação do *P. heliotrinreducans* com a detoxificação dos alcalóides pirrolizidínicos na biotransformação ruminal em ovinos, tornando possível a resistência dos mesmos a intoxicações por plantas que contém esse princípio, no entanto é citada a necessidade de sua associação a outras espécies bacterianas ainda não identificadas para a degradação completa do composto tóxico. Outros autores associam a detoxificação dos alcalóides pirrolizidínicos a ação de enzimas hepáticas (Williams & Iatropoulos 2002). A ingestão contínua de doses não tóxicas de monocrotalina induz resistência à intoxicação por sementes de *C. retusa* em ovelhas, contudo, esta, é de curta duração (7 a 15 dias após o final do consumo) e seu mecanismo de indução ainda é desconhecido, sendo sugerido que ocorra por intermédio de enzimas hepáticas (Maia et al. 2014).

Pigmentiphaga kullae* e *Ancylobacter dichloromethanicus

Pigmentiphaga kullae faz parte da família *Alcaligenaceae*, é uma bactéria aeróbica facultativa, Gram-negativa e móvel que apresenta forma cilíndrica e não é formadora de esporos. Suas colônias opacas crescem bem em temperaturas que variam de 30-42 °C. A estirpe é oxidase e catalase positiva. *Ancylobacter dichloromethanicus* também é uma bactéria Gram-negativa aeróbica facultativa, não formadora de esporos. Sua consistência é homogênea, possui colônias de aspecto semitransparente e não apresenta motilidade (Blümel et al. 2001).

Pigmentiphaga kullae e *Ancylobacter dichloromethanicus* recentemente foram isoladas de fluidos ruminais de dois caprinos por Camboim et al. (2012), e identificadas como degradadoras de MFA. Estudos recentes demonstraram o aumento da resistência à intoxicação por plantas que contém MFA em caprinos inoculados com essas bactérias e que essa resistência pode ser transmitida de animais resistentes para animais susceptíveis pela transfaunação de líquido ruminal (Pessoa 2014, Silva 2015). As dehalogenases produzidas pelas bactérias atuam por meio da clivagem da ligação carbono-halogênio e no caso do MFA, a dehalogenase fluoroacetato e a L-2-haloácido dehalogenase são capazes de atuar sobre a ligação carbono-flúor, ocasionando a inativação desse composto tóxico (Fetzner & Lingers 1994, Chan et al. 2010).

A detoxificação do MFA no rúmen mediada por bactérias é uma das alternativas para o controle de intoxicações por plantas que contém MFA (Gregg et al. 1998, Camboim et al. 2012, Pessoa et al. 2014). A inoculação intraruminal dessas bactérias está sendo pesquisada para a profilaxia das intoxicações por plantas que contém MFA, incluindo *Amorimia rigida* (Cunha et al. 2012, Lee et al. 2012), *Amorimia septentrionalis*, *Amorimia pubiflora* (Lee et al. 2012), *Palicourea marcgravi*

(Oliveira, 1963, Krebs et al. (1994), *Palicourea aenofusca* (Lee et al. 2012), e *Tanaecium bilabiatum* (*Arrabidaea bilabiata*) que são responsáveis, no Brasil, por 410.380 a 877.881 mortes de bovinos anualmente (Pessoa et al. 2013). Davis et al. (2012) isolaram outra bactéria ruminal pertencente ao filo *Synergistes* que igualmente demonstrou eficácia no processo de degradação do MFA.

Selenomonas ruminantium, Veillonella parvula e Wollinella succinogenes

Selenomonas ruminantium, Veillonella parvula e *Wollinella succinogenes*, pertencem a família *Veillonellaceae* são bactérias ruminais Gram-negativas, anaeróbias que estão associadas à detoxificação de nitritos no organismo animal (Lewis 1951a, Cheng et al. 1985, Alaboudi & Jones 1985), onde os nitratos são reduzidos a nitritos pelos microorganismos ruminais para a síntese de proteína microbiana e posteriormente à amônia para ser eliminada e utilizada para o metabolismo das bactérias e protozoários ruminais (Lewis 1951b, Kozloski 2009).

Dependendo de uma série de fatores, sobretudo da quantidade de nitratos ingeridos, da flora do rúmen ou da dieta do animal, o processo de redução de nitratos à amônia é inadequado ocorrendo o acúmulo de nitrito (Wang et al. 1961, Kozloski 2009). Uma vez acumulado no rúmen, o nitrito é absorvido pelos capilares ruminais e chega à corrente sanguínea. O nitrito oxida a molécula heme da hemoglobina, que é oxidada do estado ferroso (Fe²⁺) para o estado férrico (Fe³⁺). A forma oxidada da hemoglobina (meta-hemoglobina), não carrega o oxigênio (O₂), resultando nos sinais clínicos característicos de hipóxia e anóxia tecidual (Rosenberger 1975, Radostits et al. 2000). No Brasil há relato de intoxicação por nitrato/nitrito em bovinos no sertão da Paraíba com a ingestão de capim-mandante (*Echinochloa polystachya*) e capim-elefante (*Pennisetum purpureum*) (Medeiros et al. 2003), em Santa Catarina causada pelo consumo espontâneo e experimental de aveia (*Avena sativa*) e azevém (*Lolium* spp.) (Jönck et al. 2013) e no Paraná proveniente da ingestão da grama estrela africana (*Cynodon nlemfuensis*) (Romão et al. 2011).

Denitrobacterium detoxificans, Megaspheera elsdenii, Ramibacterium e Selenomonas sp.

Microrganismos ruminais que degradam nitrotoxinas, incluindo o miserotoxin um glicosídeo que é tóxico para o gado e pode ser encontrado em *Astragalus miser*, e outras espécies do astrágalo, foram identificados por Majak (1992) e Majak et al. (1998).

Glicosídeos de 3-nitro-1-propanol (nitropropanol) e ésteres de glucose de ácido 3-nitro-1-propanóico (ácido nitropropiónico) ocorrem em diversas forragens distribuídos por todo o mundo.

Sistemicamente o ácido nitropropiónico irreversivelmente inativa succinato desidrogenase, bloqueando assim a formação de Adenosina trifosfato (ATP). Nitropropanol não é tóxico em mamíferos, por si só, mas é convertido em ácido nitropropiónico pela álcool-desidrogenase hepática. Estudos sugerem que pelo menos 20 diferentes bactérias ruminais podem metabolizar nitrotoxinas (Anderson et al. 2005).

Megasphaera elsdenii é uma das principais degradadoras desses compostos, pertence ao grupo de bactérias que realizam a fermentação de açúcar e de lactato ruminal e intestinal. Anteriormente conhecida como *Peptostreptococcus elsdenii*, é uma bactéria anaeróbica obrigatória que apresenta-se na forma de cocos Gram- negativos metabolizando hidratos de carbono e ácidos orgânicos. Pertence a flora normal do rúmen de bovinos e de ovinos (Hungate 1966; Kamra 2005; Klieve et al. 2003).

Denitrobacterium detoxificans, pertence à família *Coriobacteriaceae*, é uma bactéria anaeróbica estrita, apresenta-se na forma de bastonetes Gram-positivos medindo 0,5- 1,5 µm. Foi isolada a partir do rúmen de bovinos por Anderson et al. (2000), não é móvel e não produz esporos. Está associada ao metabolismo das nitrotoxinas 3-nitro-1-propanol e 3-nitro- 1-propionato de etilo (Anderson et al. 1996).

Ramibacterium sp. e *Selenomonas* sp. são bactérias anaeróbicas estritas, sendo respectivamente Gram- positiva e Gram-negativa (Bryant et al. 1958, Marchandin et al. 2009), estudos quanto ao uso destas como detoxificadoras de nitrotoxinas *in vivo* ainda são escassos. No entanto, Allison & Rasmussen (1992b) sugerem sua participação nessa degradação.

Streptococcus gallolyticus*, *Streptococcus caprinus* e *Selenomonas ruminantium

Streptococcus gallolyticus e *Streptococcus caprinus* apresentam-se como cocos Gram-positivos pertencentes à família *Streptococcaceae*. Brooker et al. (1994) isolaram essas bactérias do conteúdo do rúmen de uma cabra e sugerem que são detoxificadoras de compostos de taninos. Todos os isolados de *S. gallolyticus* que foram caracterizados têm atividade da galato descarboxilase (Sly et al. 1997).

Taninos são polifenóis de ligação proteica, estão presentes naturalmente em muitas plantas forrageiras reduzindo seu valor nutritivo mediante efeitos inibitórios ruminais e intestinais. No Brasil são encontrados principalmente na *Cambretum (Thiloa) glaucocarpa* (sipaúba, vagueta) causando degeneração e necrose das células epiteliais dos túbulos contorcidos proximais no rim. Alguns animais são adaptados a esses compostos através da síntese de proteínas salivares (Brooker et al. 1999). Seu efeito nocivo para microrganismos ruminais é notável, no entanto, uma alimentação prolongada rica em

taninos, faz com que bactérias degradadoras se proliferem tornando os animais mais resistentes ou mesmo mais tolerantes a níveis elevados desses em sua dieta (Kamra 2005, Sly et al. 1997).

As cabras selvagens e camelos alimentados com *Acacia* e *Calliandra calothyrsus*, que contêm altos níveis de taninos, são capazes de tolerar essa dieta, sem apresentar sinais de intoxicação, devido à presença de um elevado número de bactérias detoxificadoras desse composto como *Streptococcus caprinus* e a *Selenomonas ruminantium* (Sly et al. 1997).

Selenomonas ruminantium pertence ao gênero *Selenomonas* que constitui um grupo de bactérias com crescente motilidade dentro da família *Veillonellaceae* e inclui espécies que vivem no trato gastrointestinal dos animais, em particular, os ruminantes (Marchandin et al. 2009). É uma bactéria gram-negativa anaeróbica estrita, móvel e é também altamente fermentadora de açúcares (Prins 1971). Segundo Brooker et al. (1999), *S. ruminantium* é capaz de se desenvolver na presença de qualquer ácido tânico ou de taninos condensados, utilizando-os como única fonte de carbono produzindo ácido gálico de ácido tânico, realizando assim a detoxificação desse composto. Outras bactérias ruminais que detoxificam taninos foram identificadas, como *Coprococcus* sp., no entanto estudos *in vivo* sobre o mesmo ainda são escassos (Tsai & Jones 1975).

DETOXIFICAÇÃO RUMINAL DE MICOTOXINAS

As micotoxinas são metabólitos secundários produzidos por fungos que causam intoxicação em animais (Bennett e Klich 2003). Os fungos pertencentes aos gêneros *Aspergillus*, *Penicillium* e *Fusarium* são os principais responsáveis pela produção das micotoxinas mais importantes, incluindo aflatoxinas, ocratoxinas, tricotecenos, zearalenonas e fumonisinas (Vasanthi & Bhat 1998). Desta forma o isolamento e caracterização de culturas puras de microrganismos no rúmen ou de isolamento e clonagem de genes que codificam enzimas que degradam micotoxinas, pode ter efeito benéfico na indústria de alimentação humana e animal (Upadhaya et al. 2010).

