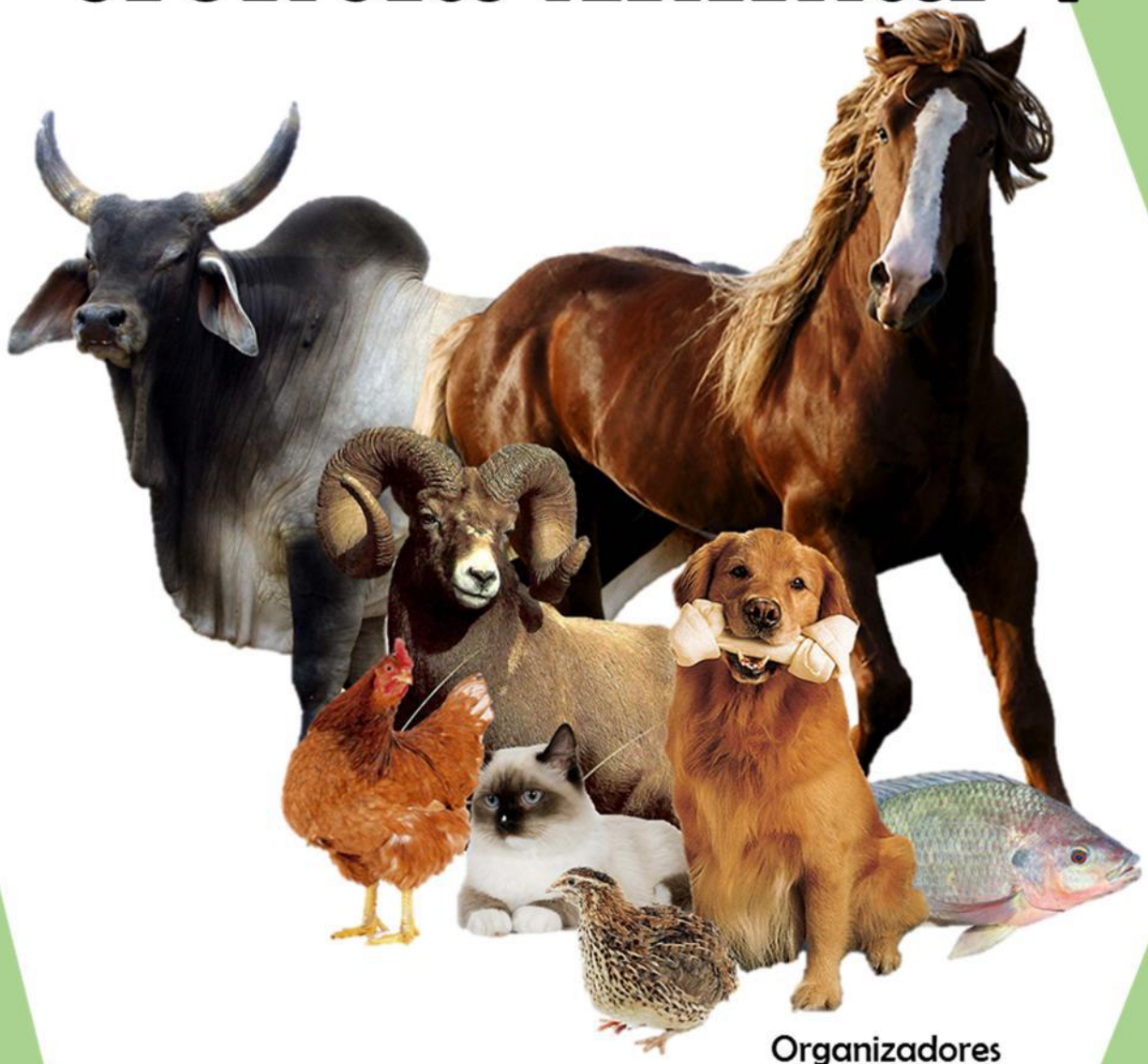
Tópicos especiais em Ciência Animal V



Organizadores
Ulysses Rodrigues Vianna
Fabrício Albani Oliveira
José Romário de Carvalho
Joelly Mariano Barbosa

Agência Brasileira do ISBN
ISBN 978-85-61890-87-2
9 788561 890872

PPGC
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS
CCAE-UFES

ULYSSES RODRIGUES VIANNA
FABRÍCIO ALBANI OLIVEIRA
JOSÉ ROMÁRIO DE CARVALHO
JOELLY MARIANO BARBOSA
(ORGANIZADORES)

TÓPICOS ESPECIAIS EM CIÊNCIA ANIMAL V

1ª EDIÇÃO

ALEGRE-ES
CAUFES
2016

CCAE-UFES
Centro de Ciências Agrárias e Engenharias, Universidade Federal do Espírito Santo
Alto Universitário, s/n, Guararema, Alegre-ES
Telefone: (28) 3552-8955 – Fax (28) 3552-8903
www.alegre.ufes.br/ccae

ISBN: 978-85-61890-87-2
Editor: CAUFES
Dezembro 2016

Diagramação e capa

José Romário de Carvalho

Dados Internacionais de Catalogação-na-publicação (CIP)
(Biblioteca Setorial de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Espírito Santo, ES, Brasil)

T674 Tópicos especiais em Ciência Animal V [e-book] / Ulysses Rodrigues Vianna ... [et al.]. – 1. ed. – Alegre, ES : CAUFES, 2016.

506 p. : il.

Inclui bibliografia.
ISBN: 978-85-61890-87-2

1. Medicina Veterinária. 2. Zootecnia. 3. Diagnóstico de enfermidades. 4. Ciência. 5. Reprodução Animal. 6. Nutrição Animal. I. Vianna, Ulysses Rodrigues.

CDU: 619

Os textos apresentados nessa edição são de inteira responsabilidade dos autores. Os organizadores não se responsabilizam pela revisão ortográfica e gramatical dos trabalhos apresentados.

REITOR – UFES
REINALDO CENTODUCATTE

DIRETOR DO CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E ENGENHARIAS – UFES
DIRCEU PRATISSOLI

COORDENADOR - PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS
MARCOS SANTOS ZANINI

ORGANIZADORES DESTA OBRA
ULYSSES RODRIGUES VIANNA
FABRÍCIO ALBANI OLIVEIRA
JOSÉ ROMÁRIO DE CARVALHO
JOELLY MARIANO BARBOSA

APRESENTAÇÃO

A coletânea “Tópicos especiais em Ciência Animal” teve o início das suas publicações em 2012 com o objetivo de agregar a Jornada Cientifica da Pós-Graduação em Ciências Veterinárias da Universidade Federal do Espírito Santo. Em 2014, mesmo não sendo realizada a Jornada de Iniciação Científica, o Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias (PPGCV) decidiu que a obra teria a sua continuidade, onde seriam publicados trabalhos dos professores integrantes do quadro do Programa (PPGCV).

Esta obra, até o momento, consta de quatro volumes publicados, sendo este o volume V. Desta forma o presente livro, obra cuidadosamente produzida como fruto do tranbalho de diversos autores, corresponde a uma compilação aprimorada do material por eles utilizado e extensivamente testado em disciplinas de graduação e de Pós-graduação ministradas na Universidade Federal do Espírito Santo.

O material aqui apresentado tem como finalidade principal servir como texto fundamental de estudo sobre Ciência Animal, nas linhas de Pesquisa do Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias da Universidade Federal do Espírito Santo: 1) Reprodução e Nutrição Animal e 2) Diagnóstico e Terapêutica das Enfermidades Clínico-Cirúrgicas. Seu público-alvo é, portanto, os alunos da Graduação e da Pós-Graduação das áreas de Ciências Agrárias, Biológicas, Farmacêuticas, Medicina Veterinária e Zootecnia.

Assim, apresentamos o livro “TÓPICOS ESPECIAIS EM CIÊNCIA ANIMAL V”, sendo permitido seu pleno uso de textos e figuras, desde que respeitados os direitos dos autores a terem os devidos créditos. Ainda, os textos apresentados nessa edição são de inteira responsabilidade dos autores. Os organizadores não se responsabilizam pela revisão ortográfica e gramatical dos trabalhos apresentados.

OS ORGANIZADORES

LISTA DE AUTORES

Adilson Vidal Costa. Departamento de Química e Física, Centro de Ciências Exatas, Naturais e da Saúde, Universidade Federal do Espírito Santo, Alegre-ES, e-mail: avcosta@hotmail.com

Afonso Cassa Reis. Graduando em Medicina Veterinária, Centro de Ciências Agrárias e Engenharias, Universidade Federal do Espírito Santo, Alegre-ES, e-mail: afonsocassa@hotmail.com

Alda Trivellato Lanna Neta. Mestranda em Ciências Veterinárias, Centro de Ciências Agrárias e Engenharias, Universidade Federal do Espírito Santo, Alegre-ES, e-mail: alda.neta@hotmail.com

Alessandra Cunha Lopes. Instituto Federal do Espírito Santo, *Campus* Ibatiba, Ibatiba-ES, e-mail: alessandra.lopes@ifes.edu.br

Amanda Pereira dos Anjos. Mestranda em Ciências Veterinárias, Centro de Ciências Agrárias e Engenharias, Universidade Federal do Espírito Santo, Alegre-ES, e-mail: amandaveterinaria@gmail.com

Ana Paula Madureira. Universidade Federal de São João Del Rei, São João Del Rei-MG, e-mail: ana_paulamad@hotmail.com

Anderson Barros Archanjo. Doutorando em Biotecnologia, Centro de Ciências Agrárias e Engenharias, Universidade Federal do Espírito Santo, Alegre-ES, e-mail: andersonarchanjo@gmail.com

Andressa Ribeiro Vicentini. Mestranda em Ciências Veterinárias, Centro de Ciências Agrárias e Engenharias, Universidade Federal do Espírito Santo, Alegre-ES, e-mail: andry.ribeiro@hotmail.com

Antônio Carlos Cóser. Bolsista DCR do CNPq/FAPES, e-mail: acoser1@yahoo.com.br

Antonio de Calais Júnior. Universidade Estadual do Norte Fluminense, Campos dos Goytacazes-RJ, e-mail: vetcalais@gmail.com

Carla Braga Martins. Departamento de Medicina Veterinária, Centro de Ciências Agrárias e Engenharias, Universidade Federal do Espírito Santo, Alegre-ES, email: cbmvt@hotmail.com

Carlos Augusto Alencar Fontes. Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Laboratório de Zootecnia e Nutrição Animal (LZNA), Universidade Estadual do Norte Fluminense, CCTA/UENF, Campos dos Goytacazes-RJ, e-mail: cafontes@uenf.br

Clara Souto dos Santos. Graduanda em Zootecnia, Centro de Ciências Agrárias e Engenharias, Universidade Federal do Espírito Santo, Alegre-ES, e-mail: clara_sds@hotmail.com

Danilo de Vargas Gonçalves Vieira. Professor do Curso de Zootecnia da Universidade Federal do Tocantins, UFT, Araguaína-TO, e-mail: danilovargaszoo@hotmail.com

Deolindo Stradiotti Júnior. Departamento de Zootecnia, Centro de Ciências Agrárias e Engenharias, Universidade Federal do Espírito Santo, Alegre-ES, e-mail: jrstradiotti@terra.com.br

Dione Henrique Breda Binoti. Zootecnista, Centro de Ciências Agrárias e Engenharias, Universidade Federal do Espírito Santo, Alegre-ES, e-mail: dionebinoti@hotmail.com

Drielly Gomes Bizarria. Graduanda em Zootecnia, Centro de Ciências Agrárias e Engenharias, Universidade Federal do Espírito Santo, Alegre-ES, e-mail: drielly.bizarria@hotmail.com

Dyeime Ribeiro de Sousa. Médica Veterinária Autônoma, e-mail: dyeimester@gmail.com

Edina Santos Alves. Mestranda em Ciências Veterinárias, Centro de Ciências Agrárias e Engenharias, Universidade Federal do Espírito Santo, Alegre-ES, e-mail: edinaalves91@hotmail.com

Eduardo Vargas de Oliveira. Médico Veterinário autônomo, e-mail: duvargass@hotmail.com

Elaine Gimenez Guimarães. Graduanda, Centro de Ciências Agrárias e Engenharias, Universidade Federal do Espírito Santo, Alegre-ES, e-mail: elainegimenezg@hotmail.com

Elisa Liz Belli Cassa Domingues. Mestranda em Nutrição e Saúde, Centro de Ciências Exatas, Naturais e da Saúde, Universidade Federal do Espírito Santo, Alegre-ES, e-mail: elisappo@gmail.com

Elizabêth Fonseca Processi. Doutora em Ciência Animal, Campos dos Goytacazes-RJ, e-mail: processi@zootecnista.com.br

Fabiane Matos dos Santos. Departamento de Farmácia e Nutrição, Centro de Ciências Exatas, Naturais e da Saúde, Universidade Federal do Espírito Santo, Alegre-ES, e-mail: fabiane.santos@ufes.br

Fábio Costa Henry. Professor do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal e do Laboratório de Tecnologia de Alimentos (LTA) da Universidade Estadual do Norte Fluminense, CCTA/UENF, Campos dos Goytacazes -RJ, e-mail: fabiocosta@henry@uenf.br

Fabrício Albani Oliveira. Instituto Federal do Espírito Santo, *Campus* Alegre, Alegre-ES, e-mail: fabricio.oliveira@ifes.edu.br

Fernanda de Paula Roldi Vieira. Mestranda em Ciências Veterinárias, Centro de Ciências Agrárias e Engenharias, Universidade Federal do Espírito Santo, Alegre-ES, e-mail: fernandaroldi@hotmail.com

Francine Alves Nogueira de Almeida. Departamento de Farmácia e Nutrição, Centro de Ciências Exatas, Naturais e da Saúde, Universidade Federal do Espírito Santo, Alegre-ES, e-mail: frannogueir@yahoo.com.br

Gabriel Pinto Brunoro. Graduando em Zootecnia, Centro de Ciências Agrárias e Engenharias, Universidade Federal do Espírito Santo, Alegre-ES, e-mail: gabrielbrunorozoo@hotmail.com

Gercílio Alves de Almeida Junior. Departamento de Zootecnia, Centro de Ciências Agrárias e Engenharias, Universidade Federal do Espírito Santo, Alegre-ES, e-mail: gerciliozootec@uol.com.br

Gisele Rodrigues Moreira. Departamento de Engenharia Rural, Centro de Ciências Agrárias e Engenharias, Universidade Federal do Espírito Santo, Alegre-ES, e-mail: gisele.moreira@ufes.br

Graziela Barioni. Departamento de Medicina Veterinária, Centro de Ciências Agrárias e Engenharias, Universidade Federal do Espírito Santo, Alegre-ES, e-mail: grazibari@gmail.com

Greiciane Gaburro Paneto. Departamento de Farmácia e Nutrição, Centro de Ciências Exatas, Naturais e da Saúde, Universidade Federal do Espírito Santo, Alegre-ES, e-mail: ggpaneto@gmail.com

Higor Azevedo Assis. Mestrando em Ciências Veterinárias, Centro de Ciências Agrárias e Engenharias, Universidade Federal do Espírito Santo, Alegre-ES, e-mail: higorassis_@hotmail.com

Hugo da Silva Nascimento. Graduando em Zootecnia, Centro de Ciências Agrárias e Engenharias, Universidade Federal do Espírito Santo, Alegre-ES, e-mail: hugonas@gmail.com

Ingrid Ney Kramer de Mello. Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-MG, e-mail: ingkramer@yahoo.com.br

Isabella Vilhena Freire Martins. Departamento de Medicina Veterinária, Centro de Ciências Agrárias e Engenharias, Universidade Federal do Espírito Santo, Alegre-ES, e-mail: ivfmartins@gmail.com

Ítalo Câmara de Almeida. Médico Veterinário Centro de Ciências Agrárias e Engenharias, Universidade Federal do Espírito Santo, Alegre-ES, e-mail: almeidaicvet@gmail.com

Jacymara Dutra Santos. Mestranda em Ciências Veterinárias, Centro de Ciências Agrárias e Engenharias, Universidade Federal do Espírito Santo, Alegre-ES, e-mail: jacydutra28@gmail.com

Jairo Pinheiro da Silva. Departamento de Ciências Fisiológicas, Instituto de Biologia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, Brasil, e-mail: pinheiro@ufrrj.br

Jankerle Neves Boeloni. Departamento de Medicina Veterinária, Centro de Ciências Agrárias e Engenharias, Universidade Federal do Espírito Santo, Alegre-ES, e-mail: jankerle@gmail.com

Joelly Mariano Barbosa. Mestranda em Ciências Veterinárias, Centro de Ciências Agrárias e Engenharias, Universidade Federal do Espírito Santo, Alegre-ES, e-mail: joellymariano@hotmail.com

Jonhny de Azevedo Maia Júnior. Doutorando em Ciência Animal, Universidade Estadual do Norte Fluminense, CCTA/UENF, Campos dos Goytacazes-RJ, e-mail: jonhnymaia@yahoo.com.br

José Augusto Oliveira David. Universidade Federal de São Carlos, Campus Lagoa do Sino, Buri-SP, e-mail: joseaugustodavid@hotmail.com

José de Oliveira Carvalho. Departamento de Medicina Veterinária, Centro de Ciências Agrárias e Engenharias, Universidade Federal do Espírito Santo, Alegre-ES, email: joseocneto@hotmail.com

José Geraldo Vargas Júnior. Departamento de Zootecnia, Centro de Ciências Agrárias e Engenharias, Universidade Federal do Espírito Santo, Alegre-ES, email: josegeraldovargas@yahoo.com.br

José Romário de Carvalho. Doutorando em Produção Vegetal, Centro de Ciências Agrárias e Engenharias, Universidade Federal do Espírito Santo, Alegre-ES, email: jromario_carvalho@hotmail.com

Juliana Aparecida Severi. Departamento de Farmácia e Nutrição, Centro de Ciências Exatas, Naturais e da Saúde, Universidade Federal do Espírito Santo, Alegre-ES, e-mail: juseveri@yahoo.com.br

Julianne Almeida Rodrigues. Mestranda em Ciências Veterinárias, Centro de Ciências Agrárias e Engenharias, Universidade Federal do Espírito Santo, Alegre-ES, e-mail: julianne_ar@hotmail.com

Julio Lopes Sequeira. Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", São Paulo-SP, e-mail: sequeira@fmvz.unesp.br

Júlio Valiati Marin. Graduando em Zootecnia, Centro de Ciências Agrárias e Engenharias, Universidade Federal do Espírito Santo, Alegre-ES, e-mail: julio_valiati@hotmail.com

Kamila Teixeira Pandolfi. Mestranda em Ciências Veterinárias, Centro de Ciências Agrárias e Engenharias, Universidade Federal do Espírito Santo, Alegre-ES, e-mail: kamilapandolfi@yahoo.com.br

Karina Preising Aptekmann. Departamento de Medicina Veterinária, Centro de Ciências Agrárias e Engenharias, Universidade Federal do Espírito Santo, Alegre-ES, e-mail: kapreising@gmail.com

Karolyne Coutinho Vieira. Graduanda, Universidade Federal do Espírito Santo, Alegre-ES, e-mail: karolvieiras2@hotmail.com

Laila Cecília Ramos Bendia. Doutoranda em Ciência Animal, Universidade Estadual do Norte Fluminense, CCTA/UENF, Campos dos Goytacazes-RJ, e-mail: lailabendia@yahoo.com.br

Larice Tosi Marques. Mestranda em Ciências Veterinárias, Centro de Ciências Agrárias e Engenharias, Universidade Federal do Espírito Santo, Alegre-ES, e-mail: marques.larice@hotmail.com

Larissa Marchiori Sena. Mestranda em Ciências Veterinárias, Centro de Ciências Agrárias e Engenharias, Universidade Federal do Espírito Santo, Alegre-ES, e-mail: la_marchiori@hotmail.com

Layara Pestana Sarmento. Mestranda em Ciências Veterinárias, Centro de Ciências Agrárias e Engenharias, Universidade Federal do Espírito Santo, Alegre-ES, e-mail: layarapestana@gmail.com

Letícia Mária Costa Fregulhia. Mestranda em Ciências Veterinárias, Centro de Ciências Agrárias e Engenharias, Universidade Federal do Espírito Santo, Alegre-ES, e-mail: lefregulhia@hotmail.com

Letícia Maria Silva Uzai. Mestranda em Ciências Veterinárias, Centro de Ciências Agrárias e Engenharias, Universidade Federal do Espírito Santo, Alegre-ES, e-mail: leticiauzai@hotmail.com

Livia Reisen Perin. Mestranda em Ciências Veterinárias, Centro de Ciências Agrárias e Engenharias, Universidade Federal do Espírito Santo, Alegre-ES, e-mail: livia_perin@hotmail.com

Louisiane de Carvalho Nunes. Departamento de Medicina Veterinária, Centro de Ciências Agrárias e Engenharias, Universidade Federal do Espírito Santo, Alegre-ES, e-mail: louisiane.nunes@ufes.br

Lucas Pedro Gonçalves Junior. Doutorando em Zootecnia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte-MG, e-mail: juniorvezula@hotmail.com

Luciano Bertolani Filho. Graduando em Zootecnia, Centro de Ciências Agrárias e Engenharias, Universidade Federal do Espírito Santo, Alegre-ES, e-mail: lucianobertolanifilho@hotmail.com

Maiara Bianchini Narde. Mestranda em Ciências Veterinárias, Centro de Ciências Agrárias e Engenharias, Universidade Federal do Espírito Santo, Alegre-ES, e-mail: maiara.bn@hotmail.com

Marcel Arcanjo Silva Azevedo. Médico Veterinário autônomo, e-mail: marcel.arcanjo@hotmail.com

Marcela Santos Sena Martins. Mestranda em Ciências Veterinárias, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campo Grande-MS, e-mail: marcelasena2@hotmail.com

Marcele Temporim Novaes. Mestranda em Ciências Veterinárias, Centro de Ciências Agrárias e Engenharias, Universidade Federal do Espírito Santo, Alegre-ES, e-mail: marcelle_temporim@hotmail.com

Marcos Santos Zanini. Departamento de Medicina Veterinária, Centro de Ciências Agrárias e Engenharias, Universidade Federal do Espírito Santo, Alegre-ES, e-mail: zaninims@gmail.com

Maria Aparecida da Silva. Departamento de Biologia, Centro de Ciências Exatas, Naturais e da Saúde, Universidade Federal do Espírito Santo, Alegre-ES, e-mail: mvmariaaparecida@gmail.com

Mariana Paganini Lourencini. Mestranda em Ciências Veterinárias, Centro de Ciências Agrárias e Engenharias, Universidade Federal do Espírito Santo, Alegre-ES, e-mail: mariplourencini@gmail.com

Nara Clara Lazaroni e Merchid. Mestranda em Ciências Veterinárias, Centro de Ciências Agrárias e Engenharias, Universidade Federal do Espírito Santo, Alegre-ES, e-mail: nara.merchid@ufv.br

Natália Oliveira Cabral. Doutoranda em Ciência Animal, Universidade Estadual do Norte Fluminense, CCTA/UENF, Campos dos Goytacazes-RJ, e-mail: nataliacabral@zootecnista.com.br

Natalia Viana Tamiasso. Mestranda em Ciências Veterinárias, Centro de Ciências Agrárias e Engenharias, Universidade Federal do Espírito Santo, Alegre-ES, e-mail: natalia_tamiasso@yahoo.com.br

Nathalia Chicon Elert. Mestranda em Ciências Veterinárias, Centro de Ciências Agrárias e Engenharias, Universidade Federal do Espírito Santo, Alegre-ES, e-mail: nathalia.elert@hotmail.com

Nayara Camatta Campos. Mestranda em Ciências Veterinárias, Centro de Ciências Agrárias e Engenharias, Universidade Federal do Espírito Santo, Alegre-ES, e-mail: ncamattavet@gmail.com

Pablo Viana Oliveira. Mestrando em Biotecnlogia, Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória-ES, e-mail: pablo.viana27@gmail.com

Paula Otoni Pereira Ronzani Santos. Mestranda em Ciências Veterinárias, Centro de Ciências Agrárias e Engenharias, Universidade Federal do Espírito Santo, Alegre-ES, e-mail: paularonzani@hotmail.com

Pedro Pierro Mendonça. Instituto Federal do Espírito Santo, *Campus* Alegre, Alegre-ES, e-mail: ppierrom@gmail.com

Roselena Abreu Guedes. Mestranda em Ciências Veterinárias, Centro de Ciências Agrárias e Engenharias, Universidade Federal do Espírito Santo, Alegre-ES, e-mail: rosinhafarma25@gmail.com

Sâmila Esteves Delprete. Mestranda em Ciências Veterinárias, Centro de Ciências Agrárias e Engenharias, Universidade Federal do Espírito Santo, Alegre-ES, e-mail: samiladelprete@hotmail.com

Stefani Graceda Silva Moraes. Mestranda em Ciências Veterinárias, Centro de Ciências Agrárias e Engenharias, Universidade Federal do Espírito Santo, Alegre-ES, e-mail: stefani.moraes@outlook.com

Stelio Simões de Morais. Médico Veterinário Autônomo, e-mail: stelio_mv06@hotmail.com

Taiana Alencar. Graduanda em Farmácia, Centro de Ciências Exatas, Naturais e da Saúde, Universidade Federal do Espírito Santo, Alegre-ES, e-mail: taiana_alencar@hotmail.com

Talita Pinheiro Bonaparte. Pós-Doutoranda em Ciências Veterinárias, Centro de Ciências Agrárias e Engenharias, Universidade Federal do Espírito Santo, Alegre-ES, e-mail: talitabonaparte@gmail.com

Thadeu de Castro. Mestranda em Ciências Veterinárias, Centro de Ciências Agrárias e Engenharias, Universidade Federal do Espírito Santo, Alegre-ES, e-mail: thadeudecastro@hotmail.com

Thays de Carvalho Amorim. Mestranda em Ciências Veterinárias, Centro de Ciências Agrárias e Engenharias, Universidade Federal do Espírito Santo, Alegre-ES, e-mail: mv.thaysamorim@gmail.com

Ulysses Rodrigues Vianna. Departamento de Produção Vegetal, Centro de Ciências Agrárias e Engenharias, Universidade Federal do Espírito Santo, Alegre-ES, e-mail: ulyssesvianna@hotmail.com

Vagner Tebaldi de Queiroz. Departamento de Química e Física, Centro de Ciências Exatas, Naturais e da Saúde, Universidade Federal do Espírito Santo, Alegre-ES, e-mail: vagnertq@gmail.com

Victor Menezes Tunholi. Pós-Doutorando em Ciências Veterinárias, Centro de Ciências Agrárias e Engenharias, Universidade Federal do Espírito Santo, Alegre-ES, e-mail: victortunholi@yahoo.com.br

Vinícius Menezes Tunholi-Alves. Departamento de Ciências Fisiológicas, Instituto de Biologia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica-RJ, e-mail: vinícius_menezestunholi@yahoo.com.br

Winner Duque Rodrigues. Graduando em Farmácia, Universidade Federal do Espírito Santo, Alegre-ES, e-mail: winnerduque@gmail.com

SUMÁRIO

DIAGNÓSTICO E TRATAMENTO DAS ENFERMIDADES CLÍNICO-CIRÚRGICAS

Capítulo 1 - Epidemiologia da doença de chagas canina.....21
Maiara Bianchini Narde; Elisa Liz Belli Cassa Domingues; Fabiane Matos dos Santos.

Capítulo 2 - Avaliação da proliferação e viabilidade celular.....33
Livia Reisen Perin; Elaine Gimenez Guimarães; Greiciane Gaburro Paneto; Francisco de Paula Careta.

Capítulo 3 - Utilização do DNA *Barcoding* na ciência animal.....41
Pablo Viana Oliveira; Francine Alves Nogueira de Almeida; Greiciane Gaburro Paneto; Francisco de Paula Careta.

Capítulo 4 - Aspectos relacionados à brucelose, diarreia viral bovina e rinotraqueíte infecciosa bovina e sua relação com a qualidade do leite.....51
Ítalo Câmara de Almeida; Larissa Marchiori Sena; Layara Pestana Sarmento; Graziela Barioni; Fabrício Albani Oliveira.

Capítulo 5 - *Biomphalaria* spp. e equinostomíase: aspectos biológicos e estudos experimentais desta interface.....65
Victor Menezes Tunholi; Vinícius Menezes Tunholi-Alves; Jairo Pinheiro da Silva; Isabella Vilhena Freire Martins.

Capítulo 6 - Uso de métodos de flutuação na rotina laboratorial para diagnóstico das principais helmintoses de animais domésticos.....87
Fernanda de Paula Roldi Vieira; Layara Pestana Sarmento; Marcela Santos Sena Martins; Isabella Vilhena Freire Martins.

Capítulo 7 – Panorama da avicultura e principais causas de condenações *post mortem* em frangos de corte.....103
Kamila Teixeira Pandolfi; Jankerle Neves Boeloni.

Capítulo 8 – Fatores que influenciam a diferenciação condrogênica das células-tronco mesenquimais da medula óssea e do tecido adiposo: novas perspectivas.....121
Nathalia Chicon Elert; Higor Azevedo Assis; Jankerle Neves Boeloni.

Capítulo 9 – Fitoterapia na Medicina Veterinária.....137
Roselena Abreu Guedes, Larice Tosi Marques; Marcele Temporim Novaes; Winner Duque Rodrigues; Juliana Aparecida Severi.

Capítulo 10 – Plantas da família Rubiaceae úteis ao tratamento de enfermidades veterinárias.....149
Andressa Ribeiro Vicentini; Taiana Alencar; Karolyne Coutinho Vieira; Juliana Aparecida Severi.

Capítulo 11 – Ecocardiografia nas principais cardiopatias congênitas em cães.....163
Edina Alves dos Santos; Afonso Cassa Reis; Paula Otoni Pereira Ronzani Santos; Karina Preising Aptekmann.

Capítulo 12 – Guia prático de ecocardiografia em cães.....179
Afonso Cassa Reis; Edina Alves dos Santos; Paula Otoni Pereira Ronzani Santos; Karina Preising Aptekmann.

Capítulo 13 – Impacto das atividades pesqueiras como causa de morte em tartarugas-verdes (*Chelonia mydas*) nas praias da costa Espírito Santo entre 2013 e 2014.....189
Letícia Maria Silva Uzai; Antonio de Calais Júnior; Louisiane de Carvalho Nunes.

Capítulo 14 – Lesões microscópicas em fígados bovinos condenados por fasciolose provenientes de região endêmica para *Brachiaria* spp. no Estado do Espírito Santo.....203
Natalia Viana Tamiasso; Isabella Vilhena Freire Martins; Louisiane de Carvalho Nunes.

Capítulo 15 – Expressão de VEGF e CD31 na vasculatura vesical de bovinos com hematúria enzoótica: avaliação intra e extratumoral.....213
Maria Aparecida da Silva; Dyeime Ribeiro de Sousa; Anderson Barros Archanjo; Julio Lopes Sequeira; Ana Paula Madureira; Louisiane de Carvalho Nunes.

Capítulo 16 – Lavado vesical de bovinos com hematúria enzoótica: expressão de p53 e uso do teste do cometa.....233
Natalia Viana Tamiasso; Marcel Arcanjo Silva Azevedo; Eduardo Vargas de Oliveira; Anderson Barros Archanjo; José Augusto Oliveira David; Julio Lopes Sequeira; Louisiane de carvalho Nunes.

Capítulo 17 – Xenotransplantes e o uso de células e órgãos de suínos na medicina humana.....245
Talita Pinheiro Bonaparte; José Geraldo Vargas Júnior; Danilo de Vargas Gonçalves Vieira, Drielly Gomes Bizarria, Hugo da Silva Nascimento, Natália Oliveira Cabral; Elizabêth Fonseca Processi; Dione Henrique Breda Binoti.

Capítulo 18 – Mastite bovina.....255
Joelly Mariano Barbosa; Jacymara Dutra Santos; Julianne Almeida Rodrigues; Ulysses Rodrigues Vianna.

Capítulo 19 – Excipientes para medicamentos anti-helmínticos destinados a uso de ruminantes.....269
Marcelle Temporim Novaes; Vagner Tebaldi de Queiroz; Adilson Vidal Costa.

Capítulo 20 – Métodos de controle do carrapato *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *microplus*.....281
Nayara Camatta Campos; Vagner Tebaldi de Queiroz; Adilson Vidal Costa.

Capítulo 21 – Potencial fitoterapêutico de *Punica granatum* L. (romãzeira) em medicina veterinária.....301
Thays de Carvalho Amorim; Andressa Ribeiro Vicentini; Winner Duque Rodrigues; Juliana Aparecida Severi; Marcos Santos Zanini.

REPRODUÇÃO E NUTRIÇÃO ANIMAL

Capítulo 22 – Maturação oocitária bovina.....315
Larissa Marchiori Sena; Ítalo Câmara de Almeida; Nara Clara Lazaroni e Merchid; José de Oliveira Carvalho; Carla Braga Martins.

Capítulo 23 – Espermatogênese e fatores que podem alterar a produção e qualidade de sêmen em touros.....327
Nara Clara Lazaroni e Merchid; Amanda dos Anjos; Thadeu de Castro; Fabrício de Oliveira Albani; Alessandra Cunha Lopes.

Capítulo 24 – Ultrassonografia Doppler: princípios e principais utilizações na reprodução da fêmea equina.....341
Thadeu de Castro; Nara Clara Lazaroni e Merchid; Amanda Pereira dos Anjos; Fabrício Albani Oliveira; Alessandra Cunha Lopes.

Capítulo 25 – Dieta 100% concentrado para bovinos de corte.....355
Sâmila Esteves Delprete; Letícia Mária Costa Fregulhia; Gercílio Alves de Almeida Junior; Luciano Bertolani Filho; Ingrid Ney Kramer de Mello; Gisele Rodrigues Moreira.

Capítulo 26 – Diferimento de pastagem para bovinocultura de corte.....375
Sâmila Esteves Delprete; Letícia Mária Costa Fregulhia; Luciano Bertolani Filho; Antônio Carlos Cóser; Deolindo Stradiotti Júnior; Gisele Rodrigues Moreira.

Capítulo 27 – Relação entre transtornos metabólicos e reprodutivos no pós-parto de vacas leiteiras.....391
Jacymara Dutra Santos; Mariana Paganini Lourencini; Larissa Marchiori Sena; Joelly Mariano Barbosa; Stelio Simões de Morais; Graziela Barioni.

Capítulo 28 – Fatores que afetam a qualidade da carne.....409
Natália Cabral Oliveira; Fábio Costa Henry; Elizabeth Fonsêca Processi; Jonhny de Azevedo Maia Júnior; Dione Henrique Breda Binoti, José Geraldo Vargas Júnior; Talita Pinheiro Bonaparte.

Capítulo 29 – Redução do custo da proteína e seus benefícios para piscicultura.....429
Stefani Graceda Silva Moraes; Lucas Pedro Gonçalves Junior; Pedro Pierro Mendonça.

Capítulo 30 – Fitoquímicos e moléculas bioativas em nutrição de organismos aquáticos.....443
Lucas Pedro Gonçalves Junior; Stefani Graceda Silva Moraes; Pedro Pierro Mendonça.

Capítulo 31 – Fatores que afetam a síntese de proteína microbiana no rúmen.....461
Elizabeth Fonsêca Processi; Carlos Augusto Alencar Fontes; Natália Oliveira Cabral; Laila Cecília Ramos Bendia; Dione Henrique Breda Binoti, Talita Pinheiro Bonaparte; José Geraldo Vargas Júnior.

Capítulo 32 – Alimentação líquida para suínos.....479
Talita Pinheiro Bonaparte; José Geraldo Vargas Júnior; Drielly Gomes Bizarria; Hugo da Silva Nascimento; Clara Souto dos Santos; Júlio Valiati Marin; Gabriel Pinto Brunoro; Natália Oliveira Cabral; Elizabêth Fonseca Processi; Dione Henrique Breda Binoti.

Capítulo 33 – Potencial inseticida de extratos de plantas em *Sitophilus* spp. 493
Julianne Almeida Rodrigues; Alda Trivellato Lanna Neta; Joelly Mariano Barbosa; Ulysses Rodrigues Vianna, José Romário de Carvalho.

Capítulo

1

Epidemiologia da doença de chagas canina

Maiara Bianchini Narde[1]
Elisa Liz Belli Cassa Domingues[2]
Fabiane Matos dos Santos[3]

1 INTRODUÇÃO

A doença de Chagas ou tripanossomíase americana é uma doença parasitária que tem como agente etiológico o *Trypanosoma (Schyzotripanum) cruzi*, um protozoário flagelado transmitido naturalmente ao ser humano pelas fezes do triatomíneo conhecido como barbeiro, o inseto vetor do parasito (CHAGAS, 1909).

A doença de Chagas é classificada como uma zoonose, uma vez que apresenta o envolvimento de diferentes espécies de animais silvestres e domésticos considerados reservatórios do parasito (MACEDO; JUNIOR, 2004). Entre os animais domésticos considerados reservatórios do parasito, destaca-se o cão pela maior proximidade humana e, portanto, maior influência na transmissão da doença de Chagas humana (COHEN; GÜRTIER, 2001). O cão ainda desenvolve alterações patológicas crônicas ocasionadas pelo *T. cruzi* que muito se assemelham com as que ocorrem nos humanos (BARR et al., 1995; BRADLEY et al.,

[1] Universidade Federal do Espírito Santo, e-mail: maiara.bn@hotmail.com;
[2] Universidade Federal do Espírito Santo, e-mail: elisappo@gmail.com;
[3] Universidade Federal do Espírito Santo, e-mail: fabiane.santos@ufes.br.

2000; COHEN; GÜRTLER et al., 1991). Neste sentido, o cão também é muito importante como modelo experimental para condução de estudos sobre quimioterapia e patogenia da doença de Chagas, pois além de possuir um tempo de vida prolongado, aproximadamente 20 anos, é altamente susceptível à infecção pelo *T. cruzi* e apresenta a evolução das fases aguda e crônica de maneira similar à infecção humana, sendo bem reproduzidas as formas clínicas crônicas da doença (ANDRADE, 1984; BAHIA et al., 2002; CALDAS et al., 2013; CALIARI et al., 1995; GUEDES et al., 2002, 2004; LANA et al., 1988; SANTOS et al., 2012; TAFURI et al., 1988).

2 A INFECÇÃO PELO *Trypanosoma cruzi*

A principal via de transmissão do *T. cruzi* é a vetorial, pela qual ocorre a penetração do *T. cruzi* em mucosas ou na pele lesionada (SCHOFIELD, 1994). Entretanto, há outras vias de transmissão que são predominantes principalmente em áreas não endêmicas, como transplante de órgãos, transfusão de sangue e via congênita, onde o indivíduo que possui a doença de Chagas representa um risco de ocasionar a transmissão da doença na ausência do inseto vetor e das precárias condições ambientais que são necessárias para sua existência (FORÉS et al., 2007; PRATA, 2001).

A transmissão vetorial do parasito para um hospedeiro vertebrado ocorre quando após o repasto sanguíneo pelo vetor infectado o mesmo defeca no local e a forma infectante tripomastigota metacílica presente nesses dejetos penetra no hospedeiro. A forma tripomastigota do parasito é infectante ao hospedeiro vertebrado, e uma vez no interior celular transforma-se na forma amastigota, que se divide por fissão binária e libera na circulação sanguínea as formas tripomastigotas sanguíneas. Por sua vez, em hospedeiros invertebrados o *T. cruzi* inicia seu ciclo quando o inseto vetor ao se alimentar do sangue (repasto sanguíneo) de hospedeiros vertebrados infectados ingere conjuntamente as formas tripomastigotas sanguíneas infectantes, permitindo assim a continuidade do ciclo biológico (NELSON; COUTO, 2006). Neste contexto, o cão infectado pelo *T. cruzi* representa uma importante fonte de infecção aos hospedeiros invertebrados que possam coexistir principalmente nas proximidades do domicílio humano, sendo ainda o cão considerado como o principal mamífero reservatório doméstico do parasito (FLORIDIA-YAPUR et al., 2014).

Por sua vez, a transmissão da doença de Chagas ocasionada pelo consumo de alimentos que são contaminados pelos dejetos do vetor é um desafio atual ao controle epidemiológico da doença, uma vez que vários casos dessa forma de transmissão via oral estão sendo reportados

na região amazônica. Além do Brasil, a Colômbia e o México têm documentado a elevação da ocorrência da doença por essa forma de transmissão (PEREIRA et al., 2009).

Uma vez infectado pelo *T. cruzi*, pode ser reconhecido no indivíduo infectado a presença de dois estádios da doença de Chagas: agudo e crônico, sendo neste último observadas as formas indeterminadas, cardíaca, digestiva, e mais raramente a forma mista. Tais formas clínicas crônicas são consequentes de uma longa associação entre o parasito e o hospedeiro vertebrado, que pode gerar principalmente inflamação e fibrose na musculatura cardíaca, dilatação do esôfago ou cólon e anormalidades no sistema nervoso central (MONCAYO, 1999; TAFURI, 1987). De modo similar à infecção humana, a doença de Chagas canina resulta em danos às células do miocárdio e os sinais clínicos podem variar de acordo com o estádio da doença, sendo bem caracterizada a ocorrência da cardiopatia chagásica na fase crônica da infecção (NELSON; COUTO, 2006; TILLEY; SMITH, 2003).

3 PREVALÊNCIA DA DOENÇA DE CHAGAS

Mesmo após mais de 100 anos de sua descoberta, ainda não existe um medicamento capaz de induzir a cura parasitológica em todas as fases da doença de Chagas, a qual persiste como um sério problema de saúde pública na América Latina com aproximadamente 8 a 10 milhões de indivíduos atualmente infectados (CHAGAS, 1911; SANTOS et al., 2012). De acordo com a Organização Panamericana de Saúde (2006), em média 9 milhões de indivíduos que habitam desde o sul dos Estados Unidos até a Argentina estão infectados pelo parasito *T. cruzi*, e aproximadamente 28 milhões de indivíduos possuem o risco de se contaminarem com o mesmo. A doença de Chagas possui ainda uma incidência de 41.200 novos casos por ano e apresenta uma mortalidade anual de aproximadamente 12.500 indivíduos (OPS, 2006).

No Brasil, a doença de Chagas acomete cerca de quatro a seis milhões de indivíduos, representando um dos principais problemas médico-sociais brasileiros (SCHMUNIS, 1994). Calcula-se que 8,2% das 5.074.000 mortes ocorridas no Brasil, no período de 1977 a 1983, foram provocadas por essa enfermidade (SILVEIRA, 1986). Felizmente o programa de controle da transmissão do *T. cruzi* nos países do Cone-Sul reduziu a transmissão pelo vetor *Triatoma infestans* e a transmissão por transfusão sanguínea do parasito, chegando a interromper a transmissão vetorial da doença em 12 dos 16 estados endêmicos do Brasil em 2000 (MONCAYO, 2003) e nos demais estados em 2006, nos quais a incidência do *T. cruzi* podia ser associada à presença do *T. infestans* (MONCAYO; SILVEIRA, 2009). Mas mesmo nas áreas onde a transmissão vetorial está controlada, ainda persiste o problema dos indivíduos na

fase crônica da doença que representam um grande impacto socioeconômico e uma das principais causas de aposentadoria precoce. Concomitante a essa existência de casos crônicos em regiões de incidência controlada, também tem sido relatado um aumento nas taxas de incidência da doença no norte do país (especialmente por transmissão oral), com sinais e sintomas clínicos de uma doença de Chagas humana um pouco diferente da conhecida desde o início do século XX (AGUILAR et al., 2007; MARCILI et al., 2009; PINTO et al., 2008, 2009). Estes dados reforçam a necessidade de que paralelamente aos incentivos pelas buscas por fármacos tripanocidas eficazes, sejam mantidas políticas de controle desta parasitose que envolvam o papel das agências de fiscalização sanitária e de saúde em monitorar as etapas desde a coleta até a comercialização de alimentos/produtos gerados em áreas geográficas endêmicas, e ainda o delineamento de medidas de controle da infecção nos reservatórios mais próximos ao homem, como o cão.

4 A DOENÇA DE CHAGAS CANINA

A doença de Chagas canina no Brasil é muito pouco relatada, apesar de ser uma zoonose de grande impacto, visto que no mundo existem cerca de 10 milhões de pessoas infectadas (SÁ et al., 2015).

A doença de Chagas pode se enquadrar também como antropozoonose, pois atinge tanto o homem, quanto diversos animais caracterizadamente presentes em seus ciclos silvestre, doméstico e peridoméstico, dando destaque ao cão como principal reservatório no ciclo doméstico. A importância do cão na avaliação do risco de transmissão da doença de Chagas humana vai também além de sua grande proximidade ao homem, uma vez que o cão apresenta a capacidade de intercomunicar os ciclos silvestre e doméstico do parasito e pode desse modo atuar, portanto, como um importante sentinela da região, principalmente em casos onde a doença de Chagas humana está interligada com a soropositividade de cães para tal enfermidade. (SILVA L. F., 2014; SOUZA, 2007).

As vias de infecção do *T. cruzi* em cães ocorrem a partir do mesmo princípio que em humanos, porém, outros fatores como o hábito de lamber a pele no local irritado pela picada, assim como, caçar, matar e comer animais e vetores infectados presentes no domicílio e/ou peridomicílio, contribuem significativamente para a infecção destes animais (SILVA L. F., 2014).

Além do fato de ser um reservatório de grande importância para a doença de Chagas, o cão também é uma vítima desta doença, sendo esta espécie de reservatório caracterizada por

desenvolver sinais clínicos muito similares aos que são verificados na infecção humana. Este fato também constitui um dos critérios para classificar o cão como um importante reservatório frente a outros animais domésticos e silvestres. Em localidades onde o principal vetor domiciliar é o *T. infestans*, a taxa de infecção canina superou os valores humanos. Portanto, os cães assim como os humanos são vítimas do parasito, e podem desenvolver alterações patológicas crônicas semelhantes às observadas em humanos, tal como a insuficiência cardíaca congestiva (SOUZA et al., 2008).

De modo similar aos seres humanos, a infecção pelo *T. cruzi* nos cães também apresenta uma evolução em quatro formas clínicas: aguda, subaguda, crônica indeterminada e crônica determinada, sendo que esta última pode manifestar lesões cardíacas, digestivas e mais raramente nervosas. A doença nos cães vai se caracterizar principalmente por uma cardiomiopatia, com desenvolvimento relacionado a lesões causadas às células do miocárdio pelo parasito e/ou por reações imunomediadas (BIGNARDE et al., 2008; SANTANA, 2011).

Na fase aguda da infecção, a qual pode ser observada mais facilmente em cães jovens, entre cinco dias a oito meses de idade, os sinais clínicos da doença de Chagas vão depender dos níveis de parasitemia. Estes animais podem apresentar quadros clínicos variáveis desde assintomáticos a infecções generalizadas, com lesões extensas predominantemente no miocárdio e sistema nervoso central, além de febre, pulso baixo, miocardite, encefalite, taquicardia, linfadenopatia generalizada, letargia, hepatoesplenomegalia, adenomegalia, intolerância ao exercício, mucosas pálidas, anorexia, distensão abdominal, diarreia e conjuntivite unilateral (sinal de Romaña), podendo também ocorrer morte súbita devido à arritmia grave. Em casos de meningoencefalite, os sinais neurológicos presentes podem ser fatais chegando a 10% nos casos graves. A fase aguda pode ser fatal principalmente em cães menores de dois anos de idade, sendo que a maioria dos cães que sobrevivem a esta fase, desenvolvem cardiomiopatia dilatada. (BIGNARDE et al., 2008; SÁ et al., 2015; SANTANA, 2011).

Na fase crônica da doença, verificada aproximadamente após quatro a 36 meses da infecção, o animal pode apresentar-se tanto assintomático quanto sintomático. Os sinais clínicos são relacionados aos distúrbios do ritmo cardíaco, que no cão tem duração desconhecida, sendo ainda caracterizados por falência miocárdica e arritmias ventriculares. No caso da falência cardíaca, primeiramente ocorre a falência direita, dominando as manifestações clínicas que posteriormente são seguidas pela disfunção esquerda. Na doença de Chagas canina podem ainda ser evidenciados sinais clínicos de fraqueza, intolerância a exercícios, morte súbita e síncope. Entretanto, de acordo com as diferentes áreas geográficas e cepas do *T. cruzi*, o quadro clínico-

patológico do animal pode variar (BIGNARDE et al., 2008; SÁ et al., 2015; SANTANA, 2011; SOUZA, 2007).

5 PREVALÊNCIA DA DOENÇA DE CHAGAS CANINA

Alguns poucos estudos sobre infecção canina por *T. cruzi* encontram-se publicados no Brasil. Destes, observa-se que a soropositividade canina nacional para tal parasito varia de 0,3% a 22,7% (MENDES, 2013; SILVA L. S., 2002; SOUZA et al., 2009). Porém, nem todos os casos chegam a apresentar a sintomatologia clínica, o que dificulta a identificação de casos positivos. Um exemplo ocorreu no município de São Domingos do Capim – PA, onde foi relatada uma prevalência de 31% de soropositividade em cães assintomáticos (SILVA P. B., 2013); e na Bahia também foram relatados os primeiros casos de endemicidade em uma região no sul do estado (LEÇA JÚNIOR et al., 2013). No Mato Grosso do Sul, quatro casos foram descritos em 2008, sendo estes relatados como os primeiros casos evidenciados no estado (SOUZA et al., 2008). Em Araçatuba – SP, num estudo com 408 amostras coletadas de cães domiciliados, foi observada a ocorrência da infecção pelo *T. cruzi* em 42 animais (VIOL et al., 2010). Em Cuiabá – MT (ALMEIDA et al., 2013), mesmo não havendo relatos da doença de Chagas em humanos, esta foi diagnosticada em um cão por exame direto, onde foram encontradas formas tripomastigotas em esfregaço sanguíneo, além de amastigotas na microscopia de diversos órgãos, sendo que o parasito também teve sua identificação através da técnica de diagnóstico molecular por Reação em cadeia da polimerase (em inglês *Polymerase Chain Reaction* - PCR) (SÁ et al., 2015).

No Brasil a região nordeste é considerada endêmica para doença de Chagas humana, apresentando elevada prevalência principalmente na zona rural. Em estudo realizado nas cidades de Patos - PB e Teixeira – PB, a soropositividade dos cães foi detectada como próxima ao que se observou em humanos no sertão paraibano, sendo esta de 9,5%. Em um estudo no Mato Grosso do Sul, 22,7% dos cães apresentaram-se sorologicamente positivos, aproximando-se do resultado observado no nordeste da Argentina (LAURICELLA et al., 1998) e na zona rural da Costa Rica (MONTENEGRO et al., 2002), o que confirma a infecção chagásica nos cães de Mato Grosso do Sul (SOUZA et al., 2009). Na cidade de Caicó – RN a soropositividade encontrada de 16% (10/52) foi semelhante à observada em Mossoró – RN (AMÓRA, 2004). Outro estudo em 30 comunidades rurais da região do semiárido nordestino, revelou uma porcentagem igual a 8,8%, de cães soropositivos para *T. cruzi*, embora para estimativa da prevalência real o número amostral deva ainda ser elevado (SANTANA, 2011).

Em estudo realizado na cidade de Mossoró – RN no ano de 2003, a incidência de doença de Chagas para cães foi de 16% na área rurale 38% na área urbana, sendo que em 2008 esses níveis se mantiveram próximos, alcançando 36%. Por outro lado, em 2010 a incidência da doença de Chagas canina nesta região apresentou uma queda para 2,71% (AMÓRA, 2004; SILVA L. F., 2014).

Mendes (2013) em estudo realizado na zona rural do município de Patos, semiárido paraibano, observou uma soroprevalência de 4,08% da doença de Chagas canina, sendo que no norte do estado foi detectado o maior registro, com 6,06% de prevalência, seguido pelo sul e sudeste da região avaliada, respectivamente.

Reyes et al. (2002), observaram que 5,2% dos cães domiciliados de áreas endêmicas para *T. cruzi* na Costa Rica foram soropositivos, ao passo que entre os cães errantes esse índice subiu para 12% (TRONCARELLI et al., 2008).

Estes dados demonstram a amplitude geográfica da doença de Chagas e revelam a necessidade de mais estudos que melhor elucidem a real abrangência desta zoonose. Percebe-se que no Brasil muito pouco ainda se estuda a respeito da doença de Chagas canina, sendo os estudos de sua epidemiologia mais verificados nas regiões nordeste e centro-oeste do país. Não se encontram descritos na literatura os dados sobre a prevalência da doença de Chagas canina no estado do Espírito Santo e nem mesmo da região Sudeste do país, o que indica a necessidade de pesquisas com esse direcionamento para tal região, visto que a doença de Chagas merece destaque e atenção nesse cenário por ser caracterizada como um problema de saúde pública nacional. Por sua vez, grande parte da ausência desses dados também pode ser explicada pela falta de notificação, que ocorre principalmente porque os donos dos cães, ou até a mesmo os próprios médicos veterinários, não identificam a presença dos sinais clínicos da doença devido ao fato de muitas vezes estarem ausentes. Em conjunto, essas situações contribuem para a inexistência do conhecimento da real situação epidemiológica do país com relação à doença de Chagas canina. Desse modo, é relevante que futuros direcionamentos ocorram no sentido de facilitar essa notificação da infecção canina, principalmente em áreas de existência de triatomíneos infectados pelo *T. cruzi*, para assim também minimizar o risco da própria infecção humana.

6 REFERÊNCIAS

AGUILAR, H. M. et al. Chagas disease in the Amazon Region. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 102, n. 1, p. 47-55, 2007.

ALMEIDA, A. B. P. F. et al. Natural Infection by Trypanosoma cruzi in One Dog in Central Western Brazil: A Case Report. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 55, p. 287-289, 2013.

AMÓRA S. S. A. **Epidemiologia da Leishmaniose e Tripanossomíase Canina no Município de Mossoró, Rio Grande do Norte.** 2004. 90 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) - Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, 2004.

ANDRADE, Z. A. The canine model of Chagas' disease. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 79, p. 77- 83, 1984.

BAHIA, M. T. et al. Comparison of *Trypanosoma cruzi* infection in dogs inoculated with blood or meta cyclic trypomastigotes of Berenice-62 and Berenice-78 strains via intraperitoneal and conjunctival routes. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 35, n. 4, p. 339-345, 2002.

BARR, S. C. et al. *Trypanosomacruzi* infection in Walker hounds from Virginia. **American Journal of Veterinary Research**, Schaumburg, v. 56, n. 8, p. 1037-1044, 1995.

BIGNARDE, J. M. P. et al. Doença de Chagas em cães. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**, v. 6, n. 11, 2008.

BRADLEY, K. K. et al. Prevalence of American trypanosomiasis (Chagas disease) among dogs in Oklahoma. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 217, n. 12, p. 1853-1857, 2000.

CALDAS, I. S. et al. Myocardial scars correlate with eletrocardiographic changes in chronic Trypanosoma cruzi infection for dogs treated with Benznidazole. **Tropical Medicine & International Health**, v. 18, n. 1, p. 75-84, 2013.

CALIARI, M. V. et al. Morphological and morphometric study of atrial specific granules and other secretory components in dogs experimentally infected with *Trypanosoma cruzi*. **International Journal of Experimental Pathology**, v. 76, n. 4, p. 299-307, 1995.

CHAGAS, C. Nova tripanozomiase humana. Estudos sobre a morfolojia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanumcruzi*n. *gen*., n. sp., ajenteetiolójico de nova entidade mórbida do homem. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 1, p. 159-218, 1909.

_____. Nova entidade mórbida do homem. Resumo geral dos estudos etiológicos e clínicos. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 3, p. 219-275, 1911.

COHEN, J. E.; GÜRTLER, R. E. Modeling household transmission of American trypanosomiasis. **Science**, v. 293, p. 694-698, 2001.

FLORIDIA-YAPUR, N. et al. Evaluation of recombinant antigens of *Trypanosomacruzi* to diagnose Infection in naturally infected dogs from Chaco region, Argentina. **Parasite Immunology**, v. 36, p. 694-699, 2014.

FORÉS, R. et al. Chagas disease in a recipient of cord blood transplantation. **Bone Marrow Transplantation**, v. 39, p. 127-128, 2007.

GUEDES, P. M. M. et al. The dog as model for chemotherapy of the Chagas' disease. **Acta Tropica**, v. 84, p. 9-17, 2002.

_____. Activity of the new triazole derivative albaconazole against *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi* in dog hosts. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 48, n. 11, p. 4286-4292, 2004.

LEÇA JÚNIOR et al. First report of Trypanosoma cruzi infection in naturally infected dogs from southern Bahia, Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 22, n. 1, p. 182-185, 2013.

LANA, M. et al. Fase crônica cardíaca fibrosante da tripanossomíase cruzi experimental no cão. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 21, n .3, p. 113-121, 1988.

LAURICELLA, M. A. et al. Immuno diagnosis of *Tripanosomacruzi* (Chagas'Disease) infection in naturally infected dogs, **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 93, p. 501-507, 1998.

MACEDO, H. S.; MARÇAL JUNIOR, O. Distribuição de vetores da doença de Chagas em nível domiciliar: um estudo na zona rural de Uberlândia. **Caminhos da Geografia**, v. 3, p. 50-66, 2004.

MARCILI, A. et al. *Trypanosoma cruzi* in Brazilian Amazonia: Lineages TCI and TCII a in wild primates, *Rhodnius spp*. and in humans with Chagas disease associated with oral transmission. **International Journal for Parasitology**, v. 39, p. 615-623, 2009.

MENDES, R. S. **Epidemiologia da Doença de Chagas canina no semiárido Paraibano e alterações cardiovasculares em cão naturalmente infectado por *Leishmania (leishmania) infantumchagasi***. 2013. 73 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Universidade Federal de Campina Grande, Patos, 2013.

MONCAYO, A. Progress towards interruption of transmission of Chagas disease. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 94, n. 1, p. 401-404, 1999.

_____. Chagas Disease: Current epidemiological trends after the interruption of vectorial and transfusional transmission in the Southern Cone countries. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 98, n. 5, p. 577-591, 2003.

MONCAYO, A.; SILVEIRA, A.C. Current epidemiological trends for Chagas disease in Latin America and future challenges in epidemiology, surveillance and health policy. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz,** v. 104, n. 1, p. 17-30, 2009.

MONTENEGRO, V. M. et al. Chagas disease in dogs frorn endemic áreas of Costa Rica. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 97, p. 491-494, 2002.

NELSON, R. W.; COUTO, C. G. **Tripanossomíase Americana**. Medicina Interna de Pequenos Animais. 3. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2006. p. 1266-1267.

ORGANIZACIPÓN PANAMERICANA DE LA SALUD- OPS/HDM/CD/425. **Estimacióncuantitaiva de laenfermedad de Chagas enlas Américas**, Montevideo, Uruguay, 2006.

PEREIRA, K. S. et al. Chagas' disease as a food borneillness. **Journal of Food Protection**, v. 2, p. 441-446, 2009.

PINTO, A. Y. N. et al. Fase aguda da doença de Chagas brasileira. Estudo de 233 casos do Pará, Amapá e Maranhão observados entre 1988 e 2005. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 41, n. 6, p. 602-614, 2008.

PINTO, A. Y. N. et al. Urban outbreak of acute Chagas disease in Amazon region of Brazil: four-year follow-up after treatment with benznidazole. **Revista Panamericana de Salud Publica**, v. 25, n. 1, p. 77-83, 2009.