Principais bactérias ruminais detoxificadoras de micotoxinas

Butyrivibrio fibrisolvens

B. fibrisolvens é uma bactéria, anaeróbica Gram-positiva encontrada na flora ruminal de animais, fermentando uma vasta variedade de carboidratos (Forster et al. 1996). Juntamente com outras bactérias de solo e plantas, o *B. fibrisolvens* pode atuar na biotransformação de micotoxinas no fluido

ruminal, as transformando em metabólitos com baixa toxicidade ou não tóxicos. Westlake et al. (1989) verificaram a degradação da toxina T-2, diacetoxiscirpenol, desoxinivalenol, aflatoxina B1, ocratoxina A e verrucarina A pelo *B. fibrisolvens* demonstrando que nenhuma das toxinas testadas foi capaz de inibir o crescimento desse agente.

Licheniformis bacillus

Licheniformis bacillus é uma bactéria de aspecto bacilar formadora de esporos, muito tolerante ao calor, frio, radiação, e outros tipos de estresses ambientais (Wecke et al. 2006). É Gram-positiva e mesofílica. Apresenta temperatura ótima de crescimento em 30 °C, embora possa sobreviver a temperaturas muito mais elevadas (Kalishwaralal et al. 2009).

Sua atuação na detoxificação de micotoxinas tem sido verificada em diversos estudos. Petchkongkaew et al. (2008) relata a alta degradação de ocratoxina (OTA) presente na soja pela presença de *L. bacillusi*. Upadhaya et al. (2011) em cabras nativas coreanas verificou alta degradação de OTA em 100 % dos alimentos volumosos utilizados devido, provavelmente, ao aumento na população do *L. Bacillus* no rúmen, concluindo que a degradabilidade da OTA é influenciada pela alimentação, pelo tempo de ingestão e pela população desta bactéria na flora ruminal.

Eubacterium sp.

É uma bactéria anaeróbica, não-formadora de esporos, Gram-positiva (Moore et al. 1986). Binder et al. (1997, 2000) relataram que culturas de bactérias anaeróbicas foram capazes de detoxificar desoxinivalenol (DON) no fluido ruminal de bovinos, e classificou essas bactérias como pertencentes ao gênero *Eubacterium* (BBSH *Eubacterium* estirpe 797). Fuchs et al. (2002) isolaram *Eubacterium* sp. com capacidade de detoxificação de micotoxinas a partir de rúmen de bovinos.

Lactobacillus sp.

Pertence ao gênero *Lactobacillus*, é uma bactéria Gram-positiva, anaeróbica facultativa ou microaerofílica, em forma de bastonete (Murray et al. 1999). Essas bactérias foram relatadas como participantes nos processos de ligação de compostos como a zearalenona, tricotecenos e aflatoxinas, podendo atuar na detoxificação ruminal desses compostos no organismo animal (El-Nezami et al. 2002, Haskard et al. 2001, Zou et al. 2007).

BACTÉRIAS RUMINAIS MODIFICADAS GENETICAMENTE

O uso de bactérias geneticamente modificadas para a profilaxia de intoxicações por plantas que contêm MFA vem sendo estudado. Gregg et al. (1998) utilizando quatro linhagens de *Butyrivibrio fibrisolvens*, modificados geneticamente com um gene proveniente de uma espécie de *Moraxella*, codificador de uma dealogenase, observou que cinco ovinos inoculados intraruminalmente com essa bactéria apresentaram sinais clínicos acentuadamente reduzidos após a administração de MFA, quando comparados com outras cinco ovelhas não inoculadas.

CONCLUSÃO

O estudo de bactérias que realizam detoxificação ruminal em animais possibilita alternativas para controle de intoxicações por plantas e por micotoxinas, mediante a detoxificação de compostos nocivos ao organismo animal. Evidências demonstradas no presente trabalho fortalecem estudos futuros sobre o uso dessas bactérias como instrumentos de avanços biotecnológicos permitindo inovações e benefícios no setor da medicina veterinária.

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

REFERÊNCIAS

- Alaboudi A.R. & Jones G.A. 1985. Effects of acclimation to high nitrate intake on some rumen fermentation parameters in sheep. *Can. J. Anim. Sci.* 65(4):841-849.
- Allison M. J. & Reddy C.A. 1984. Adaptations of gastrointestinal bacteria in reponse to changes in dietary oxalate and nitrate, p. 248-256. In: Klug, M.J. & Reddy, C.A. eds. *Current Perspectives in Microbial Ecology*, American Society for Microbiology, Washington, D.C.
- Allison M.J., Mayberry W.R., McSweeney C.S. & Stahl D.A. 1992a. *Synergistes jonesii*, gen. sp. nov.: A rumen bacterium that degrades toxic pyridinediols. *Syst. Appl. Microbiol.* 15(4):522-529.
- Allison M.J. & Rasmussen M.A. 1992b. The potential for plant detoxification through manipulation of the rumen fermentation, p.208-214. In: James, L.F. Keeler, R. F. Bailey, E.M., Cheeke, P.R.,

- Hegarty, M. (eds). *Poisonous Plants: Proceedings of the Third International Symposium*, Iowa State University Press, Ames, Iowa.
- Anderson R.C., Rasmussen, M. A. & Allison, M. J. 1996. Enrichment and isolation of a nitropropanol-metabolizing bacterium from the rumen. *Appl. Environ. Microbiol.* 62(10):3885-3886.
- Anderson R.C., Rasmussen M.A., Jensen N.S. & Allison M.J. 2000. *Denitrobacterium detoxificans* gen. nov., sp. nov., a ruminal bacterium that respire on nitrocompounds. In. *J. Syst. Evol. Micro.* 50(2):633–638.
- Anderson R.C., Majak W. , Rasmussen M.A., Callaway T.R., Beier R.C. , Nisbet D. J., Allison M. J. 2005. Toxicity and Metabolism of the Conjugates of 3-Nitropropanol and 3-Nitropropionic Acid in Forages Poisonous to Livestock. *J. Agric. Food Chem.* 53(6):2344–2350.
- Bennett J.W & Klich M.2003. Mycotoxins. *Clin. Microbiol. Rev.* 16(3):497-516.
- Binder J., Horvath E.M., Schatzmayr G., Ellend N., Danner H., Krska R. & Braun. R. 1997. Screening for deoxynivalenoldetoxifying anaerobic rumen microorganisms. *Cereal Res. Commun.* 25(3):343-346.
- Binder E. M., Heidler D., Schatzmayr G., Thimm N., Fuchs E., Schuh M., Krska R. & Binder J. 2000. Microbial detoxification of mycotoxins in animal feed, p. 271-277. In: *Proceedings of the 10th International IUPAC Symposium on Mycotoxins and Phycotoxins, Brazil.*
- Blümel S., Mark B., Busse H. J., Kämpfer P. & Stolz A. 2001. *Pigmentiphaga kullae* gen. nov., sp. nov., a novel member of the family Alcaligenaceae with the ability to decolorize azo dyes aerobically. In. *J. Syst. Evol. Micro.* 51(5)1867–1871.
- Brooker J.D., O’Donovan L.A., Skene I., Blackall L. & Muslera P. 1994. *Streptococcus caprinus* sp. nov., a tannin-resistant ruminal bacterium from feral goats. *Lett. Appl. Microbiol.* 18(6):313-318.
- Brooker J.D., O’Donovan L., Skene I. & Sellick G. 1999. Mechanisms of tannin resistance and detoxification in the rumen, p. 117-122. In: Brooker J.D. (ed.) *Tannins in livestock and human nutrition, Proceedings of an International Workshop, Australia.*
- Camboim E.K.A, Almeida A.P., Tadra-Sfeir M.Z., Junior F.G., Andrade P.P., McSweeney C.S., Melo M.A. & Riet-Correa, F. 2012. Isolation and identification of sodium fluoroacetate degrading bacteria from caprine rumen in Brazil. *Scientif. World J.* 2012:178254.
- Chan W.Y., Wong M., Guthrie J., Savchenko A.V., Yakunin A.F., Pai E.F. & Edwards E.A. 2010. Sequence- and activity-based screening of microbial genomes for novel dehalogenases. *Microbial Biotech.* 3(1):107–120.

- Cheeke P.R. 1998. Natural Toxicants in feeds Forrages and Poisonous Plants. Interstate Publishers, Danville, IL.479p.
- Cheng K.J., Phillippe R.C., Kozub G.C., Majak W., Costerton J.W. 1985. Induction of nitrate and nitrite metabolism in bovine rumen fluid and the transfer of this capacity to untreated animals. *Can. J. Anim. Sci.* 65(3):647-652.
- Craig, A.M., Blythe L.L., Lassen E.D. & Slizeski M.L.1986. Resistance of sheep to pyrrolizidine alkaloids. *Isr. J. Vet. Med.* 42(1):376-384.
- Craig A.M. & Blythe L.L.1994. Review of ruminal microbes relative to detoxification of plant toxins and environmental pollutants, p.462-467. In: Colegate S.M. & Dorling P.R. (ed.) *Plant Associated Toxins*. CAB International, Wallingford.
- Cunha L.C., Pípole F., Carvalho L.R., Lago J.H.G. & Górnaiak S.L. 2012. Isolation and characterization of sodium 2-fluoroacetate from *Mascagnia rigida* using chromatography and infrared spectroscopy. *Toxicon* 60(3):329–332.
- Davis C.K., Webb R.I., Sly L.I., Denman S.E. & McSweeney C.S. 2012. Isolation and survey of novel fluoroacetate-degrading bacteria belonging to the phylum *Synergistetes*. *FEMS Microbiol. Ecol.* 80(3):671-684.
- Duarte A.L.L., Medeiros R.M.T., Carvalho F.K.L., Lee S.T., Cook D., Pfister J. A., Costa V.M.M. & Riet-Correa F. 2014. Induction and transfer of resistance to poisoning by *Amorimia (Mascagnia) septentrionalis* in goats. *J. Appl. Toxicol.* 34(2):220–223.
- El-Nezami H.S., Chrevatidis A., Ariola S., Salminen S & Mykkänen H. 2002. Removal of common *Fusarium* toxins *in vitro* by strains of *Lactobacillus* and *Propionibacterium*. *Food Addit. Contam.* 19(7):680–686.
- Fetzner S. & Lingens F. 1994. Bacterial dehalogenases: biochemistry, genetics, and biotechnological applications. *Microbiol. Rev.* 58(4):641-685.
- Forster R.J., Teather R.M., Gong J. & Deng S. J.1996. 16S rDNA analysis of *Butyrivibrio fibrisolvens*: Phylogenetic position and relation to butyrate producing anaerobic bacteria from the rumen of white tailed deer. *Lett. Appl. Microbiol.* 23(4):218–222.
- Fuchs E., Binder E.M., Heidler D. & Krska R. 2002. Structural characterization of metabolites after the microbial degradation of type *A. trichothecenes* by the bacterial strain BBSH 797. *Food Addit. Contam.* 19(4):379–386.