PRATA, A. Clinical and epidemiological aspects of Chagas disease. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 1, p. 92-100, 2001.

REYES, L. et al. Presencia de anticuerpos contra *Trypanosoma cruzi*en perros de Costa Rica. **Parasitología Latinoamericana**, v. 57, p. 66-68, 2002.

SÁ, M. A. R. et al. Infecção canina por *Trypanosoma sp*. em Sergipe, Brasil. **Revista Enciclopédia Biosfera**, Goiânia, v. 11, n. 21, p. 1200-1209, 2015.

SANTANA, V. L. **Doença de Chagas em cães naturalmente infectados em região do semiárido nordestino**. 2011. 68 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Universidade Federal de Campina Grande, Patos, 2011.

SANTOS, F. M. et al. Cardiomyopathy prognosis after benznidazole treatment in chronic canine Chagas' disease. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 67, p. 1987-1995, 2012.

SILVA, L. F. **Doença de Chagas canina:** Análise de fatores de risco e educação em saúde. 2014. 86 f. Dissertação (Mestrado em Ambiente, Tecnologia e Sociedade) - Universidade Federal Rural do Semiárido, Mossoró, 2014.

SILVA, L. S. **Prevalência de Soropositivos para doença de Chagas em uma amostra da população de cães domiciliados da cidade de Porto Alegre**. 2002, 80f. Dissertação (Mestrado em Cardiologia e Ciências Cardiovasculares) – Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2002.

SILVA, P. B. Aspectos Clínicos Epidemiológicos da Infecção por *Trypanosoma cruzi*em Cães Naturalmente Infectados no Município de São Domingos do Capim – Pará. In: XXIV SEMINÁRIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UFPA, 24., **Anais...** UFPA, 2013.

SILVEIRA, A. C. Mortalidade por doença de Chagas no Brasil, 1977/1983. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz,** v. 81, p. 70, 1986.

SCHMUNIS, G. A. American Trypanosomiasis as a public health problem. In: Pan American Health Organization (ed). **Chagas' Disease and the nervous system**. Washington, DC: Pan American Health Organization. 1994. p. 3-29.

SCHOFIELD, C. J. Tiatominae. **Biologia y Control**, p. 5-30, 1994.

SOUZA, A. I. **Estudo clínico da infecção natural por *T. cruzi* em cães residentes em uma área rural de Mato Grosso do Sul, Brasil**. 2007. 95 f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Jaboticabal, 2007.

_____. Aspectos clínico-laboratoriais da infecção natural por *Trypanosoma cruzi* em cães de Mato Grosso do Sul. **Revista Ciência Rural**, v.38, n.5, p.1351-1356, 2008.

SOUZA, A. I. et al. Soroprevalência da infecção por *Trypanosoma cruzi* em cães de uma área rural do Estado de Mato Grosso do Sul. **Revista Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 29, n.2, p. 150-152, 2009.

TAFURI, W. L. Patogenia da doença de Chagas. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 29, p. 194-199, 1987.

TAFURI, W. L. et al. O cão como modelo experimental para o estudo da História Natural da Doença de Chagas. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 21, p. 77-82, 1988.

TILLEY, L. P.; SMITH, F. W. K. **Consulta Veterinária em 5 Minutos – Espécies Canina e Felina:** Doença de Chagas (Tripanossomíase Americana). 2. ed. São Paulo: Editora Manole, 2003.

TRONCARELLI, M. Z. et al. Associação entre resultados sorológicos no diagnóstico da leishmaniose e da tripanossomíase canina, pela técnica de imunofluorescência indireta. **Revista Veterinária e Zootecnia**, v. 15, n. 1, p. 39-46, 2008.

VIOL, M. A. et al. Ocorrência de Trypanosoma spp. em Cães no Município de Araçatuba, SP. In: CONBRAVET, 38., 2010. **Resumos...** 2010. p. 1-3.

Capítulo

2

Avaliação da proliferação e viabilidade celular

Livia Reisen Perin[1]
Elaine Gimenez Guimarães[2]
Greiciane Gaburro Paneto[3]
Francisco de Paula Careta[4]

1 INTRODUÇÃO

O cultivo de células é uma ferramenta amplamente utilizada em investigações de diversas naturezas, podendo ser aplicado em experimentos que envolvam análises de citogenética, de expressão gênica e proteica, de transdução de sinais citoplasmáticos, de viabilidade e proliferação celular, entre outros. Muitas vezes, tais análises são empregadas para o esclarecimento de vias de sinalização celular ou para a realização de testes farmacológicos.

É essencial que condições adequadas de desenvolvimento sejam providenciadas às células, garantindo assim que condições básicas de desenvolvimento sejam oferecidas ao longo do experimento. Normalmente, as células são acondicionadas em garrafas ou placas contendo o meio de cultura, que é constituído de uma solução estéril contendo os nutrientes necessários para o seu desenvolvimento. A temperatura e a umidade também são controladas por

[1] Universidade Federal do Espírito Santo, e-mail: livia_perin@hotmail.com;
[2] Universidade Federal do Espírito Santo, e-mail: elainegimenezg@hotmail.com;
[3] Universidade Federal do Espírito Santo, e-mail: ggpaneto@gmail.com;
[4] Universidade Federal do Espírito Santo, e-mail: franciscopcareta@gmail.com.

incubadoras apropriadas que também pode manter constante a concentração de CO_2, fator importante que auxilia no tamponamento e diminui a flutuação do pH. Para diminuir o risco de contaminação com bactérias e fungos, pode-se utilizar antibióticos e antifúngicos no meio de cultura durante todo o experimento, embora essa prática não seja recomendada devido ao risco de selecionar microrganismos resistentes.

As células utilizadas podem ser de origem primária, obtidas diretamente de tecidos de organismos, ou então podem ser linhagens imortalizadas. Dentre as linhagens que podem ser utilizadas destacam-se aquelas provenientes de tumores, que são corriqueiramente utilizadas em experimentos que avaliam a eficiência de compostos com atividade antiproliferativa. Nesse tipo de pesquisa, é importante que o laboratório possua as metodologias que avaliem a proliferação e a viabilidade celular após o ensaio farmacológico. Nesse contexto, o uso da cultura de células tem o objetivo de definir o perfil toxicológico ou metabólico de novos medicamentos para que seja verificada a sua segurança e eficácia antes que se realizem testes em seres vivos.

Discutiremos a seguir algumas metodologias que podem ser empregadas na quantificação da proliferarão e da viabilidade celular.

2 ANÁLISE DE PROLIFERAÇÃO CELULAR

Uma das técnicas mais simples que pode ser utilizada para a análise da proliferação celular é a simples contagem de células em microscópio. Tal técnica baseia-se na retirada de alíquotas em tempos definidos e na contagem de células em Câmara de Neubauer. Tal método é menos laborioso quando se trabalha com células que crescem em suspensão, bastando apenas a homogeneização das amostras com pipeta para a retirada de material para contagem. A utilização de células que crescem aderidas não inviabiliza o método, no entanto, exige a etapa de tripsinização para a obtenção de amostras para contagem. É importante mencionar que a simples contagem de células apresenta menor eficácia pois baseia-se apenas na capacidade do observador de contabilizar o número de células quantificadas, apresentado pouca reprodutibilidade. Assim, embora seja de fácil execução devido à pouca necessidade de equipamentos, há outras técnicas que possuem resultados mais robustos.

Uma técnica que pode ser utilizada para avaliar a proliferação consiste em usar a Carboxifluoresceína diacetato succinimidil éster (CFDA-SE), um composto adicionado ao meio de cultivo e que apresenta alta permeabilidade na bicamada lipídica. Contudo, para a

utilização dessa técnica, é necessário a disponibilidade de um citômetro de fluxo, o que por muitas vezes inviabiliza o seu emprego.

Após ser adicionado ao meio, o CFDA-SE é internalizado e processado por esterases celulares e se transforma em Carboxifluoresceína succinimidil éster (CFSE), que emite fluorescência quando excitado por comprimento de onda adequado. O CFSE liga-se então de forma covalente às proteínas da célula onde permanece conjugado de forma estável por longo período. Após a divisão celular, cada uma das duas novas células formadas possuirá metade da quantidade de CFSE que estava presente na célula original, logo, apresentará metade de sua fluorescência. O decaimento da fluorescência pode ser quantificado por citometria de fluxo, revelando o número de divisões celulares que ocorreram em um determinado período (LAST'OVICKA et al., 2009).

Outra importante técnica de análise de proliferação celular consiste na quantificação do 5-bromo-2′-deoxiuridina (BrdU), um análogo da timina e que é incorporado ao DNA na fase S do ciclo celular. É importante mencionar que, diferentemente do CFSE, o BrdU não é um marcador da divisão celular, e sim da duplicação do DNA, uma vez que o mesmo revela apenas que a célula entrou na fase S da divisão celular, mas não necessariamente se ocorreu o processo de citocinese. Nesta técnica, o BrdU precisa ser adicionado à cultura de células por poucas horas, o suficiente para revelar se as células estão transitando pela fase S do ciclo. Se as células estiverem proliferando, o BrdU é incorporado na dupla fita do DNA no lugar da timina, etapa que ocorre na fase S do ciclo celular. Posteriormente, o BrdU poderá ser revelado por técnicas que utilizem anticorpos específicos para essa molécula (TAUPIN, 2007). Como resultado, é considerado que as células que foram positivas para a marcação com o anticorpo anti-BrdU entraram na fase S da divisão celular.

3 ANÁLISE DE VIABILIDADE CELULAR

Algumas metodologias de análise de viabilidade, tais como a marcação com Anexina-V e Iodeto de Propídio, utilizam propriedades inerentes da membrana plasmática. Em condições normais, a fosfatidilserina, um dos quatro fosfolipídios presentes na bicamada lipídica, encontra-se presente face interna da membrana, característica que é mantida por ação enzimática dependente de ATP. Entretanto, com o início da apoptose as células cessam a produção de energia e perdem a capacidade de translocar a fosfatidilserina da face externa para a face interna. Uma vez na parte externa da membrana, a fosfatidilserina torna-se alvo da molécula Anexina-V, que é conjugada a algum fluorocromo para sua visualização (BÖHMERT

et al., 2012; LECOUER et al., 1997). Assim, é possível distinguir as células viáveis das células em apoptose pela marcação com Anexina-V através da análise por citometria de fluxo (WU et al., 2012).

Pouco tempo após o início da apoptose, a membrana da célula começa a perder a sua integridade e passa a apresentar orifícios em toda a sua extensão. Como consequência, ocorre a perda da seletividade dos componentes que devem entrar ou sair da célula. O Iodeto de Propídeo (IP) é um fluorocromo impermeável à membrana plasmática íntegra. No entanto, se a célula apresentar orifícios em consequência da morte celular, o IP entrará no interior da célula e se ligará ao DNA. Assim, apenas as células não viáveis com orifícios na sua membrana é que apresentarão o IP ligado ao DNA. Da mesma forma que a Avexina-V, o IP também pode ser analisado por citometria de fluxo. A dupla marcação desses dois compostos é muito usada para distinguir entre a morte celular inicial, a tardia, e a necrose (WU et al., 2012).

4 XTT e MTT

Algumas técnicas baseiam-se na análise da absorbância e exploram a capacidade de células viáveis processarem compostos resultando em produtos coloridos. Dois exemplos de tais compostos são apresentados abaixo.

Os sais de tetrazólio, MTT, 3-(4,5-dimetil-2-tiazol)-2,5-difenil-2H-tetrazólio bromida, e XTT, 2,3-bis [2-metoxi-4-nitro-5-sulfofenil]-2H-tetrazólio-5-carboxanilida, são métodos de ensaio amplamente utilizados para medir a viabilidade e proliferação celular (TSUKATANI et al., 2009; WANG et al., 2010). Na presença de células viáveis, o MTT e o XTT são reduzidos a compostos formazan pela ação de enzimas redutases da membrana da célula. Uma vez reduzido, ocorre alteração da coloração do meio que pode ser lida por absorbância no comprimento de onda de 475nm (no caso do XTT). Quanto maior a for a alteração da cor, maior será o número de células viáveis que promoveram a redução dos sais. Dessa forma, XTT e MTT medem a atividade metabólica das células, podendo refletir na citotoxidade de uma droga ao diminuir a viabilidade celular, ou mesmo o efeito miogênico ao estimular a atividade proliferativa. O XTT tem sido considerado um substituto do MTT por fornecer leituras de absorvância melhores e por formar produtos formazan solúveis em água, o que não ocorre com o MTT. Assim, não existe a necessidade de solubilizar o XTT antes de realizar a análise de absorbância (ROEHM et al., 1991).

Embora esse tipo de análise esteja na seção de viabilidade celular, O resultado da análise da absorvância (abs) é geralmente obtido pela seguinte fórmula:

Abs específica = abs da amostra – abs do controle negativo – abs numa faixa não específica (geralmente a 660 nm).

Pode-se também avaliar a viabilidade pela exclusão de células mortas com o corante Azul de Tripan. Este ensaio baseia-se na premissa de que as células viáveis com as membranas intactas irão excluir o corante, ou seja, as células que se encontrarem com a membrana íntegra não serão marcadas pelo corante em questão (AHUJA et al., 2003; CHEN et al., 2012), enquanto as células que estiverem mortas ou a morrer serão coradas com Azul de Tripan (JÄHN et al., 2012). Dessa forma, podemos avaliar a quantidade e a viabilidade celular utilizando uma câmara de Neubauer ao microscópio de células marcadas com esse corante (DORNELAS et al., 2006), com isso pode-se quantificar o número de células viáveis e de células mortas, utilizando a equação seguinte: percentagem de células sobreviventes = (número total de células – número total de células coradas) / número total de células x 100% (BASTOS et al., 2007; CHEN et al., 2012).

A viabilidade celular também pode ser aferida ao analisar o padrão de clivagem da proteína Poli (ADP-ribose) polimerase (PARP) por *western blot*. PARP é uma proteína nuclear de 116 kDa que atua normalmente na detecção de danos e reparos do DNA (INVITROGEN CORPORATION, 2007). Ela é clivada entre Asp214 e Glyn215 pelas caspases 3 (TEWARI et al., 1995) e 7 (GERMAIN et al., 1999), o que resulta nos fragmentos de p85 e p25. Esta clivagem neutraliza com eficiência a atividade de PARP na reparação do DNA, permitindo que a célula entre em apoptose (KAUFMANN et al., 1993). Assim, detecções sensíveis da clivagem de PARP, permitem distinguir os diferentes tipos de morte celular e quantificar as células apoptóticas numa população (INVITROGEN CORPORATION, 2007).

A detecção de proteínas presentes em uma amostra em estudo pode ser realizada por meio da técnica de Western blot (WB). WB é uma ferramenta útil que permiti monitorar alterações no estado imune, particularmente no que diz respeito a anticorpos específicos contra as proteínas virais, cuja presença ou ausência pode refletir em significado prognóstico (BURKE et al., 1987).

5 REFERÊNCIAS

AHUJA, S. S. et al. CD40 ligand blocks apopitosis induced by tumor necrosis fator α, glucocorticoids, and etoposide in osteoblasts and the osteocyte-like cell line murine long bone osteocyte-Y4. **Endocrinology,** v. 144, n. 5, p. 1761-1769, 2003.

BASTOS, C. V. et al. Manutenção *in vitro* de células IDE8 em dois tipos de soro bovino. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia,** v. 59, n. 2, p. 543-546, 2007.

BÖHMERT, L. et al. Cytotocity of peptide-coated silver nanoparticles on the human intestinal cell line Caco-2. **Archives of Toxicology,** n. 86, p. 1107-1115, 2012.

BURKE, Donald S. et al. Human immunodeficiency virus infections among civilian applicants for United States military service, October 1985 to March 1986. **New England Journal of Medicine**, v. 317, n. 3, p. 131-136, 1987.

CHEN, C. S. et al. Nrf2-Kkeap1 antioxidant defense and cell survival signaling are up-regulated by 17β-estradiol in homocysteine-treated dopaminergic SH-SY5Y cells. **Neuro-endocrinology**, v. 97, n. 3, p. 232-241, 2012.

DORNELAS, C. A. et al. Modelo experimental do carcinossarcoma 256 de Walker em bexiga de ratos. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v. 21, n. 1, p. 38-42, 2006.

GERMAIN, M. et al. Cleavage of automodified poly (ADP-ribose) polymerase during apoptosis evidence for involvement of caspase-7. **Journal of Biological Chemistry**, v. 274, n. 40, p. 28379-28384, 1999.

INVITROGEN CORPORATION, 2007. Disponível em: <https://www.thermofisher.com/br/en/home/brands/invitrogen.html?gclid=CjwKEAiAyO_BBRDOgM-K8MGWpmYSJACePQ9C_QG4lJpj2jEfjy53wAsqTHS6Talt2jAKUlQnxCPHoBoCqEbw_wcB&s_kwcid=AL!3652!3!114323286987!b!!g!!in%20vitrogen&mkwid=slEC0AICI-dc_pcrid_114323286987_pkw_in%20vitrogen_pmt_b_slid__dimid=&ef_id=WCt@qwAABRP6MQ3d:20161128124827:s> . Acesso em: 28 nov. 2016.

JÄHN, K. et al. Skeletal muscle secreted factors prevent glucocorticoid-induced osteocyte apoptosis through activation of B-catenin. **European Cells and Materials,** v. 24, p. 197-210, 2012.

KAUFMANN, S. H. et al. Specific proteolytic cleavage of poly (ADP-ribose) polymerase: an early marker of chemotherapy-induced apoptosis. **Cancer research**, v. 53, n. 17, p. 3976-3985, 1993.

LAST'OVICKA, J. et al. Assessment of lymphocyte proliferation: CFSE kills dividing cells and modulates expression of activation markers. **Cellular Immunology,** v. 256, n. 1-2, p. 79-85, 2009.

LECOUER, H. et al. Strategies for phenotyping apoptotic peripheral human lymphocytes comparing ISNT, annexin-V and 7-AAD cytofluorometric staining methods. **Journal of Immunological Methods**, n. 209, p. 111-123, 1997.

ROEHM, N. W. et al. An improved colorimetric assay for cell proliferation and viability utilizing the tetrazolium salt XTT. **Journal of Immunological Methods,** v. 142, p. 257-265, 1991.

TAUPIN, P. BrdU immunohistochemistry for studying adult neurogenesis: paradigms, pitfalls, limitations, and validation. **Brain Research Reviews,** v. 53, n. 1, p. 198-214, 2007.

TEWARI, M. et al. Yama/CPP32β, a mammalian homolog of CED-3, is a CrmA-inhibitable protease that cleaves the death substrate poly (ADP-ribose) polymerase. **Cell**, v. 81, n. 5, p. 801-809, 1995.

TSUKATANI, T. et al. Colorimetric microbial viability assay based on reduction of water-soluble tetrazolium salts for antimicrobial susceptibility testing and screening of antimicrobial substances. **Analytical Biochemistry,** v. 393, n. 1, p. 117-125, 2009.

WANG, H. et al. An improved 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) reduction assay for evaluating the viability of *Escherichia coli* cells. **Journal of Microbiological Methods,** v. 82, n. 3, p. 330-333, 2010.

WU, J. et al. Antiproliferative and cell apoptosis-inducing activities of compounds from Buddleja davidii in Mgc-803 cells. **Cell Division**, v. 7, n. 1, p. 20, 2012.

Capítulo

3

Utilização do DNA *Barcoding* na ciência animal

Pablo Viana Oliveira[1]
Francine Alves Nogueira de Almeida[2]
Greiciane Gaburro Paneto[3]
Francisco de Paula Careta[4]

1 INTRODUÇÃO

A partir da definição da estrutura química da molécula de DNA, proposto pelos pesquisadores Watson e Crick em 1953, foi possível uma série de descobertas a respeito da vida dos seres vivos. Isso porque a molécula de DNA, constituída por uma sequência de nucleotídeos com bases nitrogenadas (adenina, timina, citosina e guanina), é a responsável por carregar a informação genética e transmitir às gerações seguintes. Essa transmissão se dá através dos genes, que expressam uma característica genética ao indivíduo.

As informações a respeito do DNA possibilitaram inúmeros avanços na Biologia Molecular, uma área que estuda as interações dos sistemas da célula; a relação entre o DNA, o RNA e a síntese de proteínas; e também a regulação dessas interações. Para que isso seja possível, faz-se necessário isolar o DNA em quantidade suficiente para a análise, puro e íntegro.

[1] Universidade Federal do Espírito Santo, e-mail: pablo.viana27@gmail.com;
[2] Universidade Federal do Espírito Santo, e-mail: frannogueir@yahoo.com.br;
[3] Universidade Federal do Espírito Santo, e-mail: ggpaneto@gmail.com;
[4] Universidade Federal do Espírito Santo, e-mail: franciscopcareta@gmail.com.

Assim sendo, a extração de DNA total de uma amostra é o primeiro passo para a obtenção de dados genéticos adequados em análises moleculares (PANETO et al., 2016).

Na ciência animal, obter as informações genéticas dos indivíduos são medidas valiosas, pois a diversidade de organismos desse grupo é muito grande. A quantidade de espécies animais catalogadas para a vida na terra é de 953.434 e de 171.082 animais de vida na água (animais marinhos), e estima-se que o total de indivíduos seja de 7.770.000 e 2.150.000, respectivamente (MORA et al., 2011). Isso significa que pouco mais de 10% das espécies de animais são conhecidas.

Segundo Waugh (2007), a identificação de espécies em números extremamente grandes representa uma carga de trabalho insuportável para taxonomistas, e mesmo com a melhoria nas comunicações e o impacto da internet, a tarefa é sacrificante.

Mesmo com tantos anos de trabalho em sistemática, a maioria das espécies ainda não foi identificada (WAUGH, 2007) e a identificação de espécies é importante para a classificação genética e biodiversidade animal (KLOMTONG; PHASUK; DUANGJINDA, 2016), levando em consideração que a perda de habitat, as alterações climáticas, as espécies introduzidas e outros componentes da crise ambiental global resultam em uma rápida perda de biodiversidade, incluindo espécies, populações e também diversidade genética (BILGIN et al., 2016).

2 IDENTIFICAÇÃO DE ESPÉCIES

Uma acurada identificação dos espécimes é o passo crucial para se classificar os organismos. No entanto, esse passo não é facilmente executado. Geralmente a identificação se baseia em caracteres morfológicos e nem sempre é possível que seja concluída. Os problemas que envolvem identificação morfológica são citados na literatura geralmente como semelhanças entre espécies, e especialmente em estágios iniciais da vida (HARVEY et al., 2003), o uso de pequenas partes do animal (CARMO, 2011), espécies crípticas ou intimamente relacionadas (ARCHANA et al., 2016; MADEIRA et al., 2016).

Erros na identificação não apenas geram dados enganosos para vários campos da pesquisa biológica, mas também se traduzem em subutilização dos recursos humanos e financeiros. A identificação errada é um dos muitos impedimentos no manejo de pragas e insetos vetores e afeta o planejamento de melhores estratégias de gestão (BANERJEE et al., 2015).

Um dos desafios que a biologia moderna enfrenta é desenvolver métodos precisos e eficientes na rápida identificação de espécies em numerosos campos de estudo, incluindo a

taxonomia, a ecologia, as ciências forenses (MALEWSKI et al., 2010). Devido a esses problemas de identificação com base em caracteres morfológicos, são utilizadas técnicas moleculares por meio da análise de DNA (OLIVEIRA et al., 2016; WELLS; STEVENS, 2008).

A análise de DNA tem sido utilizada com o objetivo de identificar perfis genéticos nos mais variados casos (KANTHASWAMY, 2015). Nos últimos anos, uma grande variedade de abordagens baseadas em DNA tem sido desenvolvida para identificar espécies em diversos grupos taxonômicos que pode ser realizada por fragmentos de DNA (DESMYTER; GOSSELIN, 2009).

A biologia molecular apresenta um desafio constante que é desenvolver técnicas precisas e confiáveis para detectar rapidamente as variações da sequência de DNA. Isso seria de valor imediato para a detecção e identificação de espécies para muitas aplicações, incluindo a identificação de pragas e patógenos de biossegurança. No entanto, outros ramos adicionais da biologia se beneficiariam de tais melhorias de diagnóstico, incluindo a agricultura, conservação, ecologia, evolução e medicina humana e veterinária (WINDER et al., 2011).

2.1 MARCADORES GENÉTICOS

Para a identificação de espécies, a utilização do *DNA Barcoding* (código de barras de DNA) tem sido utilizada e recomendada por diversos autores. É um método taxonômico que utiliza um ou mais marcadores genéticos curtos padronizados no DNA dos organismos para identificá-los como pertencente a espécies particulares. Utilizando este método, amostras de DNA desconhecidas são identificadas como espécies registradas com base na comparação com uma biblioteca de referência (BARCODE..., 2016). O *DNA Barcoding* fornece resultados mais subjetivos e precisos em comparação com os métodos tradicionais, e também é um complemento eficaz para os métodos tradicionais de identificação.

O principal objetivo do *DNA barcoding* é a identificação das espécies, além do diagnóstico de novas espécies e fornecer unidades taxonômicas operacionais moleculares (OTUs) para estudos ecológicos e de biodiversidade (DEWALT, 2011). Essa tecnologia molecular que permite a identificação de quaisquer espécies biológicas pela amplificação, sequenciamento e consulta às informações gênicas e/ou regiões-alvo intergênicas padronizadas pertencentes aos genomas extranucleares (BARCACCIA; LUCCHIN; CASSANDRO, 2016). Com o uso desses marcadores específicos, grupos taxonômicos distintos puderam ser revelados, baseado no pequeno fragmento amplificado e comparado com as sequências registradas no

banco de dados. Os marcadores utilizados para amplificar os fragmentos de DNA são: rbcl e matK (plantas), ITS (fungos) e COI (animais).

Embora as sequências amplificadas utilizando esses marcadores representem uma pequena fração do DNA total de uma célula, tanto códigos de barras de cloroplasto e mitocôndria escolhida para a identificação de espécies de plantas e animais, respectivamente, demonstraram a diversidade de nucleotídeos suficientes para avaliar a identidade taxonômica da grande maioria dos organismos utilizados na agricultura (BARCACCIA; LUCCHIN; CASSANDRO, 2016).

Para animais, a região do gene do DNA mitocondrial (DNAmt) citocromo c oxidase subunidade I (COI) é proposta como código de barras de DNA, uma vez que é uma poderosa ferramenta para a identificação exata de espécies animais em vários táxons. Esse gene contém 648 pares de bases (pb) e tem como referência o genoma mitocondrial de camundongo *Mus musculus* Linnaeus, 1758 (HEBERT et al., 2003).

Para plantas, os genes rbcL (codifica a subunidade grande da ribulose-1,5-bifosfato carboxilase/oxigenase) e o matK (codifica a proteína maturase K) (CBOL PLANT WORKING GROUP et al., 2009; HOLLINGSWORTH; GRAHAM; LITTLE, 2011) são os marcadores utilizados pelo BOLD para a identificação ao nível de espécie.

Para fungos, o marcador mais eficaz é o gene espaçador interno transcrito (ITS), que tem a maior probabilidade de sucesso para a identificação de uma ampla variedade de fungos, com a diferença de código de barras mais claramente definida entre a variação inter e intraespecífica (AWOMUKWU et al., 2015; SCHOCH et al., 2012).

2.1.1 Banco de dados BOLD

No *DNA barcoding* a identificação das sequências de DNA é realizada de modo comparativo, isto é, a amostra que se quer identificar (amostra questionada) é comparada com amostra já identificada e registrada (amostra referência), que está depositada em um banco de dados (CARMO, 2011). Os bancos de dados contêm as sequências depositadas por pesquisadores do mundo inteiro, o que dá margem para uma maior confiança nos dados das sequências que estão sendo trabalhados.

O BOLD (*Barcode of Life Data System*) é um banco de dados administrado pelo *Consortium for the Barcode of Life* (CBOL) e contém sequências do gene COI de diferentes espécies de animais e também outros marcadores para vegetais, fungos e protistas (RATNASINGHAM; HEBERT; BARCODING, 2007). De acordo com Azeredo (2005), por

meio deste banco, no futuro, será possível identificar qualquer espécie apenas comparando a sequência de DNA de interesse com as sequências já depositadas.

Embora a seleção de um algoritmo eficaz, rápido para o reconhecimento de uma OTU é um passo fundamental na construção de um registro baseado em DNA de espécies animais, ele precisa ser acoplado a uma plataforma de informática persistente que mapeia cada sequência recém-adquirida a um OTU existente ou o reconhece como fundador (RATNASINGHAM; HEBERT, 2013).

Para favorecer aos usuários do BOLD, um sistema denominado BIN (*Bacorde Index Number*) agrupa sequências utilizando algoritmos bem estabelecidos para produzir OTUs (KLIPPEL et al., 2015), que correspondem às espécies. Os BINs são únicos em que os clusters são indexados de forma regimentada. Os conjuntos de dados são baseados em taxonomia estabelecida para reconhecer os clusters de sequências provavelmente correspondem a espécies biológicas. Cada novo cluster romance é atribuído um identificador exclusivo que está registrado no BOLD. Atualmente estão registrados 409,215 BINs, sendo 406,106 para o reino animal (BARCODE..., 2016).

Além de um papel pragmático em avaliações da biodiversidade, os BINs auxiliam a taxonomia revisionária ao sinalizar possíveis casos de sinonímia, e pela recolha de informação geográfica, metadados descritivos e imagens para os espécimes que são susceptíveis de pertencer à mesma espécie, mesmo que ainda seja não descrita (RATNASINGHAM; HEBERT, 2013).

2.1.2 Usando o COI na ciência animal

Estudos de *DNA Barcoding* em animais fornecem uma fonte ideal de dados porque mais de dois milhões de registros estão atualmente disponíveis para esta região de 648 pb do gene COI. A análise prévia destes dados estabelece dois padrões importantes: 1) Mais de 95% das espécies animais examinadas possuem uma matriz sequência de diagnóstico de COI, e 2) divergências do COI raramente ultrapassam 2% dentro de uma espécie, enquanto membros de diferentes espécies normalmente apresentam maior divergência (RATNASINGHAM; HEBERT, 2013).

Um dos principais objetivos do *DNA Barcoding* é permitir que a maioria de biólogos não taxonomistas e, na verdade, qualquer um, possa ter acesso à informação taxonômica diretamente enquanto os taxonomistas profissionais se concentram na geração mais de mais conhecimento (HEBERT; GREGORY, 2005).

Nos últimos anos, esta tecnologia tem sido amplamente utilizada na identificação de espécies, investigação da biodiversidade e testes de segurança alimentar, porque foi demonstrado que, em muitos grupos, incluindo insetos, a variação interespecífica em sequências de DNA de alguns genes é muito maior do que intraespecífica e isto proporcionou uma oportunidade de usar sequências de DNA para a identificação de espécies (ARCHANA et al., 2016; BLAGOEV et al., 2016; LI et al., 2016).

O DNA mt é apenas de origem materna e oferece várias vantagens em comparação com o DNA nuclear, incluindo: evolução rápida, exposição limitada à recombinação, falta de íntrons, um elevado número de cópias (GOU et al., 2012). Estas características do DNAmt são importantes para a utilização da técnica de PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) para a amplificação da sequência de DNA a ser analisada.

Como já mencionado, o *DNA Barcoding* emprega uma região de 648 pb da sequência do COI como padrão para o código de barras, no qual vários estudos demonstraram a efetividade dessa sequência na identificação de mais de 95% das espécies animais (BLAGOEV et al., 2016; HEBERT; DEWAARD; LANDRY, 2010; RATNASINGHAM; HEBERT, 2013).

O *DNA barcoding* pode ser empregado, na prática, na identificação de espécies ameaçadas de extinção e de animais explorados comercialmente (KRESS et al., 2015), para serem tomadas medidas que acarretem na contenção dos crimes contra a fauna. Além disso, também há possibilidades na identificação de animais silvestres provenientes de tráfico ilegal. Na Tânzania, espécies de antílopes selvagens de áreas protegidas e bovídeos domésticos foram identificadas adequadamente pelo COI. O sequenciamento do gene pode servir como uma ferramenta para determinar a origem da espécie ou fonte de amostras desconhecidas no reforço ao tratamento de casos forenses para a identificação de espécies silvestres (BITANYI et al., 2011). Smith et al. (2012) utilizando o código de barras de DNA, conseguiram identificar animais, primatas e roedores, em remessas importadas ilegalmente que foram apreendidas em aeroportos internacionais dos EUA. Nesse trabalho, também foi possível identificar patógenos zoonóticos nos espécimes apreendidos, que poderiam resultar em doenças aos humanos.

O código de barras de DNA pode ser aplicado a produtos alimentares e matrizes distintas derivadas a partir de espécies individuais ou mistas, produzindo sequências de DNA espécie-específicas (isto é, os códigos de barras). Desta forma, esta metodologia pode ser usada para descobrir substitutos voluntários ou acidentais relacionados com erros de rotulagem em alimentos e fraudes comerciais (BARCACCIA; LUCCHIN; CASSANDRO, 2016). Raupach et al. (2015) confirmaram a identificação eficaz de crustáceos marinhos analisados no Mar do

Norte, representando um marco importante para estudos de avaliação de biodiversidade modernos utilizando sequências de código de barras.

No Brasil, Ardura et al. (2010), mostraram que pelo menos sete espécies distintas de peixes eram exploradas comercialmente e vendidas sob o nome comum "Acará", fazendo com que a estimativa real das taxas de exploração fosse impossível. Corroborando esses resultados, Henriques, José e Ashikaga (2015), confirmaram a hipótese de que código de barras de DNA pode ser uma ferramenta eficaz para a identificação de peixes. Porém, os dados indicam que em alguns grupos de espécies há a necessidade de uma investigação mais aprofundada e em outros a existência de espécies ainda não identificadas.

Atualmente, o BOLD contém 6.821.036 de espécimes registrados, sendo 5,185,737 com *DNA Barcode*, agrupando 259.579 de espécies registradas através do código de barras de DNA. O filo animal com maior número de registros de espécies é o Arthropoda com 181.983, e em plantas o filo Magnoliophyta, com 62.392 de espécies registradas (TAXONOMY, 2016). Apesar disso, algumas lacunas ainda permanecem. Os anfíbios representam um desafio, pois a variação do COI de um indivíduo para outro é muito alta e a confiabilidade dos dados não podem aplicados para essas espécies (CARMO, 2011). Baixos níveis de identificação usando BOLD também foram descritos por Klippel et al. (2015) ao estudarem animais atropelados. Usando o gene COI foi possível identificar apenas 62,16% das amostras. No entanto, a percentagem variou de 0% em répteis para cerca de 87,5% quando se estudaram mamíferos não-voadores.

Apesar das limitações atuais na aplicação de códigos de barras de DNA, os resultados mostram que este método pode ser aplicado com relativo sucesso em estudos de ecologia de estradas e podem ajudar a desenvolver medidas preventivas voltadas para os animais mais afetados por atropelamentos e também sobre as espécies ameaçadas de extinção (KLIPPEL et al., 2015; KRESS et al., 2015).

3 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Diante do que foi explorado neste capítulo, é conveniente dizer que as perspectivas para futuras melhorias nas análises moleculares utilizando o *DNA Barcoding* são grandiosas, sobretudo com as contribuições que são realizadas rotineiramente para aumentar o tamanho das amostras registradas no banco de dados e a cobertura taxonômica e geográfica, para favorecer as identificações de espécies em todo o mundo.

Assim sendo, pode-se concluir que a aplicação do *DNA Barcoding* poderá ser utilizada em inúmeras áreas da ciência animal e também permitirá descobertas novas espécies, prevenção de extinção de animais e conservação das espécies, diminuindo os problemas que hoje são aparentes pela falta de dados e informações.

4 REFERÊNCIAS

ARCHANA, M. et al. DNA barcoding of flies commonly prevalent in poultry farms of Bengaluru District. **Journal of Entomology and Zoology Studies**, v. 4, n. 4, p. 228-233, 2016.

ARDURA, A. et al. DNA barcoding for conservation and management of Amazonian commercial fish. **Biological Conservation**, v. 143, n. 6, p. 1438-1443, 2010.

AWOMUKWU, D. A. et al. Identification, Validation and Classification of the Genus Phyllanthus in Nigeria using ITS Genetic Marker and the Taxonomic Implication. **International Journal of Genetics and Genomics**, v. 3, n. 1, p. 1-7, 2015.

AZEREDO, A. M. L. de. **O Código de Barras da Vida baseado no DNA "Barcoding of Life": Considerações e Perspectivas,** 2005. Disponível em: <www.cgee.org.br/atividades/redirect/1749>. Acesso em: 30 set. 2016.

BANERJEE, D. et al. Identification through DNA barcoding of Tabanidae (Diptera) vectors of surra disease in India. **Acta Tropica**, v. 150, p. 52-58, 2015.

BARCACCIA, G.; LUCCHIN, M.; CASSANDRO, M. DNA barcoding as a molecular tool to track down mislabeling and food piracy. **Diversity**, v. 8, n. 1, 2016.

BARCODE index numbers. Disponível em: <http://v4.boldsystems.org/index.php/Public_BarcodeIndexNumber_Home>. Acesso em: 6 out. 2016.

BILGIN, R. et al. DNA barcoding of birds at a migratory hotspot in eastern Turkey highlights continental phylogeographic relationships. **PLoS ONE**, v. 11, n. 6, p. 1-17, 2016.

BITANYI, S. et al. Species identification of Tanzanian antelopes using DNA barcoding. **Molecular Ecology Resources**, v. 11, n. 3, p. 442-449, 2011.

BLAGOEV, G. A. et al. Untangling taxonomy: A DNA barcode reference library for Canadian spiders. **Molecular Ecology Resources**, v. 16, n. 1, p. 325-341, 2016.

CARMO, R. R. do. **Identificação de animais silvestres de interesse criminal da fauna matogrossense por meio de DNA mitocondrial**. 2011. 102 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Evolutiva) - Universidade Estadual do Centro-Oeste, Guarapuava, 2011.

CBOL PLANT WORKING GROUP. A DNA barcode for land plants. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 106, n. 31, p. 12794-12797, 2009.

DESMYTER, S.; GOSSELIN, M. COI sequence variability between Chrysomyinae of forensic interest. **Forensic Science International: Genetics**, v. 3, n. 2, p. 89-95, 2009.

DEWALT, R. E. DNA barcoding: a taxonomic point of view. **Journal of the North American Benthological Society**, v. 30, n. 1, p. 174-181, 2011.

GOU, H. et al. A DNA barcode for Piroplasmea. **Acta Tropica**, v. 124, n. 1, p. 92-97, 2012.

HARVEY, M. L. et al. Molecular identification of some forensically important blowflies of southern Africa and Australia. **Medical and Veterinary Entomology**, v. 17, n. 4, p. 363-369, 2003.

HEBERT, P. D. N.; DEWAARD, J. R.; LANDRY, J.-F. DNA barcodes for 1/1000 of the animal kingdom. **Biology letters**, v. 6, n. 3, p. 359-362, 2010.

HEBERT, P. D. N.; GREGORY, T. R. The promise of DNA barcoding for taxonomy. **Systematic biology**, v. 54, n. 5, p. 852-859, 2005.

HEBERT, P. D. N et al. Biological identification through DNA barcodes. Procedings of the Royal Society of London B. v. 270, n. 1512, p. 313-321, 2003.

HENRIQUES, J. M.; JOSÉ, G.; ASHIKAGA, F. Y. Use of DNA barcode in the identification of fish species from Ribeira de Iguape Basin and coastal rivers from São Paulo State (Brazil). **DNA Barcodes**, v. 3, p. 118-128, 2015.

HOLLINGSWORTH, P. M.; GRAHAM, S. W.; LITTLE, D. P. Choosing and using a plant DNA barcode. **PLoS ONE**, v. 6, n. 5, 2011.

KANTHASWAMY, S. Review: Domestic animal forensic genetics - Biological evidence, genetic markers, analytical approaches and challenges. **Animal Genetics**, v. 46, n. 5, p. 473-484, 2015.

KLIPPEL, A. H. et al. Using DNA barcodes to identify road-killed animals in two atlantic forest nature reserves, Brazil. **PLoS ONE**, v. 10, n. 8, p. 1-15, 2015.

KLOMTONG, P.; PHASUK, Y.; DUANGJINDA, M. Animal Species Identification through High Resolution Melting Real Time PCR (HRM) of the Mitochondrial 16S RRNA Gene. **Annals of Animal Science**, v. 16, n. 2, p. 415-424, 2016.

KRESS, W. J. et al. DNA barcodes for ecology, evolution, and conservation. **Trends in Ecology and Evolution**, v. 30, n. 1, p. 25-35, 2015.

LI, J. et al. Application of barcode high-resolution melting for rapid authentication of the medicinal plant Psammosilene tunicoides. **Biotechnology and Biotechnological Equipment**, v. 30, n. 4, p. 790-796, 2016.

MADEIRA, T. et al. The use of DNA barcode for identifying species of Oxysarcodexia Townsend (Diptera: Sarcophagidae): A preliminary survey. **Acta Tropica**, v. 161, p. 73-78, 2016.

MALEWSKI, T. et al. Identification of forensically important blowfly species (Diptera: Calliphoridae) by high-resolution melting PCR analysis. **International Journal of Legal Medicine**, v. 124, n. 4, p. 277-285, 2010.

MORA, C. et al. How many species are there on Earth and in the ocean? **PLoS biology**, v. 9, n. 8, p. e1001127, 2011.

OLIVEIRA, P. V et al. Using DNA barcodes to identify forensically important species of Diptera in Espírito Santo state, Brazil. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 59, 2016.

PANETO, G. G. et al. **Métodos de extração de DNA: Resina Chelex**. 1. ed. Alegre: CAUFES, 2016.

RATNASINGHAM, S.; HEBERT, P. D. N. A DNA-Based Registry for All Animal Species: The Barcode Index Number (BIN) System. **PLoS ONE**, v. 8, n. 7, 2013.

RATNASINGHAM, S.; HEBERT, P. D. N. BARCODING, B. The Barcode of Life Data System (www.barcodinglife.org). **Molecular Ecology Notes**, v. 7, p. 355–364, 2007.

RAUPACH, M. J. et al. The Application of DNA Barcodes for theIdentification of Marine Crustaceans fromthe North Sea and Adjacent Regions. **PLoS ONE**, v. 10, n. 9, p. 1-23, 2015

SCHOCH, C. L. et al. Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 109, n. 16, p. 1-6, 2012.

SMITH, K. M. et al. Zoonotic viruses associated with illegally imported wildlife products. **PLoS ONE**, v. 7, n. 1, 2012.

TAXONOMY. **Kingdoms of Life Being Barcoded.** Disponível em: <http://v4.boldsystems.org/index.php/TaxBrowser_Home>. Acesso em: 6 out. 2016.

WAUGH, J. DNA barcoding in animal species: Progress, potential and pitfalls. **BioEssays**, v. 29, n. 2, p. 188-197, 2007.

WELLS, J. D.; STEVENS, J. R. Application of DNA-based methods in forensic entomology. **Annual review of entomology**, v. 53, p. 103-120, 2008.

WINDER, L. et al. Evaluation of DNA melting analysis as a tool for species identification. **Methods in Ecology and Evolution**, v. 2, n. 3, p. 312-320, 2011.

Capítulo

4

Aspectos relacionados à brucelose, diarreia viral bovina e rinotraqueíte infecciosa bovina e sua relação com a qualidade do leite

Ítalo Câmara de Almeida[1]
Larissa Marchiori Sena[2]
Layara Pestana Sarmento[3]
Graziela Barioni[4]
Fabrício Albani Oliveira[5]

1 INTRODUÇÃO

O controle sanitário do rebanho bovino leiteiro está entre as prioridades da pecuária, visto que qualquer enfermidade que acometa esses animais ocasiona graves prejuízos econômicos e muitas vezes coloca em risco a saúde humana. A mastite é considerada uma das doenças mais importantes que acometem os rebanhos leiteiros, gerando prejuízos econômicos decorrentes da redução da produção e da qualidade do leite, redução do período de lactação,

[1] Universidade Federal do Espírito Santo, e-mail: almeidaicvet@gmail.com;
[2] Universidade Federal do Espírito Santo, e-mail: la_marchiori@hotmail.com;
[3] Universidade Federal do Espírito Santo, e-mail: layarapestana@gmail.com;
[4] Universidade Federal do Espírito Santo, e-mail: grazibari@gmail.com;
[5] Instituto Federal do Espírito Santo, e-mail: falboli@hotmail.com.

demanda de maior tempo no manejo higiênico e substituição dos indivíduos cronicamente afetados, consequentemente, gerando prejuízos econômicos ao produtor e à indústria (FONSECA; SANTOS, 2001; PEIXOTO; MOTA; COSTA, 2010).

No Brasil, a alta prevalência da mastite representa prejuízo de 12 a 15% na produção de leite (FAGUNDES; OLIVEIRA, 2004). O grande impacto econômico deve ser ressaltado, principalmente, pelas perdas decorrentes na produção, alto custo com tratamento, perda de tetos, honorários veterinários, ou mesmo morte do animal (RIBEIRO JÚNIOR et al., 2008). Outro aspecto importante trata-se de estudos epidemiológicos mais eficazes sobre fatores de risco que podem identificar características relacionadas ao animal, ao ambiente, aos procedimentos de manejo e ao equipamento de ordenha, associadas à mastite bovina (SOUZA et al., 2005).

Apesar da crescente expansão da bovinocultura nos últimos anos, se faz necessário a realização de programas de saúde animal, que incluem o diagnóstico de enfermidades infectocontagiosas e protocolos de vacinação, para que a viabilidade econômica, sobretudo da produção leiteira, seja sustentada dentro do sistema de produção, com a mantença de animais saudáveis no rebanho.

No entanto, a produção de leite está vinculada também a eficiência reprodutiva, devendo as vacas parirem em intervalos cíclicos, serem inseminadas e tornarem-se gestantes dentro de um curto período de tempo. Uma vez que a concepção é atrasada, a ineficiência reprodutiva acarreta em maiores custos de produção, podendo comprometer a atividade leiteira economicamente, e desta forma, causar desestímulos por parte dos produtores (PASQUALOTTO; SEHNEM; WINCK, 2015).

Portanto, vários fatores interferem na eficiência produtiva e reprodutiva de bovinos, sobretudo a ocorrência de doenças infectocontagiosas no rebanho. Estas doenças provocam imunodeficiência no animal, que por sua vez, com a capacidade reduzida do sistema imune, há dificuldade em combater os agentes infecciosos, aumentando desta forma a incidência de mastite no rebanho (GOFF, 1999).

Perdas produtivas e reprodutivas estão relacionadas às doenças infectocontagiosas, dentre elas a Brucelose, a Diarreia Viral Bovina (BVD) e a Rinotraqueíte Infecciosa Bovina (IBR), pois estas uma vez instaladas no rebanho espalham-se geralmente de forma silenciosa causando infertilidade, repetição de estro, morte embrionária, defeitos congênitos, aborto e susceptibilidade do animal frente a outras doenças como a mastite (SOUZA et al., 2009). Portanto, ações como diagnóstico, prevenção e redução da exposição do rebanho às enfermidades infectocontagiosas, contribuem para que o sistema imunológico funcione

adequadamente, minimizando as perdas econômicas do sistema de produção (VIANA; ZANINI, 2009).

Contudo, objetivou-se abordar os principais assuntos inerentes a Brucelose, Diarreia Viral Bovina e Rinotraqueíte Infecciosa Bovina e suas possíveis influências na mastite e qualidade do leite.

2 BRUCELOSE

A brucelose bovina é uma doença infecciosa de caráter crônico e com grande importância à saúde pública por se tratar de zoonose. É causada principalmente pela bactéria *Brucella abortus*, no entanto, outras espécies como a *B. suis* e *B. melitensis* também podem causar a brucelose em bovinos, uma vez que estes estão em contato com suínos, caprinos e ovinos respectivamente (ACHA; SZYFRES, 2003).

Por ser endêmica no Brasil, a brucelose bovina já foi diagnosticada em todos os estados, contudo existem diferenças sobre sua prevalência nas várias regiões do país. De acordo com estudo sorológico realizado pelo Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA), foi constatada prevalência em 7,5% dos bovinos na região Sudeste, 6,8% na região Centro-Oeste, 4,1% na região Norte, 4,0% na região Sul e 2,0% na região Nordeste (MAPA, 2006; POESTER et al., 2009). Para o Estado do Espírito Santo a prevalência de animais infectados com brucelose foi de 3,53%, o que representa aproximadamente 77.209 bovinos infectados, demonstrando a importância desta enfermidade no estado (AZEVEDO et al., 2009).

A manifestação clínica da brucelose se dá principalmente por abortos no terço final da gestação e nascimento de bezerros fracos, no entanto, outras perdas econômicas relacionadas à baixa eficiência reprodutiva, com consequente diminuição da produção, sobretudo de leite, podem ser citadas. Estima-se que a diminuição na produção de carne e leite está na ordem de 25% nos animais infectados com brucelose, acarretando em grande prejuízo para a pecuária bovina (MIRANDA et al., 2008).

As principais vias de infecção por *B. abortus* em bovinos são a oral e aerógena, uma vez que enorme quantidade de bactéria é eliminada durante o aborto ou parto de animais infectados, acrescentando o fato de que bovinos possuem o hábito de lamber e cheirar recém-nascidos ou mesmo fetos abortados de outras vacas infectadas por brucelose, favorecendo assim a transmissão (ACHA; SZYFRES, 2003).

Os sinais clínicos dos animais infectados estão ligados a problemas reprodutivos, sendo o aborto no final da gestação, nascimento de bezerros fracos e natimortos os mais frequentes,

no entanto, podem haver também retenção de placenta e infertilidade temporária ou permanente. Nos machos a infecção causa orquite com consequente diminuição da qualidade espermática e infertilidade (CAMPERO, 1993).

Existem vários métodos para se diagnosticar a brucelose bovina no rebanho, no entanto, a detecção de anticorpos no soro ou leite é o meio mais comum, mais rápido e menos trabalhoso de diagnóstico, se mostrando um método confiável à infecção por *B. abortus*. Testes com antígeno acidificado tamponado (AAT) são rotineiramente utilizados como teste de triagem, contudo, animais reagentes (positivos), nesses testes devem ser submetidos a testes confirmatórios como o teste do 2-mercaptoetanol (2ME) ou a fixação de complemento (POESTER et al., 2009). Testes imunoenzimáticos como o ELISA (Enzyme Linked Immunono Sorbent Assay), permite a detecção de anticorpos específicos no soro, sangue ou leite, e possui alto valor diagnóstico por apresentar alta sensibilidade e alta especificidade (NIELSEN, 2002).

3 DIARREIA VIRAL BOVINA – BVD

A Diarreia Viral Bovina (BVD) possui distribuição mundial, e estima-se que 50 a 90% da população de bovinos apresentam anticorpos no soro sanguíneo contra o vírus (KRAMPS et al., 1999). No Brasil, vários estudos sorológicos demonstram a ampla distribuição e a alta taxa de prevalência em diversos estados: Bahia 56% (NORONHA; CAMPOS; SARDI, 2001), Minas Gerais 61% (MINEO et al., 2002), São Paulo 78% (RICHTZEINHAIN, 1997) e Paraná 61,5%. Até o presente momento não há levantamento sobre a prevalência da BVD no estado do Espírito Santo, sendo necessário fazer o diagnóstico desta enfermidade para que se possam estabelecer estratégias de controle e prevenção minimizando os prejuízos que a doença causa ao rebanho.

A infecção pelo Vírus da Diarreia Viral Bovina (BVDV) está associada à extensa variedade de sinais clínicos que vão desde infecções inaparentes e sintomatologia subclínica até doença aguda e fatal conhecida como doença das mucosas. Embora identificado originalmente em casos clínicos de manifestações gastroentéricas, o BVDV é frequentemente associado com patologias que afetam o sistema reprodutivo de bovinos, portanto, considera-se que o principal impacto econômico da enfermidade na bovinocultura está relacionado aos problemas reprodutivos causados pela BVD (BAKER, 1995).

O BVDV apresenta dois sorotipos: um não citopatogênico, que é o sorotipo mais isolado a campo, e outro citopatogênico, sendo este último uma mutação do primeiro (FRAY; PATON; ALENIUS, 2000). A maior limitação no diagnóstico da BVD são os animais persistentemente

infectados (PI), pois quando ocorre infecção fetal entre 40 e 120 dias de gestação, ou seja, antes do desenvolvimento do sistema imunológico, resulta em indivíduos imunotolerantes que geralmente são soronegativos, clinicamente normais e fonte de disseminação contínua do vírus (BAKER, 1995; BROWNLIE; CLARK; HOWARD, 1989). Os animais PI apresentam resposta imune cronicamente prejudicada, o que pode desempenhar papel indireto na susceptibilidade do animal a mastite por infecções bacterianas secundárias (ELVANDER, 1996; POTGIETER et al., 1984).

O BVDV pode ser transmitido por secreções nasais, oculares, saliva, urina, fezes, sêmen, placenta, sangue e outros objetos contaminados (VOGEL et al., 2001). A infecção resulta em grande variabilidade de sinais clínicos de ordem respiratória, digestiva e reprodutiva, podendo causar infertilidade temporária, diminuição nas taxas de concepção, morte embrionária, mumificação fetal, abortos, malformação fetal e nascimento de bezerros fracos (BAKER, 1995; BROWNLIE; CLARK; HOWARD, 1989; DIAS; SAMARA, 2003; VOGEL et al., 2001).

A técnica mais utilizada para o diagnóstico sorológico de infecção da diarreia viral bovina é a Soro neutralização (SN), no entanto, outras técnicas como a Neutralização Viral (Vírus neutralização) e o ELISA vêm sendo estudadas. O ELISA é uma técnica para a detecção de anticorpos contra o BVDV apresentando sensibilidade de até 97% e especificidade de 99% (CANAL et al., 1998).

4 RINOTRAQUEÍTE INFECCIOSA BOVINA – IBR

O Herpesvírus Bovino Tipo 1 (BHV-1) é o agente causador da Rinotraqueíte Infecciosa Bovina (IBR) e encontra-se disseminado em rebanhos de leite e corte, sendo responsável por grandes prejuízos econômicos na bovinocultura. No Brasil, a prevalência da IBR é variada com 17% em rebanhos do Mato Grosso do Sul (PELLEGRIN et al., 1997), Goiás 83% (VIEIRA et al., 2003), São Paulo 68,3% (JUNQUEIRA et al., 2006) e Minas Gerais 58,2% (ROCHA et al., 2001). Até o presente momento não há levantamento sobre a prevalência da IBR no estado do Espírito Santo, sendo necessário fazer o diagnóstico desta enfermidade para que se possam estabelecer estratégias de controle e prevenção minimizando os prejuízos que a doença causa ao rebanho.

Infecções pelo BHV-1 podem afetar o sistema imune dos bovinos, e com base nessas propriedades imunossupressoras tem sido proposto que o vírus pode desempenhar papel secundário na etiologia de doenças bacterianas (KOPPERS-LALIC et al., 2001; SAINI et al.,

1999). No entanto, o papel secundário do BHV-1 na etiologia da mastite bovina ainda não está claro. Estudos epidemiológicos para examinar se os animais soropositivos são mais propensos à mastite bovina que animais soronegativos, ainda são escassos. Hage et al. (1998), relataram uma queda significativa na produção de leite em animais cursando infecção subclínica pelo BHV-1, o que pode ser indicativo de mastite subclínica.

Os animais portadores de IBR podem apresentar sintomatologia variada, comprometendo as vias respiratórias, trato genital, reprodutivo e o sistema nervoso. Desta forma, ocasionam diversas formas de manifestações clínicas, que são comuns em outras doenças infecciosas e parasitárias dificultando assim o diagnóstico conclusivo (TAKIUCHI; ALFIERI; ALFIERI, 2001).

Apesar da sintomatologia variada a infecção pelo BVH-1 possui predileção pelos órgãos do trato respiratório e reprodutivo de bovinos, podendo serem denominadas portanto de Rinotraqueíte Infecciosa Bovina (IBR) quando há sintomatologia respiratória principalmente, e Vulvovaginite/Balanopostite Pustular Infecciosa (IPV/IPB) quando afeta o sistema reprodutivo de fêmeas e machos respectivamente (GIBBS; RWEYEMANN, 1977).

Na forma respiratória os sinais clínicos são hiperemia das mucosas, aumento de temperatura, conjuntivite, rinite, corrimento nasal, lesões erosivas nas cavidades oral e nasal, dispneia e pneumonia. A mortalidade desta enfermidade geralmente é baixa, no entanto, podem ocorrer complicações decorrentes de infecções secundárias, agravando o quadro clínico do animal (SISTEMA BRASILEIRO DE EMERGÊNCIAS VETERINÁRIAS - SISBRAVET, 2009; WYLER; ENGELS; SCHWYZR, 1989).

A forma genital é caracterizada pelo aparecimento progressivo de vesículas, pústulas e erosões localizadas na região da vulva e vagina nas fêmeas, prepúcio e pênis nos machos. O epitélio dessas regiões pode apresentar-se hiperêmico e edemaciado, com presença de secreção mucopurulenta decorrente de infecção bacteriana secundária. Dentre os distúrbios reprodutivos estão à mortalidade embrionária, repetição de cio, mortalidade fetal, aborto, natimortos, nascimentos de bezerros fracos acompanhado de mortalidade neonatal e infertilidade (STRAUB, 1991). Retardo no crescimento de animais jovens e menor produção leiteira são atribuídos a animais infectados com o BVH-1 (BARR; ANDRESON, 1993).

A transmissão do BVH-1 ocorre por aerossóis ou contato direto do exsudado nasal de animais contaminados, ingestão de água e alimentos contaminados, uso de vaginas artificiais contaminadas em coletas de sêmen, transmissão venérea pela monta natural e até mesmo na inseminação artificial com sêmen congelado (ENGELS; ACKERMANN, 1996; PHILPOTT, 1993).

Atualmente as técnicas sorológicas mais utilizadas na detecção de anticorpos contra IBR incluem a Soro neutralização (SN) e o ELISA. A SN por depender da manutenção de linhagens celulares possui maior custo, também possui menor sensibilidade podendo não se identificar animais positivos, por estes apresentarem títulos basais de anticorpos neutralizantes que não são detectáveis, quando comparado ao ELISA (WYLER; ENGELS; SCHWYZR, 1989). Portanto, estudos demonstram que o teste de ELISA na detecção de anticorpos contra o BHV-1 foi mais sensível que a técnica de SN, sendo capaz de detectar baixos títulos de anticorpos nos animais infectados (KRAMPS et al., 1994).

5 ASPECTOS RELACIONADOS À MASTITE

Dentre as manifestações clínicas já citadas, animais infectados com brucelose também podem apresentar lesões na glândula mamária, uma vez que a *B. abortus* é capaz de infectar este órgão, causando mastite, perdas na produção e na qualidade do leite. A redução na produção de leite é considerada o fator individual mais importante das perdas econômicas da mastite. Estudos realizados no Brasil mostraram que quartos mamários com mastite subclínica produziram em média 25 a 42% menos leite do que quartos mamários normais. Nos Estados Unidos, estima-se que o custo por vaca/ano devido à mastite seja de aproximadamente US$ 185, o que corresponde a um custo anual de US$1,8 bilhão. Esse valor corresponde a aproximadamente 10% do total de leite vendido pelos produtores. Deste, cerca de dois terços correspondem à redução na produção de leite devido à mastite subclínica (BRITO et al., 2013).

No entanto, em casos de doenças sistêmicas como a brucelose, o agente infeccioso pode ser eliminado pelo úbere sem que aja comprometimento do mesmo, ou até ausência de mastite. Sendo assim, a brucelose torna-se importante fonte de infecção para outros animais e seres humanos, demonstrando assim seu caráter zoonótico e a importância da doença na saúde pública (CRAWFORD; HUBER; ADAMS, 1990; XAVIER et al., 2009).

A BVD e IBR estão disseminadas no rebanho nacional, havendo necessidade de fazer o diagnóstico correto destas enfermidades e preveni-las (DEL FAVA et al., 2003). Outro fator importante sobre estas doenças é que para o SisBraVet e a Organização Internacional de Epizootias (OIE), a BVD e a IBR são classificadas como doenças vesiculares, e diagnóstico diferencial para a febre aftosa, sendo necessário, portanto o correto diagnóstico, prevenção, controle e imunização frente aos vírus de BVD e IBR, sobretudo no estado do Espírito Santo, onde os dados sobre a soroprevalência de ambas as doenças são escassos.

Há relatos de associação positiva entre o BVDV e casos de mastite bovina, onde o número de casos de mastite aumentou em rebanhos com título aumentado de anticorpos para BVDV no leite (NISKANEN et al., 1995). Em outro estudo, ao examinar a exposição de rebanhos leiteiros para BVDV, foi observado aumento de 7% nos casos de mastite clínica em rebanhos expostos em comparação aos não expostos (WAAGE, 2000). Há relatos também na redução da produção de leite em vacas positivas para o BVDV, embora nenhuma informação fosse apresentada em relação a mastite (MOERMAN et al., 1994).

O BHV-1 já foi detectado no leite de vacas com mastite clínica, sendo a cultura bacteriana negativa para as amostras em questão (BILGE, 1998; ROBERTS; CARTER; CARTER, 1974). Além do isolamento de BVH-1 no leite, o vírus também foi isolado de lesões vesiculares no úbere e nas tetas das vacas, sendo este vírus associado com lesões cutâneas no úbere bovino e consequente porta de entrada para infecções bacterianas secundárias (GUY et al., 1984). Portanto, os estudos acima mencionados demonstram que o BHV-1 tem sido isolado a partir de casos de mastite e que o úbere de vacas é susceptível ao mesmo. No entanto, o seu impacto sobre os casos de mastite ainda não é claro, havendo a necessidade de mais estudos.

Apesar da investigação etiológica da mastite ser intensa, de 20 à 35% dos casos tem sua etiologia desconhecida. Uma explicação para estas porcentagens elevadas pode ser a baixa concentração do patógeno em questão na amostra, e também outros agentes de difícil cultivo em laboratório (BARKEMA et al., 1998; MILTENBURG et al., 1996; WEDDERKOPP, 1997).

Devido às elevadas porcentagens de causas desconhecidas de mastite, há de se ressaltar o papel dos vírus na sua etiologia. No caso das infecções virais, sinais de mastite podem não ter sido reconhecidos, pois outros sintomas são mais proeminentes. Casos de mastite subclínica muitas vezes não são diagnosticados e, consequentemente, sua etiologia não é investigada. Isso pode causar uma subestimação de infecções por vírus envolvidos na mastite subclínica em bovinos (WELLENBER; VAN DER POEL; VAM OIRSCHOT, 2002).

No entanto, tem sido sugerido um possível papel dos vírus na mastite subclínica em bovinos. A mastite subclínica ocorre com frequência, e pode levar a prejuízos elevados devido à reduzida produção e qualidade do leite, podendo as perdas econômicas resultantes da mastite clínica e subclínica atingirem 20% do potencial de produção (BECK; WISE; DODD, 1992).

Outro importante fator em relação às infecções virais seria o seu papel indireto nos casos de mastite bovina. Danos à glândula mamária, aos tetos e ao esfíncter do teto, que funcionam como uma barreira natural, podem levar a maior susceptibilidade para os casos de mastites bacterianas e infecções bacterianas generalizadas, acarretando em curso mais grave nos casos de mastite. Em adição aos vírus que causam lesões nas tetas, outras infecções virais podem

induzir ou aumentar os casos de mastite bovina devido aos seus efeitos imunossupressores (WELLENBER; VAN DER POEL; VAM OIRSCHOT, 2002).

Estima-se que a maior parte das infecções não sejam diagnosticadas, no entanto, elas desencadeiam efeito imunossupressor nos bovinos afetados, com isso, diminui a resposta imunológica dos animais frente a outros micro-organismos, causando desta forma doenças entéricas, helmintoses e mastites contribuindo para menor produção e qualidade do leite (POTGIETER, 2004). Embora seja plausível que a imunossupressão induzida por vírus cause a mastite, há poucos dados que sustentem esta hipótese. Além disso, apenas poucos e antigos estudos epidemiológicos bem concebidos têm sido realizados para apoiar uma relação causal entre a infecção por vírus e a mastite.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

De acordo com o exposto, a brucelose, a BVD e a IBR podem estar envolvidas de forma direta ou indireta na etiologia da mastite bovina, representando sérias perdas econômicas e, sobretudo, riscos à saúde pública. Mais pesquisas devem ser realizadas para estabelecer a importância destas infecções na mastite bovina a campo. No entanto, deve-se ter em conta que a mastite é uma doença multifatorial, e que tais pesquisas são difíceis de projetar, uma vez que na etiologia da mastite deve-se investigar as infecções bacterianas e virais tanto em conjunto como separadamente. Neste contexto, a aplicação de ferramentas de diagnóstico mais poderosas, oferecem novas oportunidades para uma rápida detecção simultânea de vírus e bactérias envolvidos na mastite bovina.

7 REFERÊNCIAS

ACHA, P. N.; SZYRES, B. **Zoonoses and communicable diseases common to man and animals**. 3. ed. Washington: Pan American Health Organization, 2003.

AZEVEDO, S. S. et al. Situação epidemiológica da brucelose bovina no Estado do Espírito Santo. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia.** v. 61, p. 19-26, 2009.

BAKER, J. C. The clinical manifestations of bovine viral diarrhea infection. **Veterinary Clinics North America,** v. 11, p. 425-445, 1995.

BARKEMA, H. W.et al. Incidence of clinical mastitis in dairy herds grouped in three categories by bulk milk somatic cell count. **Journal Dairy Science,** v. 81, p. 411-419, 1998.

BARR, B. C.; ANDERSON, M. L. Infectious diseases causing bovine abortion and fetal loss. **Veterinary Clinics North America: Food Animal Practice**, v. 9, p. 343-368, 1993.

BECK, H. S.; WISE, W. S.; DODD, F. H. Costs benefit analysis of bovine mastitis in the UK. **Journal of Dairy Research,** v. 59, p. 449-460, 1992.

BILGE, S. Detection of antibodies of IBR-IPV infection in blood and milk by serum neutralization test and virus isolation from milk samples in dairy cows. **Veteriner Fakultesi Dergisi,** v. 45, p. 313-321, 1998.

BRITO, M. A. et al. **Mastite**. Brasília: Agência de Informação Embrapa, 2013. Disponível em: <http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/Agencia8/AG01/arvore/AG01_202_21720039247.html>. Acesso em: 02 jan. 2016.

BROWNLIE, J.; CLARK, M. C.; HOWARD, C. J. Experimental infection of cattle in early pregnancy with a cytopathic strain of bovine virus diarrhoea virus. **Research Veterinary Science**, v. 46, p. 307-311, 1989.

CAMPERO, C. M. Brucelosis en toros: una revisión. **Revue de Medecine Veterinaire**, v. 74, p. 8-14, 1993.

CANAL, C. W. et al. Detection of antibodies to bovine viral diarrhoea virus (BVDV) and characterization of genomes of BVDV from Brazil. **Veterinary Microbiology,** v. 63, p. 85-97, 1998.

CRAWFORD, R. P.; HUBER, J. D.; ADAMS, B. S. Epidemiology and surveillance. In: NIELSEN, K.; DUNCAN, J. R. (org.). **Animal Brucellosis**. Boca Raton: CRC Press, 1990, p. 131-151.

DEL FAVA, C. et al. Manejo sanitário para o controle de doenças da reprodução em um sistema leiteiro de produção semi-intensivo. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 70, p. 25-33, 2003.

DIAS, F. C.; SAMARA, S. I. Detecção de anticorpos contra o vírus da diarréia viral bovina no soro sangüíneo, no leite individual e no leite de conjunto em tanque de expansão de rebanhos não vacinados. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 40, p. 161-168, 2003.

ELVANDER, M. **An experimental study of a concurrent primary infection with Bovine Respiratory Syncytical Virus (BRSV) and Bovine Viral Diarrhea Virus (BVDV) in calves**. 1996. Ph.D. Thesis, Swedish University of Agricultural Sciences, Uppsala, Sweden, 1996.

ENGELS, M.; ACKERMANN, M. Pathogenesis of ruminant herpesviruses infections. **Veterinary Microbiology**, v. 53, p. 3-15, 1996.

FAGUNDES, H.; OLIVEIRA, C. A. F. Infecções intramamárias causadas por Staphylococcus aureus e suas implicações em saúde pública. **Ciência Rural,** v. 34, p. 1315-1320, 2004.

FONSECA, L. F. L.; SANTOS, M. V. **Qualidade do leite e controle da mastite**. São Paulo: Lemos, 2001.

FRAY, M. D.; PATON, D. J.; ALENIUS, S. The effects of bovine viral diarrhoea virus on cattle reproduction in relation to disease control. **Animal Reproduction Science**, v. 60-61, p. 615-627, 2000.

GIBBS, E. P. J.; RWEYEMANN, M. M. Bovine herpesviruses. Part I. Bovine herpesvirus 1. **Veterinary Bulletin,** v. 47, p. 317-343, 1977.

GOFF, J. P. Mastitis and retained placenta – relationship to bovine immunology and nutrition. **Advances in Dairy Technology,** v. 11, p. 185-192, 1999.

GUY, J. S. et al. Isolation of bovine herpesvirus-1 from vesicular lesions of bovine udder. **America Journal of Veterinary Research,** v. 45, p. 783-785, 1984.

HAGE, J. J. et al. Milk production and reproduction during a subclinical bovine herpesvirus 1 infection on a dairy farm. **Preventive Veterinary Medicine,** v. 34, p. 97-106, 1998.

JUNQUEIRA, J. R. C. et al. Avaliação do desempenho reprodutivo de um rebanho bovino de corte naturalmente infectado com BoHV-1, BVDV e Leptospira hardjo. **Semina, Ciências Agrárias**, v. 27, p. 471-480, 2006.

KOPPERS-LALIC, D. et al. The UL41-encoded virion host shuttoff (vhs) protein and vhs-independent mechanisms are responsible for down-regulation of MHC class I molecules by bovine herpesvirus 1. **Journal of General Virology,** v. 82, p. 2071-2081, 2001.

KRAMPS, J. A. et al. A simple, specific, and highly sensitive blocking enzyme-linked immunosorbent assay for detection of antibodies to bovine herpesvirus 1. **Journal of Clinical Microbiology,** v. 32, p. 2175-2181, 1994.

_____. A simple, rapid and reliable enzyme-lindked immunosorbent assay for the detection of bovine virus diarrhoea virus (BVDV) specific antibodies in cattle serum, plasma and bulk milk. **Veterinary Microbiology**, v. 64, p. 135-144, 1999.

MILTENBURG, J. D. et al. Incidence of clinical mastitis in a random sample of dairy herds in the southern Netherlands. **Veterinary Record,** v. 139, p. 204-207, 1996.

MINEO, T. W. P. et al. Seroprevalence of bovine viral diarrhea virus and bovine herpesvirus type 1 in two abortion prone dairy herds in the Triangulo Mineiro Region. **Virus Reviews & Research**, v. 7, p. 145, 2002.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO - MAPA/SDA/DAS/BRASIL. **Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e da Tuberculose Animal (PNCEBT)**. Brasília: MAPA, 188p. 2006. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/pls/portal/url/ITEM/3D2720AF1E0FD62246C>. Acesso em: 25 jan. 2016.

MIRANDA, K. L. et al. Quem ganha com a certificação de propriedades livres ou monitoradas pelo PNCEBT? **Leite Integral**, v. 3, p. 44-55, 2008.

MOERMAN, A. et al. Clinical consequences of a bovine virus diarrhoea virus infection in a dairy herd: a longitudinal study. **Veterinary Quarterly**, v. 16, p. 115–119, 1994.

NIELSEN, K. Diagnosis of brucellosis by serology. **Veterinary Microbiology**, v. 90, p. 447-459, 2002.

NISKANEN, R. et al. Effects of infection with bovine virus diarrhoea virus on health and reproductive performance in 213 dairy herds in one county in Sweden. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 23, p. 229-237, 1995.

NORONHA R.; CAMPOS, S. G.; SARDI, S. Serum neutralization test and viral isolation for bovine viral diarrhea virus in the state of Bahia. **Virus Reviews & Research**, v. 6, p. 146, 2001.

PASQUALOTTO, W.; SEHNEM, S.; WINCK, C. A. Incidência de Rinotraqueíte Infecciosa Bovina (IBR), Diarreia Viral Bovina (BVD) e Leptospirose em Bovinos Leiteiros da Região Oeste de Santa Catarina – Brasil. **Revista em Agronegócio e Meio Ambiente,** v. 8, p. 249-270, 2015.

PEIXOTO, R. M.; MOTA, R. A.; COSTA, M. M. Mastite em pequenos ruminantes no Brasil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 30, p. 754-762, 2010.

PELLEGRIN, A. O. et al. **Doenças da reprodução em bovinos no Pantanal:** ocorrência de animais soropositivos para os vírus da rinotraqueíte infecciosa bovina, diarreia bovina a vírus e língua azul. (Comunicado Técnico, 20). Corumbá: Embrapa Pantanal, 1997.

PHILPOTT, M. The dangers of disease transmission by artificial insemination and embryo transfer. **British Veterinary Journal**, v. 149, p. 339-369, 1993.

POESTER, F. et al. Estudos de prevalência da brucelose bovina no âmbito do Programa Nacional de Controle e Erradicação de Brucelose e Tuberculose. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 61, n. 1, p. 1-5, 2009.

POTGIETER, L. N. D. Bovine viral diarrhea and mucosal disease. **Infectious Diseases of Livestock,** v. 2, p. 946-969, 2004.

POTGIETER, L. N. D. et al. Experimental production of bovine respiratory tract disease with viral diarrhea virus. **American Journal of Veterinary Research,** v. 45, p. 1582-1585, 1984.

RIBEIRO JÚNIOR, E. et al. California Mastitis Test (CMT) e whiteside como métodos de diagnóstico indireto da mastite subclínica. **Revista Brasileira de Saúde Produção Animal**, v. 9, p. 680-686, 2008.

RICHTZENHAIN, L. J. Em busca de respostas. **Revista Criadores**, v. 808, p. 40, 1997.

ROBERTS, A. W.; CARTER, G. R.; CARTER, F. A. Infectious bovine rhinotrachitis virus recovered from milk of a cow with mastitis. **Journal of American Veterinary Medical Association,** v. 164, p. 413, 1974.

ROCHA, M. A. et al. Pesquisa de anticorpos para IBR em amostragem de demanda no Estado de Minas Gerais, 1990-1999. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 53, p. 645-647, 2001.

SAINI, M. et al. Apoptosis in bovine herpesvirus 1 infected bovine peripheral blood mononuclear cells. **Indian Journal of Experimental Biology,** v. 37, p. 976-979, 1999.

SISTEMA BRASILEIRO DE EMERGÊNCIAS VETERINÁRIAS - SISBRAVET/BRASIL. **Programa Nacional de controle e Erradicação da Febre aftosa.** Brasília: MAPA/SDA/DSA**,** 2009. 61p. Disponível em: <http://www3.servicos.ms.gov.br/iagro_ged/pdf/1435_GED.pdf>. Acesso em: 25 jan. 2016.

SOUZA, G. N. et al. Fatores de risco para alta contagem de células somáticas do leite do tanque em rebanhos leiteiros da Zona da Mata de Minas Gerais, Brasil. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 57, n. 2, p. 251-260, 2005.

SOUSA, V. E. de et al. Frequência de anticorpos contra o Vírus da Diarréia Viral Bovina (BVDV) em bovinos leiteiros não vacinados na bacia leiteira da ilha de São Luís-MA. **Ciência Animal Brasileira**, v. 1, p. 496-501, 2009.

STRAUB, O. C. BHV1 infections: relevance and spread in Europe. **Comparative Immunolgy, Microbiology & Infectious Diseases**, v. 14, p. 175-186, 1991.

TAKIUCHI, E.; ALFIERI, A. F.; ALFIERI, A. A. Herpesvírus bovino tipo 1: tópicos sobre a infecção e métodos de diagnóstico. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 22, n. 2, p. 203-209, 2001.

VIANA, K. F.; ZANINI, M. S. Perfil de produtores frente à vacinação contra doenças infecciosas abortivas em rebanhos bovinos no município de Alegre/ES. **Archives of Veterinary Science,** v. 14, n. 2, p. 103-108, 2009.

VIEIRA, S. et al. Anticorpos para o herpes vírus bovino 1 (BHV1) em bovinos do Estado de Goiás. **Ciência Animal Brasileira**, v. 4, n. 2, p. 131-137, 2003.

VOGEL, F. S. F. et al. Resposta sorológica e avaliação de proteção fetal em ovelhas prenhes vacinadas contra o vírus da diarreia viral bovina (BVDV). **Ciência Rural**, v. 31, p. 831-838, 2001.

WAAGE, S. Influence of new infection with bovine virus diarrhoea virus on udder health in Norwegian dairy cows. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 20, p. 123–135, 2000.

WEDDERKOPP, A. *Haemophilus somnus*—unlikely to be a causative microbiological agent in bovine clinical mastitis in Denmark. **Acta Veterinary Scandinavica**, v. 38, p. 193-195, 1997.

WELLENBERG, G. J.; VAN DER POEL, W. H. M.; VAM OIRSCHOT, J. T. Viral infections and bovine mastitis: a review. **Veterinary Microbiology**, v. 88, p. 27-45, 2002.

WYLER, R.; ENGELS, M.; SCHWYZR, M. Infectious bovine rhinotracheitis/vulvovaginitis (BHV-1). In: WITTMANN, G. **Herpesvirus diseases of cattle, horses and pigs**. Boston: Kluwer Academic Publishers. p. 1-72, 1989.

XAVIER, M. N. et al. Pathology, immunohistochemistry and bacteriology of tissues and milk of cows and fetuses experimentally infected with *Brucella abortus*. **Journal of Comparative Pathology,** v. 140, p. 149-157, 2009.

Capítulo

5

Biomphalaria spp. e equinostomíase: aspectos biológicos e estudos experimentais desta interface

Victor Menezes Tunholi[1]
Vinícius Menezes Tunholi-Alves[2]
Jairo Pinheiro da Silva[3]
Isabella Vilhena Freire Martins[4]

1 INTRODUÇÃO

Moluscos pertencentes às classes Gastropoda e Bivalvia são organismos invertebrados de grande importância para a medicina humana e veterinária, pois participam como hospedeiros intermediários de ciclos de vários parasitos principalmente dos trematódeos digenéticos. Muitos desses helmintos acometem animais domésticos e de produção, bem como o homem causando respectivamente, perdas econômicas e problemas de saúde pública (SANTOS et al., 2009).

Os resultados dos inúmeros tipos de relações parasito-hospedeiros existentes são quase sempre interpretados como um processo adaptativo que ocorre entre ambos os organismos (PINHEIRO; MALDONADO; LANFREDI, 2009). Como consequência, alterações comportamentais são demonstradas nos hospedeiros infectados, onde passam a optar por micro-

[1] Universidade Federal do Espírito Santo, e-mail: victortunholi@yahoo.com.br;
[2] Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica-RJ, e-mail: vinícius_menezestunholi@yahoo.com.br;
[3] Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica-RJ, e-mail: pinheiro@ufrrj.br;
[4] Universidade Federal do Espírito Santo, e-mail: ivfmartins@gmail.com.

habitat e tipos de dietas que diferem dos organismos não parasitados. Além disto, mudanças fenotípicas, na habilidade competitiva e na atratividade aos companheiros são observadas nos animais infectados (MOORE; GOTELLI, 1990) facilitando a transmissão do parasito.

As infecções por larvas de trematódeos e nematóides promovem não apenas alterações nos padrões fisiológicos de moluscos por afetar seu metabolismo, mas também são capazes de induzirem mudanças no comportamento do hospedeiro que resultam em economia de energia. Deste modo, o hospedeiro passa a gastar menos energia nos padrões de comportamento agressivo, de corte e de reprodução, poupando-a de forma que possa ser disponibilizada para garantir o completo desenvolvimento parasitário (MINCHELLA, 1985). Por outro lado, segundo Becker (1980), ao invadir o seu hospedeiro molusco, as larvas de trematódeos causam-lhe danos pela retirada de substâncias, induzindo neste, um balanço energético negativo. Além disto, tais larvas ainda eliminam os seus produtos de excreção/secreção que acabam alterando momentaneamente a composição normal da hemolinfa e alterando o sistema neuroendócrino e imunológico do molusco, interferindo na homeostase do hospedeiro.

Parasitos pertencentes ao gênero Echinostoma apresentam grande importância tanto em medicina humana quanto veterinária por infectarem quando adultos uma ampla variedade de hospedeiros vertebrados, incluindo desde espécies de peixes, répteis, aves e mamíferos. Adicionalmente, dados indicam a infecção de humanos por equinostomatídeos através da ingestão de caramujos e peixes crus ou malcozidos (KANEV et al., 2000).

O molusco planorbídeo *Biomphalaria glabrata* está comumente associado à alta morbidade da esquistossomose devido à vasta distribuição e altos índices de infecção, advindo desse fato, sua grande importância em saúde pública. Concomitantemente, estudos observacionais e experimentais têm constatado a susceptibilidade de *B. glabrata* à infecção por *Echinostoma paraensei* (MALDONADO JÚNIOR et al., 2001a, 2001b).

O trematódeo digenético *E. paraensei* foi descrito no Brasil a partir de *B. glabrata* naturalmente infectadas e coletadas no estado de Minas Gerais, tendo todas as fases do seu ciclo biológico desenvolvidas em laboratório. Em adição, a descrição morfológica de todos os seus estágios evolutivos foi realizada com auxílio da microscopia de luz e eletrônica (LIE; BASCH, 1967).

Muitos estudos têm sido realizados com o objetivo de elucidar o ciclo de vida dos parasitos, sua rota de migração e como a infecção por larvas de helmintos se processa ao longo do tempo em que estão hospedando moluscos (MELLO-SILVA et al., 2010). No entanto, pouco

se conhece sobre as alterações fisiológicas impostas pela infecção de *E. paraensei* em *B. glabrata*.

1.1 *Biomphalaria* spp. Preston (1910)

Em termos de abundância de espécies, moluscos constituem o segundo maior filo de invertebrados, logo após os artrópodes. Mais de 50.000 espécies vivas de moluscos já foram descritas (BARKER, 2001). Os gastrópodes compreendem cerca de três quartos do número total de espécies de moluscos já notificados. Os pulmonados, que incluem a ordem Basommatophora, estão representados nas águas continentais da América do Sul pelas seguintes famílias: Chilinidae, Lymnaeidae, Physidae, Ancylidae e Planorbidae. Muitos destes organismos têm importância fundamental no ciclo de vida dos trematódeos digenéticos e alguns nematóides, atuando como hospedeiros intermediários (TUNHOLI-ALVES et al., 2014). Adema e Loker (1997) destacam que apesar da grande diversidade em espécies e da complexidade dos ciclos biológicos dos trematódeos digenéticos, todos apresentam moluscos como hospedeiros intermediários, sendo estes considerados imprescindíveis para o desenvolvimento ontogênico de tais parasitos. De acordo com Cribb, Bray e Littlewood (2001), aproximadamente 40.000 espécies de trematódeos requerem moluscos seu para completarem ciclo de vida, havendo relatos de cercárias emergindo de moluscos de 76 diferentes famílias pertencentes as classes Gastropoda (66 famílias), Bivalvia (nove famílias) e Scaphopoda (um família). Estes dados refletem a importância dos gastrópodes e em especial a espécie *B. glabrata* como hospedeiros de parasitos que infectam animais silvestres e domésticos, incluindo humanos.

Estudos sobre a helmintofauna têm registrado inúmeras associações parasito-molusco em várias regiões brasileiras sendo *Biomphalaria* o gênero com maior variedade de tipos cercarianos (THIENGO et al., 2004). Segundo Rohde (2001), a estreita relação observada entre moluscos e trematódeos digenéticos sugere que estes tiveram origem de um ancestral turbelário rabdocele de vida livre, que habitava como comensal a cavidade palial de moluscos, tornando-se posteriormente, parasitos obrigatórios e dependentes, tendo desenvolvido vários tipos de adaptações que assegurassem a infecção nestes hospedeiros.

Moluscos *Biomphalaria* pertencem ao filo Mollusca, classe Gastropoda, subclasse Pulmonata, ordem Basommatophora e família Planorbidae. O nome do gênero tem origem do latim e refere-se a *Bis* (duas vezes) e *omphalos* (umbigo), devido ao aprofundamento do giro

central em ambos os lados da concha. No Brasil, as sinonímias aceitas e empregadas para *Biomphalaria* são *Planorbina*, 1843; *Armigerus*, 1884; *Thaphius*, 1855; *Tropicorbis*, 1914 e *Australorbis*, 1934 (PARAENSE, 1975).

Anatomicamente, a massa cefalopediosa (cabeça e pé), exposta quando o molusco se movimenta é unida pelo colo à massa visceral que é permanentemente protegida pela concha. Na massa cefalopediosa (lado esquerdo) encontra-se a abertura anal e proximamente ao colo, verificam-se as aberturas genitais masculinas e femininas separadas, uma vez que são hermafroditas. O sistema genital é composto basicamente por um ovoteste, que produz óvulos e espermatozoides, seguido de um canal para a passagem dos mesmos, o ovispermiduto, o qual se divide em dois ramos, um masculino (o espermiduto) e outro feminino (o oviduto).

Biomphalaria abrange cerca de vinte espécies, sendo amplamente distribuída na África, América do Sul, Caribe, sudoeste da Ásia (Arábia Saudita e Iêmen), na América Central e sul dos Estados Unidos (PARAENSE, 1975), com características biológicas fundamentais para garantirem a sua preservação e a expansão de suas espécies e populações, mesmo em ambientes sujeitos as perturbações ambientais: 1) são hermafroditas e se reproduzem tanto por fecundação cruzada, quanto por autofecundação; e, 2) em situações de seca, dessecam, mantendo-se vivos, recolhidos à concha, em estado fisiológico vegetativo, preservando-se até a próxima estação úmida (TUAN; SIMÕES, 1989).

No Brasil, este gênero possui onze diferentes espécies e uma subespécie (TEODORO et al., 2010) das quais três foram encontradas naturalmente infectadas por *Schistosoma mansoni: B. glabrata*, *Biomphalaria tenagophila* e *Biomphalaria straminea*, sendo a primeira considerada a de maior importância em saúde pública, devido: a ampla distribuição geográfica já notificada em 16 estados brasileiros mais o Distrito Federal, a capacidade de adaptação em diferentes condições ambientais e a uma maior susceptibilidade à infecção pelo parasito e eliminação de cercárias por um longo período de tempo (SOUZA; LIMA, 1990).

Os equinostomatídeos, por sua vez, são exemplos adicionais de trematódeos digenéticos que apresentam como hospedeiros intermediários diferentes espécies de moluscos límnicos, incluindo *B. glabrata*, *Lymnaea columella* e *Physa marmorata*. Muitas aves, mamíferos selvagens e domésticos, incluindo humanos mostram-se susceptíveis a infecção por *Echinostoma* spp., apresentando, portanto, importância médica e veterinária (MALDONADO JÚNIOR et al., 2006). Em adição, trabalhos têm identificado a possibilidade de *B. glabrata* em atuar como hospedeiro intermediário de *Angiostrongylus costaricensis*, *Angiostrongylus vasorum* e *Angiostrongylus cantonensis* (TUNHOLI-ALVES et al., 2011).

1.2 *Echinostoma* spp. – O PARASITO

Echinostoma tem como espécie tipo *Echinostoma revolutum*, entretanto, o grupo dos equinostomatídeos apresenta muitos aspectos controversos relacionados à sua taxonomia. Kanev (1994), utilizando apenas informações sobre a biologia de *E. revolutum*, afirmou que esta espécie utilizava exclusivamente aves como hospedeiros definitivos e moluscos límnicos como primeiro hospedeiro intermediário. Já os espécimes encontrados em roedores pertenceriam à espécie *Echinostoma caproni*, que apresenta *Biomphalaria* spp. como primeiro e segundo hospedeiros intermediários e roedores como hospedeiro definitivo. O aspecto biológico levou a considerar *E. paraensei* e *E. caproni* como sinonímias (CHIRSTENSEN et al., 1990); já Sloss et al. (1995), utilizando ferramentas bioquímicas como eletroforese em gel, observaram que *E. paraensei* e *E. caproni* possuíam seis sistemas enzimáticos diferentes entre si, em um total de dez, demonstrando que *E. paraensei* está geneticamente mais próximo de *Echinostoma trivolvis* do que de *E. caproni*, tratando-se, portanto, de espécies diferentes. Estudos baseados em técnicas de biologia molecular (FUJINO et al., 1999), vêm ratificar os resultados obtidos por Sloss et al. (1995).

Estes parasitos têm sido largamente estudados por algumas razões: (1) apresentam ampla distribuição geográfica; (2) são encontrados infectando muitas aves, mamíferos selvagens e domésticos, incluindo humanos. Muitos equinóstomas são hematófagos; (3) infectam a maioria dos órgãos e sítios na cavidade abdominal das aves e mamíferos, incluindo o trato alimentar, excretor e sistemas reprodutores; (4) adultos e larvas constituem bons materiais para estudos biológicos, fisiológicos, bioquímicos, imunológicos e outros estudos em biologia moderna; e (5) podem ser mantidos facilmente em laboratório com baixo custo (KANEV, 2000).

1.2.1 Morfologia e classificação

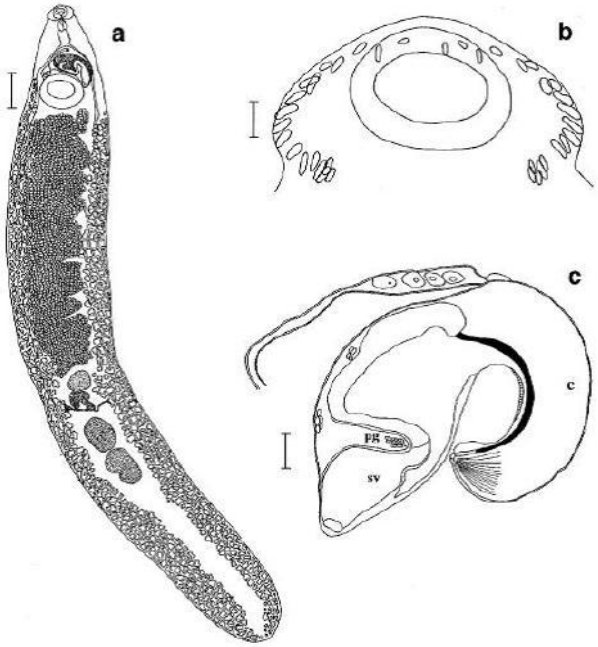
Helmintos adultos pertencentes à família Echinostomatidae são morfologicamente caracterizados pela presença de um colar cefálico guarnecido por espinhos ao redor da ventosa oral. O número e a disposição dos espinhos presentes no colar cefálico são considerados importantes aspectos empregados na classificação taxonômica destes parasitos. Significativas variações no tamanho de equinóstomas adultos têm sido registradas, podendo estas ser em parte

justificadas em função da espécie de *Echinostoma* relacionada, em decorrência do procedimento de fixação utilizado, bem como, da espécie de hospedeiro definitivo envolvida. Neste contexto, os equinóstomas adultos são classificados como pequenos, se apresentarem comprimento longitudinal de até cinco mm; médios, quando apresentarem comprimento entre 5-10 mm e, grandes, quando portarem comprimento maior que 10 mm. Os espinhos presentes no colar cefálico podem estar organizados em uma ou duas fileiras circulares, sendo o número de espinhos constante para cada espécie de equinostomatídeo. O tegumento é revestido por escamas semelhantes a espinhos em ambas as superfícies ventral e dorsal, embora o número e tamanho dos espinhos sejam reduzidos na metade posterior do corpo do parasito. As ventosas orais e ventrais estão situadas próximas uma da outra. Os dois testículos, geralmente em conjunto, são posteriores ao ovário (TOLEDO; ESTEBAN; FRIED, 2012).

Existe considerável controvérsia em relação à sistemática dos membros da família Echinostomatidae, particularmente relacionado à *Echinostoma*. Isto pode ser atribuído a vários fatores, incluindo espécies identificadas incorretamente ou espécimes que foram insuficientemente descritos, a existência de substancial homogeneidade interespecífica associada às características morfológicas observadas nas fases adultas, bem como a grande diversidade de hospedeiros vertebrados definitivos e a ampla distribuição geográfica. Segundo alguns autores, os equinostomatídeos têm sido considerados como um táxon monofilético, embora a morfologia e a diversidade dos critérios adotados por diferentes pesquisadores levaram a sua divisão em um número impressionante de táxons (ou seja, um total de 21 subfamílias) (TOLEDO; ESTEBAN; FRIED, 2012).

Echinostoma paraensei é um representante de equinostomatídeo no Brasil, pertencente ao grupo "*revolutum*", pois quando adultos os helmintos apresentam colar cefálico ou peristômico formado por 37 espinhos (FIGURA 1).

Figura 1 - *Echinostoma paraensei* (isolado do Rio de Janeiro),



Fonte: Maldonado Júnior et al. (2001a).
Nota: (a) parasito adulto, 28 dias de idade; (b) colar peristômico; (c) bolsa do cirro, vesícula seminal (sv), glândula prostática (pg) e útero terminal com ovos (Barras de escalas são 100µm exceto para o parasito adulto que é um mm).

Maldonado Júnior et al. (2001a, 2001b) identificaram como hospedeiro definitivo natural, o roedor *Nectomys squamipes*, conhecido popularmente como rato d'água, e propuseram o ciclo de vida natural deste parasito. Estes pesquisadores também demonstraram que larvas de *E. paraensei* em *B. glabrata* podem interferir potencialmente na sobrevivência de *S. mansoni*. Alguns estudos realizados por estes autores demonstraram a participação direta de *E. paraensei* no controle biológico da esquistossomose, pois as rédias deste parasito atacam e destroem os esporocistos de *S. mansoni*. Deste modo, verificar as possíveis alterações fisiológicas nos moluscos parasitados por *E. paraensei* contribuirá para elucidar este processo.

1.2.2 Ciclo de vida

Quando adultos parasitos pertencentes ao gênero *Echinostoma* mostram-se essencialmente hermafroditas apresentando como sítio de infecção final o intestino delgado e o ducto biliar de numerosos hospedeiros vertebrados, particularmente aves aquáticas ou semi-aquáticas e mamíferos, incluindo humanos. Em meio silvestre, o ciclo de vida de um equinostomatídeo é mantido a partir de um hospedeiro definitivo infectado que elimina, juntamente com suas fezes, ovos do parasito. Ao alcançarem coleções hídricas (rios, lagos e

lagoas) tem-se início o processo de embriogênese dos ovos culminando com a completa formação dos miracídios. Este processo dura em média de 2-3 semanas a uma temperatura média de 22 °C. Uma vez formados, observa-se a eclosão dos miracídios que ativamente localizam o seu primeiro hospedeiro intermediário por meio da identificação de glicoconjugados por ele secretado. Várias espécies de planorbídios, limneídios e bulinídios, tais como, *B. glabrata*, *Lymnaea columella* e *Physa marmorata* têm sido registradas como primeiros hospedeiros intermediários de *Echinostoma* spp. Os miracídios penetram ativamente na massa cefalopediosa do molusco hospedeiro infectando-o, transformando-se logo em esporocistos na cavidade cardíaca do mesmo. Duas gerações de rédias (mãe e filha) são observadas no interior do primeiro hospedeiro intermediário. Por fim, cercárias desenvolvem a partir de rédias filhas emergindo de moluscos infectados por volta de 4-6 semanas pós-infecção. Em um ambiente aquático e dulcícola, cercárias ativamente alcançam o segundo hospedeiro intermediário. As cercárias dos equinostomatídeos apresentam baixo grau de especificidade, e várias espécies de moluscos, rãs, crustáceos e peixes podem atuar como segundos hospedeiros intermediários. Tais estágios infectam ativamente seus hospedeiros através da abertura cloacal nos crustáceos ou por meio do poro excretor em moluscos, encistando principalmente nos rins e cavidades pericárdicas destes; as cercárias podem ainda penetrar ativamente a musculatura de peixes encistando neste sítio (TOLEDO; ESTEBAN; FRIED, 2012).

O hospedeiro definitivo torna infectado após a ingestão do segundo hospedeiro intermediário contendo a metacercária. Após infecção, *Echinostoma* não realiza migração sistêmica no hospedeiro definitivo. As metacercárias desencistam na luz duodenal e os parasitos imaturos migram para o jejuno, onde fixam na mucosa intestinal auxiliado pela presença de ventosas orais e acetabulares. Numerosos vertebrados incluindo aves aquáticas e semi-aquáticas, roedores e humanos, podem atuar como hospedeiros definitivos de equinóstomas. A eliminação de ovos por tais hospedeiros frequentemente ocorre entre 10-16 dias pós-infecção. Embora a eliminação de ovos seja contínua desde o primeiro dia de patência, variações significativas ao longo do curso de infecção têm sido documentadas. A duração da infecção pode variar de uma a duas semanas, no entanto, dependendo da espécie de equinóstoma envolvida, bem como da capacidade imunológica do hospedeiro, a infecção poderá persistir por até um ano (TOLEDO; ESTEBAN; FRIED, 2012).

1.2.3 Importância dos Equinostomatídeos em saúde pública

Parasitos da família Echinostomatidae (=equinóstomas) constituem cerca de 50 gêneros, com 355 espécies descritas, e seis subespécies. Dentre eles, até 1964, um total de 13 espécies apresentava a capacidade de realizar infecções em humanos. Todavia, trabalhos mais recentes destacam que o número de equinóstomas infectando humanos tem aumentado para um total de 20-21 espécies (CHAI, 2008).

Por muitos anos sabe-se que equinóstomas parasitam humanos. Infecções humanas por tais parasitos foram demonstradas no Brasil durante o período pré-colombiano. Estudos paleoparasitológicos têm constatado a presença de ovos de *Echinostoma* em coprólitos de corpos humanos mumificados no Brasil, que apresentam grande similaridade com *E. paraensei* e *E. luisrey* (LELES et al., 2014). Entretanto, o primeiro relato de equinostomíase humana foi registrado por Garrison (1908) que encontrou ovos de um equinostomatídeo nas fezes de cinco prisioneiros em Manila (Filipinas), junto com a recuperação de 21 helmintos adultos a partir de um paciente após o tratamento com praziquantel. Tais parasitos foram identificados como sendo pertencentes à *Echinostoma ilocanum***.** Depois disto, vários registros foram realizados na Ásia. Por exemplo, Majima (1927) observou infecções por *E. macrorchis* em humanos e Hirazawa (1928) demonstrou infecção humana por *Echinoschasmus perfoliatus* no Japão.

Particular interesse é conferido aos estudos publicados por Sandground e Bonne (1940) que constituem a primeira abordagem epidemiológica da equinostomíase humana. Casos de equinostomíases em humanos, descobertos durante autópsias, foram relatados por Sandground e Prawirohardjo (1938). A maioria dos helmintos recuperados foi classificada como *E. ilocanum*, porém alguns espécimes de *E. recurvatum* e *E. revolutum* foram também identificados. Sandground (1938) ainda reportou que equinóstomas foram frequentemente recuperados de roedores silvestres próximos a Jacarta, Indonésia. No mesmo estudo foi documentada a descoberta de um foco endêmico de *E. ilocanum* em moradores de uma colônia rural situada na mesma região. Bonne e Sandground (1939) e Sandground e Bonne (1940) demonstraram vários focos endêmicos de transmissão de *E. echinatum* (= *E. lindoense*) na Sulawesi Central, Indonésia. Atualmente, estima-se que cerca de vinte espécies de equinostomatídeos estejam relacionadas com a equinostomíase humana, sendo endêmica no Sudeste Asiático e extremo Oriente. A grande maioria destes focos endêmicos está localizada na China, Índia, Indonésia, Coréia, Malásia, Filipinas, Rússia, Taiwan e Tailândia. Em adição,

casos autóctones da doença tem também sido reportados em outros países (TOLEDO; ESTEBAN; FRIED, 2012).

1.2.4 Importância de *Echinostoma* spp. em animais silvestres e domésticos

A infecção por *Echinostoma* spp. tem sido registrada em muitos animais silvestres. Por exemplo, Maldonado Júnior et al. (2006) identificaram a presença de *E. paraensei* em *Nectomys squamipes* após necropsia. Presença de *E. trivolvis* tem sido verificada no intestino delgado de gaviões e corujas durante estudos observacionais realizados por Taft, Suchow, Vanhorn (1993). Adicionalmente, Huffman (2000) relatou que os equinostomatídeos representam um significativo impacto na saúde de mamíferos aquáticos. Segundo alguns autores, a transmissão destes parasitos no ambiente silvestre e não silvestre pode ser facilitada por apresentarem baixa especificidade para com o hospedeiro vertebrado definitivo, bem como em função das alterações ambientais ecológicas e climáticas induzidas pelo homem, em especial o desmatamento, que acabam exercendo intensa pressão sobre os animais silvestres, forçando suas migrações para novos habitats (KING et al., 2007).

Echinostoma spp. pode ser visto parasitando animais domésticos e peridomésticos como cães residentes em áreas metropolitanas, suínos, galinhas e patos (LUTZ, 1924). Tal cenário epidemiológico é resultado do aumento da interface entre animais silvestres e domésticos associado a fatores antropogênicos (agentes de transformação da dinâmica global).

Além dos registros naturais, vários estudos experimentais têm analisado o estabelecimento de *Echinostoma* spp. em algumas aves, como as galinhas domésticas (HUMPHRIES; REDDY; FRIED, 1997). Fried (1984) registrou 100% de infectividade de *E. trivolvis,* com uma recuperação de 25% dos helmintos adultos em aves domésticas experimentalmente infectadas. A mesma metodologia foi utilizada para verificar as taxas de infectividade de *E. revolutum* e de recuperação dos parasitos adultos em galinhas. Como resultado, os autores estabeleceram infectividade entorno de 64 a 67%, com aproximadamente 32% de recuperação dos helmintos, caracterizando valores inferiores àqueles observados para *E. trivolvis* (MULLICAN; HUFFMAN; FRIED, 2001).

Revisões propostas por Huffman e Fried (1996) ainda registram acentuadas alterações anatomopatológicas no íleo, reto, cloaca, ceco e bolsa de Fabricius de aves domésticas naturalmente e experimentalmente infectadas por *E. trivolvis,* coincidindo com as regiões onde os helmintos foram recuperados.

1.3 RELAÇÃO ENTRE MOLUSCOS E LARVAS DE HELMINTOS

1.3.1 Aspectos sobre o metabolismo glicídico em moluscos infectados por larvas de helmintos

Muitos estudos têm constatado alterações no metabolismo de moluscos infectados por larvas de trematódeos, em particular nas concentrações de carboidratos. A interação entre larvas de helmintos e seus hospedeiros intermediários causa um estado de hipometabolismo nestes, que acabam utilizando de reservas para manterem suas funções vitais, bem como atender às necessidades energéticas das larvas durante etapa de desenvolvimento. Deste modo, estas alterações levam a um balanço energético negativo, caracterizado pelo consumo de glicogênio da glândula digestiva e massa cefalopediosa, além de depósitos de galactogênio na glândula de albúmen (PINHEIRO; AMATO, 1994). Nestas circunstâncias, moluscos infectados começam a utilizar fontes não glicídicas para sua sobrevivência e reprodução, culminando em muitas alterações fisiológicas (PINHEIRO; MALDONADO; LANFREDI, 2009) e um processo de compensação na fecundidade como observado no modelo *E. paraensei /B. glabrata* (TUNHOLI et al., 2011a).

Mello-Silva et al. (2010), durante estudo experimental, avaliaram as influências da infecção por larvas de *S. mansoni* e da exposição ao látex de *Euphorbia milii* var. *splendens* no metabolismo de carboidratos de *B. glabrata*. Como principais resultados, os autores registraram severa redução nas concentrações de glicogênio, especialmente na glândula digestiva dos moluscos hospedeiros, com os menores valores apresentados pelos animais simultaneamente infectados e expostos ao látex. Estes resultados podem ser em parte justificados pela ativação de centros enzimáticos relacionados à glicogenólise, remetendo a ocorrência de mecanismos fisiológicos associados na manutenção do estado bioenergético do hospedeiro. O mesmo foi demonstrado por Thompson e Lee (1985) em *B. glabrata* submetidas a períodos de jejum, bem como infectadas por *S. mansoni*, indicando a presença de mecanismos homeostáticos objetivados na manutenção da glicemia, seja a partir da mobilização de reservas (glicogênio) ou através da modulação de vias bioquímicas.

Variações expressivas no conteúdo de glicogênio da glândula digestiva de *B. alexandrina* e *Bulinus truncatus* infectados com *S. mansoni* foram verificadas (ISHAK; MOHAMED; SHRAF, 1975). Segundo os autores, as larvas do trematódeo em

desenvolvimento poderiam indiretamente inibir centros enzimáticos ligados a gliconeogênese, através de seus produtos de secreção/excreção, comprometendo a formação de reservas neste sítio.

Autores têm observado ativação de vias anaeróbias fermentativas como fator essencial para o sucesso da infecção de trematódeos (TUNHOLI et al., 2013) e nematóides (STEWART; UBELAKER; CURTIS, 1985) em moluscos hospedeiros. Em estudo recente, Tunholi-Alves et al. (2014) verificaram aumento na atividade hemolinfática da lactato desidrogenase de *B. glabrata* quando infectada por *Angiostrongylus cantonensis*. Esta variação foi mais pronunciada na segunda semana pós-infecção, representando um acréscimo de 210% em relação ao grupo controle. A ativação do metabolismo anaeróbio via lactato desidrogenase em moluscos infectados é fundamental para a sobrevivência do hospedeiro, uma vez que, possibilita o mesmo obter energia e excretar substâncias originadas de seu metabolismo sem comprometer suas estruturas celulares (SCHOTTLER, 1986). Para Nabih et al. (1993) a aceleração do metabolismo anaeróbio verificado em *B. alexandrina* experimentalmente infectada por *S. mansoni* pode ainda ser explicada em resposta a inibição da LD_{11}, isoenzima associada a respiração aeróbia, concomitantemente a estimulação da LD_5, isoenzima responsável pela manutenção da respiração anaeróbia do hospedeiro, a partir de produtos de secreção/excreção oriundos das larvas intra-molusco do trematódeo em desenvolvimento. Estes resultados demonstram que a interação parasito-hospedeiro promove severas alterações nos padrões fisiológicos do molusco por afetar seu metabolismo, sendo estas alterações interpretadas como um processo adaptativo que ocorre entre ambos os organismos (TUNHOLI-ALVES et al., 2014).

1.3.2 Alteração nas concentrações de ácidos orgânicos em moluscos submetidos a condições de estresse fisiológico

Massa et al. (2007) utilizando de análises de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) observaram que a infecção por larvas de *S. mansoni* resultou em uma significativa redução na concentração dos ácidos acético, fumárico, málico e pirúvico presentes em células do complexo gônada-glândula digestiva de *B. glabrata.* Segundo os autores, a redução observada nos níveis dos ácidos orgânicos analisados, pode ser em parte explicada pela utilização destas moléculas como substratos necessários para o desenvolvimento de

esporocistos e cercárias do parasito, que seriam incorporadas pelo mesmo a partir dos tecidos dos moluscos.

Em estudo recente, Tunholi-Alves et al. (2014) observaram que a infecção experimental de *A. cantonensis* resultou em alterações nas concentrações hemolinfáticas de alguns ácidos orgânicos em *B. glabrata*. Aumento nos níveis de ácido lático foi constatado com a redução nos conteúdos de ácido pirúvico ao longo de três semanas de infecção em relação aos moluscos não-infectados. Estes resultados denunciam a ativação do metabolismo anaeróbio fermentativo considerado imprescindível à sobrevivência do hospedeiro por possibilitá-lo obter energia (ATP) a partir da redução do piruvato para lactato, assegurando a reoxidação do NADH. H^+. Além disso, permitem os moluscos excretarem substâncias oriundas de seus metabolismos sem causar danos as suas estruturas celulares sendo, portanto, fator essencial que garante o sucesso da infecção por larvas de helmintos parasitos (SCHOTTLER, 1986).

Além de atuarem como excelentes bioindicadores do estado energético de moluscos hospedeiros, ácidos carboxílicos tem também sido utilizados como potentes ferramentas no diagnóstico de moluscos infectados por larvas de helminto, auxiliando estudos epidemiológicos desenvolvidos em áreas consideradas endêmicas. As taxas de infecção em populações de moluscos são rotineiramente determinadas através da emissão cercarial, negligenciando a ocorrência de infecções pré-patentes. Assim, a quantificação de ácidos carboxílicos da hemolinfa e do complexo Gônada-Glândula Digestiva (DGG) de *B. alexandrina* auxiliaria na discriminação entre moluscos infectados e não-infectados por *S. mansoni*. Utilizando da técnica de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) os pesquisadores observaram que a concentração de todos ácidos estudados (oxálico, málico, pirúvico, acético e fumárico) diminuiu significativamente em moluscos infectados quando comparado aos não-infectados em ambos os tecidos. A redução verificada pode ser explicada em decorrência da utilização destes metabólitos pelos esporocistos e cercárias do parasito em desenvolvimento. Estas larvas habitam os espaços intertubulares do DGG causando danos mecânicos nas células glandulares do tecido (THOMPSON, 1997). O dano celular resulta em um extravasamento dos ácidos, que são por sua vez incorporados pelas larvas do parasito. Além disso, o aumento da atividade metabólica do organismo hospedeiro associado com a presença de larvas de trematódeos pode acelerar o uso dos ácidos carboxílicos pelas células hospedeiras, abastecendo assim, reações químicas que integram o metabolismo intermediário do molusco (THOMPSON, 1997).

Em estudo experimental, Mantawy et al. (2013) demonstraram aumento significativo na concentração de ácidos málico e fumárico e decréscimo nos níveis de ácido succínico na

hemolinfa de cepas de *B. alexandrina* susceptíveis e infectadas por *S. mamsoni* em relação a cepas resistentes. Segundo os autores, as alterações observadas podem ser explicadas em decorrência ao aumento da taxa metabólica vistas em moluscos infectados, que passam a utilizar de certos intermediários do ciclo de Krebs para a síntese de uma nova glicose, aminoácidos e lipídios na tentativa de manutenção de sua homeostase.

1.3.3 Alterações fisiológicas verificadas durante a interface *Biomphalaria glabrata*/*Echinostoma paraensei*

Espécimes de trematódeos digenéticos apresentam um ciclo de vida heteroxeno utilizando moluscos como hospedeiros intermediários. Esta fase inicial é essencial ao desenvolvimento do parasito, possibilitando-o atingir estágios infectantes ao hospedeiro definitivo (MALDONADO JÚNIOR et al., 2001a). Como consequência, alterações fisiológicas em moluscos são observadas, já que as larvas acabam utilizando substâncias que seriam utilizadas como nutrientes pelo hospedeiro, causando-lhe um desequilíbrio nutricional semelhante aquele gerado durante período de jejum (PINHEIRO; AMATO, 1994). Segundo Fried et al. (1998), além da competição por substratos verificada entre o parasito e o molusco, as larvas em desenvolvimento eliminam no interior do organismo hospedeiro, os seus produtos de degradação que interferem no metabolismo normal do molusco hospedeiro. Nos últimos anos, resultados sinalizam a ausência de um padrão de variação metabólica em moluscos infectados, destacando a necessidade de mais estudos para melhor entendimento destes eventos, possibilitando o desenvolvimento de medidas direcionadas no controle do hospedeiro intermediário e, por conseguinte, de doenças por ele transmitidas.

Estudos prévios realizados por Tunholi et al. (2011a) tem demonstrado alterações na biologia reprodutiva de *B. glabrata* infectada por diferentes cargas miracidiais de *E. paraensei*. Como principais resultados, a infecção causou aumento significativo, em média, na taxa ovipositória dos moluscos infectados com cinco (32,381 ± 4,741 ovos/molusco) e 50 (38,516 ± 5,659 ovos/molusco) miracídios, em comparação ao grupo não-infectado (12,107 ± 4,195 ovos/molusco). Mesma ordem de variação foi demonstrada para o número de massas ovígeras/moluscos, com os grupos infectados apresentando valores em média superiores ao grupo controle. Entretanto, quando se avaliou a taxa de viabilidade dos ovos postos, moluscos parasitados apresentaram menor eclodibilidade em relação ao grupo controle. Estes dados indicam que quando infectado o molusco hospedeiro é capaz de aumentar sua atividade

reprodutiva, sugerindo uma estratégia ecológica como tentativa de manutenção da espécie no meio ambiente.

Autores têm ainda verificado que a infecção por *E. paraensei* altera as concentrações de cálcio na hemolinfa e concha de *B. glabrata* (TUNHOLI et al., 2011c). Decréscimo significativo nos conteúdos de íons cálcio na concha foi verificado em ambos os grupos infectados (cinco e 50 miracídios), coincidindo com o aumento da calcemia nestes hospedeiros. Os resultados demonstram a existência de uma via homeostática estabelecida entre concha e hemolinfa voltada na regularização do conteúdo hemolinfático de cálcio no organismo do molusco hospedeiro quando este é exposto a condições de infecção e, que o metabolismo de cálcio depende da dose miracidial utilizada, uma vez que as maiores necessidades energéticas e danos celulares são observadas nos organismos com alta parasitemia.

No mesmo ano, Tunholi et al. (2011b) avaliaram o efeito da infecção por *E. paraensei* sobre as atividades das enzimas Alanina Aminotransferase (ALT), Aspartato Aminotransferase (AST) e conteúdo de proteínas totais, ácido úrico e uréia na hemolinfa de *B. glabrata* após exposição a 5 e 50 miracídios. Foi observado decréscimo significativo nas concentrações de proteínas totais, aumento dos produtos nitrogenados de excreção, bem como aumento das atividades das aminotransferases nos moluscos expostos a ambas as cargas miracidiais. A elevação da atividade da ALT observada na hemolinfa dos moluscos após a infecção com 50 miracídios sugere maior requerimento energético destes em relação àqueles infectados por cinco miracídios. Em adição, tais resultados ainda indicam utilização de proteínas totais como substrato alternativo na manutenção glicêmica nos organismos hospedeiros, uma vez que, aumento da formação de catabólitos nitrogenados (uréia e ácido úrico) foi verificado em conformidade com elevação das atividades das aminotransferases, frequentemente relacionada à condição de injúria tecidual. Isto pode ser explicado em decorrência à penetração dos miracídios e subsequente desenvolvimento de esporocistos, rédias e cercárias durante o período pré-patente de desenvolvimento do trematódeo.

Variações nos níveis lipídicos em *B. glabrata* infectadas com diferentes doses miracidiais de *E. paraensei* foram também verificadas (TUNHOLI-ALVES et al., 2011). Em relação aos conteúdos hemolinfáticos de colesterol e triacilglicerol, os resultados demonstraram que a infecção pelo equinostomatídeo provoca decréscimo significativo nos conteúdos de ambos os substratos, com menores valores registrados na primeira semana de infecção. A diminuição do conteúdo destes lipídeos nos moluscos infectados indica intensa utilização destes substratos tanto pelo hospedeiro intermediário quanto pelo parasito, sugerindo sua provável

participação no metabolismo energético e construção estrutural das larvas em desenvolvimento. O perfil de lipídeos neutros no complexo gônada-glândula digestiva apresentou alterações relevantes, indicando que neste modelo, o metabolismo de lipídios é dependente da dose miracidial usada.

2 CONSIDERAÇÕES FINAIS

É possível encontrar na literatura diversos trabalhos de infecção experimental voltados na caracterização da relação entre parasito e hospedeiro sobre aspectos biológicos e metabólicos do molusco.

A caracterização das alterações bioquímicas em *B. glabrata* em resposta à infecção por estágios larvais de *E. paraensei* permite que conheçamos o mecanismo da ação do parasito através da mensuração dos níveis de algumas moléculas orgânicas e da atividade de algumas enzimas, que são indícios do estado energético destes animais. Estas informações poderão ser utilizadas para subsidiar trabalhos futuros que visam desenvolver uma metodologia prática e eficaz para o controle do molusco *B. glabrata* e, por conseguinte das parasitoses por ele transmitidas.

3 REFERÊNCIAS

ADEMA, C. M.; LOKER, E. S. Specificity and Immunobiology of Larval Digenean-Snail Association. In: FRIED, B.; GRACZYK, T. K. **Advances in Trematode Biology**. New York: Springer, 1997. p. 229-263.

BARKER, M. G. Gastropods on land: phylogeny, diversity and adaptative morphology. In: _____. **The biology of terrestrial molluscks**. New York: CABI Publishing, 2001. p. 01-146.

BECKER, W. Metabolic interrelationship of parasitic trematodes and molluscs, especially *Schistosoma mansoni* in *Biomphalaria glabrata*. **Zeitschrift fur Parasitenkunde,** v. 63, n. 2 p. 101-111, 1980.

BONNE, C.; SANDGROUND, J. H. Echinostomiasis in Sulawesi as a result of eating mussels. **Geneeskundig Tijdschrift voor Nederlandsch-Indie,** v. 79, n. 34, p. 2116-2134, 1939.

CHAI, J. Y. Echinostomes in humans. In: FRIED, B.; TOLEDO, R. (Eds). **The Biology of Echinostomes**: from the molecule to the community. New York: Springer, 2008. p. 147-183.

CHIRSTENSEN, N. O. et al. Establishment, survival and fecundity in *Echinostoma caproni* (Trematoda) infections in hamsters and girds. **Journal of the Helminthological Society of Washington,** v. 57, n. 2, p. 104-107, 1990.

CRIBB, T. H.; BRAY, R. A.; LITTLEWOOD, D. T. J. The nature and evolution of the association among digeneans, molluscs and fishes. **International Journal for Parasitology,** v. 31, n. 9, p. 997-1011, 2001.

FRIED, B. Infectivity, growth and development of *Echinostoma revolutum* (Trematoda) in the domestic chick. **Journal of Helminthology**, v. 58, n. 3, p. 241-244, 1984.

FRIED, B. et al. Thin layer chromatography and histochemistry analyses of neutral lipids in Helisoma trivolvis infected with four species of larval trematodes. **Parasitology Research**, v. 84, n. 5, p. 369-373, 1998.

FUJINO, T. et al. Comparative ultrastructure study of lamellar gastrodermal projections in *Echinostoma paraensei*, *E. caproni* and *E. trivolvis* (Trematoda: Echinostomatidae). **Parasitology Research,** v. 85, n. 8-9, p. 655-660, 1999.

GARRISON, P. E. A new intestinal trematode of man. **Philippine Journal of Science,** v. 3, p. 385-393, 1908.
HIRAZAWA, I. *Echinochasmus perfoliatus* (Ratz) found in man. **Tokyo Iji Shinshi,** v. 2577, n. 2577, p. 1328-1334, 1928.