- Gregg K., Hamdorf B., Henderson K., Kopency J. & Wong C. 1998. Genetically modified ruminal bacteria protect sheep from fluoracetate poisoning. *Appl. and Environ. Microbiol.* 64(9): 3496-3498.
- Hammond A.C., Alisson J.J., Williams M.J., Prine G.M. & Bates D.B. 1989. Prevention of leucaena toxicosis of cattle in Florida by ruminal inoculation with 3-hydroxy-4-(1H)-pyridine-degrading bacteria. *Am. J. Vet. Res.* 50(5):2176-2180.
- Haskard C.A., El-Nezami H.S., Kankaanpää P.E., Salminen S. & Ahokas J.T. 2001. Surface binding of aflatoxin B1 by lactic acid bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 67(7):3086–3091.
- Hespell R.B. 1985. Potential for manipulation of ruminal bacteria using recombinant-DNA technology, p. 95-100. In: *Biotechnology and Recombinant-DNA technology in the Animal Production Industries- Reviews in Rural Science 6*. Leng R.A., Barker J.S.F., Adams D.B. & Hutchinson K.J. (eds.), University of New England, Armidale, Australia.
- Hofmann, R.R. 1989. Evolutionary steps of ecophysiological adaptation and diversification of ruminants: a comparative view of their digestive system. *Oecol.* 78(4):443-457.
- Hungate, R.E. 1966. *The rumen and its microbes*. Academic Press, Inc., New York. 533p.
- Jönck F., Gava A., Traverso S. D., Lucioli J., Furlan F. H. & Gueller, E. 2013. Intoxicação espontânea e experimental por nitrato/nitrito em bovinos alimentados com *Avena sativa* (aveia) e/ou *Lolium* spp. (azevém). *Pesq. Vet. Bras.* 33 (9):1062-1070.
- Jones R.J. & Megarrity R.G. 1986. Successful transfer of dihydroxypyridine- degrading bacteria from Hawaiian (USA) goats to Australian ruminants to overcome the toxicity of *Leucaena*. *Aust. Vet. J.* 63(8):259–262.
- Kalishwaralal K., Deepak V., Ram Kumar Pandian S. & Gurunathan S. 2009. Biological synthesis of gold nanocubes from *Bacillus licheniformis*. *Bioresour. Technol.* 100 (21):5356–5358.
- Kamra D.N. 2005. Rumen microbial ecosystem. *Curr. Sci.* 89(1):124-134.
- Klieve A. V., Hennessy D., Ouwerkerk D., Forster R. J., Mackie R. I. & Attwood G. T. 2003. Establishing populations of *Megasphaera elsdenii* YE 34 and *Butyrivibrio fibrisolvens* YE 44 in the rumen of cattle fed high grain diets. *J. Appl. Microbiol.* 95(3):621–630.
- Kozloski G.V. 2009. Bioquímica Microbiana Ruminal, p.11-66. In: *Ibid.* (Ed), *Bioquímica dos Ruminantes*. Editora da Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria.
- Krebs H.C., Kemmerling W., Habermehl G. 1994. Qualitative and quantitative determination of fluoroacetic acid in *Arrabidea bilabiata* and *Palicourea marcgravii* by F-NMR spectroscopy. *Toxicon* 32(8):909–913.

- Kudo H., Cheng K.J., Majak W., Hall J.W. & Costerton J.W. 1984. Degradation of mimosina in rumen fluid from cattle and sheep in Canada. *Can. Jo. Anim. Sci.* 64(4):937-942.
- Kuhner C.H., Hartman P.A. & Allison M.J. 1996. Generation of a proton motive force by the anaerobic oxalate-degrading bacterium *Oxalobacter formigenes*. *Appl. Environ. Microbiol.* 62(7):2494-2500.
- Lanigan G.W. 1971. Metabolism of pyrrolizidine alkaloids in the ovine rumen. III. The competitive relationship between heliotrine metabolism and methanogenesis in rumen fluid in vitro. *Aust. J. Agric. Res.* 22(1):123-130.
- Lanigan G.W. 1976. *Peptococcus heliotrinreducans*, sp. nov., a Cytochrome-producing Anaerobe which Metabolizes Pyrrolizidine Alkaloids. *J. Gen. Microbiol.* 93(2):1-10.
- Lee S.T., Cook D., Riet-Correa F., Pfister J.A., Anderson W.R., Lima F.G. & Gardner D. 2012. Detection of monofluoroacetate in *Palicourea* and *Amorimia* species. *Toxicon* 60(5):791–796.
- Lewis D. 1951a. The metabolism of nitrate and nitrite in the sheep. 1. The reduction of nitrate in the rumen of the sheep. *Biochem. J.* 48(2):175-180.
- Lewis D. 1951b. The metabolism of nitrate and nitrite in the sheep. 2. Hydrogen donors in nitrate reduction by 385 rumen microorganisms *in vitro*. *Biochem. J.* 49(2):149-158.
- Maia, L. A., Pessoa, C. R. M., Rodrigues, A. F., Colegate, S., Dantas, A. F. M., Medeiros, R. M. T. & Riet-Correa, F. 2014. Duration of an induced resistance of sheep to acute poisoning by *Crotalaria retusa* seeds. *Ciênc. Rural*, 44 (6):1054-1059.
- Majak W. 1992. Metabolism and absorption of toxic glycosides by ruminants. *J. Range Manage.* 45(1):67-71.
- Majak W., Hunter C. & Stroesser L. 1998. Tolerance in cattle to timber milkvetch (*Astragalus miser* var. *serotinus*) due to changes in rumen microbial population, p.239-242. In: Garland T. & Barr A.C. (ed.) *Toxic Plants and Other Natural Toxicants*. CAB International, New York.
- Marchandin H., Teyssier C., Campos J., Jean-Pierre H., Roger F., Gay B., Carlier, J. P. & Jumas-Bilak E. 2009. *Negativicoccus succinicivorans* gen. nov., sp. nov., isolated from human clinical samples, emended description of the family Veillonellaceae and description of Negativicutes classis nov., Selenomonadales ord. nov. and Acidaminococcaceae fam. nov. in the bacterial phylum Firmicutes. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 60(6):1271–1279.
- Medeiros R.M.T., Riet-Correa F., Tabosa I.M., Silva Z.A., Barbosa R.C., Marques A.V.M.S. & Nogueira F.R.B. 2003. Intoxicação por nitratos e nitritos em bovinos por ingestão de *Echinochloa polystachya* (capim-mandante) e *Pennisetum purpureum* (capim-elefante) no sertão da Paraíba. *Pesq. Vet. Bras.* 23(1)17-20.

- Moore W.E.C., Holdeman M.L.V. 1986. Genus *Eubacterium* Prévot 1938, p.1353-1373. In: Sneath P.H.A., Mair N.S., Sharpe M.E., Holt J.G. (Eds), *Bergey's manual of systematic bacteriology*. Vol. 2. Baltimore, Md: The Williams & Wilkins Co.787p.
- Murray P.R., Baron E.J., Tenover F.C. & Tenover F.C. 1999. *Manual of Clinical Microbiology*. 7^a ed. American Society for Microbiology, Washington.1072p.
- Oliveira M.M. 1963. Chromatographic isolation of monofluoroacetic acid from *Palicourea marcgravii* St. Hil. *Experientia*. 19 (11):586.
- Pessoa C.R.M., Medeiros R.M.T. & Riet-Correa F. 2013. Importância econômica, epidemiologia e controle das intoxicações por plantas no Brasil. *Pesq. Vet. Bras.* 33(6):752-758.
- Pessoa D.A.N. 2014. Utilização de bactérias produtoras de dealogenases no controle da intoxicação por monofluoroacetato de sódio presente em *Amorimia septentrionalis*. Dissertação de Mestrado, Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária, Universidade Federal de Campina Grande, Patos, PB.52p.
- Petchkongkaew A., Taillandier P., Gasaluck P. & Lebrihi A. 2008. Isolation of *Bacillus* spp. from Thai fermented soybean (Thua-nao): screening for aflatoxin B1 and ochratoxin A detoxification. *J. Appl. Microbiol.* 104(5):1495-1502.
- Prins, R. A. 1971. Isolation, Culture, and Fermentation Characteristics of *Selenomonas ruminantium* var. bryanti var. n. from the Rumen of Sheep. *J. Bacteriol.* 105(3):820-825.
- Quirk M.F., Bushnell, J.J. & Jones R.J. 1988. Live- weight gains on leucaena and native grass pastures after dosing cattle with rumen bacteria capable of degrading DHP, a ruminal metabolite from leucaena. *J. Agric Sci.* 111(1):165-170.
- Radostits O.M., Gay C.C., Blood D.C. & Hinchcliff K.W. 2000. Doenças causadas por toxinas de plantas, fungos, cianofitas, clavibactéria e por venenos de carrapatos e animais vertebrados, p.1472-1547. In: *Ibid.* (Eds), *Clínica Veterinária: um tratado de doenças dos bovinos, ovinos, suínos, caprinos e eqüinos*. 9^a ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro.
- Rincón M.T., Allison M.J., Michelangeli F., De Sanctis Y. & Domènguez-Bello M.G. 1998. Anaerobic degradation of mimosine-derived hydroxypyridines by cell free extracts of the rumen bacterium *Synergistes jonesii*. *Microb. Ecol.* 27(2):127-132.
- Romão, F. T., Agudo N. M., Pereira, P. F. V., Queiroz, G. R., Cosenza, M., Ribeiro, R. C., Lisboa, J. A. N. & Reis, A. C. F. 2011. Intoxicação por nitrito em bovinos na região centro ocidental do Paraná. *Vet. e Zootec.* 18(4): 568.