HUFFMAN, J. E. Echinostomes in veterinary and wildlife parasitology. In: FRIED, B.; GRACZYK, T. K. **Echinostomes as experimental models for biological research**. Dordrecht: Kluwer, 2000. p. 59-82.

HUFFMAN, J. E.; FRIED, B. *Echinostoma* and echinostomiasis. **Advances in Parasitology**, v. 29, p. 215-269, 1996.

HUMPHRIES, J. E.; REDDY, A.; FRIED, B. Infectivity and growth of *Echinostoma revolutum* (Froelich, 1802) in the domestic chick. **International Journal for Parasitology**, v. 27, n. 1, p. 129-130, 1997.

ISHAK, M. M.; MOHAMED, A. M.; SHRAF, A. A. Carbohydrate metabolism in uninfected and trematode-infected snails *Biomphalaria alexandrina* and *Bulinus truncatus*. **Comparative Biochemistry Physiology (B)**, v. 51, n. 4, p. 499-505, 1975.

KANEV, I. Life cycle, delimitation and redescription of *Echinostoma revolutum* (Fröelich, 1802) (Trematoda: Echinotomatidae). **Systematic Parasitology**, v. 28, n. 2, p. 125-144, 1994.

KANEV, I. et al. An Overwiew on the Biology of Echinostomes. In: FRIED, B.; CRACZYK, T. K. **Echinostomes as Experimental Models for Biological Research**. Netherlands: Kluwer Academic Publishers, 2000. p. 1-30.

KING, K. C. et al. Impacts of agriculture on the parasite communities of northern leopard frogs (*Rana pipiens*) in southern Quebec, Canada. **Parasitology,** v. 134, n. 14, p. 2063-2080, 2007.

LELES, D. et al. Insights about echinostomiasis by paleomolecular diagnosis. **Parasitology International**, v. 63, n. 4, p. 646-649, 2014.

LIE, K. J.; BASCH, P. F. The life history of *Echinostoma paraensei* (Trematoda: Echinostomatidae). **Journal of Parasitolology,** v. 53, p. 1192-1199, 1967.

LUTZ, A. Estudos sobre a evolução dos Endotrematodes brasileiros. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz,** v. 17, n. 1, p. 55-57, 1924.

MAJIMA, M. On *Echinostoma macrorchis* found in man. **Kumamoto Igakkai Zasshi**, v. 2252, n. 2252, p. 2260, 1927.

MALDONADO JÚNIOR, A. et al. Description of the adult worms of a new Brazilian isolate of *Echinostoma paraensei* (Platyhelminthes: Digenea) from its natural vertebrate host *Nectomys squamipes* by light and scanning electron microscopy and molecular analysis. **Parasitology Research**, v. 87, n. 10, p. 840–848, 2001a.

_____. Changes on *Schistosoma mansoni* (Digenea: Schistosomatidae) worm load in *Nectomys squamipes* (Rodentia: Sigmodontinae) concurrently infected with *Echinostoma paraensei* (Digenea: Echinostomatidae). **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 96, p. 193-198, 2001b.

MALDONADO JÚNIOR, A. et al. Helminth communities of *Nectomys squamipes* (Rodentia: Sigmodontinae) naturally infected by the exotic trematode *Schistosoma mansoni* in southeastern Brazil. **Journal of Helminthology,** v. 80, p. 369-375, 2006.

MANTAWY, M. M. et al. Carboxylic acids and their metabolic enzymes as new novel biomarkers of susceptible, resistant strains of *Biomphalaria alexandrina* and snails infected with *Schistosoma mansoni*. **International Journal of Scientific & Engineering Research,** v. 4, p. 1039-1047, 2013.

MASSA, D. R. et al. High performance column liquid chromatographic analysis of selected carboxylic acids in *Biomphalaria glabrata* patently infected with *Schistosoma mansoni*. **Parasitology Research**, v. 101, n. 4, p. 925-928, 2007.

MELLO-SILVA, C. C. et al.Carbohydrate metabolism alterations in *Biomphalaria glabrata* infected with *Schistosoma mansoni* and exposed to *Euphorbia splendens* var. hislopii látex. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 105, n. 4, p. 492-495, 2010.

MINCHELLA, D. J. Host life-history variation in response to parasitism**. Parasitology**, v. 90, n. 1, p. 205-216, 1985.

MOORE, J.; GOTELLI, N. J. A phylogenetic perspective on the evolution of altered host behaviours: A critical look at the manipulation hypothesis. In: BARNARD, C. J.; BEHNKE, J. M. **Parasitism and host behaviour**. London: Taylor and Francis: London, 1990. p. 193-233.

MULLICAN, S. K.; HUFFMAN, J. E.; FRIED, B. infectivity and comparative pathology of *Ecinostoma caproni*, *Echinostoma revolutum* and *Echinostoma trivolvis* (Trematoda) in the domestic chick. **Comparative Parasitology,** v. 68, n. 2, p. 256-259, 2001.

NABIH, L. et al. Effect of magnesium and urea on glucose and glycogen content in schistosomiasis intermediate host. **Pakistan Journal of Biochemistry and Molecular Biology**, v. 26, n. 1-2, p. 9-14, 1993.

PARAENSE, W. L. Estado atual da sistemática dos planorbídeos brasileiros. **Museu Nacional Rio de Janeiro**, v. 55, p. 105-128, 1975.

PINHEIRO, J.; AMATO, S. B. *Eurytrema coelomaticum* (Digenea, Dicroceliidae): the effect of infection on carbohydrate contents of its intermediate snail host, *Bradybaena similaris* (Gastropoda, Xanthnychidae). **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 89, n. 3, p. 407-410, 1994.

PINHEIRO, J.; MALDONADO JÚNIOR, A.; LANFREDI, R.M. Physiological changes in *Lymnaea columella* (Say, 1817) (Mollusca, Gastropoda) in response to *Echinostoma paraensei* Lie and Basch, 1967 (Trematoda: Echinostomatidae) infection. **Parasitology Research**, v. 106, n. 1, p. 55-59, 2009.
ROHDE, K. The Aspidogastrea: An archaic group of Platyhelminthes. In: LITTLEWOOD, D. T. J.; BRAY, R. A. **Interrelationships of the Platyhelminthes**. London: CRC, 2001. p. 159-167.

SANDGROUND, J. H. On the occurrence of human echinostomiasis in Java. II. The discovery of an endemic focus of infection with *Echinostoma ilocanum* and the elucidation of the parasites life cycle. **Geneeskundig Tijdschrift voor Nederlandsch-Indie,** v. 79, n. 28, p. 1722–1734, 1938.

SANDGROUND, J. H.; PRAWIROHARDJO, S. On the occurrence of human echinotomiasis in Java. Preliminary report. **Geneeskundig Tijdschrift voor Nederlandsch-Indie**, v. 79, n. 24, p. 1497–1503, 1938.

SANDGROUND, J. H.; BONNE, C. *Echinostoma lindoensis* n. sp., a new parasite of man in the Celebes with an account of its life history and epidemiology. **The American Journal of Tropical Medicine,** v.20, n. 4, p.511–535, 1940.

SANTOS, S. B. et al. In: ROCHA, R. M.; BOEGER, W. A. **Estado da arte e perspectiva para a Zoologia no Brasil**. Curitiba: Universidade Federal do Paraná, 2009. p. 66-90.

SCHOTTLER, U. Weitere untersuchungen zun anaeroben energiestoffwechsel des polychaeten *Arenicola marina* L. **Zoologische Beiträge**, v. 30, p. 141-152, 1986.

SLOSS, B. et al. The genetic relationships between *Echinostoma caproni*, *Echinostoma paraensei*, and *Echinostoma trivolvis* as determined by electrophoresis. **Journal of Helminthology,** v. 69, n. 3, p. 243-246, 1995.

SOUZA, C. P.; LIMA, L. C. **Moluscos de interesse parasitológico do Brasil**. Belo Horizonte: Centro de Pesquisa René Rachou - Fiocruz, 1990.

STEWART, G. L.; UBELAKER, J. E.; CURTIS, D. Pathophysiologic alterations in *Biomphalaria glabrata* infectedwith *Angiostrongylus costaricensis*. **Journal of Invertebrate Pathology,** v. 45, n. 2, p. 152–157, 1985.

TAFT, S. J.; SUCHOW, K.; VANHORN, M. Helminths from some Minnesota and Wisconsin raptors. **Journal of Helminthological Society of Washington,** v. 60, n. 2, p. 260-263, 1993.

TEODORO, T. M. et al. Occurrence of *Biomphalaria cousini* (Mollusca: Gastropoda) in Brazil and its susceptibility to *Schistosoma mansoni* (Platyhelminths: Trematoda). **Molecular Phylogenetics and Evolution,** v. 57, n. 1, p. 144-151, 2010.

THIENGO, S. C. et al. Freshwater snails and schistosomiasis mansoni in the state of Rio de Janeiro, Brazil: V - Norte Fluminense Mesoregion. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz,** v. 99, n. 1, p. 99-103, 2004.

THOMPSON, S. N. Physiology and biochemistry of snail-larval trematode relationships. In: FRIED, B.; GRACZYK, T. K. (Eds). **Advances in Trematode Biology**. Florida: CRC Press; 1997. p. 149-195.

THOMPSON, S. N.; LEE, R. K. W. Comparison of starvation and infection by *Schistosoma mansoni* on tissue viability and the 31P NMR spectrum of *Biomphalaria glabrata*. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 72, p. 417- 421, 1985.

TOLEDO, R.; ESTEBAN, J. G.; FRIED, B. Current status of food-borne trematode infections. **European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases,** v. 31, n. 8, p. 1705-1718, 2012.

TUAN, R.; SIMÕES, L. C. G. Effect of self-fertilization on *Biomphalaria tenagophila* (Orbigny, 1835) (Pulmonata: Planorbidae). **Genetics and Molecular Biology**, v. 21, n. 4, p. 477-478, 1998.

TUNHOLI-ALVES, V. M. et al. Lipid levels in *Biomphalaria glabrata* infected with different doses of *Echinostoma paraensei* miracidia. **Experimental Parasitology**, v. 128, n. 3, p. 212–216, 2011.

_____. Activation of anaerobic metabolism in *Biomphalaria glabrata* (Mollusca: Gastropoda) experimentally infected by *Angyostrongylus cantonensis* (Nematoda, Metastrongylidae) by high-performance liquid chromatography. **Parasitology International,** v. 63, n. 1, p. 64-68, 2014.

TUNHOLI, V. M. et al. Changes in the reproductive biology of *Biomphalara glabrata* infected with different doses of *Echinostoma paraensei* miracidia. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 106, n. 2, p. 192–195, 2011a.

_____. Biochemical profile of *Biomphalaria glabrata* (Mollusca: Gastropoda) after infection by *Echinostoma paraensei* (Trematoda: Echinostomatidae). **Parasitology Research**, v. 109, n. 3, p. 855–891, 2011b.

_____. Influence of *Echinostoma paraensei* (Lie and Basch, 1967) infection on the calcium content in *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818). **Experimental Parasitology**, v. 129, n. 3, p. 266-269, 2011c.

_____. Aerobic to anaerobic transition in *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818) infected with different miracidial doses of *Echinostoma paraensei* (Lie and Basch, 1967) by highperformance liquid chromatography. **Experimental Parasitology,** v. 133, n. 4, p. 403–410, 2013.

Capítulo

6

Uso de métodos de flutuação na rotina laboratorial para diagnóstico das principais helmintoses de animais domésticos

Fernanda de Paula Roldi Vieira[1]
Layara Pestana Sarmento[2]
Marcela Santos Sena Martins[3]
Isabella Vilhena Freire Martins[4]

1 INTRODUÇÃO

O diagnóstico da maioria das infecções parasitárias causadas por helmintos gastrointestinais pode ser realizado por métodos coproparasitológicos. Segundo a Organização Mundial de Saúde, há mais de 50 anos o exame microscópico do material fecal é utilizado como ferramenta para diagnóstico das helmintoses.

Esses métodos podem ser classificados em: quantitativos, quando se conta o número de ovos, larvas ou oocistos para determinação do grau de intensidade do parasitismo; e os qualitativos, quando somente indicam a presença ou não das formas parasitárias.

[1] Universidade Federal do Espírito Santo, e-mail: fernandaroldi@hotmail.com;
[2] Universidade Federal do Espírito Santo, e-mail: layarapestana@gmail.com;
[3] Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande-MS, e-mail: marcelasena2@hotmail.com;
[4] Universidade Federal do Espírito Santo, e-mail: ivfmartins@gmail.com.

Outra classificação remetida aos métodos coproparasitológicos diz respeito ao peso das formas parasitárias a serem diagnosticadas, pois os métodos de flutuação são realizados com soluções hipersaturadas, que promovem a flutuação dos ovos e outras formas e, portanto, são usadas para estruturas leves. Já os métodos de sedimentação são realizados com água para ovos de maior densidade ou formas pesadas.

A escolha do método a ser utilizado não é tarefa simples. As formas parasitárias, como ovos, larvas, cistos e oocistos possuem peso e sobrevida diferentes, concluindo que não há um método único capaz de detectá-las todas ao mesmo tempo. Alguns métodos são mais abrangentes, e outros mais específicos para determinado tipo de parasito.

Atualmente, os métodos coproparasitológicos têm como objetivo não somente diagnosticar possíveis parasitos, mas também avaliar possíveis problemas de resistência parasitária, fenômeno comum nos helmintos de ruminantes e equinos a diferentes classes de fármacos anti-helmínticos.

Na rotina do laboratório veterinário os métodos qualitativos são frequentemente desempenhados para animais de companhia, enquanto que para animais de produção são mais utilizados os quantitativos.

Os métodos de flutuação, independentemente se animais de companhia ou de produção, são os mais utilizados na rotina do laboratório veterinário, tendo em vista a dificuldade de se efetuar mais de um método e também devido à falta de informações detalhadas sobre a suspeita clínica nas requisições dos exames.

O objetivo deste trabalho foi revisar os principais métodos de flutuação para análises fecais, comumente empregadas na rotina laboratorial para o diagnóstico das principais helmintoses de animais domésticos.

1.1 TÉCNICA MCMASTER (GORDON; WHITLOCK, 1939) E SUAS VARIAÇÕES

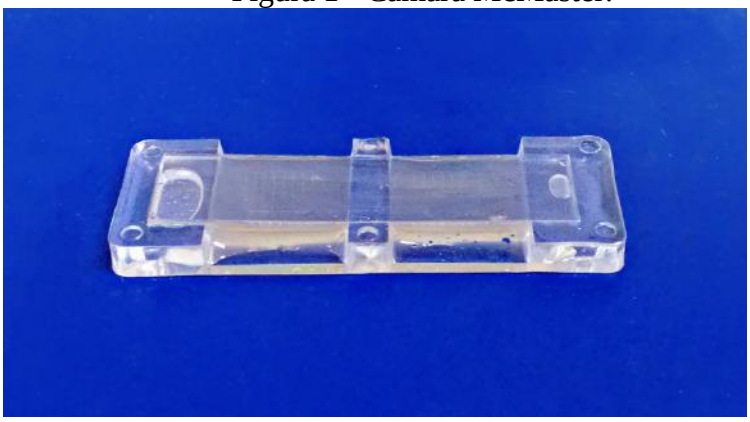
O princípio da flutuação fecal baseia-se na capacidade de uma solução exercer, por diferença de densidade a suspensão de um material menos denso, dependentemente do seu peso. Entre as técnicas de flutuação comumente utilizadas na rotina laboratorial para diagnóstico de parasitas gastrointestinais de ruminantes e equídeos, o exame de eleição é o McMaster e sua contagem de ovos por grama de fezes (OPG), classificada como técnica quantitativa. O método foi relatado pela primeira vez por Gordon e Whitlock em 1939, adaptado a diversas realidades, com subsequentes modificações (SILVA et al., 2013).

A técnica compreende as etapas de pesagem das fezes, homogeneização em solução hipersaturada, filtração para retirada de sujidades, distribuição da solução em uma câmara com áreas hachuradas denominada câmara McMaster, e posterior análise ao microscópio de luz em objetiva de 10x (UENO; GONÇALVES, 1998).

Originalmente utiliza-se 2g de fezes diluídos em 30mL de água e mais 30mL de solução de flutuação, na sua primeira modificação, a qual é utilizada até os dias de hoje, foi preconizado o uso de 4g de fezes para 56mL de solução, conferindo uma sensibilidade de 1:50, sendo seu limite mínimo de detecção em 50 OPG, mas essa sensibilidade pode se alterar de laboratório para laboratório dependendo da padronização utilizada. Existem relatos de sensibilidade analítica de OPG em 1:10, 1:15; 1:25 e 1:50, o que significa que a cada ovo visualizado, equivale a 10, 15, 25, 50 contagem de ovos por grama de fezes, respectivamente (CRINGOLI et al, 2010; GORDON; WHITLOCK, 1939; WHITLOCK, 1948).

Apesar de ter havido algumas variações na técnica, a câmara McMaster (FIGURA 1) se manteve até a atualidade, compreendendo um volume de 0,15mL para cada área hachurada da câmara, totalizando 0,3mL por câmara, e são esses valores de área, associados ao volume de solução e quantidade de fezes utilizadas que servem de base para determinar a sensibilidade da técnica e o seu respectivo fator de correção (WHITLOCK, 1948; SILVA et al., 2013).

Figura 1 - Câmara McMaster.



Fonte: Produção do autor (2016).

O total de ovos encontrados na área esquerda somados ao total de ovos da área direita multiplicados pelo fator de correção dá o resultado de OPG. Vale ressaltar que essa contagem não reflete uma infecção real, não há nenhum valor na determinação do grau de infecção, apenas que representa um valor relativo em relação ao total de fezes expelidas diariamente pelo animal (UENO; GONÇALVES, 1998).

Este método é mundialmente difundido por não exigir materiais de alto custo, ser rápido e detectar variedades de formas parasitárias, desde ovos dos principais helmintos a oocistos de protozoários, além de servirem de base para determinar a eficácia de princípios ativos de todos os grupos de anti-helmínticos (SILVA et al., 2013).

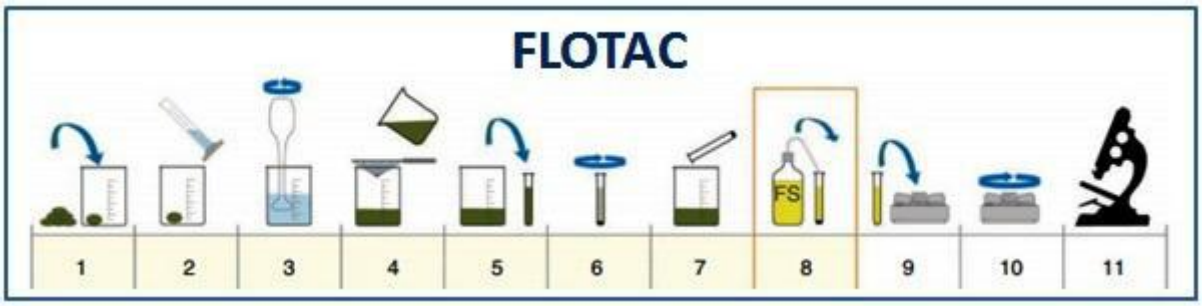
Existem diversas soluções hipersaturadas passíveis de serem utilizadas, Cringoli et al. (2004), em estudo testando 14 soluções potencialmente promotoras de flutuação, constataram que os ovos do tipo Strongyloidea foram capazes de flutuar em todos os tratamentos, entretanto, as soluções que promoveram maior flutuação desses ovos foram as soluções que continham sacarose com densidade entre 1200 e 1350, possíveis de serem mensuradas utilizando um densímetro. Atualmente, as soluções mais utilizadas nos laboratórios são as que contêm sacarose, cloreto de sódio e sulfato de magnésio, principalmente devido à acessibilidade e baixos custos.

O método McMaster se consagrou e foi sofrendo diversas modificações, incluindo variações na razão fezes/solução; centrifugação prévia; número de linhas quantificadas, tudo isso com finalidade de aumentar a sua sensibilidade (BALLWEBER et al., 2014).

Uma das mais recentes variações dessa técnica é o método FLOTAC (CRINGOLI, 2006), uma versão de flutuação incorporada com centrifugação e uma câmara de análise a mais, combinando as técnicas McMaster e a técnica de Cornell-Wisconsin (EGWANG; SLOCOMBE, 1982).

O equipamento de leitura tem característica de sistema fechado, e para realizar o exame é necessário adicionar as fezes (5-10g) em um recipiente prévio, acrescentar de 50-100mL de água (proporção de 1g de fezes para 10mL de água), homogeneizar, filtrar em peneira com abertura de malha de aproximadamente 250µm, que vão reter sujidades de maior granulometria. Em seguida, o conteúdo deve ser transferido para um tubo tipo Falcon 15mL e a centrifugação deve ser a 1500rpm durante três minutos, descartar o sobrenadante e adicionar a solução hipersaturada para completar o recipiente, ressuspender o material decantado e depositar a solução na câmara de FLOTAC, novamente centrifugar a 1000rpm por cinco minutos e fazer a leitura em microscópio (FIGURA 2) (CRINGOLI, 2006; CRINGOLI et al., 2010).

Figura 2 - Esquema ilustrativo das etapas de processamento do exame coproparasitológico FLOTAC.

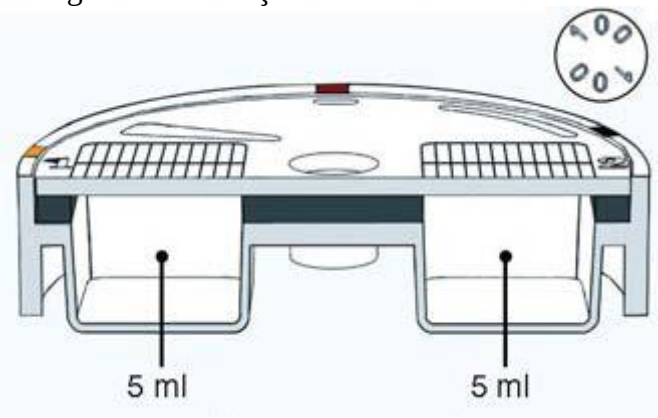


Fonte: Cringoli et al. (2010).

A câmara FLOTAC (FIGURA 3), onde a leitura é realizada, possui forma cilíndrica, é constituída de material plástico, com duas câmaras de flutuação e capacidade de 5mL para cada lado, compreendendo um volume total de 10mL, com duas áreas (18 x 18mm) gradeadas, onde os ovos ficam retidos, e cada grade contém 12 linhas que são transparentes e equidistante e, portanto, permitem a contagem. O limite mínimo de detecção da técnica FLOTAC é de cinco OPG, ou seja, um ovo contado na câmara equivale a cinco ovos por grama de fezes, sendo então esse o valor do fator de correção (CRINGOLI, 2006). Estudos atuais revelam que a técnica FLOTAC tem melhor visibilidade na leitura do exame e de fácil execução quando comparado ao McMaster, pois as sujidades ficam retidas em outra área, separando-a do local de leitura (SILVA et al., 2013).

Entretanto, devido às etapas de centrifugação do FLOTAC e pensando no aumento da sensibilidade, foi lançado o Mini-FLOTAC (CRINGOLI et al., 2010; CRINGOLI et al., 2013), uma variação do FLOTAC, porém, sua principal característica é a remoção da etapa de centrifugação, projetado para aumentar a velocidade e simplicidade de contagem de ovos e permitir sua aplicação em fazendas, mas também possui limite mínimo de detecção de cinco OPG com sensibilidade de 1:5.

Figura 3 - Ilustração da câmara de FLOTAC.



Fonte: Cringoli et al. (2010).

Segundo Cringoli et al. (2010), para execução do Mini-FLOTAC (FIGURA 4), utiliza-se 2g de fezes que devem ser homogeneizadas com solução fixadora, indica-se a formalina (em concentrações de 5 a 10%) na proporção de 1:4 (uma parte de fezes para quatro partes do fixador), seguido de homogeneização com espátula própria do dispositivo, adição da solução hipersaturada seguida de mais uma homogeneização e utilizando o próprio aparato, acoplando uma espécie de ponteira, distribuir o conteúdo na câmara de Mini-FLOTAC.

Por ter a característica de sistema fechado, com a adição das fezes e a solução em um único recipiente, é possível eliminar as diferentes etapas em diversos utensílios como na técnica McMaster e assim minimizar a perda de ovos para o meio durante a manipulação das amostras (CRINGOLI et al., 2010).

A câmara para leitura do Mini-FLOTAC (FIGURA 5) é semelhante à câmara FLOTAC, e compreende duas estruturas, a base e o disco de leitura, aqui também possui duas áreas para flutuação dos ovos, porém, com capacidade de 1mL para cada lado, compreendendo volume total de 2mL, possibilitando leitura em volume maior e mais limpo (GODBER et al., 2015).

Em ambas as variações das técnicas, alguns passos eliminam as diferentes etapas em diversos utensílios como no McMaster e assim minimiza a perda de ovos para o meio, durante a manipulação das amostras (BALLWEBER et al., 2014).

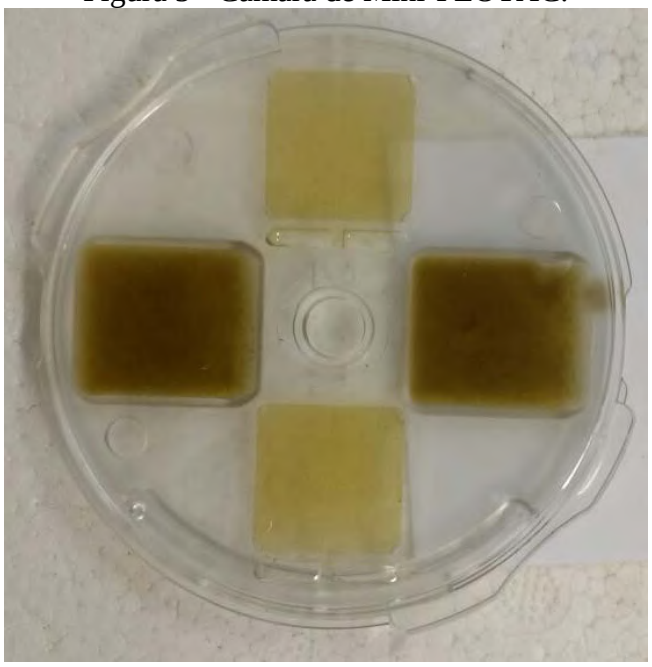
Segundo Levecke et al. (2012) o método coproparasitológico McMaster é de baixa sensibilidade analítica, e esses resultados podem interferir diretamente na conduta do profissional devido à interpretação dos exames perante seus pacientes. A explicação para essa considerável margem de erro ainda não está bem esclarecida, mas acredita-se que ocorra devido a diferentes metodologias que o processamento aberto possa proporcionar, ou seja, há pontos críticos nas etapas, que permitem falhas de recuperação dos ovos nas amostras fecais. Por isso é importante o desenvolvimento de procedimentos de maior precisão e acurácia e a

padronização dos mesmos nos diferentes laboratórios de diagnóstico parasitológico, com os resultados cada vez mais fidedignos são imprescindíveis.

Figura 4 - Esquema ilustrativo das etapas de processamento do exame coproparasitológico Mini-FLOTAC.

Fonte: Cringoli et al. (2010).

Figura 5 - Câmara de Mini-FLOTAC.



Fonte: produção do autor (2016).

As diferentes espécies de helmintos possuem diferentes taxas de fecundidade e consequentemente, produção diária de ovos distintas umas das outras, e que variam de acordo com as condições ambientais favoráveis para sua reprodutibilidade. Quando poucos ovos são secretados nas fezes dos animais, exames com baixa sensibilidade podem não detectar a infecção parasitária. Para monitorar o grau de parasitismo e a eficácia de fármacos anti-helmínticos, testes de maior sensibilidade são mais necessários devido à interferência do

resultado na interpretação da presença ou ausência da resistência anti-helmíntica (LEVECKE et al., 2012).

Em um estudo comparando as técnicas coproparasitológicas de McMaster (sensibilidade analítica de 10 OPG) e FLOTAC (sensibilidade analítica 2 OPG) em amostras individuais de ovinos positivos para ovos de estrongilídeos gastrointestinais de ovinos, a técnica FLOTAC resultou em ovos semelhantes ou mais elevados por grama de fezes (OPG) e menor coeficiente de variação (CV) que McMaster. Com a técnica McMaster os resultados são satisfatórios, embora os melhores resultados, em termos de sensibilidade, precisão e repetibilidade tenham sido obtidos com a técnica de FLOTAC. Com isso, sugere-se que fatores de multiplicação/correção maiores são necessários para a contagem de OPG devido as menores áreas e volume da câmara McMaster e evitando assim, contagens menos precisas. Além disso, usando a técnica FLOTAC, uma grande quantidade de suspensão fecal é examinada, aumentando assim sensibilidade da contagem, o que reflete na menor probabilidade de resultados falsos negativos (RINALDI et al., 2011).

Rinaldi et al. (2014) avaliaram a Redução da Contagem de Ovos por Grama de Fezes (TRCOF) em amostras individuais e amostras agrupadas (*pool*), em três diferentes sensibilidades analíticas (Mini-FLOTAC com contagem de 10 OPG e McMaster com contagem de 15 (McM15) e 50 (McM50) OPG). A técnica Mini-FLOTAC foi mais sensível em relação às duas variantes de McMaster (McM15 e McM50) para o diagnóstico de estrongilídeos gastrointestinais de ovinos, e ainda resultou em significativa maior contagem de ovos por grama de fezes, em comparação com ambas as variações, McM15 e McM50, com a diferença média na contagem de ovos de aproximadamente 90 OPG ($p<0,001$).

Entretanto, Kenyon et al. (2016) avaliaram resultados obtidos em estudo semelhante ao de Rinaldi et al. (2014) com TRCOF, mas somente em *pool* de amostras de ovinos e três diferentes sensibilidades analíticas (Mini-FLOTAC com contagem de 10 OPG e McMaster com contagem de 15 (McM15) e 50 (McM50) OPG), e com parâmetros de eficácia anti-helmíntica classificadas em: reduzida (= FECR <95% e limite inferior do intervalo de confiança de 95% (LL de 95% CI) <90%), duvidosa (= FECR <95% ou LL de IC 95% <90%) e normal (= FECR ≥95% e Ll de 95% CI ≥90%) independentemente do tamanho da amostra. Constataram que, ao utilizar o método McM50, a eficácia anti-helmíntica foi erroneamente classificada como normal ou de avaliação impossibilitada devido ao OPG estar zerado no D0 (pré-tratamento), enquanto que as mesmas amostras submetidas às técnicas Mini-FLOTAC e McM15, o resultado da redução foi considerado efetivo devido ao número de OPG do D0 tenha garantido a entrada dos animais no experimento, e esse viés tornou-se ainda mais pronunciado quando o tamanho

do *pool* de amostras foi aumentado. Isso ressalta a importância da sensibilidade da técnica de escolha em que as amostras são processadas.

A seleção da técnica utilizada depende de diversos fatores, dentre esses, o diagnóstico de diferentes parasitos, tempo e praticidade necessários para todo o processamento até o resultado final e custos do exame (UENO; GONÇALVES, 1998; SILVA et al., 2013; BALLWEBER et al., 2014). Por exemplo, utilizando uma técnica bastante difundida e de maior acessibilidade, a McMaster, para diagnóstico de parasitoses em ovinos e caprinos onde a excreção diária de fezes é menor, comumente se utiliza 2g de fezes para 58mL de solução. Já para bovinos e equinos se utiliza 4g de fezes para 56mL de solução hipersaturada. Quanto ao fator de correção, devido a diferenças de concentrações, para ovinos e caprinos, um ovo equivale a 100 e bovinos e equinos um ovo equivale a 50 na contagem de OPG.

Alguns autores defendem que é a sensibilidade possa ser aumentada de acordo com a espécie hospedeira e parasitária estudada, devido à produção de ovos, relação hospedeiro-parasito, susceptibilidade/resistência dos hospedeiros, entre outros. Já que a precisão dos testes é cada vez mais exigida, em especial dos métodos quantitativos devido ao número detectado de ovos interferirem na decisão do tratamento (BALLWEBER et al., 2014).

1.2 CENTRÍFUGO-FLUTUAÇÃO SIMPLES (SHEATER, 1923)

O método de centrifugo-flutuação simples, também denominado centrífugo-flutuação em solução hipersaturada de açúcar (solução de Sheather) foi desenvolvido em 1923 com o objetivo de promover a identificação de formas parasitárias nas fezes de animais.

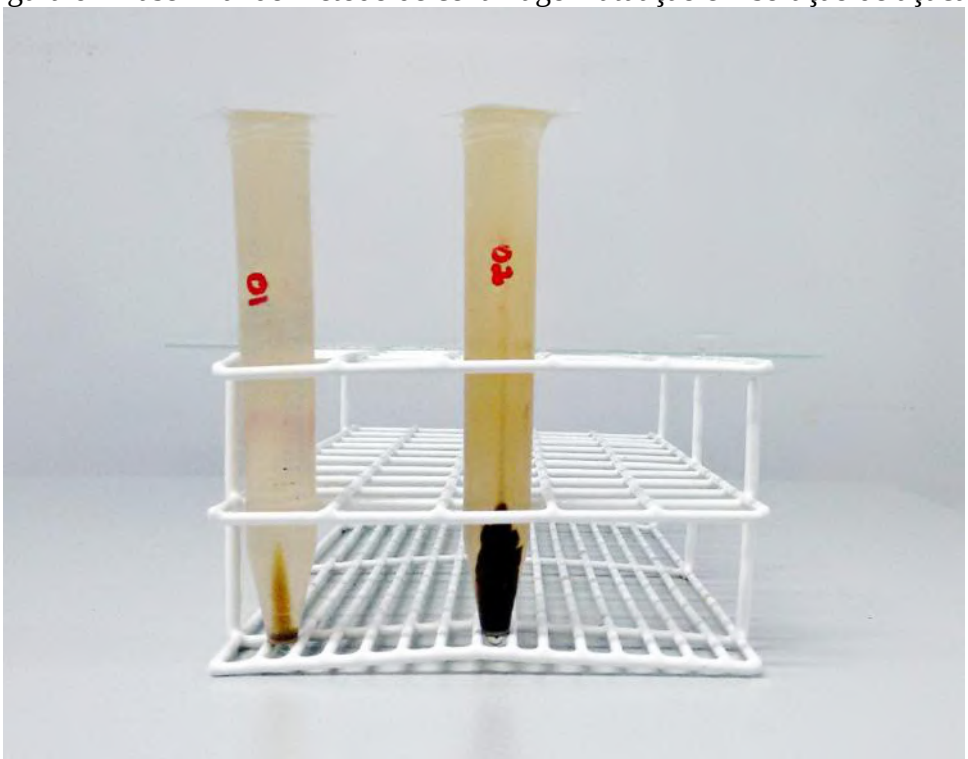
Trata-se de uma técnica qualitativa, cuja finalidade é identificar a presença de estruturas parasitárias na amostra de fezes analisada e por este motivo é mais indicada para a detecção de formas parasitárias em fezes de animais de companhia (MONTEIRO, 2007).

Esta técnica faz uso de uma solução com alta densidade a fim de promover a separação de cistos de protozoários, oocistos de coccídios e ovos e larvas de helmintos, utilizando também a centrifugação como forma de promover a sedimentação de detritos, forçando a flutuação das estruturas parasitárias para que estas possam ser recuperadas posteriormente (DRYDEN et al., 2005).

O método de Sheather consiste em pesar dois ou cinco gramas das fezes a serem analisadas e dissolvê-los em 15mL de água, filtrando a solução em gaze com auxílio de uma peneira. Este conteúdo é transferido para um tubo tipo Falcon 15 mL e centrifugado por cinco minutos a 2.500 rpm. Ao término da centrifugação, o sobrenadante é descartado e acrescenta-

se 10mL da solução saturada de açúcar ao tubo. Com auxílio de uma haste de metal, o sedimento é ressuspendido e homogeneizado. Após este procedimento, o tubo é novamente submetido à centrifugação. Ao término da centrifugação, o tubo é completado com solução saturada de açúcar até formar um menisco, permitindo que o conteúdo do tubo entre em contato com a lamínula que será repousada em seu topo (FIGURA 6). Ali a lamínula permanece por dez minutos e posteriormente é depositada sobre uma lâmina, a qual será examinada ao microscópio óptico nos aumentos de 100X e 400X (SHEATHER, 1923; DRYDEN et al., 2005).

Figura 6 – Fase final do método de centrífugo-flutuação em solução de açúcar.



Fonte: Produção do autor (2016).

Embora não seja comum na rotina clínica de pequenos animais, é possível quantificar a intensidade da infecção parasitária detectada ao exame coproparasitológico, embora isso não reflita a carga parasitária que o animal alberga. Os autores ainda são controversos com relação a esta classificação, que se baseia na convenção estabelecida por J.J. Freire citada por Hoffmann (1987), classificando um a três ovos como raríssimos, quatro a cinco ovos como raros, 6 a 10 ovos como pequena quantidade, 11 a 20 ovos como quantidade regular, 21 a 50 como grandes quantidades e acima de 51 como intensas quantidades. Liz (2011) afirma ainda que J. J. Freire determina o número de ovos por campo visual por meio do número de cruzes, as quais variam de uma (até cinco ovos) a quatro cruzes (acima de 20 ovos). Este, porém, ainda não é considerado o padrão definitivo para a quantificação da carga parasitária, e um exemplo disto

é o estudo de Bremm (2007), que embora tenha se baseado na convenção de J. J. Freire determinou que a presença de até 20 ovos denominasse a infecção como sendo leve, entre 21 a 50 ovos como infecção moderada e acima de 51 ovos como intensa. Vale ressaltar que no cotidiano dos laboratórios de parasitologia animal a contagem é padronizada de maneira subjetiva, no entanto, a nível experimental para animais de companhia recomenda-se utilizar métodos quantitativos, como o método McMaster.

Os métodos de centrífugo-flutuação podem utilizar diferentes tipos de soluções para promover a flutuação das formas evolutivas dos parasitos. De acordo com Dryden et al. (2005), as mais utilizadas incluem as soluções de cloreto de sódio (DE = 1,18), açúcar (DE = 1,27), nitrato de sódio (DE = 1,18), sulfato de magnésio (DE = 1,20) e sulfato de zinco (DE = 1,20). Levando em consideração que a densidade específica (DE) da maioria dos ovos de helmintos encontra-se entre 1,05 e 1,23 (DAVID; LINDQUIST, 1982) e que a solução hipersaturada de açúcar apresenta a maior densidade entre as substâncias supracitadas, esta constitui a melhor alternativa a ser empregada em uma técnica de flutuação, visto que a maior densidade promoveria a flutuação dos principais ovos de helmintos de interesse médico-veterinário. Além disto, a solução de “Sheather” é de fácil preparação e baixo custo, o que contribui para sua escolha. Como desvantagem, é importante destacar que a pressão osmótica exercida pelas soluções de gravidade específica mais elevadas, como a de açúcar, pode causar distorção nos cistos de *Giardia* spp., dificultando sua identificação (WILLARD, 2009).

A solução salina, embora também seja de baixo custo e simples preparação, possui densidade inferior à da solução de açúcar, o que pode resultar em menor sensibilidade desta em comparação às técnicas que utilizam soluções de maior densidade específica, tal como é descrito por Dryden et al. (2005). Além disso, as soluções salinas podem cristalizar rapidamente quando em altas densidades, dificultando a identificação do parasito (ZAJAC; CONBOY, 2012).

Para alguns autores, quando se trata do diagnóstico parasitário de animais de companhia, a técnica de Willis-Mollay ainda é considerada padrão para a comparação de técnicas coproparasitológicas (REZENDE et al., 2015; SANTANA et al., 2015). No entanto, embora diversos autores afirmem que esta técnica possui grande sensibilidade na detecção de ovos dos gêneros *Ancylostoma* spp., *Toxocara* spp., cistos e oocistos (TÁPARO et al., 2006; MONTEIRO, 2007; NOVAES; MARTINS, 2015), os ovos de cestódeos e trematódeos, por serem de maior densidade, podem não ser detectados por este exame (MONTEIRO, 2007).

Santana et al. (2015), ao compararem as técnicas de Willis-Mollay, Hoffman e centrífugo-flutuação modificada, obtiveram maior sensibilidade para a detecção de *Ancylostoma* spp. e

Toxocara spp. com o exame de centrífugo-flutuação, sugerindo que esta seja incorporada à rotina de exames coproparasitológicos veterinários. De maneira semelhante Táparo et al. (2006) recomendam associar as técnicas de Willis-Mollay e Hoffman para o diagnóstico de helmintoses gastrintestinais de caninos, uma vez que, como citado anteriormente, a primeira possui maior especificidade para estruturas leves como ovos da superfamília Strongyloidea e oocistos de coccídios enquanto a segunda, por se tratar de uma técnica de sedimentação (MONTEIRO, 2007), permite maior detecção de ovos pesados como os de cestódeos, ascarídeos e trematódeos (NOVAES; MARTINS, 2015). Contudo, nem sempre é possível ou viável submeter à mesma amostra a mais de uma técnica coproparasitológica, seja pela quantidade insuficiente de fezes, pelo custo de execução ou pela necessidade de diagnóstico rápido. Sendo assim, a técnica de centrífugo-flutuação constitui uma excelente alternativa no diagnóstico de helmintos e protozoários gastrointestinais de caninos e felinos, permitindo a detecção de quadros subclínicos ou de animais com baixas cargas parasitárias, embora apresente também limitações na detecção de ovos pesados que pudessem não flutuar (MARKS, 2016).

Greve (1989), ao comparar as técnicas de centrífugo-flutuação com soluções de açúcar e nitrato de sódio observou que a centrifugação em açúcar resultou em maior positividade das amostras. Esta afirmação é corroborada por Dryden et al. (2005), os quais compararam os métodos de centrifugo-flutuação em solução salina, de açúcar e sulfato de zinco e concluíram que a técnica de centrifugação em açúcar foi mais eficiente na recuperação de ovos de helmintos e oocistos do que a técnica de Willis-Mollay. Isto ressalta a sensibilidade deste método frente aos outros e demonstra a vantagem em submeter a amostra diretamente ao exame de centrífugo-flutuação ao invés de submetê-la a duas ou mais técnicas coproparasitológicas (REZENDE et al., 2015; TÁPARO et al., 2006).

Apesar de todas as vantagens do método, ainda existem mitos relacionados à técnica de centrífugo-flutuação em solução de Sheather. Alguns acreditam que a centrifugação seria dispensável para o processo, porém já se atestou que as taxas de recuperação de ovos de helmintos foram melhoradas após o emprego da centrifugação, especialmente para ovos mais pesados como os de *Trichuris vulpis*, *Taenia* spp., *Toxocara* spp., *Eucoleus* spp. e *Isospora* spp. Isto se deve, principalmente, ao fato de que a força centrífuga aplicada à solução é muito maior do que o empuxo e a gravidade empregados na técnica de flutuação simples (BLAGBURN, 2008).

Há quem afirme que a centrifugação é um processo complexo que exige tempo e alto investimento, devido ao custo da centrífuga. Blagburn (2008) alega, no entanto, que o processo

de centrifugação é fácil e rápido, e que a maioria das centrífugas possuem preços razoáveis, boa durabilidade e baixo custo de manutenção. Por último, alguns ainda afirmam que as limitações de espaço ou capacidade de processamento do aparelho seriam desvantagens para a adoção da técnica de maneira permanente, contudo, diante vasto mercado existente, isto traz a possibilidade de encontrar equipamentos que atendam perfeitamente à realidade de cada laboratório.

Portanto, levando em consideração fatores como a praticidade na execução, baixo custo de operação e sensibilidade da técnica pode-se concluir que o método de centrífugo-flutuação em solução de açúcar constitui a melhor opção para a detecção de ovos de helmintos em fezes de caninos e felinos, podendo também ser aplicada com sucesso em outras espécies animais, especialmente em casos onde o diagnóstico qualitativo é suficiente para a determinação do tratamento.

2 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Vários fatores podem influenciar na sensibilidade das técnicas coproparasitológicas, portanto, a escolha do método deve ser criteriosa, levando em consideração a suspeita clínica, a disponibilidade financeira e de tempo.

Modificações nos protocolos podem alterar os resultados obtidos, portanto, validar as técnicas modificadas é uma atitude desejável.

Técnicas coproparasitológicas possuem papel importante para estudos epidemiológicos, determinação da eficácia de fármacos e monitoramento da resistência anti-helmíntica, além de auxiliarem na sanidade dos animais e garantia da saúde pública.

3 REFERÊNCIAS

BALLWEBER, L. R. et al. American Association of Veterinary Parasitologists' review of veterinary fecal flotation methods and factors influencing their accuracy and use—is there really one best technique? **Veterinay Parasitology**, v. 204, n. 1, p. 73-80, 2014.

BLAGBURN, B. L. **Why Fecal Centrifugation is Better**. 2008. Disponível em: <https://www.capcvet.org/expert-articles/why-fecal-centrifugation-is-better/>. Acesso em: 20 set. 2016.

BREMM, M. **Infecção parasitária por nematódeos em cães do canil municipal de Santa Cruz do Sul/RS**. 2007. 34 f. Monografia (Especialização em Análises Clínicas Veterinárias), Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2007.

CRINGOLI, G. FLOTAC, a novel apparatus for a multivalent faecal egg count technique. **Parassitologia**, v. 48, n. 3, p. 381-384, 2006.

CRINGOLI, G. et al. FLOTAC: new multivalent techniques for qualitative and quantitative copromicroscopic diagnosis of parasites in animals and humans. **Nature Protocols**, v. 5, n. 3, p. 503-515, 2010.

_____. The influence of flotation solution, sample dilution and the choice of McMaster slide area (volume) on the reliability of the McMaster technique inestimating the faecal egg counts of gastrointestinal strongyles and *Dicrocoelium dendriticum* in sheep. **Veterinay Parasitology**, v. 123, n. 1, p. 121-131, 2004.

_____. Geospatial (s) tools: integration of advanced epidemiological sampling and novel diagnostics. **Geospatial Health**, v. 7, n. 2, p. 399-404, 2013.

DAVID, E. D.; LINDQUIST, W. D. Determination of the specific gravity of certain helminth eggs using sucrose density gradient centrifugation. **The Journal of Parasitology**, v. 68, n. 5, p. 916-919, 1982.

DRYDEN, M. W. et al. Comparison of common fecal flotation techniques for the recovery of parasite eggs and oocysts. **Veterinary Therapeutics**, v. 6, n. 1, p. 15-28, 2005.

EGWANG, T. G.; SLOCOMBE, J. O. Evaluation of the Cornell-Wisconsin centrifugal flotation technique for recovering trichostrongylid eggs from bovine feces. **Canadian Journal of Comparative Medicine**, v. 46, n. 2, p. 133-137, 1982.

GODBER, O. F. et al. A comparison of the FECPAK and Mini-FLOTAC faecal egg counting techniques. **Veterinay Parasitology**, v. 207, n. 3, p. 342-345, 2015.

GORDON, H. M. L.; WHITLOCK, H. V. A new technique for counting nematode eggs in sheep faeces. **Jounal of the Council for Scientific and Industrial Research**, v. 12, n. 1, p. 50-52, 1939.

GREVE, J. H. Comparison of sugar and sodium nitrate flotation methods for detection of parasites in dog feces. **Iowa State University Veterinarian**, v. 51, n. 2, p. 6, 1989.

HOFFMANN, R. P. **Diagnóstico de Parasitismo Veterinário**. 1. ed. Porto Alegre: Sulina, 1987.

KENYON, F. et al. Pooling sheep faecal samples for the assessment of anthelmintic drug efficacy using McMaster and Mini-FLOTAC in gastrointestinal strongyle and *Nematodirus* infection. **Veterinary Parasitology**, v. 225, n. 1, p. 53-60, 2016.

LEVECKE, B. et al. The bias, accuracy and precision of faecal egg count reduction test results in cattle using McMaster, Cornell-Wisconsin and FLOTAC egg counting methods. **Veterinary Parasitology**, v. 188, n. 1, p. 194-199, 2012.

LIZ, F. R. de. **Avaliação hematológica e parasitária por *Ancylostoma* spp em cães (*Canis familiaris*, Linnaeus, 1758) apreendidos no Centro de Controle de Zoonoses (CCZ) de Lages, SC**. 2011. 48f. Monografia (Especialização) – Programa de Pós-Graduação em Análises Clínicas, Universidade do Extremo Sul Catarinense, Lages, 2011.

MARKS, S. L. Rational Approach to Diagnosing and Managing Infectious Causes of Diarrhea in Kittens. In: LITTLE, S. E. **August's Consultations in Feline Internal Medicine**. St Louis: Elsevier Health Sciences, 2016. p. 1-22.

MONTEIRO, S. G. **Parasitologia Veterinária**: Livro didático. 2. ed. Santa Maria: Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), 2007.

NOVAES, M. T; MARTINS, I. V. F. Avaliação de diferentes técnicas parasitológicas no diagnóstico de helmintoses caninas. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, v. 37, p. 71-76, 2015.

REZENDE, H. H. A. et al. Evaluation of the accuracy of parasitological techniques for the diagnosis of intestinal parasites in cats. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 24, n. 4, p. 471-474, 2015.

RINALDI, L. et al. Calibration and diagnostic accuracy of simple flotation, McMaster and FLOTAC for parasite egg counts in sheep. **Veterinary Parasitology**, v. 177, n. 3, p. 345-352, 2011.

_____. Comparison of individual and pooled faecal samples in sheep for the assessment of gastrointestinal strongyle infection intensity and anthelmintic drug efficacy using McMaster and Mini-FLOTAC. **Veterinary Parasitology**., v. 205, n. 1, p. 216-223, 2014.

SANTANA, B. B. de. et al. Evaluation of different parasitological techniques for diagnosing intestinal parasites in dogs. **Open Journal of Veterinary Medicine**, v. 5, n. 2, p. 19, 2015.

SHEATHER, A. L. The detection of intestinal protozoa and mange parasites by a floatation technique. **Journal of Comparative Pathology and Therapeutics**, v. 36, p. 266-275, 1923.

SILVA, L. M. R. et al. Mini-FLOTAC for the diagnosis of *Eimeria* infection in goats: an alternative to McMaster. **Small Ruminant Research**, v. 114, n. 2, p. 280–283, 2013.

TÁPARO, C. V. et al. Comparação entre técnicas coproparasitológicas no diagnóstico de ovos de helmintos e oocistos de protozoários em cães. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 15, n. 1, p. 1-5, 2006.

UENO, H.; GONÇALVES, P. C. **c**. 4. ed., Tokyo: Japan International Cooperation Agency, 1998.

WHITLOCK, H. V. Some modifications of the McMaster helminth egg-counting technique and apparatus. **Jounal of the Council Scientific and Industrial Research**, v. 21, n. 3, p. 177-180, 1948.

WILLARD, M. D. Disorders of intestinal tract. In: NELSON, R. W.; COUTO, C. G. **Small Animal Internal Medicine**. 4. ed. St. Louis: Elsevier Health Sciences, 2009. p. 440-445.

ZAJAC, A. M., CONBOY, G. A. **Veterinary Clinical Parasitology**. 8. ed. Ames: Wiley-Blackwell, 2012.

Capítulo

7

Panorama da avicultura e principais causas de condenações *post mortem* em frangos de corte

Kamila Teixeira Pandolfi[1]
Jankerle Neves Boeloni[2]

1 INTRODUÇÃO

A carne de frango tem se tornado uma das mais importantes fontes de proteína animal para a população humana, consequentemente, a produção e o consumo dessa proteína têm aumentado de forma considerável (SANTOS, 2010).

No Brasil 443 milhões de cabeças de aves são abatidas por mês (INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA - IBGE, 2014) sendo que 12,69 milhões de toneladas correspondem ao total produzido anualmente, e desse total 67,7% são consumidos pelo mercado interno (UNIÃO BRASILEIRA DE AVICULTURA - UBABEF, 2015). Por esse motivo o Brasil é o terceiro país que mais produz carne de frango no mundo e sendo ainda o líder quando se trata de exportações a nível mundial do comércio avícola (RODRIGUES et al., 2014), o que justifica a avicultura brasileira ser uma atividade de referência mundial em desenvolvimento e produção (PESSOA et al., 2013).

[1] Universidade Federal do Espírito Santo, e-mail: kamilapandolfi@yahoo.com.br;
[2] Universidade Federal do Espírito Santo, e-mail: jankerle@gmail.com.

A indústria brasileira se destacou no comércio aviário de abate de frango por adotar um sistema de integração que provou ser ideal para as pequenas propriedades e isso é comprovado quando consideramos que esse sistema gera mais de 3,6 milhões de empregos, direta e indiretamente, correspondendo a quase 1,5% do Produto Interno Bruto (PIB) nacional (UBABEF, 2014).

O consumo *per capita* de carne de frango no Brasil está em torno de 41,8 kg por ano (UBABEF, 2014) e este aumento no consumo da carne de frango teve influência de quatro fatores principais: substituição das carnes vermelhas, crescente preocupação com a saúde humana, melhoria na coordenação da cadeia agroindustrial do frango de corte e surgimento de novos produtos e marcas. Além disso, o baixo custo quando comparadas ao preço relativo das outras carnes, a boa aceitação à carne de frango pela maioria da população e os ganhos na produtividade da indústria avícola do frango de corte em relação às melhorias tecnológicas e sanitárias, também contribuíram para o crescimento da produção de carne de frango no Brasil (VIOLÀ; TRICHES, 2015).

Vale a pena destacar que mesmo com todos esses progressos nesse campo da agroindústria, existe uma grande perda durante a produção e o processamento da carne de frango, acarretando assim condenações parciais e totais da carcaça (MASCHIO; RASZL, 2012). Nesse contexto, estão entre as principais condenações de carcaças: celulite, síndrome ascítica, hematomas, fraturas e contaminação devido à ruptura de vísceras no momento da evisceração (SANTOS, 2010), bem como a condenação parcial de carcaça por dermatoses (GROFF; SILVA; STEVANATO, 2015; OLIVEIRA et al., 2016).

Contudo, é importante destacar ainda que a indústria avícola e os médicos veterinários atualmente enfrentam novos desafios como a emergência de novas doenças e a reemergência das já existentes, que geram perdas econômicas significativas; constante aumento nos custos dos alimentos; mudanças nas condições sociais e políticas; e a preocupação do consumidor com o bem-estar animal e a segurança alimentar (REVOLLEDO; FERREIRA, 2009).

Assim, esta revisão de literatura teve como objetivo descrever o panorama da avicultura e as principais causas de condenações *post mortem* em frangos de corte.

2 PANORAMA GERAL DA AVICULTURA

Com relação aos setores do agronegócio brasileiro, o aviário tem tido uma crescente importância e a valorização da segurança alimentar tem acompanhado e favorecido essa situação. Nesse contexto, os matadouros frigoríficos têm buscado obter uma carcaça de

qualidade, com rendimento de carne e de corte, tendo o aproveitamento máximo das mesmas, alcançando dessa forma melhores resultados financeiros e atendendo as exigências do consumidor quanto à qualidade e textura da carne, teor de gordura e aparência do produto. Tudo isso associado à qualidade sanitária, qualidades nutricionais, qualidades organolépticas e bem-estar animal (SOUZA et al., 2016).

Com a preocupação em relação aos aspectos sanitários tanto a nível nacional como internacional foram instituídos pelo MAPA pela portaria 1428/93, programas como o APPCC (Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle) e BPG (Boas práticas de Gerenciamento) ou BPF (Boas Práticas de Fabricação) em todas as fases do processo produtivo das aves de corte como ferramenta para inspeção de todo processo de produção na indústria. Tais programas buscam garantir a qualidade do produto nacional brasileiro e atender as exigências estabelecidas pelo comércio internacional. Essas exigências são estabelecidas pelo "Codex Alimentarius", órgão normativo da Organização Mundial do Comércio (OMC) que tem por função proteger a saúde humana contra riscos de doenças transmitidas por alimentos ou vinculados a acidentes envolvendo alimentos (LIMA; MANFIO; KESKE, 2007).

No Brasil a fiscalização e o controle da sanidade de carne de aves estão baseados em normas federais que utilizam parâmetros físicos e microscópicos para permitir ou descartar para o consumo humano de forma total ou parcial as carcaças dos animais (BRASIL, 1998). Desta forma, os fiscais agropecuários avaliam, prioritariamente, aspectos visuais da carcaça nas linhas de produção dos matadouros frigoríficos avícolas usando alguns órgãos como parâmetros avaliativos (SILVA, 2009).

Dentre as doenças de notificação obrigatória estabelecidas pela Organização Mundial de Saúde Animal, 15 correspondem as doenças de aves e dessas a influenza aviária e a doença de Newcastle, que são altamente patogênicas, ganharam maior importância nos últimos anos por comprometer a saúde pública em diferentes países do mundo (REVOLLEDO; FERRREIRA, 2009).

Considerando as patologias e as tecnopatias frequentemente encontradas na rotina da inspeção de carne de aves temos: abscesso; aerossaculite; artrite; carcaças com aspectos repugnantes; celulite; colibacilose; fraturas e contusões; dermatoses; escaldagem excessiva; evisceração retardada; sangria inadequada; neoplasias; salpingites; síndrome ascítica; e caquexia (SANTOS, 2010).

3 CONSIDERAÇÕES SOBRE A AVICULTURA NO MUNDO E NO BRASIL

A criação de aves é uma atividade muito antiga que durante séculos vem sendo aprimorada pelo homem e existem relatos que as aves foram domesticadas a mais de 3.000 anos. Sabe-se ainda que, dentre as aves, as galinhas são as mais exploradas economicamente (RIBEIRO, 2013).

No Brasil, desde a época da colonização, a criação de aves esteve presente e a criação e o consumo da carne eram realizados por nobres, como D. João VI e Dom Pedro II, desde o ano de 1841. O consumo restrito a nobres era devido à escassez e a serem carnes com custo extremamente elevado (COSTA, 2011).

Até o final do ano de 1950, a avicultura do Brasil era uma atividade básica de subsistência que tinha mínimos recursos para que pudesse se desenvolver, além de não possuir bases empresariais (REVOLLEDO; FERREIRA, 2009). Segundo Costa (2011), as aves eram criadas livremente em terreiros de casas e os primeiros criatórios comerciais de galinhas surgiram no estado de Minas Gerais em seleiros, chamados em inglês de *"basse-cour"*. No início da década de 60 ocorreram as primeiras importações de linhagens híbridas de frangos da América do Norte, mais resistentes e produtivas e foram se alterando aos poucos os padrões de manejo e alimentação desses animais (RIBEIRO, 2013).

Em 1961, no estado de Santa Catarina, a SADIA foi a empresa pioneira em implantar o modelo de integração, baseado em um modelo americano. Sendo que a princípio esse modelo era caracterizado pela informalidade entre integrado e integrador (RIBEIRO, 2013).

Nos anos 70 a indústria avícola brasileira cresceu em média 12% ao ano, sendo a região Sul do país a que teve maior investimento, por ser grande produtora de milho e soja. Em 1973 realizou-se a primeira exportação de frango do Brasil e em 1976 foi criada a Associação Brasileira dos Produtores e Exportadores de Frango (ABEF) (RIBEIRO, 2013).