- Rosenberger G. 1975. Avvelenamenti, p.1120-1364. In: Ibid. (Ed.), Malattie del Bovino. Essegivi, Piacenza.1418p.
- Russel J.B. & Wilson D.B. 1988. Potential opportunities and problems for genetically altered rumen microorganisms. J. Nutr. 118(2):271-279.
- Schatzmayr G., Zehner F., Taubel M., Schatzmayr D., Klimitsch A., Loibner A. P. & Binder E. M. 2006. Microbiologicals for deactivating mycotoxins. Mol. Nutr. Food Res. 50(6):543-551.
- Silva L.C.A., 2015. Detoxificação ruminal realizada por bactérias degradadoras de monofluoroacetato de sódio. Tese de Doutorado, Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária, Universidade Federal de Campina Grande, Patos, PB.
- Siva S., Barrack E.R., Reddy G.P.V., Thamilselvan V., Thamilselvan S., Menon M. & Bhandari M. 2009. A Critical analysis of the role of gut *Oxalobacter formigenes* in oxalate stone disease. BJU International. 103(1):18-21.
- Sly L.I., Cahill M.M., Osawa R.O. & T. Fujisawa. 1997. The tannin degrading species *Streptococcus gallolyticus* and *Streptococcus caprinus* are subjective synonyms. Int. J. Syst. Bacteriol. 47(3):893–894.
- Stewart C.S., Duncan S.H. & Cave D.R. 2004. *Oxalobacter formigenes* and its role in oxalate metabolism in the human gut. FEMS Microbiol. Lett. 230(1):1-7.
- Tsai C.G. & Jones G. A. 1975. Isolation and identification of rumen bacteria capable of anaerobic phloroglucinol degradation. Can. J. Microbiol. 21(6):794–801.
- Upadhaya S.D., Park M.A. & Ha J.K. 2010. Mycotoxins and their biotransformation in the rumen: A review. Asian- Aust. J. Anim. Sci. 23(9):1250-1260.
- Upadhaya S.D., Yang L., Seo J. K., Kim M. H., Lee C-K., Lee C. H. & Ha J.K. 2011. Effect of Feed Types on Ochratoxin A Disappearance in Goat Rumen Fluid. Asian-Aust. J. Anim. Sci. 24(2):198-20.
- Vasanthi S. & Bhat R.V. 1998. Mycotoxins in foods-occurrence, health & economic significance and food control measures. Ind. J. Med. Res. 108(12):212-224.
- Wachenheim D.E., Scott S.B., Blythe L.L. & Craig A.M. 1991. Ruminal biodegradation of pyrrolizidine alkaloids in vitro, and most probable numbers of ruminal pyrrolizidine alkaloid degrading bacteria, abstr. Q-85, p. 290. In: Abstr. 91st Gen. Meet. Am. Soc. Microbiol. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
- Wang L.C., Garcia-Rivera J. & Burris R.H. 1961. Metabolism of nitrate by cattle. Biochem. J. 81(237):237-242.

- Wecke T., Veith B., Ehrenreich A. & Mascher T. 2006. Cell envelope stress response in *Bacillus licheniformis*: integrating comparative genomics, transcriptional profiling, and regulon mining to decipher a complex regulatory network. *J. Bacteriol.* 188(21):7500-7511.
- Westlake K., Mackie R.I. & Dutton M.F. 1989. *In vitro* metabolism of mycotoxins by bacterial, protozoal and ovine ruminal fluid preparations. *Anim. Feed Sci. Technol.* 25(1):169- 178.
- Williams, G.M., Iatropoulos, M.J. 2002. Alteration of liver cell function and proliferation: differentiation between adaptation and toxicity. *Toxic. Pathology*, 30:41-53,.
- Zachary J.F. & McGavin M.D. 2013. *Bases da Patologia em Veterinária*. 5ª ed. Elsevier, Rio de Janeiro.1324p.
- Zou Z-Y, He Z-F, Li H-J, Han P-F, Meng Z., Zhang Y., Zhou F., Ouyang K.P., Chen X-Y, Tang J. 2007. *In vitro* removal of deoxynivalenol and T-2 toxin by lactic acid bacteria. *Food Sci Biotechnol.* 21(6):1677–1683.

CAPÍTULO II

Indução da resistência à intoxicação por *Amorimia septentrionalis* em caprinos, mediante utilização de bactérias degradadoras de monofluoroacetato de sódio isoladas de plantas e solos do Brasil

O presente trabalho foi formatado segundo as normas da revista Toxicon de acordo com o que estabelece a NORMA N° 01/2011 de 03 de junho de 2011, do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária da Universidade Federal de Campina Grande, Centro de Saúde e Tecnologia Rural – Campus de Patos – PB.

Indução da resistência à intoxicação por *Amorimia septentrionalis* em caprinos, mediante utilização de bactérias degradadoras de monofluoroacetato de sódio isoladas de plantas e solos¹

Layze Cilmara Alves da Silva^{2*}, Danielle Aluska do Nascimento Pessoa², José Radmácyo Gomes Lopes², Laio Gomes de Albuquerque², Leomyr Sângelo Alves da Silva³, Felício Garino Junior², Franklin Riet-Correa²

ABSTRACT.- Silva L.C.A., Pessoa D.A.N., Lopes R.G.L., Albuquerque L.G., Silva L.S.A., Garino Jr. F., Riet-Correa F. [**Resistance inducing intoxication *Amorimia septentrionalis* in goats by using degrading bacteria isolated sodium monofluoroacetate plants and soils**]. Indução da resistência à intoxicação por *Amorimia septentrionalis* em caprinos, mediante utilização de bactérias degradadoras de monofluoroacetato de sódio isoladas de plantas e solos do Brasil. Pesquisa Veterinária Brasileira 00(0):00-00. Unidade Acadêmica de Medicina Veterinária (UAMV), Centro de Saúde e Tecnologia Rural (CSTR), Universidade Federal de Campina Grande (UFCG), Av. Universitária s/n, Bairro Santa Cecília, Patos, PB, 58700-970, Brasil. *Autor para correspondência: layze.cilmara@hotmail.com

The intraruminal inoculation of sodium monofluoroacetate (MFA) degrading bacteria has been proposed as a way to prevent poisoning by *Amorimia septentrionalis* and other MFA-containing plants. This study aimed to evaluate, in goats, the resistance to *A. septentrionalis* poisoning induced by the inoculation of the bacteria *Paenibacillus* sp., *Cupriavidus* sp., *Ralstonia* sp. and *Burkholderia* sp. (isolated from Brazilian plants and soils). For this 18 goats were randomly divided into three groups of six animals each. Goats from Group 1 were dosed ingested with a solution composed by a mixture of *Paenibacillus* sp. and *Cupriavidus* sp. for 40 days at a daily dose of 60 ml. Goats from Group 2 goats received, in a similar way, the bacteria *Ralstonia* sp. and *Burkholderia* sp.. In Group 3 (control) bacteria were not inoculated. Ten days after the start of the administration of the bacteria to Groups 1 and 2, the six goats from each group ingested daily green leaves of *A. septentrionalis* at a dose of 5g/kg body weight. Four goats from Group 1 ingested the plant until the 30th day showing slight signs of intoxication (tachycardia and engorgement of the jugular). The other two animals showed initial signs of intoxication on the 15th and 16th days of the plant administration, these signs worsened on the

¹ Recebido em...

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

³ Universidade Estadual da Paraíba (UEPB), Bairro Universitário s/n, CEP 58429-500, Campina Grande PB, Brasil)

17th and 19th days and the plant administration was suspended because of the risk of death. Group 2 goats consumed the plant until the 30th day without showing any sign of intoxication. The animals from Group 3 had severe clinical signs of intoxication between the 3rd and 10th days after the start of the administration. It is concluded that the continuous intraruminal administration of *Paenibacillus* sp. and *Cupriavidus* sp. confer resistance to poisoning by *A. septentrionalis* in goats and that the administration of *Ralstonia* sp. and *Burkholderia* sp. increases the resistance to poisoning.

INDEX TERMS: Sodium monofluoracetate, sudden death, *Paenibacillus* sp., *Cupriavidus* sp., *Ralstonia* sp., *Burkholderia* sp.

RESUMO - A inoculação intraruminal de bactérias que degradam monofluoracetato de sódio (MFA) tem sido proposta como uma forma de prevenir a intoxicação por *Amorimia septentrionalis* e outras plantas que contêm essa substância. O presente trabalho teve como objetivo avaliar, em caprinos, a resistência a *A. septentrionalis*, induzida por inoculação das bactérias *Paenibacillus* sp., *Cupriavidus* sp., *Ralstonia* sp. e *Burkholderia* sp. (isoladas de plantas e solos brasileiros). Para tanto, foram utilizados 18 caprinos divididos aleatoriamente em três grupos de seis animais cada. Os caprinos do Grupo 1 receberam por via oral uma solução composta pelas bactérias *Paenibacillus* sp. e *Cupriavidus* sp. durante 40 dias, na dose diária de 60 ml por animal. Os caprinos do Grupo 2 foram inoculados, da mesma forma, com as bactérias *Ralstonia* sp. e *Burkholderia* sp. No Grupo 3 não foram inoculadas bactérias. Dez dias após o início da administração das bactérias aos Grupos 1 e 2, os caprinos dos três grupos ingeriram, diariamente, folhas verdes de *A. septentrionalis* na dose de 5g/kg de peso vivo. Quatro caprinos do Grupo 1 ingeriram a planta até o 30º dia, apresentando sinais leves de intoxicação (taquicardia e ingurgitamento da jugular). Os outros dois animais apresentaram sinais iniciais de intoxicação no 15º e 16º dias de administração da planta, esses sinais se agravaram no 17º e 19º dia e o fornecimento da mesma foi suspenso devido o risco de morte. Os caprinos do Grupo 2 consumiram a planta até o 30º dia e não apresentaram sinais de intoxicação. Já os animais do Grupo 3 apresentaram sinais clínicos graves de intoxicação e deixaram de ingerir a planta entre o 3º e 10º dia após o início de sua administração. Conclui-se que a inoculação simultânea de *Paenibacillus* sp. e *Cupriavidus* sp., em forma continuada, conferem resistência à intoxicação por *Amorimia septentrionalis* em caprinos susceptíveis e que a administração de *Ralstonia* sp. e *Burkholderia* sp. aumentam a resistência a essa intoxicação.

TERMOS DE INDEXAÇÃO: Monofluoracetato de sódio, morte súbita, *Paenibacillus* sp., *Cupriavidus* sp., *Ralstonia* sp. e *Burkholderia* sp.

INTRODUÇÃO

Amorimia septentrionalis mais comumente conhecida como tinguí contém monofluoroacetato de sódio (MFA) e pode causar insuficiência cardíaca aguda em ruminantes quando ingerida em doses tóxicas, com sinais clínicos desencadeados pelo exercício (Silva et al. 2015). *Amorimia* spp., juntamente com *Palicourea* spp. e *Arrabidaea* spp., que também contêm MFA, são responsáveis por causar cerca de 50% das mortes por plantas tóxicas em bovinos no Brasil, gerando prejuízos econômicos em todo país (Pessoa et al. 2013).

A indução da resistência ao MFA mediada pela utilização de bactérias que produzem dehalogenases e inativam esse composto tóxico, vem sendo estudada como alternativa para o controle de intoxicações (Pessoa et al. 2013). Estudos recentes demonstram o aumento da resistência à intoxicação por plantas que contêm MFA em caprinos inoculados com as bactérias degradadoras de MFA *Ancylobacter dichloromethanicus* e *Pigmentiphaga kullae* isoladas do conteúdo ruminal (Pessoa et al. 2015). Além disso, foi verificado que essa resistência pode ser transmitida de animais resistentes para animais susceptíveis pela transfaunação de conteúdo ruminal (Silva et al. 2015).