Na primeira metade da década de 80, houve um baixo crescimento da produção devido a retração do mercado interno e a diminuição da atividade econômica brasileira, compensado pelo aumento das exportações. Assim, buscando atender as exigências feitas pelo mercado internacional, as empresas exportadoras brasileiras passaram a investir em melhorias genéticas, em novas tecnologias e em processos que aumentassem a eficiência na cadeia produtiva (RIBEIRO, 2013).

No ano de 2005, ocorreram focos de influenza aviária na Turquia, Grécia, Romênia, além de França e Alemanha que detectaram atividade viral em seu território. A partir de 2006,

a presença da influenza aviária já era uma realidade na Europa e na África, mas não no Brasil. No entanto, mesmo assim nesse ano houve uma queda na demanda das exportações brasileiras, promovendo um excedente do produto no mercado interno, o que levou a queda dos preços para consumidores e grandes prejuízos para produtores (ZAFALON, 2008).

Em 2008 instalou-se a crise econômica global e o setor ficou novamente vulnerável pelo fato de que aproximadamente 30% da produção nacional de frango se destinavam as exportações. Nesta época ainda, a União Brasileira de Avicultura comunicou às empresas integradoras que reduzissem a produção, para que não houvesse excesso de oferta no mercado (ZAFALON, 2008).

Em 2012 houve novamente problemas, pois fatores ambientais levaram a quedas na produção de grãos em vários países o que fez com que os custos deste insumo subissem consideravelmente. Isso resultou em enormes prejuízos, pois houve necessidade de interromper a atividade de abate e o fornecimento da ração e com isso muitos animais morreram desnutridos, levando a uma crise imensurável no setor (RIBEIRO, 2013).

Em compensação o Brasil, mesmo tendo enfrentado estes problemas, apresenta uma taxa média anual de crescimento de 5,3% no comércio avícola e a produção mundial de carne de frango cresce com taxa média de 4,3% (VIOLÀ; TRICHES, 2015). Isso se deve aos avanços tecnológicos atualmente empregados nas granjas associados ao melhoramento genético, que diminuiu o tempo que o frango leva para ser abatido. Além desses aspectos, as condições climáticas favoráveis, a matéria-prima e o sistema de integração com os pequenos produtores rurais desenvolvidos pela indústria avícola também contribuíram para esse crescimento. Nesse contexto, na década de 60, um frango demorava 56 dias para atingir 1.600g de peso corporal vivo e tinha uma conversão alimentar de 2,25, enquanto em 2002 um frango demorava 42 dias para atingir 2.300g com conversão alimentar de 1,83 (VIOLÀ; TRICHES, 2015).

Atualmente, a produção avícola é eficiente e com alta produtividade, decorrente de um sistema técnico-científico muito desenvolvido, em conjunto com a otimização da produção que oferece uma proteína de excelente qualidade a preços baixos. Essa evolução na produção é decorrente do crescimento econômico e da preocupação com os aspectos sanitários (SESTERHENN, 2013).

Apesar da grande evolução na produtividade na indústria avícola, devido ao tipo de criação e da escala industrial dos frangos de corte, tem-se verificado crescentes prejuízos decorrentes de enfermidades cutâneas como celulite e dermatite (gangrenosa, traumática, micótica e pododermatite de contato) (AMORIM NETO; MIRANDA, 2009). Esses danos podem resultar em condenação total ou parcial da carcaça no abatedouro frigorífico, levando a

redução no valor do produto final, despesas com mão de obra adicional e equipamentos, diminuição da velocidade em que se processam as carcaças e os gastos com limpeza e desinfecção das instalações (SESTERHENN, 2013).

Dessa forma, é importante ressaltar que os problemas sanitários tem sido alguns dos principais aspectos limitantes para o desenvolvimento correto da indústria avícola com o objetivo de sanar a crescente demanda dos consumidores (REVOLLEDO; FERRREIRA, 2009). Estima-se ainda que a carne de frango no próximo século será a carne mais consumida no mundo ultrapassando a carne suína. Este bom desempenho deve-se ao seu baixo custo, a sua grande aceitação por diversas culturas e regiões e a grande variedade de produtos à base de frango (FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS - OECD, 2014).

4 EXPORTAÇÃO DA CARNE DE FRANGO NO BRASIL

Em 2015, o Brasil está alcançando seu 12º ano como maior exportador mundial de carne de frango com a estimativa de exportar cerca de 3.825 mil toneladas. Espera-se, portanto, que a metade do aumento global das exportações previstas para o ano de 2015 sejam supridas pelo frango brasileiro (UNITED STATE DEPARTMENT OF AGRICULTURE - USDA, 2015).

Adicionalmente, o Brasil foi o terceiro em produção mundial de carne de frango (RODRIGUES et al., 2014), produzindo cerca de 12,680 milhões de toneladas no ano de 2014 (USDA, 2015). Perdendo apenas para os Estados Unidos da América (EUA) (maior produtor) e China (segundo maior produtor) que produziram respectivamente cerca de 17,254 e 13,000 milhões de toneladas de carne de frango. Considerando que, segundo pesquisas recentes realizadas pela USDA (2015), foi previsto crescimento "zero" para o mercado Chinês e expansão em torno de 3,5% para o Brasil e, se isso realmente ocorrer, o Brasil se tornará o segundo produtor mundial de carne de frango.

Os mercados consumidores de carne são bastante diversificados sendo que os três principais importadores são o Japonês, a Arábia Saudita e a União Europeia, que juntos somam mais de um quinto do total de importações mundiais. E quanto ao destino das exportações brasileiras da carne de aves de abatedouro, existem mais de 170 países que elas são destinadas, porém as vendas são bastante concentradas, sendo que o Oriente Médio detém um terço do total exportado (VIOLÀ; TRICHES, 2015).

O estado do Paraná se destaca como o maior produtor de carne de frango, sendo responsável pela produção de 31,12% do total produzido no país. Na segunda posição está o

estado de Santa Catarina, representando 16,66%, enquanto o estado do Rio Grande do Sul representa o terceiro lugar, produzindo 14,56%. Adicionalmente, os estados da Bahia, Pernambuco, Pará, Tocantins, Espírito santo, Paraíba, Roraima e Piauí juntos representaram apenas 2,79% da produção total de frango em 2013 (UBABEF, 2014).

Para manutenção dessas posições de destaque nos *ranking* nacional e mundial de produção de carne de frango o país necessita ainda melhorar e aumentar ainda mais sua eficiência na produção para continuar atendendo as exigências da qualidade da carne e aspectos relacionados ao bem-estar animal e à preservação do meio ambiente (PASCHOAL; OTUTUMI; SILVEIRA, 2012).

5 AÇÕES SANITÁRIAS

Para que se tenha um produto final de qualidade deve ser implantado um controle sanitário e operacional funcional na indústria, e na granja deve existir também um controle da densidade populacional, onde o número máximo recomendado de aves seja 15 por m² (SANTANA et al., 2008).

As novas exigências de segurança alimentar fizeram com que junto ao sistema de inspeção fossem estabelecidas práticas de garantia de qualidade, baseados nos princípios de Boas Práticas de Fabricação (BPF), na Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle (APPCC) e no Procedimento Padrão de Higiene Operacional (PPHO), que promovem um controle detalhado de todo o processo. O objetivo é reduzir a ocorrência de perigos, químicos, físicos e biológicos, visando à inocuidade dos alimentos produzidos mediante o controle da produção (BRASIL, 2002).

O SIF do MAPA e suas representações estaduais e municipais tem a permanente função de realizar a inspeção sanitária dos matadouros frigoríficos avícolas, garantido a qualidade da carne e vísceras para consumo. Os profissionais encarregados da inspeção são médicos veterinários, que realizam a inspeção *ante mortem*, fazem o exame visual das aves em lotes destinados ao abate, e determinam o conjunto de medidas adotadas para a habilitação das mesmas ao processo industrial (BRASIL, 1997; BRASIL, 1998).

Um dia antes do abate, os responsáveis inspetores fiscais verificam os boletins sanitários referentes aos lotes que serão abatidos, a programação de abate e o Guia de Transito Animal (GTA) (AMORIM NETO; MIRANDA, 2009). Eles também verificam um boletim sanitário que informa os seguintes aspectos: procedência das aves, constando nome e endereço da granja produtora e o número do lote ou galpão; número inicial e final de aves; doenças identificadas

nos lotes; se o lote teve tratamento, qual foi o mesmo e qual medicamento foi usado e por quanto tempo; data que parou de fornecer ração e coccidiostáticos; data e hora em que se iniciou o jejum hídrico e alimentar; outros dados que por ventura sejam considerados necessários; e pôr fim a assinatura do médico veterinário responsável pelo plantel (AMORIM NETO; MIRANDA, 2009).

Nos lotes com registro de doenças ocorridas antes do abate, as aves são abatidas ao final do turno. As aves mortas, tanto no transporte quanto na plataforma de recepção são destinadas a fábrica de subprodutos (AMORIM NETO; MIRANDA, 2009).

As aves que apresentam alguma enfermidade de modo geral têm alteração de temperatura, debilidade e muitas vezes sinais e sintomas específicos das doenças. Animais sem sinais clínicos promovem a inviabilização do julgamento de suas carcaças apenas com o exame *ante mortem*, dessa forma o julgamento só é obtido no exame *post mortem* (SILVA, 2009). Este é um exame visual e macroscópico e é realizado em linhas de inspeção, que são pontos na seleção de matança, especificamente na calha de evisceração (BRASIL, 1998).

São três linhas de inspeção utilizadas em matadouros frigoríficos avícolas: A, B e C. Na linha A, é realizado o exame interno das aves, visualizando as cavidades torácica e abdominal, e dos órgãos presentes nelas. Em seguida, na linha B, se realiza o exame das vísceras. E por fim a linha C, faz-se a inspeção da pele e articulações (BRASIL, 1998).

O processo de exposição das vísceras para inspeção *post mortem*, deve ser feito de forma cuidadosa, para evitar o rompimento desnecessário de órgãos, o que poderia contaminar a carcaça (SILVA, 2009).

As lesões identificadas nos órgãos determinam um novo detalhamento do exame da carcaça, e geralmente usam-se exames complementares, como o exame bacteriológico (SILVA, 2009). Os exames laboratoriais servem como ferramenta auxiliar para os técnicos na prevenção, no diagnóstico e tratamento de doenças. Além disso, os dados laboratoriais são importantes, pois proporcionam informações epidemiológicas para que possam definir as fontes comuns de infecção (SILVA, 2009).

Os resultados dos exames *ante mortem* associados aos exames *post mortem*, geralmente são suficientes para fechar um provável diagnóstico e para adoção de um critério de julgamento final, mesmo que muitas vezes estes sejam baseados apenas em alterações macroscópicas (SILVA, 2009). Ou seja, usando os critérios de julgamentos é possível definir se as carnes estão ou não aptas ao consumo humano, o que pela legislação brasileira são: a aprovação total, aprovação com restrições ou sob condições e, condenações total ou parcial (BRASIL, 1997; BRASIL, 1998).

Nos casos confirmados de uma doença de notificação obrigatória deve-se comunicar a Organização Mundial da Saúde (OIE). Enquanto são apenas suspeitas realizam-se coletas de materiais que são geralmente encaminhas para laboratório do MAPA (RIBEIRO, 2013).

De acordo com a Instrução Normativa nº 17, de 07 de abril de 2006 do MAPA, se, ao analisar o Boletim Sanitário constar taxa igual ou maior que 10% de mortalidade durante o alojamento das aves no galpão de origem, o médico veterinário Fiscal Federal Agropecuário do SIF deve coletar de um por cento das aves do lote o soro, *swab* cloacal e traqueal e enviar para o Laboratório Oficial. Esse laboratório informará o problema ao Serviço de Inspeção de Produto Agropecuários (SIPAG), que, por sua vez, informará ao Serviço de Defesa agropecuária (SEDESA). Se esse percentual for superior a 10% de mortalidade num período inferior a 72 horas, desde o momento do alojamento das aves no estabelecimento de origem até a emissão do boletim sanitário; ou quando tiver mortalidade igual ou superior a um por cento durante o transporte das aves, do galpão ou abatedouro; ou se forem identificados sinais clínicos de influenza aviária ou doença de *Newcastle* no lote de aves; deve se informar o problema ao SIPAG e ao SEDESA (BRASIL, 2006).

6 CAUSAS DE CONDENAÇÕES MAIS OBSERVADAS NOS MATADOUROS MATADOUROS FRIGORÍFICOS AVÍCOLAS

Formas de manejo inadequadas dos animais durante o transporte, embarque e desembarque, caminhões e estradas em mau estado de conservação, além de animais muito estressados, devido a maus tratos e manejo agressivo, podem culminar em contusões e perdas significativas na qualidade e no valor das aves (LIMA; MASCARENHAS; CERQUEIRA, 2014).

Neste contexto, a presença e as taxas de injúrias, contusões, morbidade, mortalidade e qualidade da carcaça podem ser usadas como indicadores do bem-estar animal. Sendo que, medidas de mortalidade podem fornecer informações sobre o bem-estar animal durante o processo do transporte, enquanto arranhões, contusões, manchas e fraturas de ossos fornecem informações do bem-estar durante o manejo, transporte e tempo de espera (LIMA; MASCARENHAS; CERQUEIRA, 2014).

Segundo Lima, Mascarenhas e Cerqueira (2014) um estudo realizado entre junho de 2011 e maio de 2012, correspondendo a 217 dias de abate, em um ano foi perdido R$ 494.015,18 e grande parte destas perdas (41,21%) foi devido a defeitos tecnológicos de abatedouro. As condenações *post mortem* totais representaram um total de 17% e as parciais de

83% do total que foi condenado durante o ano, considerando que as causas mais prevalentes foram: escaldagem excessiva e contusão/fratura. Este estudo verificou que o treinamento das equipes responsáveis pelas operações de pré-abate e manutenção, bem como a regulagem das máquinas reduziram as perdas do frigorífico, aumentando o lucro a logo prazo, tanto financeiro quanto social, e melhorando também as condições de bem-estar animal.

Brasil (1998) portaria n° 210, do anexo IX, define os critérios para o julgamento de condenação às carcaças de aves na inspeção *post mortem*. As carcaças que apresentarem abscessos, aerossaculite, aspecto repugnante, caquexia, contaminação, contusão, dermatoses, escaldagem excessiva, doenças infecciosas que são doenças de notificação obrigatória; fraturas, caquexia, evisceração retardada, processos inflamatórios, síndrome ascítica e tumores devem ser condenadas.

As causas de condenação total de carcaça mais frequentemente observadas pelo SIF são caquexia, contaminação e aspecto repugnante (FERREIRA; SESTERHENN; KINDLEN, 2012), sendo as duas últimas causadas por erros no processo industrial como ruptura de vísceras no momento da evisceração (SILVA; PINTO, 2009). Já as causas de condenações parciais mais observadas são contusões/fraturas e celulite (FERREIRA; SESTERHENN; KINDLEN, 2012). Segundo Amorim Neto e Miranda (2009) as lesões cutâneas também são muito comuns.

6.1 SÍNDROME ASCÍTICA/ASCITE

A ascite é uma condição patológica de origem metabólica caracterizada pelo acúmulo de fluido na cavidade abdominal (JACOBSEN; FLORES, 2008).

Acredita-se que, quando ocorre aumento da resistência ao fluxo sanguíneo no pulmão ocorre piora significativa no quadro cursado pela ave, pois este encontra-se em desequilíbrio entre a necessidade e o fornecimento de oxigênio e a insuficiência cardíaca direita. A predisposição a desenvolver ascite é maior nos frangos devido a eles terem o pulmão rígido e fixo na cavidade torácica e o peso do órgão em relação ao peso corporal reduzir-se em função da idade (JACOBSEN; FLORES, 2008).

Pode ocorrer ainda, hipertrofia do ventrículo direito como resultado da hipertensão pulmonar crônica causando também o mau funcionamento da válvula átrio ventricular direita, que resulta na ocorrência do retorno do sangue venoso dentro da veia cava. O resultado disso é o extravasamento de líquido e a congestão hepática. Se a taxa de extravasamento for superior à capacidade das membranas abdominais em absorver o fluido, ocorre o desenvolvimento da

ascite. Geralmente isso ocasiona à morte devido à falha respiratória resultante da pressão do líquido nos sacos aéreos (JULIAN; MCMILLAN; QUINTON, 1989).

A forma de controle da ascite é basicamente reduzir as condições que induzam nas aves um quadro de deficiente oxigenação, tanto pelo aumento quanto pela diminuição da demanda de oxigênio pelos tecidos, principalmente os cuidados com: crescimento rápido das aves nas duas primeiras semanas de vida; a poeira do local de sua instalação; circulação de ar uniforme e adequada, principalmente nas três primeiras semanas de vida; ventilação; reduzir contactantes que comprometem os pulmões tais como doenças respiratórias, aspergilose, alta concentração de amônia e de monóxido de carbono e densidade energética da ração (SANTOS, 2010).

Segundo Brasil (1991), as carcaças que apresentem na inspeção *post mortem*, hidropericárdio e pequena quantidade de fluido abdominal de cor clara ou âmbar, sem aderência e sem nenhum outro comprometimento ou alteração das vísceras, fígado e coração, podem ser liberadas. Porém, se houver presença de líquido ascítico com aderência na cavidade abdominal e/ou vísceras, também sem nenhum comprometimento da carcaça, é permitido apenas o aproveitamento parcial dos membros, pescoço e peito sem osso, devendo a operação de corte e desossa de peito ser efetuada em local próprio, após a inspeção final. Todo o resto da carcaça deve ser descartado. É de caráter opcional, o aproveitamento integral das carcaças quando estas forem destinadas a industrialização pela separação mecânica da carne, após a remoção do líquido e das partes afetadas pelas aderências. Carcaças são totalmente descartadas, condenadas, quando apresentarem distensão abdominal decorrente da presença de grande quantidade de líquido ascítico no abdome e/ou hidropericárdio, e ainda se houver intercorrência com outras alterações, como congestão, cianose, anasarca e caquexia.

6.2 CAQUEXIA

A caquexia é caracterizada pela perda não voluntária de massa muscular e de gordura corporal (SANTOS, 2010), principalmente na região do peito. Esta síndrome é caracterizada por uma falha no metabolismo proteico e esta compromete a degradação das proteínas miofibrilares, actina e miosina (BORGES, 2006).

Variadas lesões por diversas causas estão associadas ao aparecimento da caquexia, dessa forma, o diagnóstico de caquexia, mesmo sendo preconizado pelas normas do SIF, não apontam alterações características que a definem (BORGES, 2006).

Segundo Borges (2006), os animais que estavam caquéticos apresentavam o fígado como o órgão mais afetado, que provavelmente pode contribuir consideravelmente para o

déficit de aminoácidos e para a perda muscular. Ainda afirmou que é mais frequente o aparecimento de celulite associada à dermatose, artrite, aerossaculite, colibacilose, hepatite, pericardite, salpingite e síndrome ascítica em frangos caquéticos do que os que não apresentam este quadro.

6.3 CELULITE AVIÁRIA

Celulite aviária ou dermatite necrótica é um processo inflamatório agudo purulento que ocorre no tecido subcutâneo e que frequentemente acomete a região abdominal e os membros das aves (SANTOS, 2010).

Essa alteração causa grandes prejuízos econômicos por ser umas das principais afecções que causam a condenação das carcaças de frango de corte e acredita-se que estejam relacionadas à alta densidade de aves/m² nos galpões (17 a 18 aves/m²). Além disso, tem outras causas, desde problemas na produção como manejo e nutrição até a existência de agentes infecciosos, principalmente a *Escherichia coli*. Assim, quando ocorre a contaminação por essa bactéria, as carcaças contaminadas devem ser totalmente descartadas (SANTANA et al., 2008).

Carcaças com a presença de inflamações (artrite, celulite, dermatite, salpingite e colibacilose) acometendo qualquer parte dela ou dos órgãos devem ser condenadas parcialmente, e se tiver algum indício de caráter sistêmico do processo inflamatório, a carcaça e as vísceras devem ter condenação total (FERREIRA; SESTERHENN; KINDLEN, 2012).

6.4 HEMATOMAS, CONTUSÕES E FRATURAS

A má qualidade da cama, mau empenamento, elevado número de aves por m², nível de amônia presente no galpão, micotoxinas, a intensidade da iluminação, assim como problemas relacionadas à apanha, transporte e pendura das aves podem resultar em hematomas e contusões. A época do ano também influencia na presença de hematomas, isso porque no verão a circulação periférica aumenta para melhorar a eficiência da perda de calor, tornando por tanto as veias e as artérias mais expostas e por tanto mais frágeis o que facilita a perda de calor. Assim, tanto as veias quanto as artérias mais expostas favorecem o rompimento de pequenos vasos presentes na pele, causando hematomas e contusões (LUDTKE et al., 2010).

As contusões são causadas por um trauma agudo, sem fraturas e podem resultar em inchaço até a formação de hematomas. Podem ser provocadas durante o manejo pré-abate, na operação da apanha realizada através da elevação das aves pelos pés ou pelas asas. Na etapa de

pendura os ganchos devem ser adequados ao tamanho e peso das aves a fim de evitar contusões causadas pelos operadores por aumento da pressão exercida por eles (LUDTKE et al., 2010).

As fraturas podem ocorrer devido a alguns traumas violentos sofridos pelas aves durante o manejo pré-abate. Dessa forma as injúrias sofridas podem ocasionar a ruptura de osso e ligamentos, gerando dor severa, sofrimento, debilidade e muitas vezes podendo levar à morte das aves devido à perda de sangue por choque hipovolêmico (LUDTKE et al., 2010).

As lesões traumáticas, quando delimitadas implicam apenas nas condenações da parte atingida, ou seja, quando as lesões hemorrágicas ou congestivas são decorrentes de contusões, traumatismo ou fratura, se rejeita apenas as regiões atingidas (BRASIL, 1997).

A incorreta insensibilização antes do abate pode romper os vasos sanguíneos e provocar contusões, hemorragias nas asas, coloração arroxeada na pele, quebrando ossos e formação de coágulos na musculatura do peito das aves (BRASIL, 1997).

Brasil (2000) defende o uso de insensibilização elétrica para o abate humanitário de aves. Porém, ainda não se estabeleceu um padrão elétrico para aplicação universal isso porque cada empresa tem características especiais, dentre elas o peso dos lotes de aves e as diferenças como o peso e tamanho (AMORIM NETO; MIRANDA, 2009). Então as empresas adotaram como regra geral 990 a 1010 Hz de frequência de corrente alternada (tensão de 35 a 45V para frangos de 1,0 a 1,5 kg ou 50 a 60V para frangos de 2,0 a 2,5 kg). Estes valores causam impacto inferior na estrutura física das carcaças minimizando a ocorrência de contusões e hematomas (BRASIL, 2000).

6.5 SANGRIA INADEQUADA, ESCALDAGEM EXCESSIVA E CONTAMINAÇÃO

A sangria inadequada e a escaldagem exagerada, geralmente são resultados de falhas no funcionamento dos equipamentos responsáveis por essas tarefas. Esses erros são relacionados à falta de uniformidade dos lotes destinados ao abate, isso decorre porque é inviável regular os equipamentos a cada lote abatido, ou mesmo, entre uma ave e outra. Estas são consideradas lesões mecânicas durante o processamento (AMORIM NETO, MIRANDA, 2009). Desta maneira, a boa uniformidade dos lotes que são destinados ao abate é fundamental para permitir a pendura e a sangria regulares e também facilitar a regulagem dos equipamentos do abatedouro, dessa forma reduzem a contaminação das carcaças e facilitam o fluxo dos produtos (LUDTKE et al., 2010).

Todas as carcaças que são submetidas a condições de sangria inadequada, com lesões mecânicas extensas e escaldagem excessiva devem ser condenadas totalmente junto às suas vísceras (BRASIL, 1997).

Com relação a contaminação das carcaças, geralmente a mesma ocorre quando as alças intestinais ou a vesícula biliar se rompem durante a etapa da evisceração, por problemas na regulagem das máquinas e desuniformidade dos lotes. Mas essa contaminação também pode ser decorrente da encosta das aves nos equipamentos ou quando estas caem no piso (SANTANA et al., 2008).

Brasil (1997) advertiu que as carcaças ou parte de carcaças que se contaminarem por fezes durante as fases de remoção das vísceras ou em qualquer outra fase dos trabalhos, devem ser descartadas. Também devem ser condenadas as carcaças ou fragmentos de carcaças, vísceras ou qualquer outro produto comestível que esteja contaminado por contato com os pisos.

6.6 DERMATOSES

Dermatoses é uma classificação estabelecida pelo SIF que engloba diversas doenças cutâneas. Dentre estas doenças a celulite é a única que não se enquadra nesse grupo sendo classificada separadamente (AMORIM NETO; MIRANDA, 2009). E segundo Brasil (1998), as carcaças de aves que apresentarem lesões cutâneas devem ser rejeitadas parcialmente.

As lesões cutâneas geralmente ocorrem por ocasionais modificações realizadas durante o processo de criação (FALLAVENA, 2012) e engorda das aves, sendo que estas ocorrem por alterações de cor ou mesmo em alterações na conformação da pele ou estruturas relacionadas a mesma (folículos) (GROFF; SILVA; STEVANATO, 2015; SESTERHENN, 2013).

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A partir das considerações feitas durante a presente revisão de literatura sugere-se como alternativa mais investimentos em avanços tecnológicos para modernização das granjas, novos equipamentos dentro dos matadouros frigoríficos e treinamento com os responsáveis pela apanha, transporte, pendura, sangria, manutenção e regulagem das máquinas, para que desta forma tenha-se uma diminuição das perdas econômicas pelas indústrias e, consequentemente, em redução das perdas por condenações parciais ou totais. Visando dessa forma bem-estar animal e lucros à longo prazo com conseguinte repercussão social, gerando assim aumento no consumo da carne de frango.

8 REFERÊNCIAS

AMORIM NETO, A. A.; MIRANDA C. C. M. **Inspeção de aves**. 2009. 76 f. Monografia (Especialização em Higiene e Inspeção de Produtos de Origem Animal) - Pós-graduação em Higiene e Inspeção de Produtos de Origem Animal, Universidade Castelo Branco, Goiânia, 2009.

BORGES, V. P. **Principais lesões macro e microscópicas em frangos de corte condenados por caquexia em abatedouro:** Contribuição ao diagnóstico. 2006. 113 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Universidade Estadual Paulista "Júlio Mesquita Filho" Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias Campus de Jaboticabal, São Paulo. 2006.

BRASIL, MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E DO ABASTECIMENTO. Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal – DIPOA. Divisão de Normas Técnicas – DNT. Circular nº 160, de 07 de outubro de 1991. **Estabelece Critérios de julgamento na inspeção *post- mortem* de frangos de corte acometidos de ascite metabólica**. Brasília: 1991.

_____. Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal – DIPOA. Divisão de Normas Técnicas - DNT. Decreto Lei nº 30.691, de 29 de março de 1952. Alterado pelo decreto nº 1.255 de 25 de junho de 1997. **Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal (RIISPOA)**. Brasília: 1997. Publicado no Diário Oficial da União de 07/07/1952, Seção 1, p. 107.

BRASIL, MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E DO ABASTECIMENTO. Secretaria de Defesa Agropecuária. Portaria n.º 210, de 10 de novembro de 1998. **Regulamento técnico da inspeção tecnológica e higiênico - sanitária de carne de aves**. Brasília: 1998. Publicado no Diário Oficial da União de 26/11/1998, Seção 1, p. 226. Disponível em: <http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis>. Acesso em 28 maio. 2016.

_____. Instrução Normativa nº 03, de 17 de janeiro de 2000. **Regulamento técnico de métodos de insensibilização para o abate humanitário de animais de açougue**. Brasília: 2000. Publicado no Diário Oficial da União de 24/01/2000, Seção 1, p. 14. Disponível em: <http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis>. Acesso em: 20 maio. 2016.

_____. Instrução Normativa nº 08, de 16 de janeiro de 2002. **Instruções para Autorização de Uso de Produtos (AUP)**. Brasília: 2002. Publicado no Diário Oficial da União de 17/01/2002, Seção 1, p. 0. Disponível em: <http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis>. Acesso em: 20 abril. 2016.

_____. Instrução Normativa nº 17, de 7 de abril de 2006. **Plano Nacional de Prevenção da Influenza Aviária e de Controle e Prevenção da Doença de Newcastle**. Brasília: 2006. Publicado no Diário Oficial da União de 10/04/2006. Disponível em: <http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis>. Acesso em 30 abril. 2016.

COSTA, S. **A saga da avicultura brasileira:** Como o Brasil se tornou o maior exportador mundial de carne de frango. ApexBrasil – Agência Brasileira de Promoção de Exportação e Investimentos. São Paulo: UBABEF, 2011.

FALLAVENA, B. L. C. **Lesões cutâneas em frangos de corte**, 2012. Disponível em: <http://www.avisite.com.br/cet/trabalhos. php?codigo=27>. Acesso em: 20 abril. 2016.

FERREIRA, T. Z.; SESTERHENN, R.; KINDLEIN, L. Perdas econômicas das principais causas de condenações de carcaças de frangos de corte em matadouros-frigoríficos sob inspeção federal no Rio Grande do Sul, Brasil. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 40, n. 1, p. 1021-1026, 2012.

GROFF, A. M.; SILVA, V. L.; STEVANATO, L. K. Causas de condenação parcial de carcaças de frangos. In: CONGRESSO INTERNACIONAL DE ADMINISTRAÇÃO, 2015. **Anais...** Ponta Grossa/PR: Congresso Internacional de Administração, 2015.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA - IBGE. **Sistema IBGE de recuperação automática**. SIDRA – Banco de dados pecuária, 2014. Disponível em: <http://www.sidra.ibge.gov.br/bda/tabela/protabl.asp?c=1094&z=t&o=1&i=P>. Acesso em 19 de abril. 2016.

JACOBSEN. G.; FLÔRES L. M. Condenações por Síndrome Ascítica em Frangos de Corte no Rio Grande do Sul. **Ciência Rural**, v. 38, n. 7, p. 1966-1971, 2008.

JULIAN, R. J.; MCMILLAN, I.; QUINTON, M. The effect of cold and dietary energy on right ventricular hypertrophy, right ventricular failure and ascites in meat-type chickens. **Avian Pathology**, v. 18, n. 4, p. 675-684, 1989.

LIMA, C. L.; MASCARENHAS, M. T. V. L.; CERQUEIRA, R. B. Técnicas operacionais, bem estar animal e perda econômicas no abate de aves. **Archives of Veterinary Science**, v. 19, n. 1, p. 38-45, 2014.

LIMA, M. C. P.; MANFIO, L.; KESKE, L. C. Os pré-requisitos para certificação de BBPP e HACCP. In: CONFERÊNCIA APINCO, 2007, Campinas**. Anais...** Campinas: FACTA, 2007. p. 55-67.

LUDTKE, C. B. et al. **Abate humanitário de Aves**. Rio de janeiro: WSPA, 2010.

MASCHIO, M. M.; RASZL, S. M. Impacto financeiro das condenações post-mortem parciais e totais em uma empresa de abate de frango. **E-tech: Tecnologias para Competitividade Industrial**, Florianópolis, p. 26-38, 2012.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS - OECD. **OECD-FAO Agricultural Outlook 2014 - 2023**. p. 323, 11 dez. 2014. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1787/agr_outlook-2014-en>. Acesso em: 15 mail. 2016.

OLIVEIRA, A. A. et al. Principais causas de condenação ao abate de aves em matadouros frigoríficos registrados no serviço brasileiro de inspeção federal entre 2006 e 2011. **Ciência Animal Brasileira**, v. 17, n. 1, p. 79-89, 2016.

PASCHOAL, E. C.; OTUTUMI, L. K.; SILVEIRA, A. P. Principais causas de condenações no abate de frangos de corte de um abatedouro localizado na região noroeste do Paraná, Brasil. **Arquivo de Ciência Veterinária e Zoologia,** v. 15, n. 2, p. 93-97, 2012.

PESSOA, G. T. et al. Estratégias inovadoras no manejo de frangos de corte em avicultura industrial: fases pré-inicial, inicial, engorda e final. **Revista Pubvet**, v. 7, n. 12, 2013.

REVOLLEDO, L.; FERRREIRA, A. J. P. **Patologia Aviária**. Barueri, São Paulo: Editora Manole, 2009.

RIBEIRO, E. S. **Panorama geral do sistema agroindustrial do frango de corte no DF**. 2013. 35 f. Monografia (Gestão do Agronegócio) - Faculdade Palatina, Universidade de Brasília, Distrito Federal, 2013.

RODRIGUES, W. O. P. et al. Evolução da avicultura de corte no Brasil. **Enciclopédia biosfera**, v. 10, n. 18, p. 1666-1683, 2014.

SANTANA, A. P. et al. Causes of condemnation of carcasses from poultry in slaughterhouses located in State of Goiás, Brasil. **Ciência Rural**, v. 38, n. 9, p. 2587-2592, 2008.

SANTOS, M. M. **Principais causas de condenação de carcaças de frango em abatedouros frigoríficos**. 2010. 17 f. Dissertação (Pós-Graduação em Higiene e Inspeção de Produtos de Origem Animal) - Universidade Castelo Branco, Brasília, 2010.

SESTERHENN, R. **Lesões ulcerativas cutâneas em frangos de corte: estudo histopatológico e epidemiológico**. 2013. 64 f. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias) Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2013.

SILVA, I. M. M. **Caracterização anátomo-histopatológica de fígados de frango contaminados por *Escherichia coli* provenientes de matadouros avícolas da Bahia**. 2009. 90 f. Tese (Doutorado em Ciência Veterinária) Programa de Pós-Graduação em Ciência Veterinária - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2009.

SILVA, V. A. M.; PINTO A. T. Levantamento das condenações de abate de frangos e determinação das causas mais prevalentes em um frigorífico em Santa Catarina. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE AVICULTURA. 21., **Anais...** Porto Alegre, Brasil. 2009. p. 212-213.

SOUZA, I. J. G. de S. et al. Condenações não patológicas de carcaças de frangos em um matadouro-frigorífico sob inspeção federal no estado do Piauí. **Revista Brasileira de Higiene e Sanidade Animal**, v. 10, n. 1, p. 68-77, 2016.

UNIÃO BRASILEIRA DE AVICULTURA (UBABEF). **Relatório anual**. 2014. Disponível em: <http://www.ubabef.com.br/files/publicacoes/8ca705e70f0cb110ae3aed67d29c8842.pdf>. Acesso em: 21 abril. 2016.

_____. **Relatório anual.** 2015. Disponível em: <http://abpa-br.com.br/files/RelatorioAnual_UBABEF_2015_DIGITAL.pdf>. Acesso em 28 maio 2016.

UNITED STATE DEPARTMENT OF AGRICULTURE (USDA). **USDA long-term projections to 2019**. 2015. Disponível em:

<http://www.usda.gov/oce/commodity/projections/USDAAgriculturalProjections2019.pdf>. Acesso em: 25 mar. 2016.

VIOLÀ, M.; TRICHES, D. A. Cadeia de carne de frango: uma análise dos mercados brasileiro e mundial de 2002 a 2010. **Revista Teoria e Evidência Econômica,** v. 21, n. 44, 2015.

ZAFALON, M. **Avicultura quer enfrentar crise com menor produção**. São Paulo: Folha de São Paulo, 21 out. 2008.

Capítulo

8

Fatores que influenciam a diferenciação condrogênica das células-tronco mesenquimais da medula óssea e do tecido adiposo: novas perspectivas

Nathalia Chicon Elert[1]
Higor Azevedo Assis[2]
Jankerle Neves Boeloni[3]

1 INTRODUÇÃO

Células-tronco são células indiferenciadas que possuem um elevado potencial proliferativo, capacidade de auto-renovação, ou seja, são capazes de se multiplicar mantendo seu estado indiferenciado, proporcionando uma reposição ativa de sua população e podem se diferenciar em vários tipos celulares especializados (BYDLOWSKI et al., 2009; DU et al., 2015; LEMISCHKA, 2005). De forma geral, as células-tronco mesenquimais (CTM) apresentam um grande potencial de diferenciação, tanto *in vivo* quanto *in vitro*, em diversos tipos celulares como condrócitos, adipócitos, miócitos e osteócitos (DOMINICI et al., 2006; HOCH; LEACH, 2014). Para induzir a diferenciação condrogênica das CTM, muitas estratégias têm sido exploradas *in vitro*, como a adição de fatores de crescimento no meio de cultivo, estimulação mecânica, uso de biomateriais ou uma combinação dessas técnicas (NESIC et al., 2006). O método mais utilizado é o cultivo em sistema de *pellets* com meio de

[1] Universidade Federal do Espírito Santo, e-mail: nathalia.elert@hotmail.com;
[2] Universidade Federal do Espírito Santo, e-mail: higorassis_@hotmail.com;
[3] Universidade Federal do Espírito Santo, e-mail: jankerle@gmail.com.

diferenciação condrogênico, que consiste de meio básico *Dulbecco's modified Eagle's medium* (DMEM) enriquecido com antibióticos, antifúngicos e 10% de soro fetal bovino, além de fatores como insulina, transferrina, ácido selenoso, dexametasona, ácido ascórbico, ácido linoleico, glicose, ascorbato-2-fosfato, prolina, piruvato de sódio, além de fatores de crescimento como o fator de crescimento transformante beta (TGF-β) (BEANE; DARLING, 2012). O TGF-β e outras citocinas tem o papel de ativar vias de sinalização intracelular que induzem a condrogênese, sendo a maioria por via de ativação das quinases ativadas por mitógenos (MAP [proteínas-quinases ativadas por mitógenos]), como *quinase* regulada por *sinal extracelular* (ERK-1), p38 MAP-quinase, proteína quinase C (*PKC*) e Jun (SEKIYA et al., 2002).

Durante a condrogênese, que dura em torno de três semanas (BARRY et al., 2001; JACKSON et al., 2007; YOKOYAMA et al., 2008), os modelos *tridimensionais* de *cultura* celular (*pellets*) favorecem a indução da primeira fase de diferenciação condrogênica, caracterizado por uma condensação celular, assim como interações célula-célula e célula-matriz extracelular (AULETTA et al., 2011; GIULIANI et al., 2013). Posteriormente, as células mudam de uma morfologia fibroblastoide para redondas a ovais, aumentam de volume (ALMALKI; AGRAWAL, 2016) e sintetizam matriz cartilaginosa que contem, dentre outros constituintes, colágenos tipo I (BARRY et al., 2001; LARSSON et al., 1991), II (BARRY et al., 2001; LARSSON et al., 1991; SOLCHAGA; PENICK; WELTER, 2011) e X (BARRY et al., 2001; LARSSON et al., 1991), proteoglicanos como agrecan (BARRY et al., 2001; LARSSON et al., 1991; SOLCHAGA; PENICK; WELTER, 2011), versican (MEHLHORN et al., 2006), decorin, biglican e fibronectina (BARRY et al., 2001; LARSSON et al., 1991) e glicosaminoglicanos (GAG) (BARRY et al., 2001). Sendo o colágeno II e o agrecan os constituintes da matriz observados em maior quantidade (PUETZER; PETITTE; LOBOA, 2010; SOLCHAGA; PENICK; WELTER, 2011). Por fim, as células adquirem um formato arredondado semelhante ao condroblasto (GIULIANI et al., 2013).

Após a diferenciação, usam-se como marcadores a presença de matriz extracelular, especificamente colágeno II (típico da cartilagem articular) (PITTENGER et al., 1999), proteoglicanos e GAG (VATER; KASTEN; STIEHLER, 2011). Muitos métodos podem ser usados para identificação desses componentes da matriz como azul de toluidina (específico para proteoglicanos), alcian blue e safranina-O (específicas para GAG) (BEANE; DARLING, 2012; SOLCHAGA; PENICK; WELTER, 2011). Os tipos de colágeno podem ser detectados ainda pela técnica de imunohistoquímica ou pela expressão gênica por PCR (reação em cadeia da polimerase) (SOLCHAGA; PENICK; WELTER, 2011).

Além dos fatores já citados, faz-se necessário o entendimento sobre outros fatores que podem influenciar na diferenciação condrogênica tanto de células-tronco mesenquimais da medula óssea quanto do tecido adiposo. Assim, o objetivo da presente revisão é abordar novas perspectivas sobre os fatores que influenciam na diferenciação condrogênica dessas células.

2 FATORES QUE INFLUENCIAM A DIFERENCIAÇÃO CONDROGÊNICA DAS CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS DA MEDULA ÓSSEA E DO TECIDO ADIPOSO

Além do meio de indução básico utilizado para a condrogênese, outros fatores que influenciam ou potencializam a diferenciação condrogênica das CTM têm sido pesquisados (DANISOVIC; VARGA; POLÁK, 2012), incluindo fatores de crescimento, fatores hormonais, transcritos gênicos, estímulo mecânico, condições de hipóxia, uso de biomateriais ou a associação desses fatores (BARRY et al., 2001; BOSNAKOVSKI et al., 2006; DANISOVIC; VARGA; POLÁK, 2012; MARKWAY et al., 2010; SHEN et al., 2009; PUETZER; PETITTE; LOBOA, 2010; SHEN et al., 2010; ZHANG; ZHANG; WANG, 2014).

Os diferentes estágios da diferenciação condrogênica são regulados por fatores de sinalização, como as proteínas morfogênicas ósseas (BMP), fator de crescimento fibroblástico (FGF), TGF-β (BOSNAKOVSKI et al., 2004; HARA et al., 2016), fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1 (IGF-1) (KIM et al., 2014), fator de transcrição Wnt e *Indian hedgehog homolog* (Ihh) (LIU et al., 2014).

Especificamente, as proteínas da superfamília TGF- β desempenham um papel crítico na proliferação (KIM et al., 2014; ZHOU et al., 2016), diferenciação estímulando a biossíntese de glicosaminoglicamos (BARRY et al., 2001) e outras funções em CTM-MO (PUETZER; PETITTE; LOBOA, 2010) e em CTM-TA (KIM et al., 2014**,** ZHOU et al., 2016). Os fatores de crescimento como TGF-β1, TGF-β2 (ESTES et al., 2010; GOUDE; MCDEVITT; TEMENOFF, 2014), e TGF-β3 (GOUDE et al. 2014; PARK et al., 2011) potencializam a diferenciação condrogênica das CTM-TA (PUETZER; PETITTE; LOBOA, 2010), porém sabe-se que o TGF-β2 e TGF-β3 duplicam a deposição de glicosaminoglicanos em comparação ao TGF-β1 e proporcionam uma maior deposição de colágeno do tipo II (BARRY et al., 2001).

O IGF-I é um fator de crescimento *in vivo* que também atua no desenvolvimento e homeostase da cartilagem (BONNEVIE; PUETZER; BONASSAR, 2014; ZHOU et al., 2016). Foi relatado que o IGF-I recruta condrócitos para reparação da cartilagem, portanto a diminuição de IGF-I pode conduzir a osteoartrite (ZHOU et al., 2016). Estudos demonstraram

que o IGF-I pode modular a diferenciação condrogênica *in vitro* das CTM independente do TGF-β (LI et al., 2012).

A proteína morfogênica óssea -2 (BMP-2) é um membro da super-família TGF-β (SHU et al., 2011) que estão envolvidas em todas as fases de diferenciação condrogênica (CARON et al., 2013; RENNER; KIM; LIU, 2012). Elas também desempenham um papel essencial na regulação da proliferação de condrócitos e maturação durante o desenvolvimento endocondral (SHU et al., 2011) e ainda são capazes de regular diretamente a expressão de vários genes específicos de condrócitos (VAN DER KRAAN; DAVIDSON; VAN DEN BERG, 2010). Esta proteína tem mostrado eficiência na diferenciação condrogênica *in vitro* de CTM de diferentes origens teciduais, como CTM-MO (SEKIYA et al., 2005) e CTM-TA (AN et al., 2010). Além da BMP-2, outros membros da família da proteína morfogênica óssea, como BMP-6 e BMP-7 também são fatores importantes para a diferenciação condrogênica das CTM-TA (ESTES et al., 2010; KIM; IM, 2009; KNIPPENBERG et al., 2006) e das CTM-MO (SEKIYA; COLTER; PROCKOP, 2001; SHEN et al., 2010)**.** A BMP-4 aumenta a formação de matriz cartilaginosa por estimular a síntese de colágeno II e agrecan e diminui a expressão de colágeno tipo I e X (MILJKOVIC; COOPER; MARRA, 2008). A BMP-7 potencializa a diferenciação condrogênica por aumentar a expressão de colágeno tipo II (SHEN et al., 2009) e por promover a síntese da matriz extracelular condrogênica *in vitro* em condrócitos articulares humanos normais e osteoartríticos (BESSA; CASAL; REIS, 2008). BMP-2 promove a proliferação celular e a síntese da matriz em condrócitos articulares humanos e condrócitos da placa de crescimento e também no desemvolvimento de membros de ratos (MININA et al., 2001). A BMP-2 também demonstrou regular a expressão e atividade de Sox9 (PAN et al., 2008). Além disso, estudos relatam que a BMP-2 possui um maior potencial para induzir o desenvolvimento condrogênico de CTM quando comparado a outros fatores de crescimento, tais como BMP-4, BMP-6, BMP-7, TGF- β e IGF-1 (KURTH et al., 2007; SEKIYA et al., 2005).

Estudos demonstram uma potencialização na diferenciação condrogênica das CTM-TA (ESTES et al., 2010; KIM; IM, 2009) quando é utilizada a combinação de TGF-β3 e BMP-6 (ESTES et al., 2010), TGF-β2 e BMP-7 (KIM; IM, 2009), e TGF-β1 e BMP-2, onde neste ocorre um aumento da expressão de colágeno I e II e a síntese de glicosaminoglicanos (MEHLHORN et al., 2007). Quarto e Longaker (2006) concluíram que o TGF- β combinado com baixas concentrações de BMP-6 e FGF-2 promovem a condrogênese das CTM-TA proporcionando aumentos significativos dos fatores de transcrição SOX9 e aumento na composição total de glicosaminoglicano, enquanto inibe a osteogênese.

O fator de crescimento fibroblástico 2 (FGF-2) também conhecido como FGF básico

(FGFb) é outro fator que melhora a diferenciação condrogênica *in vitro* das CTM-TA (CHIOU, XU, LONGAKER, 2006) por potencializar a expressão de colágeno tipo II e X. Nas CTM-MO aumenta a formação de matriz cartilaginosa (SOLCHAGA et al., 2005), inclusive aumentando a produção de proteoglicanos (PARK; NA, 2008). Em CTM de humanos (ITO; SAWADA; FUJIWARA, 2008) é o fator de crescimento mais frequentemente administrado durante a sua expansão (HAGMANN et al., 2013). Hagmann et al. (2013) concluiram que a suplementação de FGF-2 juntamente com meio de cultura condrogênico proporcionam mudanças em marcadores de superfície de CTM-MO de humanos.

Estudos demonstram ainda uma potencialização na diferenciação condrogênica das CTM-MO quando existe a combinação de fatores. Nesse contexto, a combinação de TGF-β3 e BMP-2 (SCHMITT et al., 2003; SHEN et al., 2009) aumenta a expressão de colágeno II (SCHMITT et al., 2003); a combinação de TGF-β3 e BMP-7 aumenta a síntese de proteoglicanos e a expressão de colágeno II e Sox9 (SHEN et al., 2010); a combinação de TGF-β3 e BMP-6 aumenta a expressão de colágeno X (SEKIYA; COLTER; PROCKOP, 2001), e; por fim, a combinação de TGF-β1 com o IGF-1 estimula a proliferação de CTM-MO e a diferenciação condrogênica dessas células por estimular a expressão de colágeno II e Sox9 (LONGOBARDI et al., 2006).

Os fatores de transcrição Wnts também têm uma importante função moduladora na condrogênese, agindo na diferenciação e na regulação da placa de crescimento de condrócitos (WANG; SHAO; BALLOCK, 2007). Estudos relatam que Wnt-4 age como um regulador positivo na diferenciação terminal dos condrócitos ao passo que bloqueia o início da condrogênese e Wnt-5 possui efeito oposto em um modelo de pintainho (CHURCH et al., 2002). Além disso, outros estudos relatam que a via canônica Wnt3a aumenta a condrogênese induzida por BMP-2 e Wnt3a por sua vez, regula a expressão de BMP-2, sugerindo um circuito regulador durante a diferênciação condrogênica (KOLF; CHO, TUAN, 2007). Liu et al. (2014) estudaram o papel da Wnt11 na diferenciação das CTM-MO de ratas em condrócitos. Os resultados obtidos mostraram que a superexpressão de Wnt11 estimulou a expressão dos genes Sox9, Runx2, e Ihh, que são reguladores condrogênicos. Além disso, a sobre-expressão de Wnt11, em sinergismo com TGF-β, promove a condrogênese (LIU et al., 2014).

Diferentes fatores de transcrição (SOX9, SOX5, SOX6, Slug, TRSP1 e GDF5) são capazes de induzir a diferenciação e possuem papel crucial na condensação mesenquimal (GIULIANI et al., 2013). O fator de transcrição considerado mais importante para a diferenciação condrogênica é o SOX9, pois é expresso em todos os condrócitos **(**DIEDERICHS et al., 2016). Sox9 é um fator de transcrição que controla a expressão de genes-chave na

condrogênese (DIEDERICHS et al., 2016; WANG et al., 2014). Esse fator interage especificamente com dois sítios de ligação no *domínio HMG* das *proteínas* e ativa elementos promotores de Col2a1, Col9a1, Col11a2 e aggrecan (GIULIANI et al., 2013). Além disso, TNF-α (fator de necrose tumoral-alfa) também está relacionado com a regulação positiva da expressão do gene Sox9 (JAGIELSKI et al., 2014). Sabe-se também que a combinação de Sox9 com Sox5 e Sox6 estimulam a condrogênese (PARK et al., 2011) levando à produção de matriz extracelular, incluindo colágeno tipo II e agrecan que são importantes para a formação da cartilagem (BEANE; DARLING, 2012).

A proteína dedo de zinco (ZNF145) é um fator de transcrição que foi relatado por desempenhar um papel na condrogênese (LIU et al., 2007). Liu e colaboradores (2011) pesquisaram o papel da ZNF145 na diferenciação condrogênica e relataram que a inibição desse fator de transcrição diminui a diferenciação condrogênica, ao passo que a sobre-expressão aumenta a expressão de Sox9 e consequentemente a condrogênese.

As proteínas Smads também funcionam como reguladores na diferenciação condrogênica das CTM (ZHANG et al., 2015). Smads são uma família de proteínas envolvidas na translocação de sinais dos receptores TGF- β. Estudos relatam que Smad 2 e 3 são dependentes de TGF-β1 nas fases iniciais de condrogênese (ZHANG et al., 2015). Furumatsu et al. (2005) demonstraram que Smad3 se liga ao fator de transcrição Sox9, alterando de forma negativa a diferenciação condrogênica.

O *Runt-related trasnscription fator 2* (Runx2) é um gene essencial para a diferenciação osteoblástica e ativa e/ou suprime outros genes envolvidos na formação do tecido ósseo. *In vitro*, atua sinergicamente com o TGF-β aumentando a expressão de interleucina 11 (IL-11), que por sua vez promove a diferenciação condrogênica (ENOMOTO et al., 2004). Enquanto osterix, em baixas expressões, é supressor da condrogênese (TOMINAGA et al., 2009).

Pesquisas demonstram ainda que os condrócitos podem aumentar a diferenciação condrogênica das CTM-MO quando cultivados em sistema de co-cultura, promovendo aumento da produção de proteoglicanos e maior expressão de Sox9, agrecan e colágeno II (COOKE et al., 2011).

Assim, além da diferenciação condrogênica de CTM depender de uma interação complexa de vários fatores de crescimento e de outros suplementos, sabe-se que a concentração e o tempo de exposição a esses fatores também são importantes, uma vez que a superexpressão ou baixa expressão de genes relacionados com a condrogênese pode não produzir o fenótipo de cartilagem desejado (DIEKMAN; ESTES; GUILAK, 2010).

Outros fatores como o uso de *scaffolds* (arcabouços 3D e/ou biomateriais) também

podem potencializar a diferenciação condrogênica. Isto ocorre devido a sustentação mecânica, proteção e sustentabilidade que essas estruturas fornecem as células (NESIC et al., 2006). Por exemplo, quando CTM-MO foram cultivadas em hidrogel de fibrina associado a TGF-β3, houve um aumento da diferenciação condrogênica dessas células (PARK et al., 2011).

A idade do doador é outro fator que pode interferir na diferenciação condrogênica das CTM (BYDLOWSKI et al., 2009) visto que a diferenciação condrogênica de CTM-MO de ratos e de humanos diminui em indivíduos idosos (KANAWA et al., 2013) ocorrendo uma diminuição na produção de glicosaminoglicanos e na expressão de Sox9 e colágeno II (KANAWA et al., 2013). No entanto, um estudo relatou que o potencial condrogênico de CTM-MO não é alterado em indivíduos idosos e com osteoartrite (SCHARSTUHL et al., 2007).

Fatores hormonais também têm sido considerados importantes para a diferenciação condrogênica de CTM-MO (DERFOUL et al., 2006; KARL et al., 2014; RANDAU et al., 2013) e das CTM-TA (KIM; KIM; IM, 2008; SADEGHI et al., 2015). O peptídeo relacionado ao paratormônio (PTHrP) promove a diferenciação condrogênica de CTM-TA aumentando a expressão de SOX9 e COL2A1 e a formação de glicosaminoglicanos, porém inibe a hipertrofia celular (KIM; KIM; IM, 2008). Ao contrário, o estrógeno tem efeito negativo sobre a diferenciação condrogênica de CTM-TA de humanos, inibindo a expressão de colágeno tipo II e reduzindo a expressão de aggrecan (SADEGHI et al., 2015). Em CTM-MO, o PTHrP influencia a diferenciação de uma forma dose dependente, ou seja, em concentrações baixas a moderadas (0,1 a 10nM) aumenta a diferenciação em células de ratos por aumentar a expressão de Sox9, colágeno tipo II e PTH1R; no entanto, em altas concentrações (100nM) produz o efeito é oposto (ZHANG; KUMAGAI; SAITO, 2014).

A dexametasona, na dose de 1μM, potencializa a diferenciação condrogênica de CTM-MO de bovinos por aumentar a produção de glicosaminoglicanos e a expressão de colágeno X (RANDAU et al., 2013). Em humanos, a dexametasona (100nM) em associação com TGF-β3, potencializa a diferenciação condrogênica de CTM-MO, pois aumenta a produção de proteoglicanos e a expressão de agregan, colágeno tipo II e colágeno tipo XI (DERFOUL et al., 2006).

Wang, Shao e Ballock (2007) relataram que o hormônito tireoidiano regula a fase terminal da diferenciação dos condrócitos da placa epifisária cultivada *in vitro*, aumentando a expressão de Wnt-4, promovendo um maior acúmulo de β-caterina, além de aumentar a atividade transcricional de TCF/ LEF, que são um grupo de fatores de transcrição envolvidos na via de sinalização Wnt onde recrutam o coativador β-caterina (EASTMAN; GROSSCHEDL, 1999), expressão de Wnt/β-caterina para o gene alvo *Runx2/cbfa1*. A sobre-

expressão de Wnt-4 ou a forma estabilizada de β-caterina promove o crescimento placa diferenciação terminal de condrócitos e imita o efeito do T3, sugerindo que a sinalização de Wnt caônica está envolvida na maturação do hormônio da tireóide na placa de crescimento, concluindo então que o T3 é um modulador positivo da via Wnt (WANG; SHAO; BALLOCK, 2007).

In vitro, a T3 tem efeito sobre a diferenciação condrogênica das CTM do cordão umbilical humano via SRC2 (*steroid receptor co-activator 2*). Os SRCs são uma família de co-reguladores que interagem com o receptor de tiróide-b (TRb). Como resultado, a T3, em na dose de 100 ng/ml estimula a condrogênese sem estimular a hipertrofia e que esse efeito é mediado via SRC2. Relataram também que o efeito de T3 na condrogênese é modulada pela via Wnt independente do componente Lrp5/6 (FERNANDEZ-PERNAS et al., 2016), que são proteínas inicialmente propostas como co-receptoras para proteínas Wnt (GALÁN-DÍEZ et al., 2016).

Em cultura de CTM-MO de humanos, a triiodotironina (T3, 1nM) mediada pela BMP-4 estimula a hipertrofia dessas células (KARL et al., 2014). No entanto, em cultura de CTM-MO de bovinos, a T3 (100nM) não melhora a diferenciação, pois não altera a expressão de colágeno tipo X nem a produção de glicosaminoglicanos (RANDAU et al., 2013).

3 REFERÊNCIAS

ALMALKI, S. G.; AGRAWAL, D. K. Key transcription factors in the differentiation of mesenchymal stem cells. **Differentiation**, v. 92, n. 1-2, p. 41-51, 2016.

AN, C. et al. IGF-1 and BMP-2 Induces differentiation of adipose-derived mesenchymal stem cells into chondrocytes-like cells. **Annals of Biomedical Engineering**, v. 38, n. 4, p. 1647-1654, 2010.

AULETTA, J. J. et al. Fibroblast growth factor-2 enhances expansion of human bone marrow-derived mesenchymal stromal cells without diminishing their immunosuppressive potential. **Stem Cells International**, v. 2011, p. 10, 2011.

BARRY, F. et al. Chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells from bone marrow: differentiation-dependent gene expression of matrix components. **Experimental Cell Research**, v. 268, n. 2, p. 189-200, 2001.

BEANE, O.A.; DARLING, E.M. Isolation, characterization, and differentiation of stem cells for cartilage regeneration. **Annals of Biomedical Engineering**, v. 40, n. 10, p. 2079-2097, 2012.

BESSA, P. C.; CASAL, M.; REIS, R. L. Bone morphogenetic proteins in tissue engineering: the road from laboratory to clinic, part II (BMP delivery**). Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine**, v. 2, n. 2-3, p. 81-96, 2008.

BONNEVIE, E. D.; PUETZER, J. L.; BONASSAR; L. J. Enhanced boundary lubrication properties of engineered menisci by lubricin localization with insulin-like growth factor I treatment. **Journal of Biomechanics**, v. 47, n. 9, p. 2183-2188, 2014.

BOSNAKOVSKI, D. et al. Chondrogenic differentiation of bovine bone marrow mesenchymal stem cells in pellet cultural system. **Experimental Hematology**, v. 32, n. 5, p. 502-509, 2004.

_____. Gene expression profile of bovine bone marrow mesenchymal stem cell during spontaneous chondrogenic differentiation in pellet culture system. **The Japanese journal of veterinary research**, v. 53, n. 3-4, p. 127-139, 2006.

BYDLOWSKI, S. P. et al. Características biológicas das células-tronco mesenquimais. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 31, n. 1, p. 25-35, 2009.

CARON, M. M. J. et al. Hypertrophic differentiation during chondrogenic differentiation of progenitor cells is stimulated by BMP-2 but suppressed by BMP-7. **Osteoarthritis Research Society International**, v. 21, n. 4, p. 604-613, 2013.

CHIOU, M.; XU, Y.; LONGAKER, M. T. Mitogenic and chondrogenic effects of fibroblast growth factor-2 in adipose-derived mesenchymal cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 343, n. 2, p. 644-652, 2006.

CHURCH, V. et al. Wnt regulation of chondrocyte differentiation. **Journal of Cell Science**, v. 115, n. 4, p. 4809-4818, 2002.

COOKE, M. E. et al. Structured three-dimensional co-culture of mesenchymal stem cells with chondrocytes promotes chondrogenic differentiation without hypertrophy. **Osteoarthritis and Cartilage**, v. 19, n. 10, p. 210-1218, 2011.