A presença de bactérias degradadoras de MFA no solo e plantas foi comprovada por Twigg & King (1991) que isolou na Austrália 24 microrganismos degradadores de MFA. Camboim et al. (2012) isolaram *Paenibacillus* sp., *Burkholderia* sp., *Cupriavidus* sp., *Staphylococcus* sp., *Ancylobacter* sp., *Ralstonia* sp. e *Stenotrophomonas* sp. de plantas e solos brasileiros, sugerindo que a capacidade de estabelecimento, multiplicação e degradação de MFA por essas bactérias no rúmem deveria ser estudada como forma de prevenir intoxicações por esse composto. O presente trabalho teve como objetivo avaliar a eficácia da utilização de bactérias degradadoras de MFA, isoladas de plantas e solos brasileiros, na detoxificação ruminal do MFA presente em *A. septentrionalis*, indicando uma possível forma de controle para a intoxicação ocasionada por essa planta.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados 18 caprinos mestiços (9 fêmeas e 9 machos), com idades de 1 a 3 anos, pesando de 20 a 40 kg, criados em áreas livres de plantas que contêm MFA, divididos aleatoriamente em três grupos de seis animais cada. Os caprinos do Grupo 1 receberam durante 40 dias, por administração oral, 60 ml

de uma solução contendo *Paenibacillus* sp. isolada de amostras de solo e *Cupriavidus* sp. isolada de plantas e solo (Camboim et al. 2012). Os caprinos do Grupo 2 receberam durante o mesmo período *Ralstonia* sp. isolada de plantas e solo e *Burkholderia* sp. isolada de amostras de solo (Camboim et al. 2012). No Grupo 3 não foram inoculadas bactérias, no entanto a planta foi oferecida da mesma forma que aos animais dos grupos 1 e 2.

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

A planta fornecida aos animais foi coletada no município de Teixeira (S7°12.24' O37°15.11', elevação 749m), localizado no estado da Paraíba, Brasil, na mesma localização da planta utilizada por Duarte et al. 2014, Pessoa et al. 2015 e Silva et al. 2015. A concentração média de MFA de 20 amostras de folhas de *A. septentrionalis* coletadas nesse local foi de 0.002 ± 0.0009% (Lee et al. 2012)

No décimo dia de inoculação, iniciou-se a administração diária de folhas verdes da planta na dose de 5g/kg aos três Grupos. Essa dose foi determinada após a administração previa a dois caprinos que adoeceram após três dias de ingestão da planta. Outros dois caprinos que receberam, diariamente, 3g/kg de *A. septentrionalis* durante 15 dias, não apresentaram sinais clínicos. A planta era oferecida de forma voluntária aos caprinos, e os que não comiam recebiam a planta mediante a administração de pequenas quantidades diretamente em suas bocas. A inoculação de bactérias foi mantida diariamente até o 30º de administração da *A. septentrionalis*, ou até que os animais demonstrassem sinais clínicos de intoxicação. Esse protocolo foi decidido após um experimento piloto realizado anteriormente com quatro caprinos divididos em dois grupos que receberam as bactérias por 10 dias e após a última dose começaram a ingerir a planta. Os dois caprinos do Grupo piloto 1 receberam uma solução contendo as bactérias *Paenibacillus* sp. e *Cupriavidus* sp. e demonstraram sinais de intoxicação 4,5 dias após o início da ingestão de *A. septentrionalis*. Os dois caprinos do Grupo 2 receberam uma solução composta por *Ralstonia* sp. e *Burkholderia* sp. verificando-se sinais de intoxicação 10 dias após o início da ingestão da planta.

Todos os dias, antes da administração da planta, os animais eram observados e eram mensuradas as frequências cardíaca e respiratória, os movimentos ruminais e a temperatura retal. Após

a administração da planta, os caprinos eram movimentados durante 10 minutos e após o final do exercício realizava-se nova mensuração dos parâmetros mencionados anteriormente. Nos caprinos que apresentavam sinais graves de intoxicação (depressão, relutância ao caminhar, tremores musculares, incoordenação motora e decúbito esternal) suspendia-se o fornecimento da planta.

A comparação da dose média de *A. septentrionalis* consumida entre os grupos foi realizada pelo teste não-paramétrico de U de Mann-Whitney uma vez que os dados não apresentaram distribuição normal frente o teste de Shapiro Wilk. Já a dose de planta ingerida e o tempo até o início dos sinais clínicos da intoxicação foi analisada pelo teste T de Student (ZAR 1999). A análise dos dados foi realizada mediante auxílio do programa R 3.0.3 com nível de significância de 5%.

RESULTADOS

Dos caprinos do Grupo 1 quatro ingeriram *A. septentrionalis* até o final da administração, no 30° dia, apresentando sinais leves de intoxicação (taquicardia e ingurgitamento da jugular) entre o 15° e 20° dias de consumo do planta, os outros 2 animais, apresentaram sinais iniciais de intoxicação no 15° e 16° dias de administração da planta. Esses sinais se agravaram no 17° e 19° dia e o fornecimento da planta foi suspenso devido o risco de morte. Os caprinos do Grupo 2 consumiram a planta até o 30° dia e não apresentaram sinais de intoxicação pela mesma. Já os animais do Grupo 3 (controle) apresentaram sinais clínicos evidentes de intoxicação e deixaram de ingerir a planta entre o 3° e 10° dia após o início de sua administração (Quadro 1).

A dose média de planta ingerida pelos animais do Grupo 1 ($130 \pm 31,14$ g/kg) e Grupo 2 ($150 \pm 0,0$ g/kg) foi significativamente diferente ($p= 0,031$ e $p= 0,035$) da dose ingerida pelo Grupo 3 ($30,83 \pm 15,94$ g/kg). Não ocorrendo diferenças significativas entre as doses consumidas pelo Grupo 1 e Grupo 2 ($p= 0,175$). A administração da planta foi suspensa no Grupo 3 após $6,16 \pm 3,18$ dias, devido à apresentação de sinais evidentes de intoxicação com risco de morte. O tempo após o início da ingestão em que cada caprino apresentou sinais clínicos foi significativamente maior ($p= 0.000064$) no Grupo 1 que recebeu a solução de bactérias do que o Grupo 3 (Quadro 1). A dose de planta ingerida pelos animais do Grupo 1 ($91,66 \pm 18,07$ g/kg) até o início dos sinais clínicos da intoxicação por *Amorimia septentrionalis* foi também, significativamente maior do que a ingerida pelos caprinos do Grupo 3 (controle) ($16,66 \pm 6,05$) ($p= 0.000060$) (Quadro 2).

Os sinais clínicos de intoxicação apresentados pelos dois animais do Grupo 1 e por todos os animais do Grupo 3 (controle) caracterizaram-se por taquicardia e taquipnéia, seguidos de

ingurgitamento da jugular e pulso venoso positivo, culminado com depressão, relutância ao caminhar, tremores musculares, mugidos, incoordenação motora e decúbito esternal.

Os animais intoxicados se recuperaram em um período de $4,5 \pm 0,57$ dias após cessar a ingestão da planta, exceto dois caprinos pertencentes ao Grupo 3 que morreram dois e três dias após o início dos primeiros sinais clínicos. Na necropsia foram observados coágulos no ventrículo esquerdo do coração e edema pulmonar. Histologicamente, no rim, pode-se constatar a presença de degeneração hidrópico-vacuolar e necrose das células epiteliais dos túbulos contornados distais.

DISCUSSÃO

Os resultados deste trabalho comprovam que a inoculação das bactérias *Ralstonia* sp. e *Burkholderia* sp. é capaz de induzir resistência a plantas que contêm MFA em caprinos, enquanto *Paenibacillus* sp. e *Cupriavidus* sp. induzem uma resistência parcial com redução de sinais característicos de intoxicação e consumo de maiores quantidades de planta que os não inoculados. É provável que essa resistência seja induzida através da capacidade de adaptação dessas bactérias a ambientes onde o MFA esta presente, permitindo que utilizassem essa substância como fonte de carbono e energia (Blümel et al. 2001, Firsova et al. 2009). Resultados semelhantes foram observados por Greeg et al. (1998) que verificaram a redução dos sinais clínicos da intoxicação por MFA em ovinos inoculados intra-ruminalmente com a bactéria *Butyrivibrio fibrisolvens*, modificada geneticamente com um gene proveniente de uma espécie de *Moraxella*, codificador de uma dealogenase. Em experimentos anteriores de indução de resistência mediante a administração continuada de doses não tóxicas de *A. septentrionalis* (Duarte et al. 2014), pela inoculação intraruminal de bactérias que hidrolisam MFA (Pessoa et al. 2015) ou por transfaunação de líquido ruminal de caprinos resistentes para caprinos susceptíveis (Duarte et al. 2014, Silva et al. 2015) o desafio com a planta foi realizado imediatamente ou até 5 semanas após ter sido finalizado a administração da bactéria ou conteúdo ruminal. Nessas condições, quando desafiados, os animais tratados demoraram mais tempo em adoecer ou ingeriram doses maiores de planta do que os controles, demonstrando um aumento significativo da resistência, mas permanecendo susceptíveis à intoxicação (Duarte et al. 2014, Silva et al. 2015, Pessoa et al. 2015). Da mesma forma, no experimento piloto mencionado no material e métodos, os caprinos que receberam *Ralstonia* sp. e *Burkholderia* sp. durante 10 dias e foram desafiados a partir do 10º dia apresentaram sinais clínicos 10 dias após a ingestão diária de 5g/kg de folhas de *A. septentrionalis*. Diferentemente, neste experimento, a administração dessas bactérias foi realizada por 10 dias antes da administração da planta, mas foi continuada durante todo o período de administração da mesma. Com este protocolo, os animais que

receberam *Ralstonia* sp. e *Burkholderia* sp. não mostraram nenhum sinal após 30 dias de administração de *A. septentrionalis*, o que sugere que a ingestão continuada de algumas bactérias que degradam MFA pode dar resistência permanente à intoxicação. O mesmo fato não ocorreu com os caprinos que receberam *Paenibacillus* sp. e *Cupriavidus* sp. que adoeceram entre 15 e 20 dias após o início do desafio. Esses resultados, no seu conjunto, sugerem que a resistência a intoxicação por plantas que contem MFA depende da administração continuada dessas bactérias e que algumas bactérias, neste caso *Ralstonia* sp. e *Burkholderia* sp., são mais eficientes do que outras.

O uso destas bactérias como probióticos, em sua forma liofilizada adicionada à ração, à sal mineral ou a água dos ruminantes poderia ser uma alternativa de controle para intoxicação por *A. septentrionalis* e outras plantas que contêm MFA, uma vez que os resultados deste experimento, sugerem que seu consumo tem que ser contínuo para que a resistência seja permanente. Nas últimas décadas, foram crescentes as pesquisas com biotecnologia de bactérias utilizadas como probióticos na prevenção e tratamento de várias situações patológicas em animais (Ávila et al. 1998, Hori et al., 2001, Shu & Gill 2001, Coppola et al. 2003).

Futuros trabalhos deverão ser realizados para determinar a eficiência e formas de preparação e administração continuada de diferentes bactérias que degradam MFA para que possam ser utilizadas comercialmente para evitar as intoxicações pelas diferentes espécies de *Amorimia* que contêm MFA. Outro ponto a ser investigado é a eficiência dessas bactérias em proteger aos animais de intoxicação por *Palicourea* spp., que contêm concentrações de MFA bem maiores do que *Amorimia* spp (Cook et al. 2014).