DANISOVIC, L.; VARGA, I.; POLÁKI, S. Growth factors and chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells. **Tissue and Cell**, v. 44, n. 2, p. 69-73, 2012.

DERFOUL, A. et al. Glucocorticoids promote chondrogenic differentiation of adult human mesenchymal stem cells by enhancing expression of cartilage extracellular matrix genes. **Stem Cells**, v. 24, n. 6, p. 1487-1495, 2006.

DIEDERICHS, S. et al. Differential regulation of SOX9 protein during chondrogenesis of induced pluripotent stem cells versus mesenchymal stromal cells: a shortcoming for cartilage formation. **Stem Cells and Development**, v. 25, n. 8, p. 598-609, 2016.

DIEKMAN, O. B.; ESTES, B. Y.; GUILAK, F. The effects of BMP6 overexpression on adipose stem cell chondrogenesis: interactions with dexamethasone and exogenous growth factors. **Journal of Biomedical Materials Research Part A**, v. 93, n. 3, p. 994-1003, 2010.

DOMINICI, M. et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. **Cytotherapy**, v. 8, n. 4, p. 315-317, 2006.

DU, X. et al. Endometrial mesenchymal stem cells isolated from menstrual blood by adherence. **Stem Cells International**, v. 2016, p. 8, 2015.

EASTMAN Q.; GROSSCHEDL, R. Regulation of LEF-1/TCF transcription factors by Wnt and other signals. **Current Opinion in Cell Biology**, v. 11, n. 2, p. 233-240, 1999.

ENOMOTO, H. et al. Runx2 deficiency in chondrocytes causes adipogenic changes in vitro. **Journal of cell science**, v. 117, n. 3, p. 417-425, 2004.

ESTES, B. T. et al. Isolation of adipose derived stem cells and their induction to a chondrogenic phenotype. **Nature protocols**, v. 5, n. 7, p. 1294-1311, 2010.

FERNANDEZ-PERNAS, P. et al. 3, 3', 5-triiodo-L-thyronine increases in vitro chondrogenesis of mesenchymal stem cells from human umbilical cord stroma through SRC2. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 117, n. 9, p. 2097-2108, 2016.

FURUMATSU, T. et al. Smad3 induces chondrogenesis through the activation of SOX9 via CREB-binding protein/p300 recruitment. **Journal of Biological Chemistry**, v. 280, n. 9, p. 8843-8350, 2005.

GALÁN-DÍEZ, M. et al. Normal hematopoiesis and lack of β-catenin activation in osteoblasts of patients and mice harboring Lrp5 gain-of-function mutations'. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1863, n. 3, p. 490-498, 2016.

GIULIANI, N. et al. New insights into osteogenic and chondrogenic differentiation of human bone marrow mesenchymal stem cells and their potential clinical applications for bone regeneration in pediatric orthopaedics. **Stem Cells International**, v. 2013, p. 1-11, 2013.

GOUDE, M. C.; MCDEVITT, T. C.; TEMENOFF, J. S. Chondroitin sulfate microparticles modulate transforming growth factor-β1-indcuced chondrogenesis of human mesenchymal stem cell spheroids. **Cells Tissues Organs**, v. 199, n. 2-3, p. 117-130, 2014.

HAGMANN, S. et al. FGF-2 addition during expansion of human bone marrow-derived stromal cells alters MSC surface marker distribution and chondrogenic differentiation potential. **Cell Proliferation**, v. 46, n. 4, p. 396-407, 2013.

HARA, E. S. et al. Antagonistic effects of insulin and TGF-β3 during chondrogenic differentiation of human BMSCs under a minimal amount of factors. **Cells Tissues Organs**, v. 201, n. 2, p. 88-96, 2016.

HOCH, A. I.; LEACH, J. K. Concise review: optimizing expansion of bone marrow mesenchymal stem/stromal cells for clinical applications. **Stem Cells Translational Medicine**, v. 3, n. 5, p. 643-652, 2014.

ITO, T.; SAWADA, R.; FUJIWARA, Y. FGF-2 increases osteogenic and chondrogenic differentiation potentials of human mesenchymal stem cells by inactivation of TGF-*b* signaling. **Cytotechnology**, v. 56, n. 1, p. 1-7, 2008.

JACKSON, L. et al. Adult mesenchymal stem cells: differentiation potential and therapeutic applications. **Journal of Postgraduate Medicine**, v. 53, n. 2, p. 121-127, 2007.

JAGIELSKI, M. et al. The influence of IL-10 and TNF alpha on chondrogenesis of human mesenchymal stromal cell sin three-dimensional cultures. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 15, n. 9, p. 15821-15844, 2014.

KANAWA, M. et al. Age-dependent decrease in the chondrogenic potential of human bone marrow mesenchymal stromal cells expanded with fibroblast growth factor-2. **Cytotherapy**, v. 15, n. 9, p. 1062-1072, 2013.

KARL, A. et al. Thyroid hormone-induced hypertrophy in mesenchymal stem cell chondrogenesis is mediated by bone morphogenetic protein-4. **Tissue Engineering Part A**, v. 20, n. 1-2, p. 178-188, 2014.

KIM, H. J.; IM, M. D. Combination of transforming growth fator-beta2 and bone morphogenetic protein 7 enhances chondrogenesis from adipose tissue-derived mesenchymal stem cells. **Tissue Engineering Part A**, v. 15, n. 7, p. 1543-1551, 2009.

KIM, Y. J.; KIM, H. J.; IM, G. I. PTHrP promotes chondrogenesis and suppresses hypertrophy from both bone marrow-derived and adipose tissue-derived MSCs. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 373, n. 1, p. 104-108, 2008.
KIM, Y. et al. Overexpression of TGF-b1 enhances chondrogenic differentiation and proliferation of human synovium-derived stem cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 450, n. 4, p. 1593-1599, 2014.

KNIPPENBERG, M. et al. Osteogenesis versus chondrogenesis by BMP-2 and BMP-7 in adipose stem cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 342, n. 3, p. 902-908, 2006.

KOLF, C. M.; CHO, E.; TUAN, R. S. Biology of adult mesenchymal stem cells: regulation of niche, self-renewal and differentiation. **Arthritis Research & Therapy**, v. 204, n. 9, p. 1-10, 2007.

KURTH, T. et al. Chondrogenic potential of human synovial mesenchymal stem cells in alginate. **Osteoarthritis Cartilage**, v. 15, n. 10, p. 1178-1189, 2007.

LARSSON, T. et al. Cartilage matrix proteins. A basic 36-kDa protein with a restricted distribution to cartilage and bone. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 266, n. 30, p. 20428-20433, 1991.

LEMISCHKA, I. R. Stem cell biology: a view toward the future. **Annals of the New York Academy Sciences**, v. 1044, p. 132-138, 2005.

LI, J. et al. Dynamic compression of rabbit adipose-derived stem cells transfected with insulin-like growth factor 1 in chitosan/gelatin scaffolds induces chondrogenesis and matrix biosynthesis. **Journal of Cellular Physiology**, v. 227, n. 5, p. 2003-2012, 2012.

LIU, S. et al. Overexpression of Wnt11 promotes chondrogenic differentiation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells in synergism with TGF-b. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 390, n. 1-2, p. 123–131, 2014.

LIU, T. M. et al. Identification of common pathways mediating differentiation of bone marrow- and adipose tissue-derived human mesenchymal stem cells into three mesenchymal lineages. **Stem Cells**, v. 25, n. 3, p. 750-760, 2007.

_____. Zinc-finger protein 145, acting as an upstream regulator of SOX9, improves the differentiation potential of human mesenchymal stem cells for cartilage regeneration and repair. **Arthritis & Rheumatism**, v. 63, n. 9, p. 2711-2720, 2011.

LONGOBARDI, L. et al. Effect of IGF-I in the chondrogenesis of bone marrow mesenchymal stem cells in the presence or absence of TGF-beta signaling. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 21, n. 4, p. 626-636, 2006.

MARKWAY, B. D et al. Enhanced chondrogenic differentiation of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells in low oxygen environment micropellet cultures. **Cell Transplantation**, v. 19, n. 1, p. 29-42, 2010.

MEHLHORN, A. T. et al. Differential effects of BMP-2 and TGF-β1 on chondrogenic differentiation of adipose derived stem cells. **Cell Proliferation**, v. 40, n. 6, p. 809-823, 2007.

MEHLHORN, A.T. et al. Differential expression pattern of extracellular matrix molecules during chondrogenesis of mesenchymal stem cells from bone marrow and adipose tissue. **Tissue Engineering**, v. 12, n. 10, p. 2853-2862, 2006.

MILJKOVIC, N. D.; COOPER, G.M.; MARRA, K. G. Chondrogenesis, bone morphogenetic protein-4 and mesenchymal stem cells. **Osteoarthritis Cartilage**, v. 16, n. 10, p.1121-1130. 2008.

MININA, E. et al. BMP and Ihh/PTHrP signaling interact to coordinate chondrocyte proliferation and differentiation. **Development**, v. 128, n. 22, p. 4523-4534, 2001.

NESIC, D. et al. Cartilage tissue engineering for degenerative joint disease. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 58, n. 2, p. 300-322, 2006.

PAN, Q. et al. Sox9, a key transcription factor of bone morphogenetic protein-2-induced chondrogenesis, is activated through BMP pathway and a CCAAT box in the proximal promoter. **Journal of Cellular Physiology**, v. 217, n. 1, p. 228-241, 2008.

PARK, J. S. et al. Chondrogenic potential of stem cells derived from amniotic fluid, adipose tissue, or bone marrow encapsulated in fibrin gels containing TGF-β3. **Biomaterials**, v. 32, n. 32, p. 8139-8149, 2011.

PARK, K. H.; NA, K. Effect of growth factors on chondrogenic differentiation of rabbit mesenchymal cells embedded in injectable hydrogels. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 106, n. 1, p. 74-79, 2008.

PITTENGER, M. F. et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. **Science**, v. 284, n. 5411, p. 143-147, 1999.

PUETZER, J. L.; PETITTE, J. N.; LOBOA, E. G. Comparative review of growth factors for induction of three-dimensional in vitro chondrogenesis in human mesenchymal stem cells isolated from bone marrow and adipose tissue. **Tissue Engineering Part B**, v. 16, n. 4, p. 435-444, 2010.

QUARTO, N.; LONGAKER, M. T. FGF-2 inhibits osteogenesis in mouse adipose tissue-derived stromal cells and sustains their proliferative and osteogenic potential state. **Tissue Engineering**, v. 12, n. 6, p. 1405-1418, 2006.

RANDAU, T. M. et al. The effect of dexamethasone and triiodothyronine on terminal differentiation of primary bovine chondrocytes and chondrogenically differentiated mesenchymal stem cells. **Plos One**, v. 8, n. 8, p. 72-73, 2013.

RENNER, J. N.; KIM, Y.; LIU, J. C. Bone Morphogenetic Protein-Derived Peptide Promotes Chondrogenic Differentiation of Human Mesenchymal Stem Cells. **Tissue Engineering: Part A**, v. 18, n. 23-24, p. 2581-2589, 2012.

SADEGHI, F. et al. The effect of estrogen on the expression of cartilage-specific genes in the chondrogenesis process of adipose-derived stem cells. **Advanced Biomedical Research,** v. 11, n. 4, p. 43, 2015.

SCHARSTUHL, A. et al. Chondrogenic potential of human adult mesenchymal stem cells is independent of age or osteoarthritis etiology. **Stem Cells**, v. 25, n. 12, p. 3244-3251, 2007.

SCHMITT, B. et al. BMP2 initiates chondrogenic lineage development of adult human mesenchymal stem cells in high-density culture. **Differentiation**, v. 71, n. 9-10, p. 567-577, 2003.

SEKIYA, I.; COLTER, D.C.; PROCKOP, D.J. BMP-6 enhances chondrogenesis in a subpopulation of human marrow stromal cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 284, n. 2, p. 411-418, 2001.

SEKIYA; I. et al. Expansion of human adult stem cells from bone marrow stroma: conditions that maximize the yields of early progenitors and evaluate their quality. **Stem Cells**, v. 20, n. 6, p. 530-541, 2002.

_____. Comparison of effect of BMP-2, -4, and -6 on in vitro cartilage formation of human adult stem cells from bone marrow stroma. **Cell and Tissue Research**, v. 320, n. 2, p. 269-276, 2005.

SHEN, B. et al. BMP-2 enhances TGF-β3-mediated chondrogenic differentiation of human bone marrow multipotent mesenchymal stromal cells in alginate bead culture. **Tissue Engineering Part A**, v. 15, n. 6, p. 1311-1320, 2009.

_____. The role of BMP-7 in chondrogenic and osteogenic differentiation of human bone marrow multipotent mesenchymal stromal cells in vitro. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 109, n. 2, p. 406-416, 2010.

SHU, B. et al. BMP2, but not BMP4, is crucial for chondrocyte proliferation and maturation during endochondral bone development. **Journal of Cell Science**, v. 124, n. Pt.20, p. 3428-3440, 2011.

SOLCHAGA, L. A. et al. FGF-2 enhances the mitotic and chondrogenic potentials of human adult bone marrow-derived mesenchymal stem cells. **Journal of Cellular Physiology**, v. 203, n. 2, p. 398-409, 2005.

SOLCHAGA, L. A.; PENICK, K.; WELTER, J. F. Chondrogenic differentiation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells: tips and tricks. **Methods in Molecular Biology**, v. 698, p. 253-278, 2011.

TOMINAGA, H. et al. Expression of osterix inhibits bone morphogenetic protein-induced chondrogenic differentiation of mesenchymal progenitor cells. **Journal of Bone and Mineral Metabolism**, v. 27, n. 1, p. 36-45, 2009.

VAN DER KRAAN, P. M.; DAVIDSON, E. N. B.; VAN DEN BERG, W. B. Bone morphogenetic proteins and articular cartilage: to serve and protect or a wolf in sheep clothing's? **Osteoarthritis Cartilage**, v. 18, n. 6, p. 735-741, 2010.

VATER, C.; KASTEN, P.; STIEHLER, M. Culture media for the differentiation of mesenchymal stromal cells. **Acta Biomaterialia**, v. 7, n. 2, p. 463-477, 2011.

WANG, L.; SHAO, Y. Y.; BALLOCK, R. T. Thyroid hormoneiInteracts with the Wnt/b-catenin signaling pathway in the terminal differentiation of growth plate chondrocytes. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 22, n. 12, p. 1988-1905, 2007.

WANG, Z.H. et al. Delivery of the Sox9 gene promotes chondrogenic differentiation of human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells in an in vitro model. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 47, n. 4, p. 279-86, 2014.

YOKOYAMA, M. et al. Influence of fetal calf serum on differentiation of mesenchymal stem cells to chondrocytes during expansion. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 106, n. 1, p. 46-50, 2008.

ZHANG, X.; ZHANG, Y.; WANG, Z. The effect of non-growth factors on chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells. **Cell and Tissue Banking**, v. 15, n. 3, p. 319-327, 2014.

ZHANG, Y.; KUMAGAI, K.; SAITO, T. Effect of parathyroid hormone on early chondrogenic differentiation from mesenchymal stem cells. **Journal of Orthopaedic Surgery and Research**, v. 9, n. 1, p. 68-74, 2014.

ZHANG, Z. et al. MiR-455-3p regulates early chondrogenic differentiation via inhibiting Runx2. **FEBS Letters**, v. 589, n. 23, p. 3671-3678, 2015.

ZHOU, Q. et al. IGF-I induces adipose derived mesenchymal cell chondrogenic differentiation in vitro and enhances chondrogenesis in vivo. **In Vitro Cellular & Developmental Biology Animal**, v. 52, n. 3, p. 356-354, 2016.

Capítulo

9

Fitoterapia na Medicina Veterinária

Roselena Abreu Guedes[1]
Larice Tosi Marques[2]
Marcele Temporim Novaes[3]
Winner Duque Rodrigues[4]
Juliana A. Severi[5]

1 INTRODUÇÃO

O homem tem buscado o conhecimento sobre as plantas e sua utilização como medicamentos através dos tempos (SOUSA et al., 2011). O descobrimento de tais propriedades curativas no início ocorreu de maneira meramente intuitiva ou, pela observação dos animais que quando doentes procuravam nas ervas a cura para as suas afecções (OLIVEIRA; SILVA, 1994).

No campo da medicina veterinária, a utilização de plantas medicinais no tratamento ou prevenção das enfermidades rotineiras na criação de animais é uma atividade que passa entre várias gerações e que segue sendo utilizada por pessoas principalmente da zona rural. Muitos fatores têm contribuído para o aumento da utilização deste recurso, sendo alguns deles o alto custo dos medicamentos industrializados, o difícil acesso da população à assistência médica,

[1] Universidade Federal do Espírito Santo, e-mail: rosinhafarma25@gmail.com;
[2] Universidade Federal do Espírito Santo, e-mail: marques.larice@hotmail.com;
[3] Universidade Federal do Espírito Santo, e-mail: marcelle_temporim@hotmail.com;
[4] Universidade Federal do Espírito Santo, e-mail: winnerduque@gmail.com;
[5] Universidade Federal do Espírito Santo, e-mail: juseveri@yahoo.com.br.

como também a tendência ao uso de produtos de origem natural (BERNARDES; SILVA; MOLEIRO, 2011).

Diante da carência financeira, a fitoterapia tem se mostrado como alternativa viável para a maioria dos brasileiros. Se por um lado existe a necessidade de intensificação de estudos com potenciais florísticos do Brasil, buscando a descoberta ou comprovação de plantas usadas popularmente, por outro é preciso reverter os conhecimentos adquiridos em benefícios das pessoas e obter um maior envolvimento da classe médica (ALBUQUERQUE, 1989).

Com a importância da fitoterapia e a escassez de pesquisas em Medicina Veterinária, torna-se necessário estudar e aprofundar os efeitos terapêuticos das plantas inseridas no contexto agroecológico e social da população, pois mudanças no uso da terra devido à urbanização podem destruir o habitat das plantas úteis. A perda do conhecimento medicinal tradicional em uma cultura que submetida a uma mudança rápida é tão irreversível quanto a perda da espécie da planta. Consequentemente, esforços devem ser feitos para documentar o uso medicinal das plantas antes que muitas destas sejam eliminadas, ou ainda que curandeiros abandonem suas práticas médicas (JOSHI; JOSHI, 2000).

Neste capítulo será discutido o uso das plantas medicinais na medicina veterinária e na medicina popular bem como seus avanços.

2 USO DE PLANTAS MEDICINAIS NA MEDICINA VETERINÁRIA

O uso das plantas medicinais na terapêutica veterinária foi enfatizado como uma alternativa de tratamento viável, segura, de fácil obtenção e baixo custo. Da mesma forma, os conhecimentos acumulados, foram repassados para outras gerações. Segundo Amoroso (1996) a sociedade humana acumula um acervo de informações sobre o ambiente que o cerca, possibilitando-o a interagir com ele e promovendo suas necessidades de sobrevivência.

A utilização dos fitoterápicos em medicina veterinária está retomando gradativamente o espaço ocupado em tempos remotos. A procura por esta terapia parece estar associada ao fato de que os produtos da indústria farmacêutica que, causam efeitos indesejáveis, que em geral, são de alto custo o que leva também a prejuízos em decorrência do uso abusivo dos medicamentos. Porém, é necessário ter a consciência de que os fitoterápicos são medicamentos, necessitando, portanto de critérios para a sua comercialização e consumo (MARINHO et al., 2007).

O ressurgir desse recurso terapêutico nos dias de hoje, apresenta-se como uma alternativa de cura, menos agressiva ao paciente e viável para os animais e a maioria da

população brasileira. Muitas plantas são, tradicionalmente, conhecidas como possuidoras de atividade anti-helmíntica, necessitando, contudo, que suas eficácias sejam cientificamente comprovadas. No entanto, ao contrário do que ocorre na medicina humana, na medicina veterinária, estudos envolvendo produtos fitoterápicos para o controle de doenças ainda são escassos (VIEIRA et al., 1999).

Ozaki e Duarte (2006) mostram que na saúde animal, o emprego da fitoterapia é pouco abordado e explorado. Em estudo realizado mostram plantas que podem ser utilizadas no tratamento de algumas enfermidades, como a *Aloe vera* (babosa), *Sambucus nigra* L. (Sabugueiro), *Calendula officinalis* L. (Calêndula), *Matricaria chamomilla* (Camomila), *Zingiber officinale* (Gengibre), *Hydrastis canadensis* L. (Hidraste), *Glycyrrhiza glabra* L. (Alcaçuz), *Mentha piperita* (Hortelã), *Taraxacum officinale weber* (Dente de leão), *Plantago psyllium* L. (Pisilium), *Achillea millefolium* L. (Mil folhas), para distúrbios gastrintestinais; extratos de *Pterocaulon alopecuroides*, *P. interruptum* e *P. polystachyum*, contra fungos; polpa de calabaça (*Crescentia cujete*) é aplicada em dermatites, cortes, queimaduras de sol e problemas de pele de cachorros; a *Anemone hortensis* L. é usada para cura de envenenamento; para o sistema nervoso *Nepeta cataria* L. (Mentrasto) e *Valeriana officinalis* L. (Valeriana).

Em pesquisa realizada Mendonça et al. (2015) por meio de revisão bibliográfica descritiva e qualitativa, analisou artigos, tese e dissertações em um período de até 10 anos antecedentes, o levantamento foi feito de julho a setembro de 2014. O intuito foi analisar estudos inovadores enfocando pesquisas experimentais e de resgate sociocultural que credenciem e promovam a formulação de novos fitoterápicos veterinários. Registrou-se as seguintes espécies utilizadas como fitoterápicos na terapia de animais de produção, *Allium sativum* L. (Alho), *Aloe vera* L. (Babosa), *Anacardium occidentale* (Cajueiro), *Aspidosperma pirifolium* (Pereiro), *Azarirachta indica* (Nim), *Chenopodium ambrosioide*s (Mastruz), *Citrus limon* (Limão), *Curcubita pepo* (Jerimum), *Cymbopogon nardus* L. (Citronela), *Mentha piperita* (Hortelã), *Momordica charantia* (Melão de São Caetano), *Myracroduon urundeuva* (Aroeira), *Operculina hamiltoni* (Batata de purga), *Peumus boldus* (Boldo), *Psidium guayava* (Goiabeira), *Zingiber officinale* (Gengibre) e *Zizyphus joazeiro* (Juazeiro). As indicações terapêuticas mais relatadas foram antiparasitárias (ectoparasitas e endoparasitas), cicatrizantes, antimicrobianas, repelente, antitérmica, anti-inflamatória, antidiarreica, antiemética, antiespasmódica, constipações e retenção de placenta.

O efeito vermífugo é o que mais aparece entre as espécies estudadas. As plantas de uso antiparasitário anti-helmíntico foram alho, babosa, jerimum, melão de São Caetano e batata de purga. Quanto aos ectoparasitas, os fitoterápicos carrapaticidas mais encontrados foram

Citronela, Babosa e Pereiro. Pesquisas realizadas por Olivo et al. (2008) em bovinos leiteiros (Holandesa), infestados de carrapatos, as folhas de citronela e o óleo demonstraram elevada ação carrapaticida, tanto em larvas quanto em fêmeas adultas.

A ideia de que o tratamento com plantas é somente fazer um chá de folhas, faz com que as pessoas acabem usando partes da planta sem princípio ativo, quantidade exagerada ou insuficiente, podendo gerar na maioria das vezes, insucesso no tratamento ou alguma indisposição passageira pelo uso abusivo, pois elas apresentam toxicidade dependendo da dosagem ou da parte utilizada e podem apresentar ação sinérgica (OZAKI; DUARTE, 2006).

Para que a eficácia de uma planta seja comprovada, é necessária a validação científica dos fitoterápicos que é a etapa inicial obrigatória para a utilização correta de plantas medicinais ou de seus compostos ativos. Os testes *in vitro* permitem uma avaliação da existência de propriedades anti-helmínticas nos extratos vegetais, e constituem uma etapa preliminar à caracterização de novos compostos ativos presentes nos vegetais, possibilitando desta forma, a criação de novas alternativas para o controle das parasitoses (COSTA et al., 2002).

3 USO NA MEDICINA POPULAR

A etnoveterinária é um ramo promissor, pois embasa os conhecimentos populares para a cura e tratamento de doenças a partir de produtos naturais. No entanto, esse ramo é pouco estudado, o que motivou uma crescente busca pelos seus conhecimentos e fica evidente sua importância nos dias atuais para o tratamento e cura de animais. Visto essa necessidade de buscar novos conhecimentos, atualmente tende-se a acrescentar à saúde e produção animal um meio sustentável e economicamente viável (OLIVEIRA, R. G., 2003).

Cada vez mais as sociedades ocidentais demonstram interesse nas práticas da medicina veterinária tradicional através da utilização de alternativas não convencionais como as plantas medicinais, a homeopatia, a acupuntura e outras (VAN VEEN, 1997). No uso de plantas medicinais para o tratamento dos animais, a procura vem dominando o mercado, principalmente devido à pressão do consumidor, que cada vez mais anseia por mercadorias eficazes e com baixo custo, ainda mais sendo produtos ecologicamente corretos que está tão em alta na atualidade (BRANDÃO et al., 2006), seja na medicina popular, na criação de animais de grande porte (CHAGAS et al., 2004), ou em cães e gatos (OZAKI; DUARTE, 2006).

Já no Brasil, pelo menos trezentas plantas fazem parte do arsenal terapêutico nacional reconhecidamente com propriedades medicinais, sendo que muitas vezes são desvalorizadas ou não são aceitas como uma possibilidade viável para a terapêutica humana ou animal

(LORENZI; MATOS, 2002). Apesar de o Brasil abrigar a maior biodiversidade genética vegetal do mundo, com mais de 55 mil espécies catalogadas de um total estimado entre 350 mil a 500 mil espécies, atualmente não há no mercado farmacêutico nenhum medicamento fitoterápico de uso animal obtido a partir de plantas nativas brasileira.

O crescimento dos tratamentos com produtos naturais se deve principalmente as grandes empresas farmacêuticas e fabricantes de produtos para casa que investem neste ramo através da publicidade e o marketing com finalidade de chamar a atenção para o seu uso seguro (SWERDLOW, 2000). Os estudos para obtenção de novos fitoterápicos envolvem diversas etapas, como a botânica (identificação da planta para estudo), farmacêutica (produção e controle de qualidade) e os ensaios *in vivo*. Só então o medicamento passa à fase de testes clínicos, realizados com pacientes, que dependem também de uma série de etapas.

A prescrição de fitoterápicos até pouco tempo era desvalorizada pelos próprios cientistas, por não haver estudos clínicos que comprovassem sua ação terapêutica. Porém, o conceito da fitoterapia vem sofrendo transformações, à medida que os profissionais veterinários vêm prescrevendo produtos naturais que tem a suas propriedades já comprovadas pela literatura científica (ALVES, A. R.; SILVA. M. J. P., 2003).

Como as plantas medicinais são de fácil acesso, muitas das vezes o mesmo pode ser encontrado no quintal de muitas casas, ervarias e casas de produtos naturais. Abaixo segue uma tabela com as principais plantas medicinais utilizadas como alternativa para o tratamento dos principais distúrbios que acometem os animais.

Tabela 1 - Plantas utilizadas no tratamento de distúrbios gastrointestinais em animais.

(Continua...)

Nome científico	**Família**	**Nome popular**	**Parte Utilizada**
Achillea millefolium L.	Compositae	Mil folhas	Planta toda
Agropyron repens L.	Poaceae	Grama	Rizoma e raíz
Aloe vera L.	Liliaceae	Babosa	Seiva das folhas
Berberis vulgaris L.	Berberidaceae	Uva espim	Cascas e raiz
Calendula officinalis L.	Asteraceae	Calêndula	Flores, folhas e caule
Cnicus benedictus L.	Asteraceae	Cardo santo	Partes aéreas floridas
Capsicum annum L.	Solanaceae	Caiena	Fruto fresco ou seco
Cassia angustifolia	Leguminosae	Sene	Folíolos
Foeniculum vulgare gaert.	Umbelliferae	Funcho	Sementes
Gentiana lutea L.	Gentianaceae	Genciana	Rizoma e raiz
Glycyrrhiza glabra L.	Fabaceae	Alcaçuz	Raiz
Helleborns foetidus e odorus	Ranunculaceae	Heléboro verde	Raiz
Hydrastis canadensis L.	Ranunculaceae	Hidraste	Raiz e rizoma
Juglans regia L.	Juglandaceae	Nogueira	Flores
Linum usitatissimum L.	Linaceae	Linhaça	Semente e óleo de semente

Tabela 1 - Plantas utilizadas no tratamento de distúrbios gastrointestinais em animais.

(Conclusão...)

Nome científico	**Família**	**Nome popular**	**Parte Utilizada**
Matricaria chamomilla	Asteraceae	Camomila	Capítulos secos
Mentha piperita	Labiatae	Hortelã	Folhas e sumidades florais
Nepeta cataria L.	Lamiaceae	Mentrasto	Partes aéreas da flor
Picrorhiza kurroa	Escrofulariaceae	Picrorriza	Rizoma e raíz
Plantago psyllium L.	Plantaginaceae	Pisilium	Semente
Rhamnus purshiana	Rhamnaceae	Cáscara sagrada	Casca seca
Ruta chalepensis L.	Rutaceae	Arruda	Folhas
Sambucus nigra L.	Loniceraceae	Sabugueiro	Folhas, flores, casas e frutos
Silybum marianum L.	Asteraceae	Cardo mariano	Frutos secos
Solanum tuberosum L.	Solanaceae	Batata	Tubérculos
Tanacetum vulgare L.	Asteraceae	Catinga de mulata	Folhas
Ulmus campestris L.	Ulmaceae	Ulmeiro menor	Casca
Urtica dioica L.	Urticaceae	Urtiga	Folhas frescas ou secas e raiz
Zingiber officinale	Zingiberiaceae	Gengibre	Rizoma e óleo essencial

Fonte: Alonso, 1998; Berschneider, 2002; Cunha, Roque e Silva, 2003; Viegi et al., 2003.

Tabela 2 - Plantas utilizadas no tratamento de distúrbios do sistema nervoso em animais.

Nome científico	**Família botânica**	**Nome popular**	**Parte utilizada**
Valeriana officinalis L.	Valerianaceae	Valeriana	Raiz
Nepeta cataria L.	Lamiaceae	Mentrasto	Partes aéreas da flor
Passiflora alata	Passifloraceae	Maracujá	Toda planta
Humulus lúpulos	Canabinaceae	Lúpulo	Cone ou estróbilo
Ginseng	Araliaceae	Panax ginseng	Raiz
Fumaria officinalis	Fumariaceae	Fumária	Flores

Fonte: Alonso, 1998; Berschneider, 2002; Cavalcanti, 1997; Cunha, Roque e Silva, 2003; Viegi et al., 2003.

Tabela 3 - Plantas utilizadas como repelentes e no tratamento pele e pelos de animais.

(Continua...)

Nome Científico	**Família Botânica**	**Nome Popular**	**Parte Utilizada**
Aloe vera	Liliaceae	Babosa	Seiva das folhas
Azadirachta indica	Meliaceae	Neem	Folhas e casca
Bixa orellana	Bixaceae	Urucum	Sementes e folhas
Calendula officinalis	Asteraceae	Calêndula	Flores, folhas e caule
Capsicum annum	Solanaceae	Caiena	Fruto fresco ou seco
Hydrastis canadenses	Ranunculaceae	Hidraste	Raiz
Hypericum perforatum	Hipericaceae	Erva de São João	Partes aéreas floridas
Juglans regia	Juglandaceae	Nogueira	Folhas
Melilotus officinalis	Fabaceae	Trevo dos prados	Parte aérea florida
Saccharomyces cerevisiae	Sacaromicetaceae	Levedura de cerveja	Pó

Tabela 3 - Plantas utilizadas como repelentes e no tratamento pele e pelos de animais.
(Conclusão...)

Nome Científico	Família Botânica	Nome Popular	Parte Utilizada
Salix Alba	Salicaceae	Salgueiro	Casca
Tanacetum Parthenium	Asteraceae	Crisan	Partes aéreas
Verbascum sp.	Scrophularia ceal	Verbasco	Folhas, flores e raiz.
Viola tricolor	Violaceae	Violeta Azul	Parte aérea florida

Fonte: (STEIN, 1993; ALONSO, 1998; LANS et al., 2000; BERSCHNEIDER, 2002; CUNHA; ROQUE; SILVA, 2003; VIEGI et al., 2003; GUARRERA; FORTI; MARIGNOL, 2005; OLIVEIRA, M. P. B. et al., 2005).

4 AVANÇOS DA FITOTERAPIA NA MEDICINA VETERINÁRIA

A fitoterapia é uma das mais antigas práticas terapêuticas da humanidade apresentando origens tanto no conhecimento popular (etnobotânica) quanto na experiência científica (etnofarmacologia). A palavra fitoterapia vem do grego *therapeia* que é tratamento e *phyton* vegetal, e está relacionada ao estudo das plantas medicinais e suas aplicações na cura das doenças (UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUÍZ DE FORA - UFJF, 2016).

O uso das plantas medicinais para tratamento de doenças data mais de sessenta mil anos, sendo as primeiras descobertas feitas por estudos arqueológicos nas ruínas do Irã (REZENDE; COCCO, 2002). No Brasil a utilização da fitoterapia teve origem com os povos indígenas influenciadas pela cultura africana e portuguesa (ALVES, D. L.; SILVA. C. R., 2003).

Antigamente, devido ao avanço da medicina alopata e da indústria farmacêutica e também devido ao preconceito com relação ao uso de fitoterápicos, a falta de conhecimento sobre as ervas medicinais e a falta de divulgação de pesquisas clínicas, os medicamentos fitoterápicos foram deixados de lado, mas atualmente devido aos efeitos adversos e o alto custo dos medicamentos sintéticos, a fitoterapia vem ganhando seu lugar no mercado representando cerca de 22 bilhões de dólares no mercado mundial (YUNES; PEDROSA; CECHINEL FILHO, 1999; (ALVES, D. L.; SILVA. C. R., 2003); OZAKI; DUARTE, 2006).

A indústria farmacêutica veterinária teve seu início em 1980 e 1990 e nesta época ocorreram grandes fusões e aquisições devido a necessidade de novos produtos no mercado como vacinas e medicamentos veterinários (WAACK, 2000; SILVA, 2009). O Brasil possui a maior biodiversidade do mundo, mas apenas 1% do mercado de fitoterápico do país é voltado para o setor veterinário, o que mostra a possibilidade de pesquisar novas moléculas gerando assim um aumento no consumo de fitoterápicos, que atualmente representam cerca de 6,7% do mercado total de medicamentos (OZAKI et al., 2006)

Atualmente, a fitoterapia é uma alternativa de tratamento menos agressivo para aqueles que buscam uma nova opção para tratar seus animais e também é uma alternativa quando se tem a falta do medicamento sintético (FERREIRA; PINTO, 2010). A fitoterapia veterinária tem o mesmo critério de controle que a Anvisa prescreve para a fitoterapia humana, tendo assim a indústria farmacêutica condições suficientes para produzir fitoterápicos de qualidade. Além disso, a fitoterapia veterinária tem a mesma aplicação que a humana e pode ser utilizada no tratamento de diversas doenças nas formas farmacêutica de banho, compressas, óleos, inalatório e creme (VÉGAS, 2007). Um exemplo no qual a fitoterapia humana é aplicada também em doenças de origem veterinária é o uso do fitoterápico *Thuya occidentalis* que é utilizado em humanos para tratamentos de verrugas e condilomas da pele e nas mucosas (MARINS et al., 2006).

As vantagens de se utilizar a fitoterapia como uma forma de tratamento são: a relação custo/benefício já que as fontes do medicamento são as plantas; o seu fácil acesso; e seu resultado ter um efeito farmacológico identificável e menos agressivo (REZENDE; COCCO, 2002). Outra vantagem de se aplicar a fitoterapia na medicina veterinária é a possibilidade de serem empregados novas substâncias nas quais os patógenos não tiveram contato, evitando assim a resistência aos fármacos. Vale lembrar que as modernas técnicas de produção de um medicamento veterinário estão associadas a todas as etapas de desenvolvimento de um produto (estabilidade, eficácia e segurança), que garantem um resultado clínico eficaz (REGNER, 2012).

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

É de grande importância educar a população, conscientizando-a sobre o uso adequado das plantas medicinais e medicamentos ditos naturais. Muitos brasileiros que não possuem recursos para compra de medicamentos em farmácias fazem uso indiscriminado e prolongado das plantas medicinais, se automedicando ou utilizando em animais de acordo com o uso popular. Essa prática pode trazer uma série de efeitos colaterais graves (CARLINE, 2011). A pressão do consumidor é um fator importante para o crescente aumento da procura de fitoterápicos veterinários no comércio, o que leva a indústria a investir na produção desses medicamentos e também contribui para o aumento de pesquisas nessa área (BRANDÃO et al., 2006). Devido à importância da fitoterapia e da escassa difusão de pesquisas na Medicina Veterinária, fez-se necessário ampliar o conhecimento sobre o uso das plantas medicinais como tratamento terapêutico nas diversas doenças da clínica veterinária.

6 REFERÊNCIAS

ALBUQUERQUE, J. M. de. **Plantas medicinais de uso popular**. Brasília: ABEAS/MEC, 1989.

ALONSO, J. R. **Tratado de fitomedicina:** bases clínicas y farmacológicas. Isis Ediciones, 1998.

ALVES, A. R.; SILVA, M. J. P. O uso da fitoterapia no cuidado de crianças com até cinco anos em área central e periférica da cidade de São Paulo. **Revista Escola de Enfermagem**, v. 37, n. 4, p. 85-91, 2003.

ALVES, D. L.; SILVA. C. R. **Fitohormônio**: Abordagem natural de terapia hormonal. São Paulo: Atheneu, 2003.

AMOROSO, M. C. M. A abordagem etnobotânica na pesquisa de plantas medicinais. In: DI STASI, L. C. (Org.). **Plantas medicinais**: arte e ciência. São Paulo: UNESP, 1996. p. 47-68.

BERNARDES, C. A. C. G.; SILVA, F. A. da; MOLEIRO, F. C. Uso de plantas medicinais pelos moradores do bairro Cohab Tarumã, Tangará da Serra, MT para o tratamento da alergia ou de seus sintomas. **Revista Biofar**, v. 6, p. 16-172, 2011.

BERSCHNEIDER, H. M; Complementary and Alternative Veterinary Medicine and Gastrointestinal Disease. **Clinical Techniques in Small Animal Practice**, v. 17, p. 19-24, 2002.

BRANDÃO, M. G. L. et al. Medicinal plants and other botanical products from the Brazilian Official Pharmacopocia. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 16, n. 3, p. 408-420, 2006.

CARLINE, E. **Entre conhecimento popular científico**. 2011. Disponível em: <http://www. consciencia.br>. Acesso: 24 set. 2016.

CAVALCANTI, M. **A importância dos flavonóides naturais na Medicina Veterinária e na Terapia do Stress de animais de companhia**. 1997. 50 f. Dissertação (Mestrado - Área de Fitoterapia) – FACIS – Faculdade de Ciências da Saúde de São Paulo, São Paulo. 1997.

CHAGAS, A. C. S. et. al. Ação larvicida de Derivados arilsulfonílicos da cânfora e da isopinocanfona, em *Boophilus microplus*. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 54, n. 5, p. 462-467, 2004.

COSTA, C. T. C. et al. Efeito ovicida de extratos de sementes de *Mangifera indica* l. sobre *Haemonchus contortus.* **Revista Brasileira Parasitologia Veterinária**, v. 11, n. 2, p. 57-60, 2002.

CUNHA, A. P. da; ROQUE, O. R.; SILVA, A. P. da. **Plantas e produtos vegetais em fitoterapia**. 2003.

FERREIRA, V. F.; PINTO, A. C. A fitoterapia no mundo atual. **Química nova**, v. 33, n. 9, p. 1829-1829, 2010.

GUARRERA, P. M; FORTI, G; MARIGNOL, S. Ethnobotanical and ethnomedicinal uses of plants in the district of Acquapendente (Latinum, Central Italy). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 96, n. 3, p. 429-444, 2005.

JOSHI, A. R.; JOSHI, K. Indigenous knowledge and uses of medicinal plants by local communities of the Kali Gandaki Watershed Area, Nepal. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 73, p. 175-183, 2000.

LANS, C. et al. Medicinal plants used for dogs in Trinindad and Tobago. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 45, n. 3, p. 201-220, 2000.

LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. **Plantas medicinais no Brasil - nativas e exóticas**. Nova Odessa: Instituto Plantarum. 2002.

MARINHO, M. L. et al. A utilização de plantas medicinais em medicina veterinária: um resgate do saber popular. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v. 9, n. 3, p. 64-69, 2007.

MARINS, R. S. de Q. S. et al. Avaliação da eficácia da homeopatia e fitoterapia no tratamento da papilomatose cutânea bovina. **Revista Brasileira de Ciências Veterinárias**, v. 13, n. 1, p. 10-12, 2006.

MENDONÇA, V. M. et al. Perspectivas da Fitoterapia Veterinária: Plantas Potenciais na Terapia dos Animais de Produção. **Cadernos de Agroecologia**, v. 9, n. 4, 2015.

OLIVEIRA, R. G. **Avaliação "in vivo" da ação anti-helmíntica de plantas consideradas medicinais como recurso potencial no controle de endoparasitos gastrintestinais de ovinos**. Porto Alegre: UFRGS, 2003.

OLIVEIRA, M. P. B. et al. **Avaliação da atividade biológica de extrato de neem (zadirachta indica A.) larvas de musca domestica L**. 2005.

OLIVEIRA, R. A. G.; SILVA, M. S. H. **Plantas medicinais na atenção primaria à saúde**. João Pessoa: UFPB, 1994.

OLIVO, C. J. et al. Óleo de citronela no controle do carrapato de bovinos. **Ciência Rural**, v. 38, p. 406-410, 2008.

OZAKI, A. T.; DUARTE, P. C. Fitoterápicos utilizados na medicina veterinária, em cães e gatos. **Revista Pharmacia Brasileira**, v. 12, n. 2, p. 14-21, 2006.

REGNER, C. F. **Fitoterapia na clínica de pequenos animais:** um futuro promissor. 2012. Disponível em: <http://www.petshopmagazine.com.br/2012-07-fitoterapia-na-clinica-de-pequenos-animais-um-futuro-promissor-16629>. Acesso em: 18 set. 2016.

REZENDE, H. A.; COCCO, M. I. M. A utilização da fitoterapia no cotidiano de uma população rural. **Revista Escola Enfermagem USP**, v. 36, n. 3, p. 282-288, 2002.

SILVA, N. T. R. **Proposta de um modelo para geração e análise das oportunidades de mercado e tecnológica para o desenvolvimento de produtos farmacêuticos veterinários.** 2009. 246 f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto. Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto. 2009.

SOUSA, F. C. de et al. Uso de plantas medicinais (fitoterápicos) por mulheres da cidade de Icó-CE. **Revista BioFar**, v. 5, n. 1, p. 161-170, 2011.

STEIN, D. **A Cura Natural para Cães e Gatos**. São Paulo: Ground, 1993.

SWERDLOW, J. L. **Nature's Medicine:** a chronicle of mankind's search for healing plants through the ages. Washington D.C.: National Geographic Society, 2000.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUÍZ DE FORA - UFJF. **Programa de Plantas Medicinais e Terapias Não-convencionais**. 2016. Disponível em: <http://www.ufjf.br/proplamed/atividades/fitoterapia/>. Acesso em: 15 set. 2016.

VAN VEEN, T. W. S. Sense or nonsense? Traditional methods of animal parasitic disease control. **Veterinary Parasitology**, v. 71, p. 177-194, 1997.

VÉGAS, C. **Fitoterapia é a nova medicina animal**. 2007. Disponível em: <http://www.tribunapr.com.br/noticias/mundo/fitoterapia-e-nova-medicina-animal/>. Acesso em: 18 set. 2016.

VIEGI, L. et al. A review of plants used in folk veterinary medicine in Italy as basics for a databank. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 89, n. 2, p. 221-244, 2003.

VIEIRA, L. S. et al. Evaluation of anthelmintic efficacy of plants available in Ceará State, North – East Brazil, for the control of goat gastrointestinal nematodes. **Revue Medicine Veterinary**, v. 150, n. 5, p. 447-452, 1999.

WAACK, R. S. Fusões e aquisições na indústria farmacêutico-veterinária. **Cadernos de Pesquisas em Administração**, v. 7. n. 3, p. 1-18, 2000.

YUNES, R.; PEDROSA, R. C.; CECHINEL FILHO, V. Fármacos e fitoterápicos: a necessidade do desenvolvimento da indústria de fitoterápicos e fitofármacos no Brasil. **Química Nova**, v. 24, n. 1, p. 147-152, 2001.

Capítulo

10

Plantas da família Rubiaceae úteis ao tratamento de enfermidades veterinárias

Andressa Ribeiro Vicentini[1]
Taiana Alencar[2]
Karolyne Coutinho Vieira[3]
Juliana Aparecida Severi[4]

1 INTRODUÇÃO

A utilização de produtos naturais para tratamento de doenças e enfermidades é feito desde a antiguidade e nos últimos anos têm crescido a sua utilização como protótipos para o desenvolvimento de novos fármacos dentro da indústria farmacêutica. A descoberta de metabólitos secundários bioativos de diversas fontes, como animais e vegetais possibilita que estes produtos naturais sejam altamente candidatos promissores, o que transforma a natureza fonte inesgotável de produção de medicamentos não somente para o desenvolvimento de fármacos de uso humano, como também para uso animal.

[1] Universidade Federal do Espírito Santo, e-mail: andry.ribeiro@hotmail.com;
[2] Universidade Federal do Espírito Santo, e-mail: taiana_alencar@hotmail.com;
[3] Universidade Federal do Espírito Santo, e-mail: karolvieiras2@hotmail.com;
[4] Universidade Federal do Espírito Santo, e-mail: juseveri@yahoo.com.br.

Devido, principalmente, a resistência do animal a algum medicamento geralmente de cunho parasitológico existe a necessidade de que novas alternativas sejam utilizadas. Há estudos relatados que existe, em muitas comunidades, principalmente as rurais, o uso de plantas medicinais para uso veterinário, principalmente com ação anti-helmíntica, anti-inflamatória e repelente.

Levando em consideração o uso de plantas medicinais para animais, a família Rubiaceae é uma das maiores famílias pertencentes às dicotiledôneas encontrada nos biomas brasileiros como na Mata Atlântica, Cerrado e na Amazônia. Abrangendo cerca de 1400 espécies já descritas no Brasil, dentro de 120 gêneros. Popularmente as espécies da família Rubiaceae possuem grande importância econômica, que são exploradas por suas propriedades alimentícias, como a *Coffea arábica* L., ornamentais como a *Gardenia* ssp. e também medicinais, por exemplo a *Psychotria colorata* que possui propriedades analgésicas; e a *Uncaria schreb,* utilizada para tratamento de feridas e infecções causadas por fungos e bactérias. Entretanto, todos os usos de plantas devem ser devidamente monitorados, pois da mesma medida em que determinadas plantas podem causar efeitos farmacológicos positivos, também podem vir a causar efeitos tóxicos letais, sendo importante a sua observação.

2 FITOTERAPIA NA PROMOÇÃO DA SAÚDE ANIMAL

O interesse em produtos de origem natural, como o aproveitamento das plantas medicinais para produção de medicamentos tem crescido com o passar dos anos, movimentando no Brasil cerca de um bilhão de dólares anualmente. Esse mercado cresce a uma média de 15% ao ano, com maior expressão em países europeus e asiáticos, onde a terapia com plantas medicinais é significativamente maior, sendo uma forma terapêutica muitas vezes prescrita por médicos (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DA INDÚSTRIA FITOTERÁPICA - ABFIT, 2013; BRAGA, 2002).

No setor veterinário, especialmente na área de controle de parasitoses, existe a necessidade de utilização de terapias alternativas, ocasionada muitas vezes pela má conduta dos produtores, seja por administração de subdosagens de fármacos ou da utilização indevida de anti-helmínticos que ocorre de forma frequente com diferentes drogas contendo o mesmo princípio ativo, levando a uma resistência por parte do animal (ROTONDANO et al., 2008). Ainda nos dias atuais, as parasitoses representam um grande problema de saúde pública em nosso país, devido as condições precárias de saneamento básico de algumas regiões. Neste contexto, o uso da fitoterapia se mostra como uma alternativa viável, uma vez que esses

produtos visam reduzir o custo de aquisição e diminuir a possibilidade de resistência em longo prazo e ainda por se mostrarem como uma forma de tratamento acessível em lugares onde os medicamentos convencionais possam ser de difícil acesso (BELIZÁRIO; SILVA, 2012; SOBRAL, 2003).

Uma pesquisa feita por Silva et al. (2013) através de avaliação semiestruturada aberta em duas comunidades rurais, evidenciou que 63,5% das famílias entrevistadas já haviam utilizado plantas medicinais para curar as mais diversas afecções de seus animais, sendo estes compostos principalmente por aves e cães. Dentre as indicações gerais as mais citadas foram: anti-helmíntica (36,58%), anti-inflamatória (17,07%) e repelente (12,19%).

Dentre a vasta diversidade de plantas medicinais que podem ser utilizadas para tratar alguma afecção animal, pode-se destacar as espécies da família Rubiaceae, que são plantas, rotineiramente, encontradas no Espírito Santo e são uma das maiores da ordem a que pertencem, a Gentianales. Esta família possui cerca de 650 gêneros e 13.000 espécies, correspondendo a 66% do total da sua ordem (ROVA, et al., 2002; STRUWE, 2002). No Brasil encontram-se cerca de 120 gêneros e 1400 espécies já descritas, destacando a importância econômica, social e ornamental desta família para o Brasil (SOUZA; LORENZI, 2008).

Pelo fato de ser representativa em quantidade e de importância destacável pelas inúmeras substancias ativas, já conhecidas e de grande potencial farmacológico a família Rubiaceae vem sendo cada vez mais explorada tecnologicamente (BARREIRO, 1990).

3 ATIVIDADES BIOLÓGICAS DAS PLANTAS DA FAMÍLIA RUBIACEAE DE INTERESSE VETERINÁRIO

3.1 ANALGESIA

3.1.1 *Psychotria colorata*

Espécie conhecida também como perpétua-do-mato (FIGURA 1) cresce na forma arbustiva com tamanhos de em média 1 metro de altura, possui folhas simples, flores de coloração rosada a roxa com brácteas agudas e seus frutos são elípticos de coloração azulada. É uma espécie nativa, não endêmica, encontrada no Brasil, principalmente, nas regiões Norte, Nordeste e Centro Oeste (TAYLOR, et al., 2007; TAYLOR, 2012).

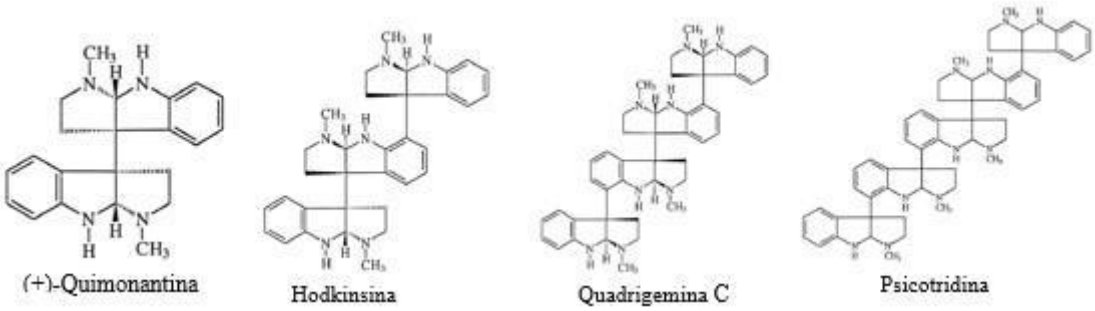
Figura 1 - *Psychotria colorata*, flor e frutos.

Fonte: Diewald (2008)

Esta planta já é utilizada tradicionalmente por nativos para dores de ouvido e abdominais, sendo as flores usadas para os problemas auriculares e os frutos e raízes para efeito colagogo (ELISABETSKY; CASTILHOS, 1990). Estudos fito-químicos feitos a partir de flores e folhas de *P. colorata* evidenciaram que a principal classe de metabólitos secundários presentes na planta foram dois grupos de alcaloides classificados como pirrolidinoindolínicos e quinolínicos (ELISABETSKY, et al., 1995; VEROTTA, et al., 1998).

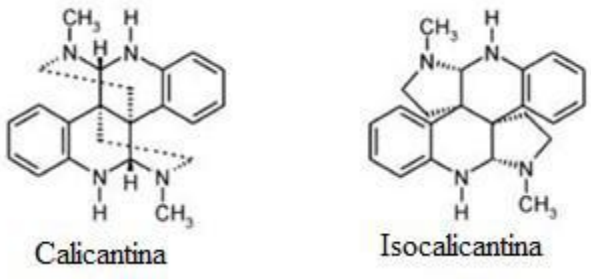
Os alcaloides pirrolidinoindolínicos são considerados a principal classe de metabólitos encontrados em espécies do gênero Psychotria. A *P. colorata* brasileira teve seus alcaloides dessa classe caracterizados como: hodgkinsina, psicotridina, quimonantina e quadrigemina C (FIGURA 2). Já para o grupo dos quinolínicos os compostos isolados foram identificados como calicantina e iso-calicantina (FIGURA 3) (VEROTTA, et al., 1998).

Figura 2 - Alcaloides pirrolidinoindolínicos isolados de *P.colorata*



Fonte: Verotta et al. (1998)

Figura 3 - Alcaloides quinolínicos de *P.colorata*



Fonte: Porto, Henriques e Fett-Neto (2009)

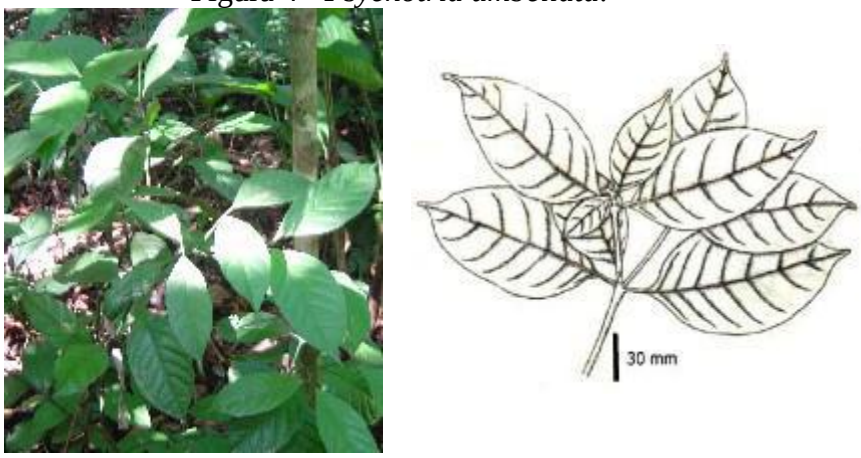
Destes a Hodkinsina assim como a Quimonantina apresentaram ação analgésica com mecanismo de ação opióide e antagonismo de receptores glutamatérgicos, semelhantes ao da morfina (AMADOR et al., 2000; KODANKO et al., 2007; VEROTTA et al., 2002). A psicotridina também apresentou atividade analgésica dose-dependente, porém com um mecanismo de ação que se sugere não ser opióide (AMADOR et al., 2001).

Apesar de apresentar grande atividade analgésica a perpétua-do-mato deve passar por estudos de isolamento e caracterização para que suas substâncias ativas possam ser testadas separadamente, pois, segundo estudos ela possui compostos que apresentam toxicidade principalmente aos bovinos, demonstrando ação abortiva em vacas (MOURA; MARUO, 2014).

3.1.2 *Psychotria umbellata*

Psychotria umbellata (FIGURA 4) conhecida também como erva-de-rato, é uma espécie de habitat tropical ou subtropical, é um arbusto de aproximadamente um a três metros de altura possuindo as folhas no formato de lâmina elíptica. As inflorescências têm brácteas triangulares, as flores são hermafroditas aparecendo normalmente nos meses de setembro a novembro, seus frutos são achatados lateralmente e de cloração roxa (DILLENBURG; PORTO, 1978).

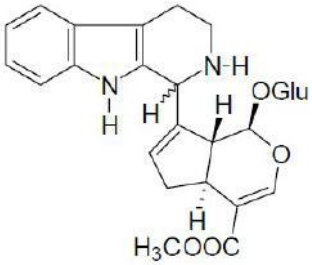
Figura 4 - *Psychotria umbellata*.



Fonte: Fragoso (2007); Porto, Henriques e Fett-Neto (2009)

Estudos de composição química das folhas de *P. umbellata* culminaram no isolamento de quatro alcaloides, dos quais podemos dar destaque para uma substancia inédita, chamada de psicolatina, anteriormente conhecida como umbelatina (FIGURA 5) (KERBER, 1999).

Figura 5 - Estrutura da psicolatina.



Fonte: Kerber (1999)

Um estudo realizado por BOTH (2001) evidenciou que a psicolatina é um alcaloide biologicamente ativo com atividade analgésica moderada, e que possivelmente essa ação é devida a dois mecanismos de ação que envolvem a ativação dos receptores opióides e antagonismo dos receptores glutamatérgicos NMDA.

3.2 ANTIPARASITÁRIA

As enfermidades parasitarias causam grande prejuízo econômico para a pecuária o que leva uma perda milionária anual aos criadores (GRISI et al., 2014). O impacto é causado principalmente pelas manifestações de carrapatos e helmintos. Uma alternativa para diminuir a ocorrência desses casos é o tratamento com plantas, algumas serão apresentadas a seguir.

3.2.1 *Morinda citrifolia*

Também conhecida como noni, a *Morinda citrifolia* (FIGURA 6) é nativa do sudeste da Ásia. A noni (*Morinda citrifolia*) é uma pequena arvore que pode crescer até nove metros de altura, ela possui folhas largas de coloração verde escuro, e apresenta flores e frutos. As flores são pequenas e de cor branca, já o fruto possui uma cor verde, podendo também ser amarelado e com muitas sementes (BRITO, 2008).

O uso dessa planta está relacionado com a atividade antiparasitária (WANG et al., 2002). Aproximadamente 200 compostos fito-químicos foram identificados, entre eles glicosídeos, flavonoides, polissacarídeos, iridóides, lignanas, antraquinonas e triterpenóides (PAWLUS et al., 2005).

Estudos realizados por Murdiati, Adiwinata e Hildasari (2000) evidenciaram que o principal composto responsável pela atividade terapêutica da *Morinda citrifolia* é a proxeronina, a qual é convertida em um alcaloide xeronina que irá ativar as enzimas catalisadoras do metabolismo celular (HEINICKE, 1985; PIMENTEL et al., 2016).

3.2.2 *Psychotria ipecacuanha*

A *Psychotria ipecacuanha* (FIGURA 7), também conhecida como ipeca é uma planta nativa da região amazônica, seu tamanho pode variar de 30 a 40 cm de altura, possuem folhas no formato oval-lanceoladas suas flores são brancas e seus frutos possuem coloração avermelhada (SILVA, 2000).

Figura 6 - *Morinda citrifolia*.