CONCLUSÃO

Conclui-se que a inoculação continuada de *Ralstonia* sp. e *Burkholderia* sp., administradas simultaneamente, conferem resistência a doses tóxicas de *A. septentrionalis* e que a administração de *Paenibacillus* sp. e *Cupriavidus* sp. aumentam a resistência a essa intoxicação.

AGRADECIMENTOS

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

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ávila, F.A., Schocken- Iturrino, R. P., Quintana, J. L., Basso, A. & Ambrosim, J.A. 1998. Use of vaccine and probiotic in the control of swine diarrhea caused by enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Arq. Bras. Med. Vet. e Zootec.* 50(5): 505-511.
- Blümel S., Mark B., Busse H. J., Kämpfer & P. Stolz A. 2001. *Pigmentiphaga kullae* gen. nov., sp. nov., a novel member of the family Alcaligenaceae with the ability to decolorize azo dyes aerobically. *Internat. J. Syst. Evol. Microbiol.* 51(5):1867–1871.
- Camboim E.K.A., Tadra-Sfeir M.Z., Souza E.M., Pedrosa F.O., Andrade P.P., McSweeney C.S., Riet-Correa F. & Melo M.A. 2012. Defluorination of sodium fluoroacetate by bacteria from soil and plants in Brazil. *Scientif. World J.* 2012:149893.
- Coppola, M.M., Conceição, F.R., Gil-Turnes, C. 2005. Effect of *Saccharomyces boulardii* and *Bacillus cereus* var. *toyoi* on the humoral and cellular response of mice to vaccines. *Food Agric. Immunol.* 16(3): 2013-2019.
- Duarte A.L.L., Medeiros R.M.T., Carvalho F.K.L., Lee S.T., Cook D., Pfister J. A., Costa V.M.M. & Riet-Correa F. 2014. Induction and transfer of resistance to poisoning by *Amorimia (Mascagnia) septentrionalis* in goats. *J. Appl. Toxicol.* 34(2):220–223.
- Firsova J., Doronina N., Lang E., Spröer C., Vuilleumier S. & Trotsenko Y. 2009. *Ancylobacter dichloromethanicus* sp. nov.- a new aerobic facultatively methylotrophic bacterium utilizing dichloromethane. *Syst. App. Microbiol.* 32(4): 227–232.
- Gregg K., Hamdorf B., Henderson K., Kopency J. & Wong C. 1998. Genetically modified ruminal bacteria protect sheep from fluoracetate poisoning. *Appl. and Environ. Microbiol.* 64(9): 3496-3498.
- Hori, T., Kiyoshima, J., Shida, K., Yasui, H. 2001. Effect of intranasal administration of *Lactobacillus casei* Shirota on Influenza virus infection of upper respiratory tract in mice. *Clin. Diagn. Lab Immunol.* 8(3): 593-597.
- Lee ST, Cook D, Riet-Correa F, Pfister JA, Anderson WR, Lima FG, Gardner D. 2012. Detection of monofluoroacetate in *Palicourea* and *Amorimia* species. *Toxicon* 60: 791–796.
- Pessoa C.R.M., Medeiros R.M.T. & Riet-Correa F. 2013. Importância econômica, epidemiologia e controle das intoxicações por plantas no Brasil. *Pesq. Vet. Bras.* 33(6):752-758.
- Pessoa D.A.N., Silva L.C.A., Garino F.J., Lopes J.R.G., Macêdo M.M.S., 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.

Silva L.C.A., Pessoa, D.A.N., Lopes, R.G.L., Silva, L.S.A., Albuquerque, L.G., Medeiros, R.M.T., Garino Jr., F. & Riet-Corrêa, F. 2015. Transfer of resistance to *Amorimia septentrionalis* poisoning in goats by transfer of ruminal fluid from goats with resistance induced by the inoculation of sodium monofluoroacetate-degrading bactéria. *Ciência Rural*. No prelo.

Silva L.C.A., Pessoa, D.A.N., Garino Jr., F. & Riet-Corrêa, F. 2015. Detoxificação bacteriana de toxinas de plantas e micotoxinas no rúmen. *Pesquisa Veterinária Brasileira*. No prelo.

Shu, Q.; Qu, F.; Gill, H.S. Probiotic treatment using *Bifidobacterium lactis* HN019 reduces weanling diarrhoea associated with rotavirus and *Escherichia coli* infection in a piglet model. 2001. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 33(2): 171-177.

Twigg, L. E. & D. R. King, "The impact of fluoroacetate-bearing vegetation on native Australian fauna: a review. 1991. *Oikos.* 61(3): 412–430.

Quadro 1. Tempo para início dos sinais clínicos da intoxicação por *Amorimia septentrionalis* em caprinos inoculados com as bactérias degradadoras de monofluoroacetato de sódio *Paenibacillus* sp. e *Cupriavidus* sp. (Grupo 1) e caprinos controle (Grupo 3) ^a

	Grupo 1						Grupo 3					
Animais (N^o)	1	2	3	4	5	6	1	2	3	4	5	6
Dias para início dos sinais clínicos	20	15	24	20	15	16	3	5	4	2	2	4
$\bar{x} \pm \sigma^b$	18,33±3,61 ^c						3,33±1,21					

^aOs caprinos do Grupo 2 não adoeceram

^bMédia ± desvio padrão

^cDiferença estatisticamente significativa com o grupo controle (P<0,05).

Quando 2. Dose de planta ingerida até o início dos sinais clínicos da intoxicação por *Amorimia septentrionalis* em caprinos inoculados com as bactérias degradadoras de monofluoroacetato de sódio *Paenibacillus* sp. e *Cupriavidus* sp. (Grupo 1) e caprinos controle (Grupo 3)

	Grupo 1						Grupo 3					
Animais (N^o)	1	2	3	4	5	6	1	2	3	4	5	6
Dose de planta (g/kg) ingerida	100	75	120	100	75	80	15	25	20	10	10	20
$\bar{x} \pm \sigma^*$	91,66 ±18,07 ^a						16,66±6,05					

*Média ± desvio padrão

^aDiferença estatisticamente significativa com o grupo controle (P<0,05).

CAPÍTULO III

Transferência da resistência à intoxicação por *Amorimia septentrionalis* em caprinos mediante transfaunação de conteúdo ruminal proveniente de caprinos inoculados com bactérias degradadoras de monofluoroacetato de sódio

O presente trabalho foi formatado segundo as normas da revista Ciência Rural de acordo com o que estabelece a Norma NORMA N° 01/2011 de 03 de junho de 2011, do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária da Universidade Federal de Campina Grande, Centro de Saúde e Tecnologia Rural – Campus de Patos – PB.

Transferência da resistência à intoxicação por *Amorimia septentrionalis* em caprinos mediante transfaunação de conteúdo ruminal proveniente de caprinos inoculados com bactérias degradadoras de monofluoroacetato de sódio

Transfer of resistance to *Amorimia septentrionalis* poisoning in goats by transfer of ruminal fluid from goats inoculated with sodium monofluoroacetate-degrading bacteria

Layze Cilmara Alves da Silva^{I*}, Danielle Aluska do Nascimento Pessoa^I, José Radmácyo Gomes Lopes^I, Leomyr Sângelo Alves da Silva^{II}, Laio Gomes de Albuquerque^I, Rosane Maria Trindade de Medeiros^I, Felício Garino Junior^I, Franklin Riet-Correa^I

RESUMO

Amorimia septentrionalis é uma planta que contém monofluoroacetato de sódio (MFA) e causa morte súbita em ruminantes. O objetivo deste trabalho foi determinar se a resistência à intoxicação conferida por *A. septentrionalis* em caprinos inoculados com as bactérias degradadoras de MFA, *Ancylobacter dichloromethanicus* e *Pigmentiphaga kullae*, pode ser transferida, por transfaunação ruminal, para outros caprinos suscetíveis. Para tanto foram utilizados dois caprinos previamente inoculados com bactérias degradadoras de MFA e dois grupos de oito caprinos para o experimento de transfaunação, denominados Grupo 1 e Grupo 2. Os caprinos do Grupo 1 receberam 4 doses diárias de 160 ml de conteúdo ruminal dos caprinos resistentes e, posteriormente, ingeriram 8 doses diárias de 5g/kg da planta. Os caprinos do Grupo 2 (controle) receberam apenas a planta. Dos caprinos do Grupo 1 apenas 2 animais apresentaram discreta taquicardia e leve ingurgitamento da jugular no 4° e 5° dia do experimento, no entanto, estes voltaram ao normal, mesmo com a continuação da administração da planta. Todos os animais do grupo controle apresentaram sinais graves de intoxicação e a administração da planta foi suspensa entre o 3° e o 7° dia. Conclui-se que a transfaunação de líquido ruminal de caprinos previamente inoculados com bactérias degradadoras de MFA induz resistência à intoxicação por *A. septentrionalis* em outros caprinos susceptíveis.

Palavras chave: *Ancylobacter dichloromethanicus*, *Pigmentiphaga kullae*, morte súbita, plantas tóxicas.

* ^IHospital Veterinário, Centro de Saúde e Tecnologia Rural, Universidade Federal de Campina Grande, Patos, PB 58700-000, Brasil. *Autor para correspondência: layze.cilmara@hotmail.com

^{II} Universidade Estadual da Paraíba (UEPB), Bairro Universitário s/n, CEP 58429-500, Campina Grande PB, Brasil)

ABSTRACT

Amorimia septentrionalis is a sodium monofluoroacetate (MFA)- containing plant that causes sudden death in ruminants. The aim of this study was to determine whether the resistance to *A. septentrionalis* poisoning in goats conferred by the intra-ruminal inoculation of the MFA- degrading bacteria *Ancylobacter dichloromethanicus* and *Pigmentiphaga kullae* can be transferred to susceptible goats by transfaunation of rumen content. Two groups of 8 goats and 2 goats resistant to *A. septentrionalis* poisoning were used. Goats in group 1 received four daily doses of 160ml of rumen content from resistant goats and subsequently ingested 8 daily doses of 5g/kg of *A. septentrionalis*. Goats from group 2 (control) received only the plant. No goats in group 1 showed clinical signs except for mild tachycardia and mild jugular engorgement observed in 2 animals in the 4th and 5th day, which subsequently returned to normal, even with the continuation of plant administration. All control goats showed severe signs of intoxication and the plant administration was suspended between the third 3rd and the 7th day. It is concluded that the transfer of ruminal fluid goats previously inoculated with MFA-degrading bacteria induces resistance to poisoning by *A. septentrionalis* in other susceptible goats. Keywords: *Ancylobacter dichloromethanicus*, *Pigmentiphaga kullae*, sudden death, toxic plants.

INTRODUÇÃO

Amorimia septentrionalis, mais comumente conhecida como tingui (MAMEDE, 2010), faz parte de um importante grupo de plantas tóxicas do Brasil, as quais contém monofluoroacetato de sódio (MFA) (LEE et al., 2012) e causam morte súbita em bovinos (TOKARNIA et al. 1994, MEDEIROS et al. 2002), caprinos (OLIVEIRA et al., 1978) e ovinos (SILVA et al., 2008), com sinais clínicos desencadeados pelo exercício (TOKARNIA et al., 2012). *Amorimia* spp., juntamente com *Palicourea* spp. e *Arrabidaea* spp., são responsáveis por causar cerca de 50% das mortes por plantas tóxicas em bovinos no Brasil, gerando prejuízos econômicos em todo país (PESSOA et al., 2013).