Fonte: Nelson (2003)

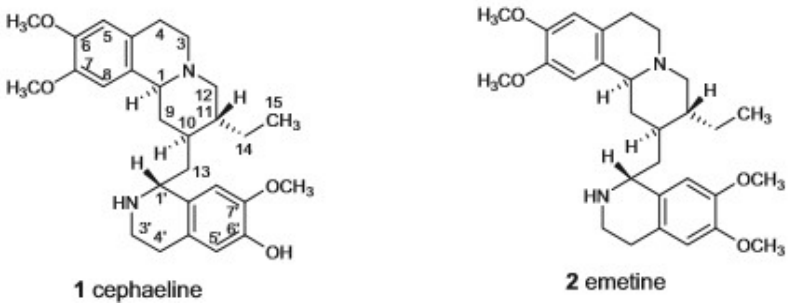
A principal classe de substâncias responsável pela sua atividade terapêutica é a presença dos alcaloides: emetina, cefelina e psicotrina, encontrados principalmente na raiz,

porém seus mecanismos de ação ainda são desconhecidos (ASSIS; GIULIETTI, 1999; LAMEIRA, 2002). Dentre suas ações farmacológicas destaca-se sua ação emética e amebicida, sendo esta última, por exercer uma ação tóxica direta sobre a *Entamoeba histolytica* (BRUNETON, 1995). De acordo com Akinboye e Bakare (2011) a emetina (FIGURA 8) é o alcaloide responsável pelo tratamento de disenteria amebiana, sendo o componente bioativo encontrado em maior proporção nas raízes da ipeca.

Figura 7 - *Psychotria ipecacuanha*

Fonte: Assis e Giulietti (1999); Lameira (2002).

Figura 8 - Estrutura de compostos encontrados nas raízes de *Psychotria ipecacuanha*



Fonte: Bernhard (2011)

3.3 TOXICIDADE

As plantas da família Rubiaceae apesar de serem muito disseminadas para usos medicinais e alimentícios também possuem grande parcela de plantas que são tóxicas, tanto para humanos quanto para animais (MOURA; MARUO, 2014).

A pecuária sofre um prejuízo econômico significativo devido à ingestão de plantas tóxicas, tanto na pecuária brasileira quanto a de outros países. Já que se estima que para um rebanho de 160 milhões de cabeças a morte de cerca de 800.000 a 1.120.000 seja causada devido a plantas tóxicas (SOTO-BLANCO et al., 2004; RIET-CORREA; MEDEIROS, 2001).

3.3.1 *Palicourea marcgravii*

No Brasil são conhecidas cerca de 61 espécies de plantas tóxicas (para animais) e 12 plantas que levam à morte súbita (PEIXOTO et al., 2012), sendo que a de maior interesse pecuário é a *Palicourea marcgravii* St. Hill. Conhecida popularmente como "erva-de-rato", possui interesse por causar em diversos animais morte súbita, ou seja, possuir elevada toxicidade, levando os animais a morte através de arritmias cardíacas e convulsões em búfalos, bovinos, caprinos e ovinos (SOTO-BLANCO et al., 2004; RIET-CORREA; MEDEIROS, 2001; OLIVEIRA et al., 2004). Além de ser uma planta extremamente palatável e de ampla distribuição.

Estudos experimentais demonstraram que a intoxicação por *P. marcgravii* em bovinos e em ovinos é superaguda e letal em apenas alguns minutos após a ingestão, porém já em caprinos a evolução da intoxicação possui algumas variações, podendo levar de alguns minutos até dois dias para que se alcance o quadro letal. Os principais sintomas apresentados por bovinos são tremores musculares seguidos de convulsões tônicas até a morte (SOTO-BLANCO et al., 2004).

Através de identificação por cromatografia em camada delgada em *P. marcgravii* foi isolada a substância responsável pelas mortes súbitas dos animais, que é o monofluoroacetato, que tem seu efeito ao bloquear a respiração celular por inibir a enzima aconitato dehidrogenase do ciclo do ácido tricarboxílico (SOTO-BLANCO et al., 2004; PEIXOTO et al., 2012; SHERLEY, 2004).

Estudos experimentais demostraram o efeito da acetamida como protetor e antídoto para intoxicação com *P. marcgravii*. Ao ser administrada logo após a intoxicação pelo monofluoroacetato, a acetamida evitou que houvesse o aparecimento dos sinais clínicos de intoxicação e até a morte dos animais (PEIXOTO et al., 2012).

3.3.2 *Palicourea juruana*

Oliveira et al. (2004) realizaram experimentos referentes à toxicidade da *Palicourea juruana*, além dos estudos já bem descritos sobre a *P. marcgravii*. Eles relataram em seus estudos que búfalos chegam a ser 4 vezes mais resistentes que os bovinos quanto à intoxicação por *P. juruana*, o que a caracteriza como uma planta de interesse, pois causa aos bovinos

também a morte subida, e além disso degeneração hidrópico-vacuolar das células epiteliais dos túbulos distais no rim (OLIVEIRA et al., 2004).

Além da *P. juruana* e *P. marcgravii*, existem outra gama de plantas responsáveis pela morte súbita em gado no Brasil, que são *Arrabidaea bilabiata*, *Arrabidaea japurensis*, *Mascagnia elegans*, *Mascagnia publiflora*, *Mascagnia rígida*, *Palicourea aeneofusca*, *Palicourea grandiflora*, e *Pseudocalymma elegans* (COUCEIRO et al., 1976 apud SOTO-BLANCO et al., 2004; FERNANDES; MACRUZ, 1964; TOKARNIA; CANELLA; DÖBEREINER, 1961; TOKARNIA; DOBEREINER; SILVA, 1981; TOKARNIA et al. 1969, 1979, 1983; TOKARNIA; DÖBEREINER, 1981).

4 PERSPECTIVAS DO USO DE PRODUTOS NATURAIS NA DESCOBERTA DE NOVOS FÁRMACOS

Os conhecimentos acerca de produtos naturais foram com o tempo, aprimorados e passados as gerações. Muitos compostos ativos que são sintetizados por indústrias farmacêuticas, tem uma origem ou são protótipos obtidos a partir de um composto natural. Dos mais de 300 bilhões de dólares que giram no mercado anual de medicamentos aproximadamente 40% é derivado desses compostos naturais, sendo que aproximadamente 23% provêm diretamente dos compostos vegetais (FIGURA 9) (BRAGA, 2002; NEWMAN; CRAGG; SNADER, 2003).

Visto a importância das fontes naturais para o desenvolvimento de novos fármacos, deve-se destacar que o Brasil tem uma vasta biodiversidade para ser explorada, sendo assim uma fonte importante para pesquisas de elucidação de novos compostos ativos oriundos de plantas, ou mesmo protótipos que permitam a síntese de análogos com as propriedades que um fármaco exige, demostrando assim a importância do ramo de pesquisas e desenvolvimento de fármacos em nosso país (YUNES; PEDROSA; CECHINEL FILHO, 2001).

Figura 9 - Novas entidades químicas introduzidas no mercado.

Fonte: Newman, Cragg e Snader (2003)

5 REFERÊNCIAS

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DA INDÚSTRIA FITOTERÁPICA - ABFIT. Informações sobre os fitoterápicos brasileiros. 2013. Disponível em: < http://www.abfit.org.br/>. Acesso em: Acesso em: 26 out. 2016.

AKINBOYE, E. S.; BAKARE O. Biological Activities of Emetine. **The Open Natural Products Journal**, v. 4, p. 8-15, 2011.

AMADOR T. A. et al. Antinociceptive profile of Hodgkinsine. **Planta Medica Letters**, v. 66, p. 1-3, 2000.

_____. Involvement of NMDA receptors in the analgesic properties of psychotridine. **Phytomedicine**, v. 8, p. 202-206, 2001.

ASSIS, M. C.; GIULIETTI, A. M. Diferenciação morfológica e anatômica em populações de "ipecacuanha" *Psychotria ipecacuanha* (Brot.) Stokes (Rubiaceae). **Revista brasileira de Botânica**, v. 22, n. 2, p. 205-216, 1999.

BARREIRO, E. J. Produtos naturais bioativos de origem vegetal e o desenvolvimento de fármacos. **Química Nova**, v. 13, n. 1, p. 29-39, 1990.

BELIZÁRIO T. L.; SILVA L. A. abordagem etnobotância no tratamento de parasitoses em comércios de fitoterápicos e numa comunidade rural em Uberlândia-MG. **Enciclopédia Biosfera**, v. 8, n. 15, p. 1730, 2012.

BERNHARD, M. et al. Dopamine-iridoid alkaloids in Carapichea affinis (= Psychotria borucana) confirm close relationship to the vomiting root Ipecac. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 39, n. 3, p. 232-235, 2011.

BOTH F. L. **Avaliação da atividade analgésica do alcalóide umbelatina isolado de *Psychotria umbellata* (Rubiaceae)**. Dissertação (Mestrado). 2001. Programa de Pós Graduação em Ciências Farmaceuticas. Universidade do Rio Grande do Sul, 2001.

BRAGA S. O uso sustentável da biodiversidade amazônica. In: VELLOSO, J. P. R.; ALBUQUERQUE, R. C. (Org.). **Amazônia vazio de soluções? Desenvolvimento moderno baseado na biodiversidade**. Rio de Janeiro: José Olympio, 2002.

BRITO, D. R. B. **Avaliação da atividade anti-helmíntica da *Morinda citrifolia* (noni) em aves poedeiras naturalmente infectadas**. Dissertação (Mestrado). 2008. Programa de Pós Graduação em Ciência Animal com área de Concentração em Sanidade e Reprodução Animal. Universidade Federal do Piauí, 2008.

BRUNETON, J. **Pharmacognosy, Phytochemistry, Medicinal Plants**. Paris: Lavoisier, 1995.

DIEWALD, C. ***Psychotria colorata***. 2008. Disponível em: <https://www.flickr.com/photos/chris_diewald/2417172228>. Acesso em: 26 out. 2016.

DILLENBURG, C. R.; PORTO, M. L. A Tribo Psychotrieae (Rubiaceae) no Rio Grande do Sul. In: **Sociedade Botanica do Brasil. Resumos dos trabalhos. II Congresso Latino-Americano de Botanica, XXIX Congresso Nacional de Botanica Sociedade do Brasil**. 1978. p. 22-29.

ELISABETSKY, E. et al. Analgesic activity of Psychotria colorata (Willd. Ex R. & S.) Muell.Arg. Alkaloids. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 48, p. 77-83, 1995.

ELISABETSKY, E.; CASTILHOS, Z. C. Plants used as analgesic by Amazonian caboclos, as a basis for selecting plants for investigation. **International Journal of Crude Drug Research**, v. 28, n. 4, p. 49-60, 1990.

FERNANDES, N. S.; MACRUZ, R. Toxicidade da "corona" - *Mascagnia pubiflora* (Juss.) Griseb. (Malpighiaceae). **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 31, n. 1, p. 1-4, 1964.

FRAGOSO, V. **Alcalóides de Psychotria: fotorregulação e propriedades antioxidantes e antimutagênicas**. 2007. 124 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular) Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rio Grande do Sul. 2007.

GRISI, L. et al. Reassessment of the potential economic impact of cattle parasites in Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 23, n. 2, p. 150-156, 2014.

HEINICKE, R. M. The pharmacologically active ingredient of Noni. **Bulletin of the National Tropical Botanical Garden**, v. 15, n. 1, p. 45-52, 1985.

KERBER, V. A. **Análise dos alcalóides de *Psychotria brachiceras* Mull. Arg. e *P. umbellata* Vell., e o estabelecimento e caracterização de cultura de células de P. umbellata Vell**. Tese (Doutorado). Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Rio Grane do Sul, 1999.

KODANKO J. J. et al. Synthesis of all-low energy stereoisomers of the tris (pyrrolidinoindoline) alkaloid hodgkinsine and preliminary assessment of their antinociceptive activity. **The Journal of organic chemistry**, v. 72, n. 21, p. 7909-7914, 2007.

LAMEIRA, O. A. Cultivo da Ipecacuanha [*Psychotria ipecacuanha* (Brot.) Stokes]. Belém, PA: MAPA- Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. 2002.

MOURA, L.; MARUO, V. Aspectos farmacológicos e toxicológicos de *Psychotria colorata*– revisão. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**, v. 23, n. 1, p. 1-16, 2014.

MURDIATI, T. B.; ADIWINATA, G.; HILDASARI, D. To trace the active compound in mengkudu (*Morinda citrifolia*) with anthelmintic activity against *Haemonchus contortus*. **Jurnal Ilmu Ternak dan Veteriner**, v. 5, n. 4, p. 255-259, 2000.

NELSON, S. C. Morinda citrifolia L. **Rubiaceae (Rubioideae) coffee family. Permanent Agriculture Resources, Holualoa, HI**, 2003.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M.; SNADER, K. M. Natural products as sources of new drugs over the period 1981-2002. **Journal of Natural Products**, v. 66, n. 7, p. 1022-37, 2003.

OLIVEIRA, C. M. C. de. et al. Estudo comparativo da toxidez de *Palicourea juruana* (Rubiaceae) para búfalos e bovinos. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 24, n. 1, p. 27-30, 2004.

PAWLUS, A. D. et al. An anthraquinone with potent quinone reductase-inducing activity and other constituents of the fruits of Morinda citrifolia (noni). **Journal of Natural Products**, v. 68, n. 12, p. 1720-1722, 2005.

PEIXOTO, T. C. et al. Efeito protetor da acetamida em bovinos indica monofluoroacetato como princípio tóxico de *Palicourea marcgravii* (Rubiaceae). **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 32, n. 4, p. 319-328, 2012.

PIMENTEL D. D. et al. Uso de Noni (*Morinda citrofolia* L.) por pacientes oncológicos: Um estudo bibliográfico. **Revista saúde e ciência**, v. 5, n. 1, p. 37-44, 2016.

PORTO, D. D.; HENRIQUES, A. T.; FETT-NETO, A. G. Bioactive alkaloids from South American Psychotria and related species. **The Open Bioactive Compounds Journal**, v. 2, p. 29-36, 2009.

RIET-CORREA, F.; MEDEIROS, R. M. T. Intoxicações por plantas em ruminantes no Brasil e no Uruguai: importância econômica, controle e riscos para a saúde pública. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 21, n. 1, p. 38-42, 2001.

ROTONDANO T. E. F. et al. Difusão do uso de plantas medicinais com ação antiparasitária na produção de caprinos do sistema de produção da Região de Patos - PB. In: III Encontro de Extensão da UFCG, 2008.

ROVA, J. H. E. et al. A trnL-F cpDNA sequence study of the Condamineeae-Rondeletieae-Sipaneeae complex with implications on the phylogeny of the Rubiaceae. **American journal of botany**, v. 89, n. 1, p. 145-159, 2002.

SHERLEY, M. The traditional categories of fluoroacetate poisoning signs and symptoms belie substantial underlying similarities. **Toxicology letters**, v. 151, n. 3, p. 399-406, 2004.

SILVA, A. B. **Ocorrência de *Omura congrua* Walker 1970, inseto-praga da ipecacuanha (psychotria ipecacuanha (stokes) no estado do Pará**. Embrapa Amazônia Oriental - Comunicado Técnico. 2000.

SILVA W. M. O. et al. Uso popular de plantas medicinais na promoção da saúde animal em assentamentos rurais de Seropédica – RJ. **Revista brasileira de Ciência Veterinária**, v. 20, n. 1, p. 32-36, 2013.

SOBRAL, C. E. Alternativas de Controle da Verminose Gastrintestinal dos Pequenos Ruminantes. **CEP**, v. 62011, p. 970, 2003.

SOTO–BLANCO, B. et al. Intoxicacao natural de caprinos e ovinos por Palicourea marcgravii St. Hill. (Rubiaceae). **Caatinga**, v. 17, n. 1, p. 52-56, 2004.

SOUZA, V. C.; LORENZI, H. **Botânica sistemática: Guia ilustrado para identificação de Fanerógamas nativas e exóticas no Brasil, baseado em APG II**. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2008.

STRUWE, L. G. **Gentianales (Coffees, Dogbanes, Gentians and Milkweeds)**. 2002. Disponível em: <gentian.rutgers.edu/reffiles/Struwe%202002%20ELS%20Gentianales.pdf>. Acesso em: 26 out. 2016.

TAYLOR, C. M. **Psychotria**. Flora do Brasil 2020 em construção. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. 2012. Disponível em: <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/>. Acesso em: 26 out. 2016.

TAYLOR, C. M.; CAMPOS, M. T. V. A.; ZAPPI, D. Flora da reserva Ducke, Amazonas, Brasil: Rubiaceae. **Rodriguésia**, v. 58, n. 3, p. 549-616. 2007.

TOKARNIA, C. H.; CANELLA, C. F. C.; DÖBEREINER, J. Intoxicação por um “tingui” (*Mascagnia rigida* Griseb.) em bovinos no Nordeste do Brasil. **Arquivos do Instituto Biológico,** v. 4, p. 203-215, 1961.

TOKARNIA, C. H.; DOBEREINER, J.; SILVA, M. F. Intoxicação por *Palicourea grandiflora* (Rubiaceae) em bovinos no Território de Rondônia. **Pesquisa veterinaria brasileira**, 1981.

TOKARNIA, C. H. et al. Intoxicação experimental por *Pseudocalymma elegans* (Vell.) Kuhlm. em bovinos. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 4, n. 1, p. 195-204, 1969.

_____. **Poisonous plants of Amazonia, affecting cattle and other herbivores**. Instituto Nacional de Pesquisas da Amazonia, 1979.

_____. Intoxicação por *Palicourea aeneofusca* (Rubiaceae), a causa de" mortes súbitas" em bovinos na Zona da Mata de Pernambuco. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 3, n. 3, p. 75-79, 1983.

TOKARNIA, C. H.; DÖBEREINER, J. Intoxicação por *Arrabidaea japurensis* (Bignoniaceae) em bovinos em R em bovinos em Roraima1. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 1, n. 1, p. 7-17, 1981.

VEROTTA, L. et al. Pyrrolidinoindoline alkaloids from *Psychotria colorata*. **Journal of Natural Products**, v. 61, p. 392-396, 1998.
VEROTTA, L. et al. Synthesis and Antinociceptive Activity of Chimonanthines and Pyrrolidinoindoline-Type Alkaloids. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 10, p. 2133–2142, 2002.

WANG, M. Y. et al. *Morinda citrifolia* (Noni): a literature review and recent advances in noni research. **Acta Pharmacologica Sinica**, v. 23, n. 12, p. 1127-1141, 2002.

YUNES, R. A.; PEDROSA, R. C.; CECHINEL FILHO, V. C. Fármacos e fitoterápicos: a necessidade do desenvolvimento da indústria de fitoterápicos e fitofármacos no brasil. **Quimica nova**, v. 24, n. 1, p. 147-152, 2001.

Capítulo

11

Ecocardiografia nas principais cardiopatias congênitas em cães

Edina Alves dos Santos [1]
Afonso Cassa Reis[2]
Paula Otoni Pereira Ronzani Santos[3]
Karina Preising Aptekmann[4]

1 INTRODUÇÃO

O ecocardiograma (ECO) se tornou um dos mais importantes exames complementares na cardiologia veterinária (DELLA TORRE et al., 2000). Este exame possibilita a identificação de estruturas, tamanho, função e hemodinâmica do coração e grandes vasos, sendo considerado uma técnica extremamente útil para o diagnóstico de doenças cardiovasculares em animais. É possível também avaliar a regressão, a estabilidade ou até mesmo o agravamento de alterações cardíacas (MADRON; CHETBOUL; BUSSADORI, 2015).

As vantagens deste exame incluem sua portabilidade, capacidade de formar rapidamente imagens em tempo real, ampla disponibilidade e natureza não-invasiva (RAM et al., 2011). Apesar da ecocardiografia ser um exame completo e de escolha para a identificação de muitas doenças cardíacas, também é o que mais depende do operador, sendo necessário que o

[1] Universidade Federal do Espírito Santo, e-mail: edinaalves91@hotmail.com;
[2] Universidade Federal do Espírito Santo, e-mail: afonsocassa@hotmail.com;
[3] Universidade Federal do Espírito Santo, e-mail: paularonzani@hotmail.com;
[4] Universidade Federal do Espírito Santo, e-mail: kapreising@gmail.com.

examinador esteja familiarizado com os princípios, limitações e capacidades deste exame (OYAMA, 2004).

Em cães, o ECO é indicado quando são identificados na anamnese e/ou no exame físico sinais de disfunção cardíaca como sopro, dispnéia, edema, tosse, intolerância ao exercício ou síncope. O aumento de silhueta cardíaca e edema pulmonar identificados pelo exame radiográfico também são indicativas para realização deste exame. O ECO também é indicado na avaliação cardíaca pré-operatória (BOON, 2011) e em pacientes idosos como exame de rotina para verificar a presença de possíveis alterações senis, tais como disfunção de contratilidade e fibrose valvular (HAMLIN, 2005). Além disso, pode ser utilizado em estudos clínicos, farmacológicos e dietéticos para detectar alterações cardíacas ocorridas após o início do tratamento específico (MADRON; CHETBOUL; BUSSADORI, 2015).

Dentre as principais alterações cardíacas detectadas em cães, por meio da ecocardiografia, estão as doenças cardíacas adquiridas, como a doença crônica de valva mitral (DCVM) ou tricúspide (DCVT), cardiomiopatia dilatada (CMD), efusão pericárdica (EP), neoplasias cardíacas, e doenças cardíacas congênitas, como a persistência do ducto arterioso (PDA), estenose de artéria pulmonar ou aorta, defeito de septo ventricular (DSV) e displasia de mitral ou tricúspide (BOON, 2011; MACDONALD et al., 2009; WESSELOWSKI et al., 2015). Nesta revisão serão abordadas as principais doenças cardíacas congênitas em cães.

2 PRINCIPAIS CARDIOPATIAS CONGÊNITAS

2.1 PERSISTÊNCIA DO DUCTO ARTERIOSO

A persistência do ducto arterioso (PDA) é a anormalidade cardiovascular congênita mais comum em cães (ASSUMPÇÃO et al., 2012), sendo mais observado em raças como o Pastor alemão, Cavalier King Charles spaniel, Springer spaniel, Border collie, Labrador, West Highland white terrier (ISRAËL et al., 2002).

O ducto arterioso é um vaso proveniente do sexto arco aórtico esquerdo que, durante a vida fetal, desvia o sangue da artéria pulmonar para a aorta, obliterando- se após o nascimento, passando desta forma a ser chamado de ligamento arterioso. A falha na oclusão deste ducto é que caracteriza o PDA (STOPIGLIA et al., 2004).

Nesta enfermidade, a maior pressão arterial sistêmica faz com que o sangue seja desviado da aorta para a artéria pulmonar (Shunt esquerda-direita). Esse desvio faz com que o sangue volte à circulação pulmonar e em seguida, ao átrio e ventrículo esquerdos, aumentando

o volume e a pressão diastólica, ocasionando desta forma, uma sobrecarga atrioventricular esquerda e consequente insuficiência cardíaca congestiva esquerda (BUCHANAN, 2001)

No PDA com shunt esquerda-direita, utilizando-se o modo bidimensional e modo-M, observa-se hipertrofia excêntrica do ventrículo esquerdo, além de dilatação do átrio esquerdo, aorta e artéria pulmonar (ASSUMPÇÃO et al., 2012). A sobrecarga de volume é proporcional ao tamanho do shunt de maneira que, shunts maiores geram sobrecargas mais intensas (BUCHANAN, 2001).

O átrio esquerdo pode se apresentar aumentado de tamanho na projeção de via de saída do ventrículo esquerdo e/ou no corte transversal, desta forma é provável que haja aumento da relação átrio esquerdo/aorta. Geralmente, não há comprometimento atrioventricular direito, no entanto, pode-se visibilizar abaulamento do septo interatrial ou interventricular em direção ao lado direito do coração nas imagens longitudinais (WINGFIELD; BOON, 1987).

A fração de encurtamento dos cães com PDA é frequentemente baixa ou dentro do intervalo de normalidade e a disfunção diastólica é confirmada quando o fluxo transmitral E/A é menor que um, o tempo de relaxamento isovolumétrico (TRIV) é maior que 80 mseg e o fluxo venoso de pulmonar é anormal (BOON, 2011).

Com frequência se observa nas imagens transversais da base cardíaca na paraesternal direita e esquerda, a artéria pulmonar aumentada. A dilatação da artéria pulmonar se estende desde a altura das valvas pulmonares até a ramificação desta artéria (ramo principal direito e esquerdo) (FIGURA 1) (ASSUMPÇÃO et al., 2012).

Figura 1 - Dilatação completa da artéria pulmonar, desde as valvas até a bifurcação observada na presença da persistência do ducto arterioso.

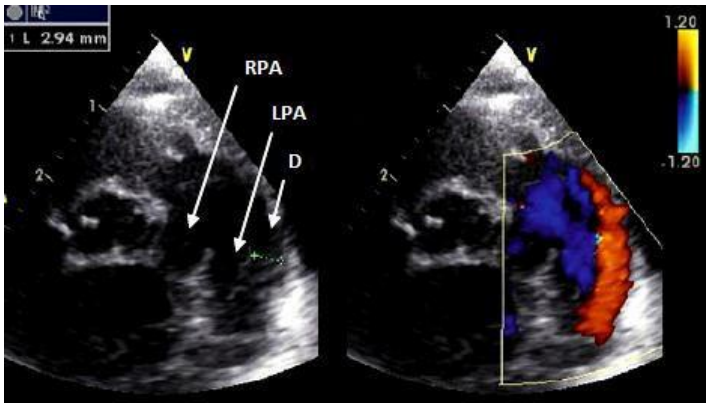
Fonte: Boon (2011).
Legenda: RV = ventrículo direito, AO = aorta, PA = artéria pumonar, RA = átrio direito. Plano transverso da paraesternal direita na base cardíaca.

A dilatação observada no PDA deve ser diferenciada da dilatação ocasionada pela

hipertensão pulmonar ou estenose pulmonar. Geralmente na estenose pulmonar a dilatação não se estende até o nível das valvas pulmonares, além disso, a dilatação pós-estenótica é bem evidente. Na hipertensão pulmonar, no entanto, a dilatação arterial chega atingir a altura das valvas pulmonares, mas nessa enfermidade, pode haver alterações hipertróficas no ventrículo direito e possível dilatação se a pressão da artéria pulmonar for mais elevada (BOON, 2011).

É possível visualizar um fluxo turbulento dentro da artéria pulmonar desde a bifurcação até as valvas pulmonares com o auxílio do Doppler em cores. O ducto arterioso em algumas vezes é visto e aparece como uma estrutura hipoecogênica entre a artéria pulmonar principal na altura de sua bifurcação e a aorta (FIGURA 2) (SEHGAL; TRAN; CARSE, 2011).

Figura 2 - Imagem obtida em plano transverso na paraesternal direita da base cardíaca envidenciando o ducto arterioso com seu respectivo fluxo demonstrado pelo Doppler em cores.



Fonte: Sehgal, Tran e Carse (2011).
Legenda: RPA = Ramo direito da artéria pulmonar, LPA = ramo esquerdo da artéria pulmonar, D = ducto.

O Doppler espectral contínuo permite realizar a mensuração da duração, velocidade e variações do fluxo durante a sístole e a diástole por meio das paraesternais direita e esquerda. A velocidade do fluxo transductal é determinada pelo gradiente entre a aorta e a artéria pulmonar. A hipertensão pulmonar, disfunção diastólica, ou alinhamento inadequado tendem a diminuir esta velocidade, no entanto, na ausência destes fatores, a velocidade transductal pode chegar a 4.5 m/s com um gradiente de 80 mmHg (MADRON; CHETBOUL; BUSSADORI, 2015).

O padrão de fluxo verificado com o Doppler espectral em qualquer uma das projeções da artéria pulmonar é bem característico e se apresenta como um fluxo positivo contínuo na trajetória espectral (FIGURA 3) (MADRON; CHETBOUL; BUSSADORI, 2015).

Figura 3 - Fluxo positivo contínuo obtido ao posicionar o cursor do Doppler espectral na artéria pulmonar em cão com persistência do ducto arterioso. Imagem obtida da paraesternal cranial esquerda no eixo curto.

Fonte: Madron, Chetboul e Bussadori (2015).

Quando a pressão pulmonar excede a pressão sistêmica, ocorre o shunt de direita-esquerda, também chamado de PDA reverso. A hipertensão pulmonar leva à hipertrofia concêntrica, dilatação da câmara ventricular direita bem como dilatação da artéria pulmonar principal. O átrio direito não apresenta alteração, a menos que haja insuficiência da valva tricúspide, neste caso, poderá haver dilatação atrial direita. As câmaras cardíacas esquerdas podem estar diminuídas devido à queda da pré-carga (ASSUMPÇÃO et al., 2012).

2.2 ESTENOSE AÓRTICA

A estenose aórtica é um defeito cardíaco obstrutivo comum em cães, sendo frequentemente relatada nas raças Pastor alemão, Boxer, Golden Retriever e Rottweiller (KIENLE; THOMAS; PION, 1994). A estenose pode se manifestar na forma subvalvar, valvar e supravalvar, contudo nos cães a forma subvalvar é a mais comum (O'GRADY et al., 1989).

A estenose subvalvar consiste no estreitamento da via de saída do ventrículo esquerdo secundário a presença de nódulos ou de uma rede complexa de tecido fibroso e/ou fibromuscular localizada logo abaixo da valva aórtica que se estende transversalmente ou circunda a saída deste vaso (KIENLE; THOMAS; PION, 1994). Esta alteração pode estar associada a outros defeitos congênitos como estenose pulmonar, PDA e defeito septal ventricular (TIDHOL, 1997).

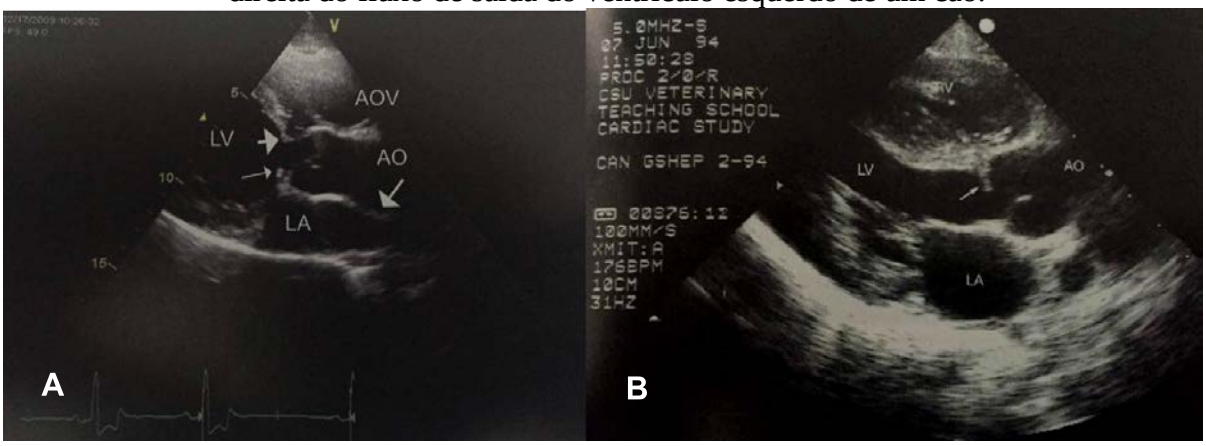
O ecocardiograma é o exame ideal para identificar e avaliar a gravidade da estenose subaórtica (STERN et al., 2012). Contudo, por se tratar de doença progressiva, o exame

ecocardiográfico detecta a estenose em animais mais velhos, mas pode não mostrar nenhuma alteração aórtica em animais jovens (KIENLE; THOMAS; PION, 1994).

As projeções transversais, de maneira geral, são melhores para definir o movimento da valva aórtica e possibilitam avaliação das dimensões da aorta, bem como sua obstrução. Nas projeções apicais, além da avaliação estrutural é possível determinar as velocidades dos fluxos e os gradientes de pressão (MADRON; CHETBOUL; BUSSADORI, 2015).

A avaliação bidimensional pode ser realizada na paraesternal direita na via de saída do ventrículo esquerdo onde se pode observar a presença de nódulos (estenose subaórtica tipo I) ou espessamento fibroso (tipo II) dentro da trajetória da aorta, reduzindo o lúmem deste vaso (FIGURA 4). Nesta projeção também é possível visualizar a dilatação pós-estenótica da aorta (QUINTAVALLA et al., 2006). A estenose subaórtica do tipo III é caracterizada por um estreitamento em túnel. Nesta alteração, a valva mitral assume uma forma rígida e juntamente com a base do septo interventricular forma um túnel subvalvar obstrutivo (FIGURA 5) (QUINTAVALLA et al., 2006).

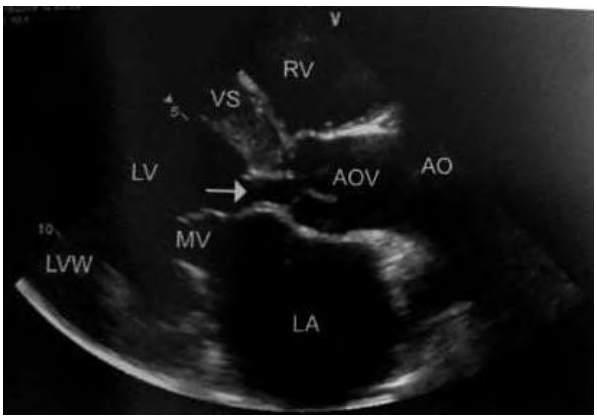
Figura 4 - A: Observa-se estenose subaórtica tipo 1 em imagem obtida na longitudinal cranial esquerda de cão. B: Observa-se estenose subaórtica tipo 2 em imagem obtida na paraesternal direita do fluxo de saída do ventrículo esquerdo de um cão.



Fonte: Boon (2011).

Legenda: Nota-se a presença de um nódulo fibroso (seta pequena) próximo a valva aórtica, bem como dilatação pós-estenótica (seta grande). Observa-se ainda a presença de hipertrofia muscular septal neste cão (seta curta). É possível visibilizar uma banda fibrosa (seta) imediatamente abaixo da valva aórtica. AOV = valva aórtica, AO = aorta, LV = ventrículo esquerdo, LA = átrio esquerdo, RV = ventrículo direito.

Figura 5 - Projeção longitudinal da via de saída do ventrículo direito da paraesternal direita em cão com estenose subaórtica em forma de túnel (seta).



Fonte: Boon (2011).
LA = aorta, LV = ventrículo esquerdo, LVW = parede livre do ventrículo esquerdo, MV = valva mitral, VS = septo ventricular, AOV = valva aórtica, AO = aorta, RV = ventrículo direito.

O uso do modo-M permite medições quantitativas da espessura do septo e da parede livre do ventrículo esquerdo, que frequentemente estão hipertrofiados em decorrência do aumento de pressão (OYAMA; THOMAS, 2002). A hipertrofia dificulta a perfusão miocárdica, gerando fibrose, isquemia miocárdica, disfunção diastólica ventricular e arritmias (MADRON; CHETBOUL; BUSSADORI, 2015). Em alguns cães com estenose subaórtica também pode haver dilatação atrial (MENEGAZZO et al., 2012). Esta alteração pode acontecer em consequência do movimento anterior sistólico da valva mitral, que culmina em refluxo da mesma ou por disfunção diastólica do ventrículo esquerdo (BOON, 2011).

A fração de encurtamento pode estar elevada em animais mais jovens, no entanto, na maioria dos cães com estenose subaórtica, a função sistólica geralmente é considerada normal (BOON, 2011). Conforme a doença progride, pode haver disfunção sistólica e diastólica e o miocárdio pode apresentar aumento de ecogenicidade decorrente da fibrose, alteração esta verificada principalmente nos músculos pailares e na base do septo ventricular (SCHOBER; FUENTES, 2002).

Com o Doppler espectral contínuo é possível observar um fluxo de alta velocidade na trajetória de via de saída do ventrículo esquerdo. O gradiente de pressão pode ser obtido pela equação de Bernoulli e utilizado na classificação da gravidade da estenose em leve (<40 a 50 mm Hg), moderado (50 a 80 mm Hg) e grave (>80 mm Hg) (MADRON; CHETBOUL; BUSSADORI, 2015). No entanto, este parâmetro apresenta limitação por sofrer influência do diâmetro da via de saída do ventrículo esquerdo e o débito cardíaco (BÉLANGER et al., 2001).

O Doppler em cores normalmente identifica um fluxo turbulento e de alta velocidade na via de saída do ventrículo esquerdo e aorta. Também é possível avaliar a regurgitação de mitral

secundária ao movimento anterior de mitral, além de verificar a presença de outros fatores complicantes, como insuficiências e shunts (BOON, 2011).

2.3 ESTENOSE PULMONAR

A estenose pulmonar consiste no estreitamento da via de saída do ventrículo direito (JONES; HUNT; KING, 2000), sendo frequentemente encontrada em raças como Golden retriever, Border terriers, Cavalier King Charles spaniels, Buldogue francês e Schnauzers (TIDHOL, 1997). Esta doença pode ser classificada em subvalar, valvar ou supravalvar, de acordo com a localização da lesão (LOCATELLI et al., 2013), contudo a forma valvular é considerada a mais comum em cães (TIDHOL, 1997).

A estenose pulmonar valvar consiste na displasia da valva pulmonar e é classificada em dois tipos. O tipo A é caracterizado pela fusão das comissuras das valvas semilunares e o tipo B consiste no espessamento e imobilidade destas valvas podendo haver hipoplasia do anilo e das cúspides valvares (BUSSADORI et al., 2000).

O estreitamento da pulmonar leva a uma sobrecarga de pressão do ventrículo direito, resultando em hipertrofia concêntrica e consequente dilatação desta câmara. Além disso, a turbulência causada pelo fluxo de alta velocidade no orifício estenosado ocasiona uma dilatação pós estenótica no tronco pulmonar principal. Pode haver ainda dilatação atrial esquerda em consequência da insuficiência da tricúspide e elevada pressão de enchimento do ventrículo direito podendo evoluir para ICC direita (TILLEY; GOODWIN, 2002).

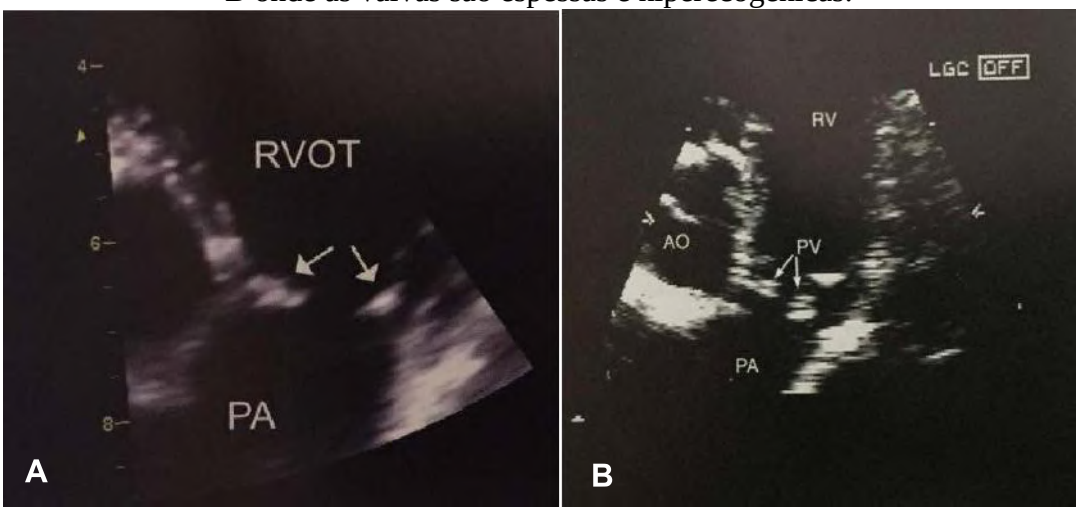
No ecocardiograma é possível observar hipertrofia ventricular direita, valvas pulmonares ou trajetória do fluxo de saída do ventrículo direito anormais, dilatação pós-estenótica do segmento da artéria pulmonar principal, além de dilatação atrioventricular direita (TILLEY; GOODWIN, 2002).

No modo-B a avaliação da valva e artéria pulmonar pode ser realizada nas imagens obtidas nas projeções transversas da paraesternal direita e oblíqua, além das projeções longitudinais da artéria pulmonar na cranial esquerda e transversa, contudo a imagem ideal para visualização destas estruturas pode variar em cada animal (BOON, 2011).

Na estenose pulmonar valvar do tipo A observa-se a falta de divisão dos folhetos valvares, no entanto, o anel valvar é normal. A valva comporta-se como um diafragma, adotando em sístole uma aparência em forma de cúpula, movimentando- se em direção à artéria pulmonar principal. Na estenose pulmonar valvar do tipo B, as cúspides se apresentam espessadas e imóveis, podendo haver hipoplasia do anel e das cúspides (FIGURA 6)

(BUSSADORI et al., 2000).

Figura 6 - A: Observa-se as cúspides da valva pulmonar em forma de cúpula pela fusão das comissuras caracterizando a estenose pulmonar tipo A. B: Observa-se estenose pulmonar tipo B onde as valvas são espessas e hiperecogênicas.



Fonte: Boon (2011).
Legenda: PA = artéria pulmonar, RVOT = trajetória do fluxo de saída do ventrículo direito, AO = aorta, RV = ventrículo direito, PV = valva pulmonar, PA = artéria pulmonar.

A hipoplasia da artéria pulmonar ou do anel valvar pode ser confirmada por meio da relação entre o diâmetro da artéria pulmonar e da aorta, sendo 0,8 -1,15 o valor normal desta relação em cães (BOON, 2011). Para tanto, o diâmetro aórtico pode ser determinado na projeção longitudinal da paraesternal direita na via de saída do ventrículo esquerdo e o anel da artéria pulmonar, nas projeções transversais da paraesternal direita ou esquerda na altura da inserção das cúspides valvares (BUSSADORI et al., 2001). A hipertrofia observada no ventrículo direito em consequência à sobrecarga de pressão é do tipo concêntrica, apresentando-se como uma câmara ventricular diminuída. Contudo, casos onde se observam dilatação das câmaras são sugestivos de insuficiência significativa de pulmonar e tricúspide ou possível associação de um shunt à estenose pulmonar. A dilatação atrial direita pode ser secundária a disfunção diastólica ou sistólica, ou pode ainda ser secundária à insuficiência de tricúspide causada por uma displasia concomitante (MADRON; CHETBOUL; BUSSADORI, 2015).

Em casos graves ou moderados de estenose pulmonar, pode se observar diminuição no diâmetro do ventrículo e átrio esquerdos em consequência do baixo débito ventricular direito. Neste caso, a baixa pré-carga e a falta de força das fibras musculares poderão levar à pseudohipertrofia ventricular esquerda, na qual se observa aumento de espessura da parede septal e ventricular esquerda associada à diminuição da câmara ventricular esquerda (BOON, 2011).

O Doppler também é de grande importância na avaliação da estenose pulmonar (MADRON; CHETBOUL; BUSSADORI, 2015). Com o Doppler espectral é possível observar um fluxo pulmonar de alta velocidade. Este recurso permite determinar a gravidade da estenose, da mesma forma que é realizado na estenose aórtica. Desta forma, gradientes inferiores a 50 mm Hg são característicos de estenose pulmonar leve. Na estenose moderada, se observa gradientes entre 51 a 80 mm Hg e, gradientes superiores a este estão associados à estenose pulmonar grave (BUSSADORI; QUINTAVALLA; CAPELLI, 2001). O Doppler em cores, contudo, auxilia na identificação da extensão da obstrução, podendo também ser utilizado para verificar a presença de insuficiência na valva pulmonar e tricúspide (MADRON; CHETBOUL; BUSSADORI, 2015).

2.4 DEFEITO SEPTAL VENTRICULAR

O defeito septal ventricular (DSV) é considerado uma alteração congênita frequente em cães (OLIVEIRA et al., 2011) e consiste na abertura do septo interventricular em consequência do desenvolvimento incompleto desta estrutura durante a vida embrionária (JONES; HUNT; KING, 2000).

Muitos tipos de DSVs tem sido definidos de acordo com sua localização no septo interventricular. DSVs do tipo supracristal são encontrados abaixo da cúspide direita e não coronariana da valva aórtica. Os DSVs membranosos, contudo, estão localizados dentro da parte membranosa do septo interventricular, logo abaixo das cúspides da valva aórtica. Defeitos localizados dorsalmente à porção muscular do septo são descritos como perimembranosos, paramembranosos ou conoventricular. Por fim, DSVs do tipo muscular podem se localizar em qualquer parte ao longo do septo ventricular muscular (BOMASSI et al., 2015).

Independente do tipo, o DSV permite a troca de fluxo sanquíneo entre o ventrículo direito e esquerdo. Normalmente, a direcção do fluxo é da esquerda para a direita, em consequência da menor resistência pulmonar em comparação com a circulação sistêmica. Sendo assim, o sangue é desviado do ventrículo esquerdo para a circulação pulmonar e regressa ao átrio esquerdo e ventrículo esquerdo, levando à hipertrofia excêntrica dessas câmaras (OYAMA; SISSON, 2001).

O tamanho do defeito septal ventricular é determinante para a apresentação clínica da doença. Pequenos defeitos podem não originar sinais clínicos. Defeitos moderados a grandes podem ocasionar dilatação atrioventricular esquerda com consenquente ICC e defeitos muitos grandes podem fazer com que os ventrículos trabalhem como uma única câmara, levando à

dilatação e hipertrofia do ventrículo direito. Além desses fatores, grandes desvios podem ocasionar sobrecarga circulatória com hipertensão pulmonar (WARE, 2006).

Além da identificação do defeito, o ecocardiograma permite definir o seu tamanho e extensão, determinar a direção do desvio, as consequências hemodinâmicas, o remodelamento ventricular, e quantificar o shunt (MADRON; CHETBOUL; BUSSADORI, 2015).

Os defeitos ventriculares maiores podem ser vistos facilmente. Contudo, defeitos muitos pequenos podem não ser notados apenas com a utilização do modo B, sendo necessário empregar o recurso Doppler em cores para confirmar a presença do DSV (WINGFIELD; BOON, 1987). Os animais com DSV geralmente apresentam aumento do diâmetro do ventrículo esquerdo em diástole com espessura normal da parede, além de função sistólica normal a aumentada (MADRON; CHETBOUL; BUSSADORI, 2015).

O tamanho do DSV influencia diretamente no grau de dilatação, pois a dilatação das câmaras é proporcional ao volume de sangue desviado (SHIMIZU et al., 2006). Em DSV menores, mesmo que não haja dilatação das câmaras cardíacas direita, a artéria pulmonar pode ter o diâmetro aumentado. Geralmente a dilatação é observada em toda sua extensão, desde as cúspides valvares até sua bifurcação. Esse fator é diferencial na dilatação pós estenótica, onde o diâmetro do vaso só aumenta distalmente à valva. Além disso, na estenose pulmonar, as cúspides dessa valva são incapazes de se movimentar durante a sístole (BOON, 2011).

Os DSV supracristais são melhor visualizados nas imagens transversas da paraesternal direita na base cardíaca, próxima a valva pulmonar ou nas imagens longitudinais craniais esquerdas da aorta proximal às valvas aórtica e pulmonar, sendo que, geralmente é necessária a utilização de Doppler em cores para identifica-los com precisão (BOON, 2011).

Os defeitos perimembranosos são frequentemente visualizados nas projeções longitudinais da paraesternal direita do fluxo de saída do ventrículo esquerdo, onde o septo ventricular se une a parede aórtica anterior (FIGURA 7) ou nas projeções transversas ao nível da aorta e átrio esquerdo ou da aorta e artéria pulmonar. Frequentemente na apical quatro câmaras, há uma baixa ecogenicidade entre o septo e a união atrioventricular, portanto, este plano não é indicado para avaliar o DSV (BOON, 2011).

Figura 7 - Grande defeito em septo ventricular perimembranoso próximo a valva aórtica (seta). É possível observar dilatação do ventrículo esquerdo e de artéria pulmonar ocasionado pela sobrecarga de volume.

Fonte: Boon (2011).
Legenda:LA= átrio esquerdo, LV = ventrículo esquerdo, AO = aorta, RV = ventrículo direito, PA = artéria pulmonar.

Os DSV do tipo muscular podem se localizar em qualquer lugar ao longo do septo interventricular. Desta forma, todo o septo ventricular deve ser examinado quando se visualizar um fluxo turbulento dentro do ventrículo direito (BOON, 2011). As imagens formadas a partir do eixo longo e eixo curto da paraesternal direita, bem como a apical quatro câmaras permitem uma melhor visualização do DSV muscular (MADRON; CHETBOUL; BUSSADORI, 2015).

Frequentemente se observa insuficiência aórtica na presença de DSV, principalmente do tipo supracristal. Durante a sístole, a cúspide não coronária da aorta é puxada pelo fluxo sanguíneo turbulento que é desviado e se prolapsa no defeito septal ventricular. Na diástole, as cúspides da valva aórtica não se fecham adequadamente e ocorre regurgitação aórtica, aumentando ainda mais a sobrecarga por volume no ventrículo esquerdo (SHIMIZU et al., 2006). Com o Doppler espectral e em cores é possível avaliar a gravidade da insuficiência aórtica, sendo que, uma insuficiência hemodinamicamente significativa pode ocasionar insuficiência cardíaca congestiva (MADRON; CHETBOUL; BUSSADORI, 2015).

O Doppler em cores e espectral também permitem identificar e avaliar o DSV. As proporções do shunt, as pressões das câmaras e o tamanho ventricular indicam a importância hemodinâmica do DSV (OYAMA; SISSON, 2001). Os grandes defeitos de septo interventricular permitem que a pressão entre os ventrículos direito e esquerdo se equilibrem, de maneira que, a velocidade do fluxo sanguíneo através do shunt vista no doppler espectral é mais baixa em comparação com a velocidade presente em defeitos menores. Isso ocorre porque uma abertura maior, permite que o sangue flua com maior facilidade e menor velocidade, originando menor turbulência do que em aberturas menores (BOON, 2011)

2.5 DISPLASIA DE VALVA TRICÚSPIDE

A displasia da valva tricúspide consiste em uma anomalia no aparato valvar da tricúspide, sendo mais observada em cães de raça grande como Labrador Retriever, Boxer, Pastor alemão e Bulldog inglês (OLIVEIRA et al., 2011). Em Labradores retrievers a transmissão genética tem sido relatada (MEURS, 2010).

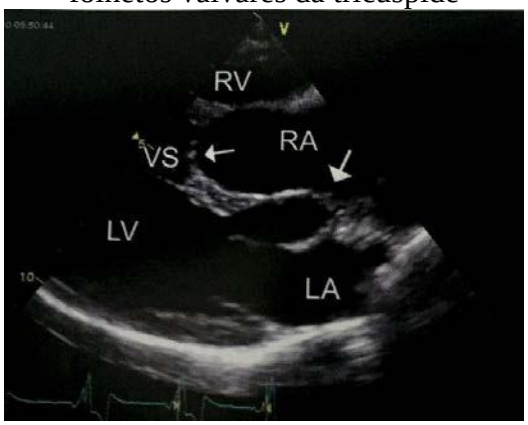
Esta doença se caracteriza pelo espessamento focal ou difuso dos folhetos valvulares, subdesenvolvimento músculos papilares e/ou das cordoalhas tendíneas, agenesia do tecido valvular bem como separação incompleta dos componentes valvares da parede ventricular (LIU; TILLEY, 1976).

As imagens ecocardiográficas que melhor possibilitam a avaliação da valva tricúspide são as obtidas na longitudinal quatro câmaras da paraesternal direita e apical quatro câmaras na paraesternal esquerda (MADRON; CHETBOUL; BUSSADORI, 2015). A aparência dos componentes valvares neste exame é variável, contudo normalmente se observa a valva septal unida ao lado direito do septo interventricular por cordas tendíneas curtas. Com frequência a valva parietal da tricúspide aparece alongada com uma união anormal a uma rede de músculos papilares, bem como não união dos folhetos valvares (BOON, 2011).

Além das alterações presentes nos componentes valvares, também é possível encontrar dilatação atrioventricular direita pela sobrecarga de volume, bem como outras alterações já relatadas na doença mixomatosa de valva tricúspide (MADRON; CHETBOUL; BUSSADORI, 2015).

Em alguns cães a displasia de tricúspide pode estar associada à Anomalia de Ebstein (SOUSA et al., 2006). Essa alteração consiste na inserção mais baixa do aparelho valvar na parede ventricular direita, próximo ao ápice. Esta situação faz com que a câmara atrial direita adquira um tamanho muito superior ao normal, ao passo que o ventrículo direito se torna diminuído, sendo este denominado ventrículo atrializado (FIGURA 8). Apesar da localização inadequada da valva tricúspide, não necessariamente haverá regurgitação importante. Na maioria das vezes se observa insuficiência moderada desta valva (BOON, 2011).

Figura 8 - Inserção da tricúspide próxima ao ápice ventricular direito na anomalia de Ebstein. Nota-se ainda o ventrículo direito auricularizado e deslocamento do ponto de união dos folhetos valvares da tricúspide



Fonte: Boon (2011).
Legenda: LA = atrio esquerdo; LV = ventrículo esquerdo; RA = átrio direito; RV = ventrículo direito; VS = septo ventricular.

3 REFERÊNCIAS

ASSUMPÇÃO, T. C. A. et al. Persistência do Ducto Arterioso – Revisão de Literatura. **Enciclopédia Biosfera**, v. 8, n. 15, p. 1295-1325, 2012.

BÉLANGER, M. C. et al. Usefulness of the Indexed Effective Orifice Area in the Assessment of Subaortic Stenosis in the Dog. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 15, n. 5, p. 430-437, 2001.

BOMASSI, E. et al. Signalment, clinical features, echocardiographic findings, and outcome of dogs and cats with ventricular septal defects: 109 cases (1992–2013). **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 247, n. 2, p. 166-175, 2015.

BOON, J. A. **Veterinary Echocardiography**. Iowa: Blackwell Publishing, 2011.

BUCHANAN, J. W. Patent Ductus Arteriosus Morphology, Pathogenesis, Types and Treatment. **Journal of Veterinary Cardiology**, v. 3, n. 1, p. 7-16, 2001.

BUSSADORI, C. et al. Guidelines for the echocardiographic studies of suspected subaortic and pulmonic stenosis. **Journal of Veterinary Cardiology**, v. 2, n. 2, p. 15-22, 2000.

_____. Valvuloplasty in 30 Dogs with Pulmonic Stenosis: Effect of Valve Morphology and Annular Size on Initial and 1-Year Outcome. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 15, n. 6, p. 553-558, 2001.

BUSSADORI, C.; QUINTAVALLA, C.; CAPELLI, A. Prevalence of Congenital Heart Disease in Boxers in Italy. **Journal of Veterinary Cardiology**, v. 3, n. 2, p. 7-11, 2001.

DELLA TORRE, P. K. et al. Echocardiographic measurements in Greyhounds, Whippets and Italian Greyhounds - dogs with a similar conformation but different size. **Australian Veterinary Journal**, v. 78, n. 1, p. 49-55, 2000.

HAMLIN, R. L. Geriatric Heart Diseases in Dogs. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, v. 35, n. 3, p. 597-615, 2005.

ISRAËL, N. V. et al. Review of left-to-right shunting patent ductus arteriosus and short term outcome in 98 dogs. **Journal of Small Animal Practice**, v. 43, n. 9, p. 395- 400, 2002.

JONES, T. C.; HUNT, R. D.; KING, N. K. **Patologia Veterinária.** 6, ed. Editora Manole Ltda, 2000.

KIENLE, R. D.; THOMAS, W. P.; PION, P. D. The Natural Clinical History of Canine Congenital Subaortic Stenosis. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 8, n. 6, p. 423-431, 1994.

LIU, S. K.; TILLEY, L. P. Dysplasia of the tricuspid valve in the dog and cat. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 169, n. 6, p. 623-630, 1976.

LOCATELLI, C. et al. Pulmonic stenosis in dogs: survival and risk factors in a retrospective cohort of patients. **Journal of Small Animal Practice**, v. 54, n. 9, p. 445- 452, 2013.

MACDONALD, K. A., et al. Echocardiographic and clinicopathologic characterization of pericardial effusion in dogs: 107 cases (1985–2006). **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 235, n. 12, p. 1456-1461, 2009.

MADRON, E.; CHETBOUL, V.; BUSSADORI, C. **Clinical Echocardiography of the Dog and Cat**. Elsevier Health Sciences, 2015.

MENEGAZZO, L. et al. The relevance of echocardiography heart measures for breeding against the risk of subaortic and pulmonic stenosis in Boxer dogs. **Journal of animal science**, v. 90, n. 2, p. 419-428, 2012.

MEURS, K. M. Genetics of cardiac disease in the small animal patient. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, v. 40, n. 4, p. 701-715, 2010.

O'GRADY, M. R. et al. Canine congenital aortic stenosis: A review of the literature and commentary. **The Canadian Veterinary Journal**, v. 30, n. 10, p. 811, 1989.

OLIVEIRA, P. et al. Retrospective review of congenital heart disease in 976 dogs. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 25, n. 3, p. 477-483, 2011.

OYAMA, M. A. Advances in echocardiography. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, v. 34, n. 5, p. 1083-1104, 2004.

OYAMA, M. A.; SISSON, D. D. Evaluation of Canine Congenital Heart Disease Using an Echocardiographic Algorithm. **Journal of the American Animal Hospital Association**, v. 37, n. 6, p. 519-535, 2001.

OYAMA, M. A.; THOMAS, W. P. Two-dimensional and M-mode echocardiographic predictors of disease severity in dogs with congenital subaortic stenosis. **Journal of the American Animal Hospital Association**, v. 38, n. 3, p. 209-215, 2002.

QUINTAVALLA, C. et al. Transesophageal Echocardiography of the Left Ventricular Outflow Tract, Aortic Valve and Ascending Aorta in Boxer Dogs With Heart Murmurs. **Veterinary Radiology & Ultrasound**, v. 47, n. 3, p. 307-312, 2006.

RAM, R. et al. New approaches in small animal echocardiography: imaging the sounds of silence. **American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology**, v. 301, n. 5, p. 1765-1780, 2011.

SCHOBER, K. E.; FUENTES, V. L. Doppler echocardiographic assessment of left ventricular diastolic function in 74 boxer dogs with aortic stenosis. **Journal of Veterinary Cardiology**, v.4, n. 1, p. 7-16, 2002.

SEHGAL, A.; TRAN, H. T.; CARSE, E. Doppler manifestations of ductal steal: role in decision making. **European Journal of Pediatrics**, v. 170, n. 6, p. 795-798, 2011.

SHIMIZU, M. et al. Surgical correction of ventricular septal defect with aortic regurgitation in a dog. **Australian Veterinary Journal**, v. 84, n. 4, p. 117-121, 2006.

SOUSA, M. G. et al. Tricuspid valve dysplasia and Ebstein's anomaly in dogs: case report. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 58, n. 5, p. 762-767, 2006.

STERN, J. A. et al. Familial subvalvular aortic stenosis in golden retrievers: inheritance and echocardiographic findings. **Journal of Small Animal Practice**, n. 4, p. 213-216, 2012.

STOPIGLIA, A. J. et al. Persistência do ducto arterioso em cães: revisão. **Revista de Educação Continuada em Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 7, n. 1/3, p. 23-33.

TIDHOL, A. Retrospective study of congenital heart defects in 15 1 dogs. **Journal of Small Animal Practice**, v. 38, n. 3, p. 94-98, 1997.