Alternativas para o controle dessas intoxicações vêm sendo estudadas, entre elas a indução da resistência ao MFA mediada pela utilização de bactérias que produzem dehalogenases e inativam esse composto tóxico (PESSOA et al., 2013). A presença dessas bactérias aeróbias no rúmen de caprinos foi comprovada por CAMBOIM et al. (2012b) que isolou *Ancylobacter dichloromethanicus* e *Pigmentiphaga kullae* do conteúdo ruminal desses animais. Estudos recentes demonstraram o aumento da resistência à intoxicação por plantas que contém MFA em caprinos inoculados com essas bactérias (PESSOA, 2014). A administração de pequenas quantidades de folhas frescas de *Palicourea aene-*

ofusca (OLIVEIRA et al., 2013) e *A. septentrionalis* (DUARTE et al., 2014) induzem, também, resistência parcial à intoxicações por MFA em caprinos, sugerindo que bactérias degradadoras de MFA podem ser habitantes normais da flora ruminal e que alimentação contendo esse substrato estimula sua multiplicação, produzindo dehalogenases capazes de detoxificar MFA (CAMBOIM et al., 2012a). Além disso, foi verificado que essa resistência pode ser transmitida de animais resistentes para animais susceptíveis pela transfaunação de líquido ruminal (DUARTE et al., 2014). Esses resultados sugerem a necessidade de estudar diferentes formas de induzir resistência à intoxicação por MFA, incluindo a inoculação de bactérias que degradam MFA e a transfaunação de conteúdo ruminal proveniente de animais resistentes, buscando alternativas que possam proteger aos animais e serem aplicadas em condições de campo.

O objetivo deste trabalho foi determinar se a resistência à intoxicação por *A. septentrionalis* em caprinos conferida pela inoculação das bactérias degradadoras de MFA *A. dichloromethanicus* e *P. kullae* pode ser transferida para caprinos que nunca tiveram contato com plantas que contém MFA através de transfaunação de conteúdo ruminal.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados 16 caprinos jovens sem raça definida (8 fêmeas e 8 machos) criados em áreas livres de plantas que contêm MFA divididos aleatoriamente em dois grupos de 8 animais cada: um grupo controle (Grupo 2) e um grupo de caprinos que receberam conteúdo ruminal (Grupo 1) de 2 caprinos resistentes. Nestes, a resistência tinha sido induzida anteriormente pela administração oral durante 10 dias de 60ml de uma solução contendo *A. dichloromethanicus* e *P. kullae*, diluída conforme a escala 1 de Mac Farland; seguida, no décimo dia de inoculação, pela administração diária de folhas verdes de *A. septentrionalis* na dose de 5g/kg por um período de 8 dias (PESSOA, 2014).

O conteúdo ruminal dos caprinos resistentes foi obtido em frascos de vidro estéreis, por meio de uma bomba de sucção ligada a uma sonda ruminal. Após ser filtrado em gazes estéreis, 160ml do suco ruminal foi administrado, diariamente, durante 4 dias, a cada caprino do Grupo 1. No 4º dia de transfaunação foi iniciada a administração diária de folhas verdes, recentemente coletadas, de *A. septentrionalis*, na dose de 5g/kg. As folhas foram administradas durante 8 dias por via oral, colocando pequenas quantidades na boca dos animais. Os caprinos do grupo 2 (controle) receberam a planta da mesma forma que os do Grupo 1. A planta fornecida aos animais foi coletada no município de Teixeira (S7°12.24' O37°15.11', elevação 749m), localizado no estado da Paraíba, Brasil, na mesma localização da planta utilizada por DUARTE et al. (2014).

Todos os dias, antes da administração da planta, os animais eram observados e eram mensuradas as frequências cardíaca e respiratória, os movimentos ruminais e a temperatura retal. Após a administração da planta, os caprinos eram movimentados durante 10 minutos e após o final do exercício realizava-se nova mensuração dos parâmetros mencionados anteriormente. Nos caprinos que apresentavam sinais evidentes de intoxicação (depressão, relutância ao caminhar, tremores musculares, incoordenação motora e decúbito esternal) suspendia-se o fornecimento da planta.

Antes da administração de *A. septentrionalis* e a cada 2 dias após a início da sua ingestão foram coletadas amostras sanguíneas mediante punção jugular, em tubos a vácuo, sem anticoagulante (Vacutainer[®]). Amostras de soro foram obtidas após centrifugação (Centrifuga Eppendorf[®], modelo 5804R) a 1600G por 15 minutos. Foram determinadas as atividades séricas de aspartato aminotransferase (AST), gama glutamiltransferase (GGT), fosfatase alcalina (FA) e as concentrações séricas de creatinina, ureia, proteínas totais, albumina, globulina, cálcio, fósforo, potássio e sódio utilizando e kits comerciais (Labteste[®]). A leitura foi realizada em analisador bioquímico semi-automático Bioclin Systems II, os resultados foram interpretados segundo KANEKO et al. (2008).

Foram considerados resistentes os animais que não apresentaram sinais clínicos característicos da intoxicação durante todo o período de administração da planta. A comparação da resistência entre os dois grupos foi realizada pelo Teste de Fischer. A diferença dos níveis séricos de fósforo e de cálcio entre os grupos 1 e 2, e a quantidade média de planta consumida por esses animais, foram analisadas estaticamente pelo teste não-paramétrico de U de Mann-Whitney, uma vez que os dados não apresentaram distribuição normal frente o teste de Shapiro Wilk (ZAR, 1999). A análise dos dados foi realizada mediante auxílio do programa R 3.0.3 com nível de significância de 5%.

RESULTADOS

Os caprinos do grupo 1 ingeriram a planta até o final da administração, no 8^o dia. Apenas 2 animais, apresentaram sinais iniciais leves de taquicardia e ingurgitamento da jugular, após o exercício, no 4^o e 5^o dia do experimento; no entanto, a dose diária da planta foi mantida, e nos dias decorrentes esses sinais não foram evidenciados. Esses resultados foram significativamente diferentes ($p=0,00007$) dos observados nos 8 caprinos do grupo controle, que apresentaram sinais clínicos evidentes de intoxicação e deixaram de ingerir a planta entre o 3^o e 7^o dia após o início de sua administração (Tabela 1). A dose de planta ingerida pelos animais do grupo 2, controle, ($25\pm 6,54\text{g/kg}$) foi significativamente diferente ($p=0,0001$) da dose ingerida pelo grupo 1 (40g/kg), que recebeu conteúdo ruminal de animais resistentes.

Os sinais clínicos dos animais do grupo 2 (controle) caracterizaram-se por taquicardia e taquipneia, seguidos de ingurgitamento da jugular e pulso venoso positivo, culminado com depressão, relutância ao caminhar, tremores musculares, incoordenação motora e decúbito esternal. A latência (média do número de dias) da dosagem inicial até a primeira observação de sinais clínicos nesse grupo foi de $3,5 \pm 1,06$ dias, após a ingestão média de $17,5 \pm 5,34$ g/kg de *A. septentrionalis*. A administração da planta foi suspensa após $5 \pm 1,30$ dias, com um consumo médio total de $25 \pm 6,54$ g/kg nesse tempo, devido à apresentação de sinais evidentes de intoxicação com risco de morte (Tabela 1.).

Todos os animais intoxicados se recuperaram em um período de 12-24 horas após cessar a ingestão da planta, exceto um caprino que morreu dois dias após o início dos primeiros sinais clínicos. Na necropsia foram observados coágulos no coração e edema pulmonar. Na histologia a única alteração significativa foi a degeneração hidrópico-vacuolar nas células do epitélio dos túbulos contorcidos distais do rim.

Não foram observadas alterações nos níveis séricos de creatinina, ureia, proteínas totais, albumina e magnésio nem nas atividades séricas de AST, GGT e FA. A concentração sérica de cálcio e fósforo após administração de *A. septentrionalis* ficou dentro dos padrões normais no Grupo 1 (KANEKO et al., 2008), diferindo significativamente do Grupo 2, no qual ocorreu aumento dos níveis de fósforo ($p=0,02$) e diminuição dos valores de cálcio ($p=0,02$) (Tabela 2).

DISCUSSÃO

Os resultados apresentados no presente trabalho comprovam que a transferência do conteúdo ruminal de caprinos resistentes à intoxicação por *A. septentrionalis* para caprinos susceptíveis, induz a resistência destes à intoxicação, permitindo um maior consumo da planta sem causar intoxicação. Neste caso a resistência dos animais doadores de líquido ruminal tinha sido adquirida pela inoculação de bactérias que degradam MFA seguida da administração da planta, o que sugere a possibilidade de utilizar essa técnica como forma de prevenir a intoxicação.

GREGG et al. (1998) relatam a redução dos sinais clínicos da intoxicação por MFA em ovinos inoculados intra-ruminalmente com a bactéria *Butyrivibrio fibrisolvens*, modificada geneticamente com um gene proveniente de uma espécie de *Moraxella*, codificador de uma dealogenase.

Estudos realizados por nosso grupo de pesquisa relatam a indução parcial da resistência à intoxicação por *A. septentrionalis* em seis caprinos após a inoculação intra-ruminal de *A. dichloromethanicus* e *P. kullae* (PESSOA, 2014); dois desses caprinos, foram utilizados como doadores de conteúdo ruminal no presente trabalho; os mesmos, tinham recebido as bactérias e

posteriormente *A. septentrionalis*, apresentado sinais clínicos leves de intoxicação após ingerir durante 8 dias, doses diárias de 5g/kg da mesma planta utilizada neste experimento. Considerando que todos os caprinos transfaunados no presente trabalho, ingeriram também 5g/kg durante 8 dias de *A. septentrionalis*, podemos inferir que a transferência de conteúdo ruminal de caprinos resistentes a intoxicação por *A. septentrionalis* pela inoculação de bactérias degradadoras de MFA, para caprinos susceptíveis, confere resistência semelhante à adquirida por caprinos mediante a inoculação intraruminal de bactérias que degradam MFA. No entanto, é provável que a resistência adquirida pelos animais doadores após a inoculação das bactérias tenha aumentado em consequência da ingestão da planta durante o desafio. DUARTE et al. (2014) verificaram que a transferência de conteúdo ruminal de animais alimentados com doses não letais da planta por períodos prolongados também confere resistência parcial à intoxicação.

Esses resultados, no seu conjunto, sugerem que as três técnicas (inoculação de bactérias que degradam MFA, administração de plantas que contêm MFA e transfaunação) podem ser utilizadas combinadamente para induzir resistência à intoxicação. Novos trabalhos deverão ser realizados para, mediante a utilização dessas técnicas, estabelecer a melhor forma de induzir resistência, qual é o grau de resistência que pode ser induzido e por quanto tempo. Deve ser levada em consideração a quantidade e a toxicidade da planta que os animais ingerem espontaneamente, pois se com a inoculação de bactérias se aumenta a resistência de forma que os animais possam ingerir doses maiores de plantas que contêm MFA sem adoecer, é provável que a ingestão dessas doses em forma continuada possa aumentar ou manter a resistência necessária para não ocorrer mortes. Um fato bem conhecido é que animais criados em áreas onde ocorre *A. septentrionalis* são menos susceptíveis que animais criados em áreas onde não ocorre essa planta (SILVA et al., 2008), mas não se sabe se essa resistência é adquirida pela ingestão de doses não tóxicas da planta ou devida a seleção natural em consequência da morte dos animais susceptíveis. Resistência em animais que permanecem em áreas onde ocorre a planta não tem sido descrita na intoxicação por espécies de *Palicourea*, que são muito mais tóxicas que *Amorimia* spp. (TOKARNIA et al., 2012; LEE et al., 2012). Dessa forma é esperada maior dificuldade na indução de resistência a intoxicação por *Palicourea* spp. do que a intoxicação por *Amorimia* spp.

Os sinais clínicos apresentados pelos animais do grupo 2 e a vacuolização de células epiteliais dos túbulos contorcidos distais dos rins, observada no único animal que morreu, são semelhantes aos descritos anteriormente em ruminantes (MEDEIROS et al., 2002; RIET-CORREA et al., 2006 ; SILVA et al. 2008; VASCONCELOS et al, 2008; TOKARNIA et al., 2012 e DUARTE et al., 2014).

O aumento dos valores séricos de fósforo e a diminuição dos valores de cálcio nos animais que apresentaram quadro de intoxicação, são semelhante aos observados por PEREIRA et al. (1996) e BORBOLETA et al. (2011), sugerindo a ocorrência de alterações na homeostase desses elementos devido à ação do MFA no organismo animal. De acordo com BORBOLETA et al. (2011), distúrbios nesses eletrólitos podem atuar desestabilizando o potencial de repouso das membranas celulares e afetando várias vias metabólicas dependentes desses íons. No ciclo de Krebs, o MFA presente na *A. septentrionalis* é transformado em fluorocitrato e durante esse processo há queda na produção de ATP, que leva ao bloqueio de uma série de processos metabólicos dependentes de energia (CLARKE, 1991), o que pode ter desestabilizado a homeostasia do cálcio e fósforo.

CONCLUSÃO

Conclui-se que a transfaunação de líquido ruminal de caprinos previamente inoculados com bactérias degradadoras de MFA induz resistência à intoxicação por *A. septentrionalis* em outros caprinos susceptíveis.

AGRADECIMENTOS

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

COMISSÃO DE ÉTICA

O experimento foi aprovado pela comissão de ética em experimentação animal da Universidade Federal de Campina Grande (UFCG), processo CEP 69-2013.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BORBOLETA, L.R., et al. Perfil bioquímico sanguíneo na intoxicação experimental com extrato de *Mascagnia rigida* (A. Juss.) Griseb. (Malpighiaceae) em coelhos. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.63, n.5, p.1113-1123, 2011. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0102-09352011000500011&script=sci_arttext. Acesso em: 19 jun. 2014. doi:<http://dx.doi.org/10.1590/S0102-09352011000500011>.

CAMBOIM, E.K.A., et al. Defluorination of sodium fluoroacetate by bacteria from soil and plants in Brazil 2012a. **The Scientific World Journal**. v.2012, id.149893, p.5. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3349100/>. Acesso em: 03 mar. 2013. doi:10.1100/2012/149893.

CAMBOIM, E.K.A., et al. Isolation of sodium fluoroacetate degrading bacteria from caprine rumen in Brazil 2012b. **The Scientific World Journal**. v.2012, ID 178254, p.6. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3417187/>. Acesso em 17 jul. 2013. doi:10.1100/2012/178254.

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

DUARTE, A.L.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. 2014.

GREGG, K., et al. Genetically modified ruminal bacteria protect sheep from fluoracetate poisoning. **Applied and Environmental Microbiology**. v.64, n.9, p. 3496-3498, 1998. Disponível em: <http://aem.asm.org/content/64/9/3496.full>. Acesso em: 12 Jun. 2014. doi 10.1128/AEM.02188-14

KANEKO, J.J., et al. Blood analyte reference values in some laboratory animals. In: **Clinical biochemistry of domestic animal**. 5.ed. Philadelphia: Academic, 2008. Appendix IX, p. 881-887.

LEE, S.T., et al. Detection of monofluoroacetate in *Palicourea* and *Amorimia* species. **Toxicon**, v.60, n.5, p.791-796, 2012. doi: 10.1016/j.toxicon.2012.05.029.

MAMEDE, M.C.H. *Amorimia* in **Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 2010. Acesso em 20 set. 2012. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/2010/FB101439>>.

MEDEIROS, R.M.T., et al. Sudden death caused by **Mascagnia rigida** in cattle in Paraíba, Northeastern Brazil. **Veterinary and Human Toxicology** v.44, n.5, p. 286-288, 2002. Acesso em: 05 jun. 2013. doi: <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-736X2008001000003>.

OLIVEIRA, A.C., et al. Intoxicação por um "tingui" (**Mascagnia rigida** Griseb.) em caprinos na Bahia. In: **XVI Congresso Brasileiro de Medicina Veterinária**, Salvador, Bahia, Anais, p.172. 1978.

OLIVEIRA M.D., et al. Indução de resistência à intoxicação por **Palicourea aeneofusca** (Rubiaceae) mediante administração de doses sucessivas não tóxicas. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. v.33, n.6, p.731-734. 2013. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0100-736X2013000600007&script=sci_arttext. Acesso em: 06 mar. 2014. doi: <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-736X2013000600007>.

PEREIRA, A.S., et al. Alterações bioquímicas e patológicas em caprinos intoxicados por tinguí (**Mascagnia rigida**). In: **CONGRESSO PANAMERICANO DE CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**. 15., 1996, Campo Grande, MS. *Anais*. Campo Grande: Associação Panamericana de Ciências Veterinárias, 1996. v.1, p.152.

PESSOA C.R.M., et al. Importância econômica, epidemiologia e controle das intoxicações por plantas no Brasil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. v.33, n.6, p. 752-758, 2013. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100736X2013000600011. Acesso em: 13 jan. 2014. doi: <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-736X2013000600011>.

PESSOA, D.A.N. 2014. Utilização de bactérias produtoras de dealogenases no controle da intoxicação por monofluoroacetato de sódio presente em **Amorimia septentrionalis**. **Dissertação de Mestrado**- Pós Graduação em Medicina Veterinária, Universidade Federal de Campina Grande- Centro de Saúde e Tecnologia Rural, Patos- PB.

RIET-CORREA, F., et al. **Plantas Tóxicas da Paraíba**. Centro de Saúde e de Tecnologia Rural/SEBRAE/PB, Patos, p.1-58, 2006.

SILVA, I.P. et al. 2008. Intoxicação natural pelas folhas de *Mascagnia rígida* (Malpighiaceae) em ovinos. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v.75, n.2, p.229-233, 2008. Disponível em: http://www.biologico.sp.gov.br/docs/arq/v75_2/silva.pdf. Acesso em: 10 mar. 2014. doi: <http://dx.doi.org/10.1590/S1808-16572013000300001>.

TOKARNIA, C.H. et al. **Plantas tóxicas do Brasil para animais de produção**. 2.ed. Rio de Janeiro: Helianthus, 2012. 566p.

TOKARNIA, C.H., et al. Aspectos clinicopatológicos complementares da intoxicação por algumas plantas tóxicas brasileiras. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. v.14, n.4, p.111-121, 1994. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-736X1998000100003. Acesso em 03 abr. 2014. doi: <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-736X1998000100003>.

VASCONCELOS, J.S. et al. Intoxicação por *Mascagnia rígida* (Malpighiaceae) em ovinos e caprinos. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.28, n.10, p.521-526, 2008. Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/pvb/v28n10/v28n10a13.pdf>. Acesso em: 03 fev. 2014. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-736X2008001000013>.

ZAR, J. H. **Biostatistical Analysis**. 4a. ed. New Jersey, USA: Prentice Hall, 1999. 929 p.

Tabela 1. Tempo de administração e quantidade de *Amorimia septentrionalis* ingerida pelos caprinos controles (Grupo 2).

Animais	Início dos sinais clínicos		Final da administração (sinais clínicos graves)	
	Dias	Quantidade de planta consumida (g/kg)	Dias	Quantidade de planta consumida (g/kg)
1	3	15	4	20
2	4	20	5	25
3	5	25	7	35
4	3	15	5	25
5	5	25	6	30
6	3	15	6	30
7	2	10	3	15
8	3	15	4	20
$\bar{x} \pm \sigma^*$	3,5±1,06	17,5±5,34	5±1,3	25±6,54

*Média ± desvio padrão

Tabela 2. Valores médios e desvio padrão de cálcio e fósforo séricos de 16 caprinos pertencentes aos grupos 1 e 2 do experimento, submetidos à administração de *Amorimia septentrionalis* por via oral durante 8 dias.

	Tempo (Dias)	Grupo 1*	Grupo 2
Fósforo (mg/dL)	0	6,42±0,77	6,38±1,00
	2	6,46±1,21	9,12±1,93
	4	7,47±1,79	9,70±3,03
	6	7,53±1,61	11,06±2,86
	8	7,55±1,19	11,08±2,28
Cálcio (mg/dL)	0	8,94±0,67	8,96±1,00
	2	8,92±0,65	8,28±1,63
	4	9,05±0,30	7,08±1,72
	6	9,35±0,50	7,83±3,06
	8	8,97±0,86	8,50±2,95

Valores de Referência (Cálcio: 8,9-11,77 g/ml; Fósforo: 4,2-9,1 g/ml); * Diferença estatisticamente significativa com o grupo controle (p<0,05).

CONCLUSÃO

O estudo de bactérias que realizam detoxificação ruminal em animais possibilita alternativas para controle de intoxicações por plantas e por micotoxinas, mediante a detoxificação de compostos nocivos ao organismo animal.

Sendo verificado que a inoculação continuada das bactérias degradadoras de MFA, isoladas de plantas e solos brasileiros, *Ralstonia* sp. e *Burkholderia* sp., administradas simultaneamente, conferem resistência a doses tóxicas de *A. septentrionalis* e que a administração de *Paenibacillus* sp. e *Cupriavidus* sp. aumentam a resistência a essa intoxicação.

A transfaunação de líquido ruminal de caprinos previamente inoculados com bactérias degradadoras de MFA induz resistência à intoxicação por *A. septentrionalis* em outros caprinos susceptíveis, permitindo um maior consumo da planta sem causar intoxicação, podendo ser utilizada como alternativa para proteger os animais e serem aplicadas em condições de campo.

Evidências demonstradas no presente trabalho fortalecem estudos futuros sobre o uso dessas bactérias como instrumentos de avanços biotecnológicos permitindo inovações e benefícios no setor da medicina veterinária.