TILLEY, L. P; GOODWIN, J. K. **Manual de cardiologia para cães e gatos**. 3. ed. São Paulo: Editora Copyright, 2002.

WARE, W. A. Distúrbios do sistema cardiovascular. In: NELSON, R.W.; COUTO, C.G, **Medicina Interna de pequenos animais**. Rio de Janeiro: Editora Elsevier, 2006. p. 142-146.

WESSELOWSKI, S., et al. Echocardiographic anatomy of the mitral valve in healthy dogs and dogs with myxomatous mitral valve disease. **Journal of Veterinary Cardiology**, v. 17, n. 2, p. 97-106, 2015.

WINGFIELD, W. E., BOON, J. A. Echocardiography for the diagnosis of congenital heart defects in the dog. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, v. 17, n. 3, p. 735-753, 1987.

Capítulo

12

Guia prático de ecocardiografia em cães

Afonso Cassa Reis[1]
Edina Alves dos Santos[2]
Paula Otoni Pereira Ronzani Santos[3]
Karina Preising Aptekmann[4]

1 INTRODUÇÃO

O ecocardiograma (ECO) é um dos exames que auxilia o médico veterinário no diagnóstico de cardiopatias congênitas e adquiridas em cães, e também utilizado como exame pré, trans e pós-cirúrgico, dentre outras aplicações (BOON, 2011; CAMPOS FILHO et al., 2004; CHRISSOS et al., 2009; DELLA TORRE et al., 2000; SAUNDERS et al., 2007). Com o uso do ECO, é possível realizar o diagnóstico da doença cardíaca ainda em sua fase inicial, quando o cão ainda não apresenta sinais de insuficiência cardíaca. Como a doença cardíaca não possui cura definitiva, apenas controle, o quanto antes se começar o acompanhamento do paciente cardiopata, maiores serão as chances de o cão ter uma melhor qualidade de vida, retardando a evolução da doença (BOON, 2011).

Durante a realização do exame ecocardiográfico o animal deve permanecer em decúbito lateral esquerdo e direito para a visibilização das imagens ecocardiográficas. As imagens são formadas nas janelas acústicas denominadas janela paraesternal esquerda, dividida em cranial

[1] Universidade Federal do Espírito Santo, e-mail: afonsocassa@hotmail.com;
[2] Universidade Federal do Espírito Santo, e-mail: edinaalves91@hotmail.com;
[3] Universidade Federal do Espírito Santo, e-mail: paularonzani@hotmail.com;
[4] Universidade Federal do Espírito Santo, e-mail: kapreising@gmail.com.

e apical, onde se realizam cortes longitudinais no coração, e janela paraesternal direita, onde se realizam os cortes longitudinais e transversais do coração. A partir da visibilização das imagens, são realizadas medidas de espessura e tamanho de câmaras por meio do modo unidimensional (modo-M) e modo bidimensional (modo-B), além da avaliação de fluxo sanguíneo, direção e velocidade, por meio da avaliação de Doppler colorido e espectral, respectivamente (BOON, 2011).

Este exame, por meio de feixes de ultrassom, possibilita a visibilização de diversas estruturas do coração, fornecendo informações precisas sobre a morfologia, fisiologia, hemodinâmica e função cardíaca, permitindo a identificação de lesões valvulares, tamanho de câmaras cardíacas, massas cardíacas, defeitos congênitos, estenoses e efusão pericárdica, possibilitando o diagnóstico de diferentes cardiopatias (CAIVANO et al., 2012; CHETBOUL, 2010; GOMEZ et al., 2012).

2 BASES FÍSICAS E ARTEFATOS

O equipamento de ecocardiografia é composto por um monitor, um software e transdutores. Os transdutores possuem em seu interior cristais piezoelétricos que vibram ao receber um impulso elétrico, emitindo ondas de ultrassom. Quando o transdutor está em contato com a pele do cão, o som atravessa os diferentes tecidos do animal e tais tecidos emitem um eco, que é capitado pelo próprio transdutor e transformado em pulso elétrico, determinando uma imagem em pontos sucessivos na tela do aparelho (BOON, 2011; OYAMA, 2004).

Conforme a posição do transdutor na superfície corporal do animal será determinada a orientação da imagem, que poderá ser longitudinal ou transversal. As profundidades que as ondas de ultrassom atingem dependem da frequência do transdutor. A frequência é definida como o número de vezes que uma onda é repetida (ciclos) por segundo. Já o comprimento de onda é a distância que a onda percorre durante um ciclo. A frequência e o comprimento de onda são inversamente proporcionais; quanto menor o comprimento de onda, maior a frequência e melhor a resolução. Já a profundidade que o som penetra no tecido é inversamente proporcional à frequência empregada; sons de alta frequência são mais atenuados que sons de baixa frequência, atingindo menor profundidade (BOON, 2011; OYAMA, 2004).

Tecidos que formam ecos são denominados ecoicos e formam imagens em tons que variam do branco ao cinza. Tecidos muito densos ou altamente reflexivos são denominados de hiperecoicos, formando imagens muito brilhantes e em cor branca; os fluidos, por não transmitirem ecos, são denominados anecoicos e aparecem na imagem na cor preta; tecidos não

muito densos, que formam ecos esparsos, gerando uma imagem em tons de cinza, são denominados hipoecoicos. O termo isoecoico é utilizado para tecidos que possuem a mesma ecogenicidade (NYLAND; MATOON, 2005).

Um artefato é qualquer alteração visibilizada na imagem ecocardiográfica que está no local incorreto, de tamanho ou formato não usuais, dificultando o entendimento do exame ou levando o examinador a uma interpretação errônea do mesmo. Para minimizar a presença dos artefatos é importante a escolha de um transdutor apropriado para o tamanho do animal. Porém, mesmo quando se utiliza um transdutor adequado, o aparecimento de artefatos ainda pode ocorrer devido a movimentos do próprio animal ou movimentos respiratórios, que podem ser minimizados pela tranquilização do animal (BOON, 2011).

3 INDICAÇÕES

Indica-se o exame ecocardiográfico na rotina clínica quando a anamnese e exame físico do cão evidenciam algumas das seguintes manifestações clínicas: intolerância ao exercício, tosse, síncope, pulso fraco ou sopro. Alterações radiográficas, como edema pulmonar e aumento de silhueta cardíaca; e eletrocardiográficas, como arritmias, também são indicações para a realização do exame. Também é indicado como exame de rotina para animais idosos, devido às alterações que ocorrem pela senilidade como fibrose de válvulas e disfunção de contratilidade, e como exame pré-cirúrgico (BOON, 2011).

O uso da ecocardiografia transoperatória ganhou impulso com a técnica transesofágica, que se apresenta superior à técnica transtorácica. É útil para dar orientação ao cirurgião sobre os aspectos anatômicos ou funcionais em tempo real, para detecção imediata de defeitos residuais na cirurgia cardíaca e nas cirurgias de correções de defeitos congênitos, como por exemplo, a persistência do arco aórtico e ainda atuando no pós-cirúrgico verificando se função cardíaca está voltando ao normal após a correção do defeito (CAMPOS FILHO et al., 2004; CHRISSOS et al., 2009; SAUNDERS et al., 2007).

Além disso, o ECO é o exame de escolha para o diagnóstico de diversas doenças cardíacas adquiridas ou congênitas nos cães, como: cardiomiopatia dilatada, doença crônica de valva mitral ou tricúspide, neoplasias cardíacas, persistência do ducto arterioso, defeito de septo ventricular, estenose de artéria pulmonar ou aorta, tetralogia de Fallot, displasia de mitral ou tricúspide, entre outras (BOON, 2011; DUKES-MCEWAN et al., 2003; SILVA et al., 2014; YUAN, 2014).

4 REALIZAÇÃO DO EXAME

Para a realização do exame o transdutor deve estar em contato com o tórax do cão, entre o quarto e sexto espaço intercostal, sendo o exame realizado em decúbitos lateral esquerdo e lateral direito. Nos cães, a tricotomia deve ser feita do lado esquerdo e direito, para diminuir os efeitos do ar na transmissão das ondas de ultrassom. Do lado esquerdo, a tricotomia deve ser realizada desde o quarto espaço intercostal até a última costela, e no lado direito a tricotomia é feita do quarto até o sexto espaço intercostal. Cães que apresentem pelagem mais fina a tricotomia pode não ser necessária, obtendo-se apenas com a utilização de gel e álcool que ajudam a aumentar o contato do transdutor com a pele do cão (BOON, 2011).

Muitos ecocardiografistas possuem uma mesa especial com furos no centro ou recortes nos bordos da mesa, que permitem um melhor acesso, pois o transdutor pode ser posicionado por baixo da mesa. Este método permite a obtenção de imagens de melhor qualidade, pois aumenta o contato do coração com a parede do tórax, afastando assim o pulmão da janela ecocardiográfica e diminuindo a interferência deste (BOON, 2011).

Os transdutores mais indicados para a realização do exame ecocardiográfico são os transdutores setoriais, pois as janelas ecocardiográficas estão sempre limitadas pelas costelas e estes transdutores permitem o acesso através de um pequeno espaço, pois originam um feixe de ultrassom em forma de cunha, que se espalha pela cavidade torácica (OYAMA, 2004).

A tranquilização para a realização de exames de diagnóstico por imagem é necessária, em algumas ocasiões, pois os animais podem não colaborar para a realização do exame. Sendo assim, é importante o conhecimento das propriedades dos fármacos anestésicos e sedativos, evitando alterações iatrogênicas que possam interferir ou impedir a interpretação do exame realizado (LOPES et al., 2011)

5 MODALIDADES E RECURSOS DA ECOCARDIOGRAFIA

O exame ecocardiográfico na medicina veterinária rotineiramente utiliza as modalidades ecocardiográficas de modo monodimensional (modo-M) e bidimensional (modo-B), além de recursos como Doppler colorido, contínuo e pulsado (BOON, 2011; OYAMA, 2004). Outros recursos ecocardiográficos que também podem ser utilizados são o Doppler tecidual, que permite uma análise do movimento realizado pelo miocárdio, e o *Speckle-Tracking*, que fornece informações sobre a dinâmica segmentar do ventrículo esquerdo (VE) (ALMEIDA et al., 2013; NAGUEH et al., 1997; SILVA et al., 2002).

O modo-B é o estudo do coração em duas dimensões. É melhor para avaliar a morfologia geral do coração, padrões de movimento e tamanho e orientação de estruturas. Porém, o modo-B é limitado em resolução para estruturas de pequenas dimensões e em animais nos quais a frequência cardíaca (FC) é muito alta ou estruturas que se movem rapidamente, dificultando assim suas medições e tornando-as imprecisas (OYAMA, 2004).

O modo-M apresenta uma melhor taxa de amostragem de imagens, permitindo a formação quase contínua da imagem, conferindo maior precisão nas imagens formadas de estruturas que se movem rapidamente. A sua resolução entre diferentes estruturas também é superior quando se comparada ao modo-B, tornando assim as medições realizadas nesse modo mais fáceis e exatas. A maior dificuldade encontrada no modo-M é alinhar corretamente o feixe de ultrassom, o que muitas das vezes pode dificultar a obtenção da imagem necessária (BOON, 2011).

O recurso Doppler avalia o fluxo sanguíneo através das valvas e dos vasos. A direção e a velocidade do fluxo sanguíneo são traduzidas graficamente (Doppler pulsado e contínuo) e/ou em escala de cores (Doppler colorido) (BOON, 2011; OYAMA, 2004). O Doppler contínuo utiliza um feixe contínuo de ultrassom, que apresenta a variação de velocidade de todos os elementos móveis atravessados pelo feixe, gerando dificuldade na interpretação do sinal. Porém, permite a realização de medidas de velocidades muito maiores quando comparado ao Doppler pulsado (BOON, 2011). O Doppler pulsado utiliza pulsos de ultrassom, coletando informações de velocidade e direção do fluxo sanguíneo de uma área específica (volume de amostra). Detecta velocidades de fluxo menores que o Doppler contínuo (SZATMÁRI et al., 2015). O Doppler colorido apresenta um mapeamento de fluxo em cores sobreposto à imagem em modo-B, sendo que o fluxo que se aproxima do transdutor aparece em vermelho, pois tem um aumento na frequência de eco, e o fluxo que se distancia do transdutor aparece em azul, pois tem uma diminuição na frequência de eco. Quando existe um fluxo turbulento apresenta-se como um mosaico de cores, uma mistura de verdes e amarelos (RAM et al., 2011; STALMANS et al., 2011).

O Doppler tecidual se assemelha muito com o recurso Doppler convencional, porém, ao invés de medir a velocidade do fluxo sanguíneo dentro do coração e vasos, este método permite medir velocidades dos tecidos que também se movimentam, como o miocárdio, por exemplo (NAGUEH et al., 1997; SILVA et al., 2002). A diferença do Doppler tecidual para o convencional são os filtros utilizados, pois no Doppler convencional registra-se velocidades muito mais altas que as velocidades registradas com o movimento do miocárdio, que produz sinais com amplitudes cem vezes maiores que o sangue. Dessa forma, para realizar o exame

com o Doppler tecidual elimina-se determinados filtros utilizados no Doppler convencional, permitindo assim registrar as menores velocidades do movimento do miocárdio (SILVA et al., 2002).

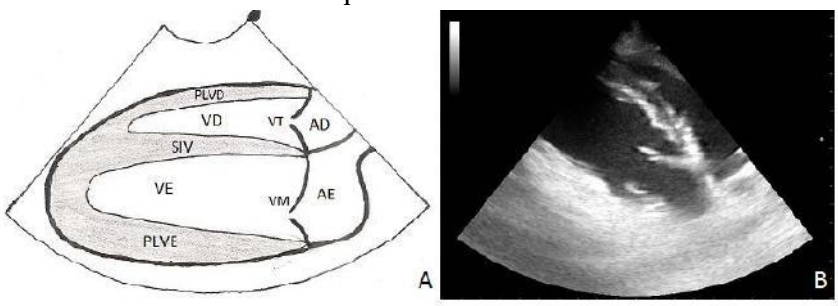
O VE apresenta disposição helicoidal e laminar das fibras do miocárdio, originando uma complexa deformação sistólica. Com isso, a ecocardiografia convencional não consegue analisar toda a complexidade da contração ventricular devido a essa disposição das fibras do miocárdio e avalia apenas um plano da contração ventricular. Já o *Speckle tracking* consiste na captura e rastreamento de pontos do ECO bidimensional ao longo do ciclo cardíaco, gerando vetores de movimento e curvas de deformação (*strain rate* e *strain*), fornecendo informações muito mais precisas sobre a função do VE (ALMEIDA et al., 2013).

6 JANELAS ACÚSTICAS, CORTES ECOCARDIOGRÁFICOS E PARÂMETROS AVALIADOS

6.1 JANELA PARAESTERNAL DIREITA - CORTE LONGITUDINAL

Para se obter as imagens na janela paraesternal direita, em corte longitudinal, o transdutor deve estar posicionado de forma que os feixes de ultrassom sejam direcionados paralelamente ao maior eixo cardíaco e com isso pode-se obter as seguintes imagens: quatro câmaras ou a via de saída do VE. Na imagem das quatro câmaras visibiliza-se ambos os átrios e ventrículos, valva mitral e tricúspide (FIGURA 1). Avalia-se subjetivamente, em modo-B, o tamanho do coração. Em um coração normal, o septo interventricular não deve possuir curvatura para nenhum dos lados (BOON, 2011).

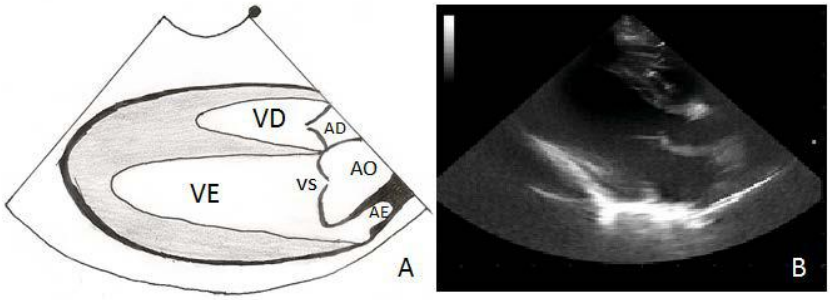
Figura 1 - A: Esquema do corte longitudinal quatro câmaras B: Imagem do corte longitudinal quatro câmaras.



A: arquivo pessoal (2015); B: Hospital Veterinário Universidade Federal do Espírito Santo (2015)
Legenda: VD, Ventrículo direito; VT, Valva Tricúspide; AD, Átrio direito; VE, Ventrículo esquerdo; VM, Valva mitral; PLVE, Parede livre do ventrículo esquerdo; SIV, Septo intraventricular ventricular; AE, Átrio Esquerdo.

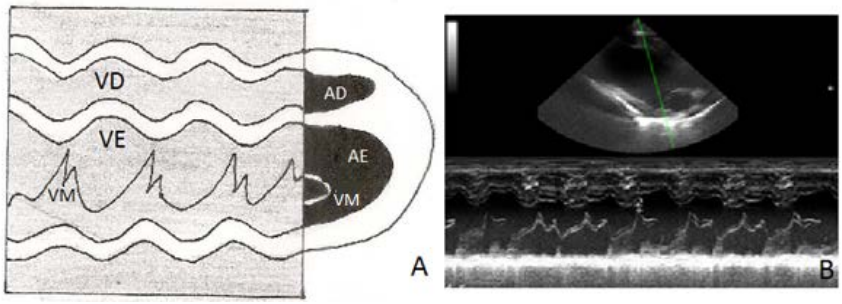
Na via de saída do VE é possível visibilizar, além das estruturas citadas na imagem quatro câmaras, a valva aórtica e a raiz da aorta (FIGURA 2) (BOON, 2011). A avaliação dessa imagem em modo-B também é realizada de forma subjetiva. A câmara do ventrículo direito (VD) deve medir até 1/3 do VE, a parede livre do ventrículo esquerdo e o septo interventricular devem ser similares em tamanho, a parede do VD deve ser de 1/3 a 1/2 da parede livre do ventrículo esquerdo, o átrio esquerdo e aorta são similares em tamanho e o septo interventricular deve ser reto (FIGURA 2). Na avaliação em modo-M realiza-se uma medida chamada distância do septo interventricular ao ponto E (E-septo), usada como indicador da função do VE e de enchimento. Este parâmetro mede a distância entre o septo ventricular e a abertura inicial máxima da valva mitral (ponto E). Para calcular o valor do E-septo deve-se posicionar o transdutor no limite dos folhetos da valva mitral, visibilizando uma imagem em forma de M (FIGURA 3). O primeiro movimento do folheto corresponde ao enchimento ventricular rápido, com abertura máxima da valva (ponto E), o valor de E-septo é medido do ponto E até o septo interventricular. Algumas vezes, em FC elevadas, há em um único pico, pois o enchimento rápido e a contração atrial coincidem (BOON, 2011).

Figura 2 - A: Esquema do corte longitudinal trato de saída do ventrículo esquerdo B: Imagem ecocardiográfica do corte longitudinal do trato de saída do ventrículo esquerdo.



A: Arquivo pessoal (2015); B: Hospital Veterinário Universidade Federal do Espírito Santo (2015)
Legenda: VD, Ventrículo direito; AD, Átrio direito; VE, Ventrículo esquerdo; AE, Átrio Esquerdo; AO, Aorta; VS, Válvulas semilunares.

Figura 3 - A: Esquema da medida E-septo realizada no modo-M em corte longitudinal via de saída do ventrículo esquerdo B: Imagem ecocardiográfica em modo-M do corte longitudinal trato de saída do ventrículo esquerdo na altura da valva mitral.

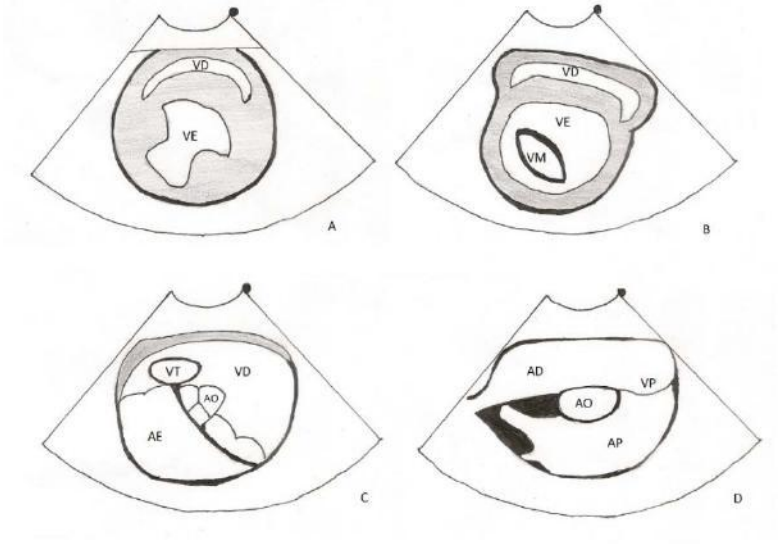


A: Arquivo pessoal (2015). B: Hospital Veterinário Universidade Federal do Espírito Santo (2015)
Legenda: VD, Ventriculo direito; VE ventrículo esquerdo; VM, valva mitral.

6.2 JANELA PARAESTERNAL DIREITA – CORTE TRANSVERSAL

A partir da imagem longitudinal, ainda em janela paraesternal direita, ao rotacionar o transdutor 90º, obtém-se um corte transversal do coração, permitindo a formação das seguintes imagens: ápice do VE, músculos papilares, cordas tendíneas, valva mitral, base do coração com artéria aorta e base do coração com artéria pulmonar. O exame começa no ápice do coração e, à medida que se angula o transdutor no sentido ventro-dorsal, se obtêm todas as imagens presentes nessa janela (FIGURA 4) (BOON, 2011).

Figura 4 - Esquema da janela paraesternal direita com os principais cortes transversais: músculos papilares (A), valva mitral (B), aorta (C) e artéria pulmonar (D).



Fonte: Arquivo pessoal (2015)
Legenda: VD, ventrículo direito; VE, ventrículo esquerdo; VM, valva mitral; AO, artéria aorta; AP, artéria pulmonar; AD, átrio direito; AE, átrio esquerdo, VT, valva mitral.

No corte na altura dos músculos papilares, em modo-B, deve-se avaliar subjetivamente o tamanho, o movimento de contração e o relaxamento do coração, que devem ser uniformes. A forma externa da imagem deve ser circular, e a forma da câmara do VE deve ser uma seta e os músculos papilares devem ser simétricos. Em modo-M realiza-se a medição da espessura do septo interventricular em diástole (SIVd), diâmetro do ventrículo esquerdo em diástole (DIVEd) e diâmetro do ventrículo esquerdo em sístole (DIVEs), espessura da parede livre do ventrículo esquerdo em diástole (PLVEd). Os valores normais variam de acordo com peso do animal e confirmação corporal, podendo-se utilizar uma escala alométrica. Calcula-se também a fração de ejeção (FEj) e fração de encurtamento (FE) (BOON, 2011).

A FE avalia a percentagem de alteração no tamanho do VE entre a diástole e a sístole, utilizando a seguinte fórmula: FE = ((VEd-VEs)/VEd) x 100 (BOON, 2011). Os fatores que podem influenciar a FE são a pré-carga, a pós-carga e a contratilidade. A diminuição da FE pode significar que há diminuição da pré-carga, aumento da pós-carga ou diminuição na contratilidade. No geral, utiliza-se como valor normal de 33 a 45%, porém existem diferenças significativas entre raças (BOON, 2011).

A FEj é uma medida da percentagem de volume ejetado no fim da diástole em cada batimento cardíaco, para calcular a FEj utiliza-se a diferença do volume do VE na diástole. A fração de ejeção pode ser calculada através da seguinte equação: FEj = ((VFD – VFS)/VFD) x 100. Onde VFD é o volume final da diástole do VE e VFS o volume final da sístole no VE (BOON, 2011).

Ao se angular o transdutor para visibilizar a valva mitral pode-se realizar a medida de E-septo. Deve-se proceder da mesma forma como foi descrita anteriormente no corte de via de saída do VE (BOON, 2011).

Na base do coração com artéria aorta, em modo-B, avalia-se subjetivamente o tamanho de câmaras e vasos, sendo que a aorta é discretamente menor que o átrio esquerdo e a artéria pulmonar. Calcula-se a razão entre o tamanho do átrio esquerdo e da aorta, medindo-se o diâmetro transverso interno da aorta ao nível da comissura entre as cúspides no fechamento da valva aórtica; e o diâmetro do átrio esquerdo numa linha que se estende paralelamente desde a comissura entre as cúspides da valva aórtica até à margem distal do átrio esquerdo. O valor normal da razão entre o átrio esquerdo e a aorta varia entre 1,3 a 1,4 (BOON, 2011; KIENLE; THOMAS, 2002; O'GRADY et al., 1986).

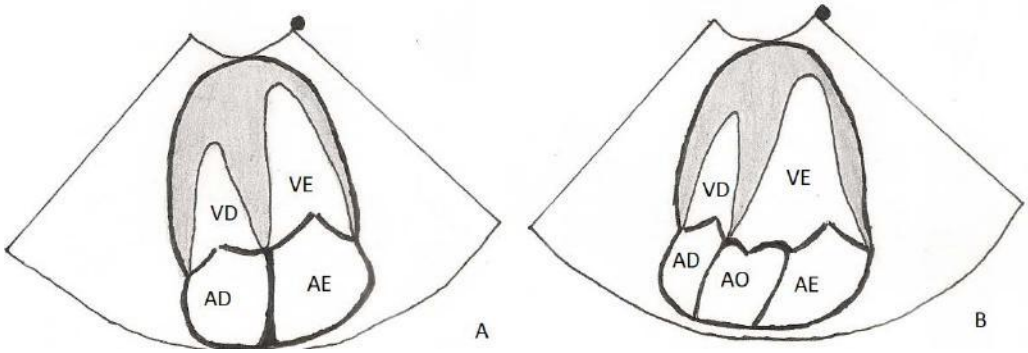
Na base do coração com a artéria pulmonar avalia-se subjetivamente, em modo-B, se existe alguma estenose ou dilatação na artéria pulmonar, utilizando-se do recurso Doppler pulsado e colorido. O Doppler colorido é posicionado na altura da valva pulmonar para

avaliação do fluxo. Não deve existir refluxo na valva pulmonar e o fluxo não pode se apresentar turbulento. O Doppler pulsado deve ser posicionado na altura da saída da valva pulmonar para calcular a velocidade em que o fluxo sanguíneo está passando pela valva ao se posicionar a amostra no local. A imagem visibilizada é uma onda negativa de ponta abaulada com velocidade menor que 130 cm/s (BOON, 2011).

6.3 JANELA PARAESTERNAL ESQUERDA APICAL - CORTE LONGITUDINAL

Para visibilizar a janela paraesternal esquerda apical direciona-se o feixe de ultrassom dorsalmente e cranialmente ao longo do comprimento do coração com o transdutor próximo ao esterno. Os principais cortes apresentados na janela paraesternal esquerda apical em corte longitudinal são quatro câmaras e cinco câmaras. Nestes cortes é possível a visualização de ambos os átrios e ventrículos, valva tricúspide e mitral, septo interventricular e parede livre do ventrículo esquerdo, com a diferença que no corte das cinco câmaras visibiliza-se a aorta e a valva aórtica (BOON, 2011). Para visibilizar a janela paraesternal esquerda apical direciona-se o feixe de ultrassom dorsalmente e cranialmente ao longo do comprimento do coração com o transdutor próximo ao esterno. Os principais cortes apresentados nesta janela são quatro câmaras e cinco câmaras (FIGURA 5). Nestes cortes é possível a visualização de ambos os átrios e ventrículos, valva tricúspide e mitral, septo interventricular e parede livre do ventrículo esquerdo, com a diferença que no corte das cinco câmaras visibiliza-se a aorta e a valva aórtica (BOON, 2011).

Figura 5 - A: Esquema do corte longitudinal em janela paraesternal esquerda apical visibilizando a imagem 4 câmaras. B: Esquema do corte longitudinal em janela paraesternal esquerda apical visibilizando a imagem 5 câmaras.



Fonte: Arquivo pessoal (2015)
Legenda: VD, Ventrículo direito; AD, Átrio direito; VE, Ventrículo esquerdo; AE, Átrio Esquerdo; AO, Aorta.

No corte quatro câmaras avalia-se subjetivamente o tamanho de câmaras cardíacas em modo-B. O Doppler colorido é posicionado na valva mitral e tricúspide para avaliar a presença de refluxo ou fluxo turbulento. O Doppler espectral é posicionado logo após a saída da valva mitral para avaliar a velocidade do fluxo sanguíneo. O resultado são duas ondas positivas, sendo a primeira onda (onda E), de maior amplitude, que indica o enchimento rápido do VE; e a segunda onda (onda A), de menor amplitude, corresponde à contração atrial esquerda. O valor normal para onda E tem de ser menor que 1 m/s e para onda A deve ser menor que 0,75 m/s. Calcula-se a razão da onda E com a onda A e o valor normal para esta razão deve estar no intervalo de 1,04 a 2,42 (BOON, 2011). Em modo-M avalia-se o movimento anular mitral (MAM) e excursão sistólica do plano anular tricúspide (ESPAT), sendo a avaliação do MAM realizada na inserção da valva mitral no SIV e o ESPAT na inserção da valva tricúspide na parede livre do ventrículo direito (PARIAUT et al., 2012; SCHOBER; FUENTES, 2001a).

No corte longitudinal cinco câmaras, posiciona-se o Doppler colorido na valva aórtica para visibilizar a presença de refluxo ou fluxo turbulento. Para avaliação do Doppler espectral posiciona-se a amostra logo após a saída da valva aórtica para avaliar a velocidade do fluxo aórtico. A onda formada será uma onda negativa com aceleração rápida e desaceleração mais lenta e seu valor não deve ultrapassar 2,5 m/s. Ao se posicionar a amostra do Doppler pulsado entre o fluxo aórtico e o fluxo mitral é possível obter o valor do tempo de relaxamento isovolumétrico (TRIV). Haverá visibilização de duas ondas positivas (ondas E e A) e uma onda negativa (fluxo aórtico), porém todas com valores subestimados devido à localização da amostra. A medida da TRIV é temporal, sendo realizada a partir do final da onda do fluxo aórtico até o início da onda E e seu valor normal varia de 38 a 54 ms (BOON, 2011; SCHOBER; FUENTES, 2001b).

6.4 JANELA PARAESTERNAL CRANIAL ESQUERDA – CORTE LONGITUDINAL

Movimentando o transdutor para uma posição cranial ao coração, entre o 4º ou 5º espaço intercostal, e com os feixes de ultrassom direcionados dorso-caudalmente, paralelos ao eixo maior do coração, visibiliza-se a janela paraesternal cranial esquerda em corte longitudinal, onde se obtém as imagens de via de saída do VE, átrio e aurícula direita e via de saída do VD (BOON, 2011).

A imagem de saída do VE é muito semelhante com a imagem formada em janela paraesternal direita, porém com as seguintes diferenças: não visibilização da valva tricúspide ou do átrio direito e a visibilização da artéria pulmonar acima da aorta ascendente. Na imagem

denominada átrio e aurícula direita é possível visibilizar átrio direito, valva tricúspide e aurícula direita e os dois ventrículos. Partindo da imagem da via de saída do VE e posicionando o transdutor paralelamente à mesa de exame, visibiliza-se a via de saída do VD onde se observa a artéria pulmonar, valva pulmonar, ventrículo e átrio esquerdo (NELSON; COUTO, 2015).

A avaliação realizada na janela paraesternal esquerda cranial em corte longitudinal limita-se à avaliação subjetiva e utilização do Doppler colorido e pulsado no corte com átrio e VD assim como na imagem da via de saída do VE, avaliando-se a presença ou ausência de refluxo (BOON, 2011).

7 FUNÇÃO DO VENTRÍCULO ESQUERDO E DIREITO

O VE tem como função bombear uma quantidade suficiente de sangue para o corpo e, a cada batida do coração, perfundir todos os tecidos e satisfazer as necessidades metabólicas do organismo. A capacidade de bombeamento do coração, ou função sistólica depende, de vários fatores como: pré-carga, pós-carga, contratilidade, relaxamento cardíaco, contração coordenada do miocárdio e FC (REECE, 2006). O ECO avalia a função sistólica do VE com os seguintes parâmetros: FE (%), FEj (%), E-septo (cm), MAM (mm) e velocidade do fluxo aórtico (m/s) (BOON, 2011).

A pré-carga determina o comprimento da fibra muscular em repouso. Com o aumento da pré-carga ocorre aumento na força de contração (lei de Frank-Starling). A pós-carga é definida principalmente pela pressão sistólica, pois as pressões sistólicas definem qual deve ser a tensão desenvolvida pela parede ventricular. Dessa forma, se a pressão sistólica estiver aumentada, as contrações ventriculares resultarão em maior pós-carga. Sendo assim, a pós-carga estabelece a quantidade de trabalho necessário para ejetar o sangue (BOON, 2011; REECE, 2006).

O aumento da FC no músculo isolado resulta em aumento da tensão desenvolvida, elevando ligeiramente o estado inotrópico, porém o efeito que prevalece com o aumento da FC é o aumento potencial no débito cardíaco (REECE, 2006). A contratilidade, ou estado inotrópico, influencia a função sistólica independente da pré-carga ou pós-carga. O aumento do estado inotrópico intensifica a tensão máxima desenvolvida em cada pré-carga, além de influenciar na velocidade de relaxamento da fibra muscular. A capacidade de relaxamento ou lusitropia refere-se à inativação do processo contrátil e retorno do músculo a um estado relaxado, sendo que a relação volume-pressão diastólica final indica o estado lusitrópico do miocárdio, importante para o enchimento ventricular adequado (REECE, 2006).

A função diastólica do VE é a capacidade de preenchimento cardíaco em uma pressão normal. A insuficiência diastólica está relacionada apenas a um aumento da resistência ao enchimento cardíaco. A manutenção da função diastólica independe da função sistólica, ou seja, o animal pode apresentar insuficiência diastólica sem comprometimento da função sistólica e vice-versa. A função diastólica é avaliada com os seguintes parâmetros ecocardiográficos: TRIV (ms), onda E (m/s), onda A (m/s) e razão onda E/A (REECE, 2006).

A diástole é constituída por quatro fases: período de relaxamento isovolumétrico; fase de enchimento rápido; fase de enchimento lento e contração atrial. O processo de relaxamento do miocárdio está intimamente relacionado à função diastólica, sendo este processo dependente de energia. A diástole causa uma mudança no gradiente de pressão, abrindo a valva mitral, e aproximadamente 80% do sangue passa de forma passiva para o VE (enchimento rápido, correspondente à onda E), enquanto os outros 20% passarão para o ventrículo após a contração atrial esquerda (enchimento lento, correspondente à onda A) (BOON, 2011; REECE, 2006). Com isso, pode-se identificar dois padrões anormais de relaxamento cardíaco. Pode haver diminuição da razão E/A devido ao aumento da onda A e diminuição da onda E, associado à falha no relaxamento do VE. O outro padrão é caracterizado por aumento na razão E/A, sugerindo disfunção na distensibilidade do VE (BOON, 2011).

Todos os parâmetros ecocardiográficos utilizados para a avaliação diastólica sofrem grande influência de outros fatores, como idade e FC. Em animais mais velhos, a porcentagem de sangue da contribuição atrial aumenta causando diminuição da relação E/A (BOON, 2011). A FC pode afetar a função diastólica de três formas: causa mudanças no relaxamento ventricular, alterando para o final da diástole a predominância do enchimento ventricular; diminui o tempo de enchimento diastólico, levando ao esvaziamento incompleto do átrio com aumento de volume sanguíneo atrial, o que causa melhor atividade atrial, aumentando a onda A e interferindo na razão E/A; no momento da contração atrial, o VE pode não estar completamente preenchido, estando mais complacente e capaz de receber um volume de sangue maior (HARRISON et al., 1991).

O VD é pouco estudado e possui poucos parâmetros que avaliam sua função. Um dos parâmetros mais aceitos para avaliar a função sistólica do VD é o ESPAT, que oferece informações sobre a contração longitudinal do VD (PARIAUT et al., 2012).

8 REFERÊNCIAS

ALMEIDA, A. L. C. et al. Speckle-Tracking pela Ecocardiografia Bidimensional – Aplicações Clínicas. **Revista Brasileira de Ecocardiográfia e Imagem Cardiovascular**, v. 26, n. 1, p. 38-49, 2013.

BOON, J. A. **Veterinary Echocardiography**. Wiley-Blackwell, 2011.

CAIVANO, D. et al. Transthoracic echocardiographically-guided interventional cardiac procedures in the dog. **Journal of Veterinary Cardiology**, v. 14, n. 3, p. 431-444, 2012.

CAMPOS FILHO, O. et al. Diretriz para Indicações e Utilização da Ecocardiografia na Prática Clínica. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 82, p. 11-34, 2004.

CHETBOUL, V. Advanced Techniques in Echocardiography in Small Animals. **Veterinary Clinics of North America-Small Animal Practice**, v. 40, n. 4, p. 529, 2010.

CHRISSOS, D. N. et al. The Effect of Open-Chest Cardiac Resuscitation on Mitral Regurgitant Flow: An On-Line Transesophageal Echocardiographic Study in Dogs. **Hellenic Journal of Cardiology**, v. 50, n. 6, p. 472-475, 2009.

DELLA TORRE, P. K. et al. Echocardiographic measurements in Greyhounds, Whippets and Italian Greyhounds - dogs with a similar conformation but different size. **Australian Veterinary Journal**, v. 78, n. 1, p. 49-55, 2000.

DUKES-MCEWAN, J. et al. Proposed guidelines for the diagnosis of canine idiopathic dilated cardiomyopathy. **Journal of Veterinary Cardiology**, v. 5, n. 2, p. 7-19, 2003.

GOMEZ, A. et al. Plastinated heart slices aid echocardiographic interpretation in the dog. **Veterinary Radiology & Ultrasound**, v. 53, n. 2, p. 197-203, 2012.

HARRISON, M. R. et al. Effect of heart-rate on left-ventricular diastolic transmitral flow velocity patterns assessed by doppler echocardiography in normal subjects. **American Journal of Cardiology**, v. 67, n. 7, p. 622-627, 1991.

KIENLE, R. D.; THOMAS, W. P. Echocardiography. NYLAND, T. G.; MATTOON, J. S. **Small animal diagnostic ultrasound**. Elsevier Health Sciences, 2002.

LOPES, B. F. et al. Hepatic quantitative radiography in dogs with acepromazine. **Ciencia Rural**, v. 41, n. 1, p. 137-142, 2011.

NAGUEH, S. F. et al. Doppler tissue imaging: A noninvasive technique for evaluation of left ventricular relaxation and estimation of filling pressures. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 30, n. 6, p. 1527-1533, 1997.

NELSON, W. R.; COUTO, C. G. **Medicina Interna de Pequenos Animais**. Elsevier Brasil, 2015.

NYLAND, T. G.; MATTOON, J. S. **Ultra-som diagnóstico em pequenos animais**. Roca, São Paulo, p. 161-198, 2005.

O'GRADY, J. G. et al. Early indicators of prognosis in fulminant hepatic failure. **Gastroenterology**, v. 97, n. 2, p. 439-445, 1989.

OYAMA, M. A. Advances in echocardiography. **Veterinary Clinics of North America-Small Animal Practice**, v. 34, n. 5, p. 1083, 2004.

PARIAUT, R. et al. Tricuspid Annular Plane Systolic Excursion (TAPSE) in Dogs: Reference Values and Impact of Pulmonary Hypertension. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 26, n. 5, p. 1148-1154, 2012.

RAM, R. et al. New approaches in small animal echocardiography: imaging the sounds of silence. **American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology**, v. 301, n. 5, p. 1765-1780, 2011.

REECE, W. O. **Dukes, Fisiologia dos Animais doméstios**. 12. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006.

SAUNDERS, A. B. et al. Echocardiographic and angiographic comparison of ductal dimensions in dogs with patent ductus arteriosus. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 21, n. 1, p. 68-75, 2007.

SCHOBER, K. E.; FUENTES, V. L. Mitral annulus motion as determined by M-mode echocardiography in normal dogs and dogs with cardiac disease. **Veterinary Radiology & Ultrasound**, v. 42, n. 1, p. 52-61, 2001a.

SCHOBER, K. E.; FUENTES, V. L. Effects of age, body weight, and heart rate on transmitral and pulmonary venous flow in clinically normal dogs. **American Journal of Veterinary Research**, v. 62, n. 9, p. 1447-1454, 2001b.

SILVA, A. C. et al. Use of discriminant analysis based on echocardiography for classification of congestive heart failure in dogs with myxomatous mitral valve disease. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinaria e Zootecnia**, v. 66, n. 6, p. 1727-1734, 2014.

SILVA, C. E. S. et al. Doppler Tecidual, Tissue Tracking, Strain Rate e Strain. Para que serve isso tudo? **Revista Brasileira de Ecocardiografia**, v. 15, n. 4, p. 17-27, 2002.

STALMANS, I. et al. Use of colour Doppler imaging in ocular blood flow research. **Acta Ophthalmologica**, v. 89, n. 8, p. 609-630, 2011.

SZATMÁRI, V. et al. Normal duplex doppler waveforms of major abdominal blood vessels in dogs: a review. **Veterinary Radiology & Ultrasound**, v. 42, n. 2, p. 93-107, 2015.

YUAN, S. M. Surgical Interventions of Common Congenital Heart Defects in Dogs: A Comprehensive Review. **Kafkas Universitesi Veteriner Fakultesi Dergisi**, v. 20, n. 3, p. 473-480, 2014.

Capítulo

13

Impacto das atividades pesqueiras como causa de morte em tartarugas-verdes (*Chelonia mydas*) nas praias da costa Espírito Santo entre 2013 e 2014

Letícia Maria Silva Uzai[1]
Antonio de Calais Júnior[2]
Louisiane de Carvalho Nunes[3]

1 INTRODUÇÃO

As tartarugas marinhas são altamente migratórias e viajam pelos oceanos tanto em busca de alimento como em busca das praias de nidificação (BAHIA; BOUDIOLI, 2010). Desenvolvem-se em uma ampla variabilidade de ambientes, uma vez que começam seu desenvolvimento em ambiente terrestre e, posteriormente, passam para uma fase pelágica ou oceânica, em que passam a ser susceptíveis a interagir com atividades antrópicas, sendo um deles a pesca (BARRERA, 2009).

Das espécies brasileiras, a tartaruga-verde, *Chelonia mydas* (LINNAEUS, 1758) é a com maior número de relatos de encalhes, avistagem e capturas incidentais na região costeira

[1] Universidade Federal do Espírito Santo, e-mail: leticiauzai@hotmail.com;
[2] Universidade Estadual do Norte Fluminense, Campos dos Goytacazes-RJ, e-mail: vetcalais@gmail.com;
[3] Universidade Federal do Espírito Santo, e-mail: louisiane.nunes@ufes.br.

no Brasil, apresentado o maior número de juvenis mortos devido à pesca (ALMEIDA et al., 2011).

A atividade pesqueira do país é fonte de renda para uma significativa parcela da população e destaca-se por sua antiga e difundida prática pelos povos do litoral (PIZETTA, 2004). O Estado do Espírito Santo possui 5% da costa brasileira e apresenta significativa representatividade de ecossistemas costeiros (INSTITUTO CAPIXABA DE PESQUISA, ASSISTÊNCIA TÉCNICA E EXTENSÃO RURAL - INCAPER, [2015]).

A combinação das características da arte da pesca é o que a torna mais ou menos perigosa para os impactos com as tartarugas-marinhas (PUPO; SOTO; HANAZAKI, 2006). Outra consequência negativa é a poluição do ambiente marinho ocasionada pelas atividades pesqueiras. As embarcações, incluindo as pesqueiras, que despejam de forma intencional ou acidental os resíduos sólidos e as atividades de exploração de petróleo e gás, são as principais fontes de poluição do ambiente marinho (ORTIZ, 2010).

O afogamento por apreensão em rede de emalhe é a causa mais marcante do impacto causado pelas atividades pesqueiras a *C. mydas*, quando os animais se prendem a restos de redes soltas no mar não conseguindo se alimentar e se movimentar, tornando-se alvo fácil para predadores (BERTOLDO FILHO, 2013; LUTCAVAGE et al., 1997). Outros impactos podem ser evidenciados pelas marcas da malha da rede nas nadadeiras, pelos cortes causados por fios de nylon, casco danificado e cortes graves na cabeça (AWABDI; SICILIANO; DI BENEDITTO, 2012). Além disso, artefatos da pesca que poluem os mares, como anzóis, restos de fios de nylon, isopor e restos de corda, podem ser ingeridos por esses animais causando sérios danos (POLI, 2011).

Buscando compreender onde o impacto gerado pelas atividades pesqueiras na Costa do Espírito Santo tem maior ocorrência, este trabalho teve como objetivo estipular o número de mortes registradas em *C. mydas* nas praias capixabas em decorrência da atividade pesqueira de forma direta e indireta nos anos de 2013 a 2014.

2 MATERIAL E MÉTODOS

A área costeira do Espírito Santo - 411 km de litoral (TEIXEIRA et al., 2012) conta com 15 municípios, uma frota pesqueira de 3 mil embarcações, as quais são utilizadas por 14 mil pescadores e uma produção estimada em 29 mil toneladas/ano (INCAPER, [2015]).

Para realização do estudo, foram obtidas informações junto à empresa CTA – Serviços em Meio Ambiente, mediante autorização para atividades com finalidade científica número

39329-2, do Sistema e Informação em Biodiversidade (SisBio), vinculado ao Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio) do Ministério do Meio Ambiente (MMA) e autorização da Comissão de Ética na Utilização Animal número 53/2015.

As informações para a realização deste trabalho foram referentes à base de Anchieta-ES, englobando o litoral das regiões Sul (Presidente Kennedy, Marataízes, Itapemirim, Piúma e Anchieta) e Metropolitana (Guarapari, Vila Velha, Vitória e Serra) do Estado (INSTITUTO JONES SANTOS NEVES - IJSN, [2016]).

A coleta dos dados foi dividida em duas campanhas, uma realizada no mês de setembro de 2014 e outra em março de 2015. Foi realizado um levantamento retrospectivo de dados dos anos de 2013 e 2014, por meio das fichas de registro e fichas de necropsias de *C. mydas* provenientes de encalhe. Das fichas foram analisadas: espécie, praia de origem (local de recolhimento), município, processo patológico principal e se houve qualquer tipo de impacto com a pesca. Nos casos em que o impacto com a pesca esteve presente foram anotadas as características que permitiram chegar a esta conclusão.

Foram abordados dois tipos de impacto com as atividades pesqueiras: direto, em que o diagnóstico presuntivo (causa primária da morte) foi à interação com pesca e indireto, em que a causa primária do óbito estava relacionada a outros tipos de ação antrópica (ingestão de resíduos sólidos associados à pesca como anzóis, restos de fios de nylon, isopor e restos de corda).

Os dados foram analisados por estatística descritiva baseada em percentuais.

3 RESULTADOS

Um total de 643 fichas foi analisado entre 2013 e 2014. Deste total 88% (568/643) foram de *C. mydas;* 5% (33/643) de *Eretmochelys imbricata* (LINNAEUS, 1766); 3% (18/643) de *Caretta caretta* (LINNAEUS, 1758); 2% (13/643) de *Lepidochelys olivacea* (ESCHSCHOLTZ, 1829) e 2% (11/643) fichas não possuíam informações.

O impacto com a pesca foi responsável pela morte de 51% (292/568) das *C. mydas* analisadas, sendo constatada em 70 praias dos seguintes municípios: Presidente Kennedy, Marataízes, Itapemirim, Piúma, Anchieta, Guarapari, Vila Velha, Vitória e Serra. As praias em que foram recolhidos mais indivíduos mortos ou encalhados (<10) foram: Praia do Suá (19/292) e Curva da Jurema (17/292), ambas em Vitória; Boa Vista do Sul (15/292), em Marataízes; Porto Velho (14/292), em Anchieta; Praia de Piúma (12/292), em Piúma e Praia de Itaipava (12/292), em Itapemirim (FIGURA 1).

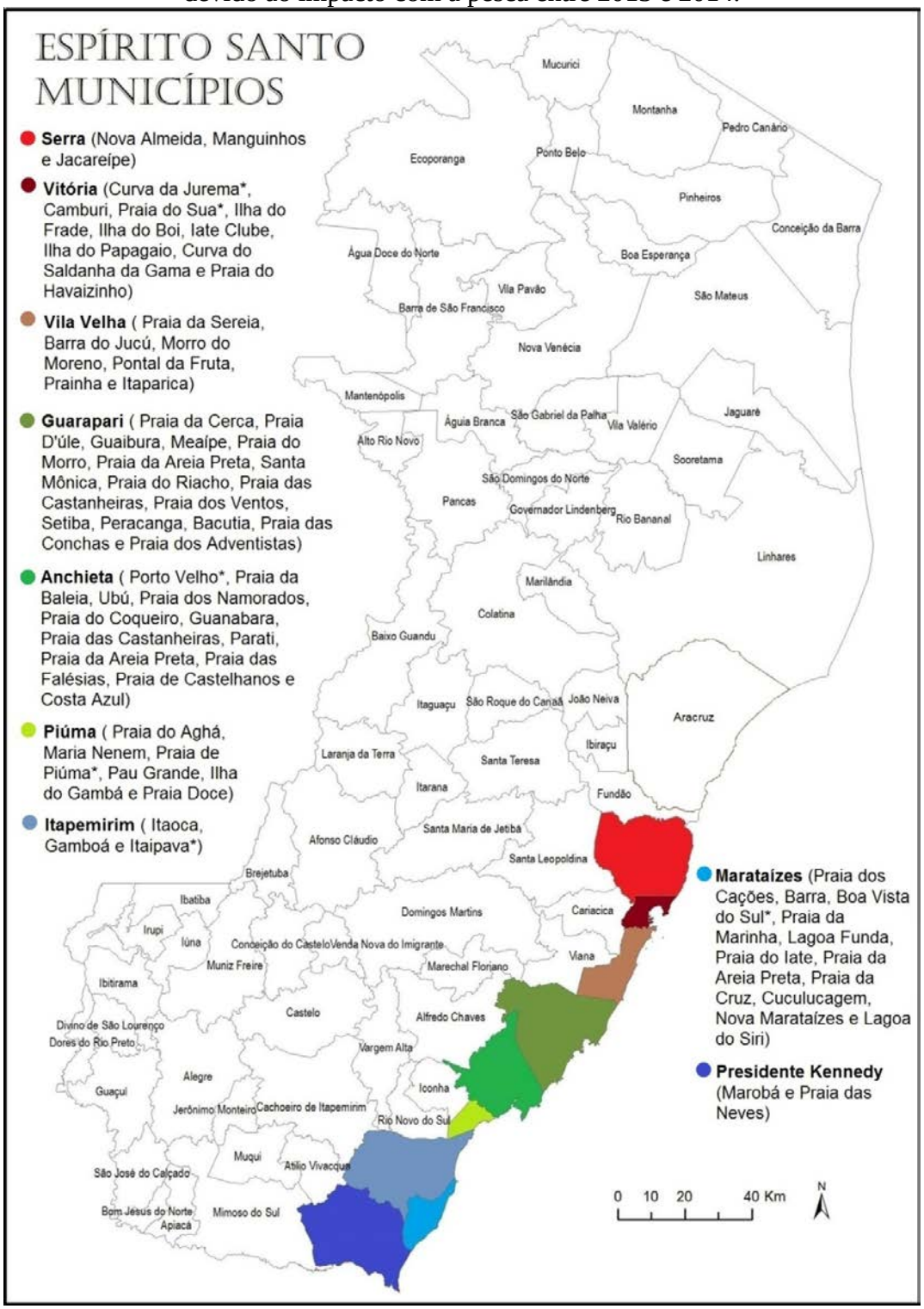
Com relação ao tipo de impacto, o direto foi o responsável pela morte de 76% (224/292) das *C. mydas* analisadas e o indireto por 24% (69/292).

Dentre os impactos indiretos verificou-se que a ingestão de resíduos sólidos foi à causa primária mais significativa para a mortalidade de *C. mydas* nos anos de 2013 a 2014 com 39% (27/69) dos casos. Os resíduos encontrados foram: plástico maleável, plástico rígido, fragmentos de nylon, corda, isopor e borracha (TABELA 1).

4 DISCUSSÃO

Neste estudo o número de mortes registradas em tartarugas-verdes no litoral sul e metropolitano do Espírito Santo foram altos, sendo de grande importância destacar tal fato, uma vez que nacionalmente esta espécie é classificada como Vulnerável (ALMEIDA et al., 2011), devido ao comportamento de filopatria. Em trabalho semelhante realizado no litoral central e sul do estado de São Paulo em 89 meses foram registrados encalhes de 218 tartarugas-verdes (SILVA; VAZ-DOS-SANTOS; MARACINO et al., 2012). De acordo com a IUCN (2015), esta espécie é considerada em perigo sendo de grande importância preservar suas áreas de alimentação e desenvolvimento (BRAGA, 2011).

Figura 1- Municípios e praias do Espírito Santo onde foram encontradas *C. mydas* mortas devido ao impacto com a pesca entre 2013 e 2014.



*Praias que tiveram maior número *C. mydas* mortas devido ao impacto com a pesca.
Fonte: Heitor (2015).

Tabela 1 - Resíduos antropogênicos encontrados em necropsias de *C. mydas* mortas nas praias do litoral sul e metropolitano do Espírito Santo entre 2013 e 2014.

Chelonia mydas	Plástico Maleável	Plástico Rígido	Fragmentos de Nylon	Corda	Isopor	Borracha
01	X	X	X			
02			X			
03	X	X	X			
04	X	X		X		
05	X	X	X			
06			X			
07	X	X	X	X		
08	X		X		X	
09	X	X	X	X	X	
10	X	X	X			
11	X		X			
12			X			
13	X					
14	X		X			
15			X			
16			X			
17	X	X	X			
18	X	X	X			
19	X	X	X			
20			X			
21	X	X	X			
22	X	X	X			X
23			X			
24						
25			X			
26	X	X	X			
27	X	X	X			

Por se alimentarem de fanerógamas submersas e algas durante a fase imatura (ALMEIDA et al., 2011; BUGONI; KRAUSE, L.; PETRY, 2003) acabam por ficar mais próximas das áreas costeiras que outras espécies de tartarugas-marinhas. A proximidade com a costa proporciona maior interação com as atividades humanas.

Almeida et al. (2011), associaram as atividades de pesca costeira, principalmente as com rede de emalhe, uma grande ameaça as populações juvenis de *C. mydas*. Outros fatores antrópicos, segundo estes autores, também influenciam na conservação da espécie, como: movimentação da área (extração de areia e aterros); foto poluição; tráfego de veículos; uso da praia por banhistas; portos ancoradouros; processos de edificação da orla (hotéis e condomínios) e a extração (produção e distribuição) de petróleo e gás. Todos os fatores citados ocorrem no litoral do Espírito Santo e a elevada mortalidade de *C. mydas* no Estado está

associada, em sua maioria, a questões antrópicas, principalmente aquelas relacionadas à atividade pesqueira.

Neste estudo a grande mortalidade de *C. mydas* foi atribuída ao impacto com a pesca e vale ressaltar que em todo o Estado a pesca tem grande importância. Existem aproximadamente 11.600 postos de trabalhos oriundos de atividades pesqueiras e, somando-se os setores de captura e comercialização, estima-se que um total de 69.720 trabalhadores dependa da pesca como fonte de renda (KNOX; TRIGUEIRO, 2015).

A pesca no Estado se revela como artesanal em sua grande maioria ao longo dos quinze municípios costeiros, mas também como empresarial/industrial em algumas áreas da região central e sul. Os petrechos mais utilizados são: rede (para a pesca de espera ou arrasto); linha (nylon); boia; anzol e corda (SECRETARIA DE ESTADO DA AGRICULTURA, ABASTECIMENTO, AQUICULTURA E PESCA DO ESPÍRITO SANTO - SEAG, 2005). Tais artefatos oferecem grandes ameaças as tartarugas-verdes, de forma direta ou indireta. A pesca costeira e que utiliza rede de emalhe é a principal causa de óbito de *C. mydas*. No Estado há basicamente duas categorias de pesca de emalhe: a oceânica (pouco praticada, ocorrendo em zonas mais afastadas da costa) e a costeira (praticada ao longo de toda a costa capixaba sem controle) (INSTITUTO BRASILEIRO DE MEIO AMBIENTE E DOS RECURSOS NATURAIS RENOVÁVEIS - IBAMA, 2006).

A captura incidental de peixes que não são o alvo, assim como espécies de tartarugas, aves e mamíferos constituem graves problemas na pesca em todo o mundo (JURAS, 2012). Diversos autores associaram tal impacto com os hábitos alimentares de juvenis de *C. mydas*, que habitam regiões mais costeiras, ficando mais suscetíveis à pesca incidental e outras formas de impacto causadas por esta atividade (ALMEIDA et al., 2011; BAHIA; BONDIOLI, 2010; BERTOLDO FILHO, 2013; PUPO; SOTO; HANAZAKI, 2006).

Em todos os munícipios litorâneos da região sul e metropolitana no Estado foram registrados óbitos em tartaruga-verde. O município de Vitória, em especial a Praia do Suá foi à região com maior índice de morte de *C. mydas*.

Nessa região são utilizadas redes de espera a uma distância de até três milhas da costa e a uma profundidade de 15 metros para a pesca da corvina, pescada, lagosta, anchova, xixarro e pescadinha. O espinhel de superfície é mantido a uma profundidade de até 60 metros e fica a uma distância entre 12 a 15 milhas da costa e as espécies visadas são: o realito, pargo, papa terra, dentão e dourado. O espinhel de fundo é utilizado para a pesca do cação e badejo e o balão para a pesca do camarão. A pesca mais comum na Praia do Suá é a de arrasto do camarão, feita

com o balão e responsável não só pela captura de camarões, mas também de outras espécies (SEAG, 2005).

Em muitos países a pesca de arrasto de camarão foi considerada a principal causa da mortalidade de tartarugas (PUPO; SOTO; HANAZAKI, 2006). No Brasil, redes de arrasto e as redes de espera destacam-se como as de maior impacto para esses animais (BRAGA, 2011; MARCOVALDI et al., 2006). Vale ressaltar que a combinação das características da arte da pesca é o que as torna mais ou menos perigosas para a captura incidental desses animais (PUPO; SOTO; HANAZAKI, 2006).

Além disso, a região da Praia do Suá bem como a da Curva da Jurema (segunda praia com maior mortalidade de *C. mydas*) sofrem com a poluição da baía de Vitória, proveniente em sua maioria dos navios que atracam na baía (SEAG, 2005). Em Vitória, o complexo portuário de Tubarão é responsável por grandes focos de poluição local, seja através do esgoto, do óleo combustível ou dos detritos de transporte de minério (GEO BRASIL, 2002). Esgotos domésticos e industriais despejados nos oceanos podem gerar um ambiente propício à proliferação de algas. O aumento da oferta de alimento (algas) contribui para existência de *C. mydas* nesses locais (TOREZANI et al., 2010).

Sendo assim, todos estes fatores (tipo de pesca, petrechos utilizados, modo de apreensão do pescado, poluição da baía de Vitória, esgotos domésticos e industriais despejados no mar) associados ou não, contribuem para a alta mortalidade de tartarugas-verdes nessas regiões.

Nas demais praias, as atividades portuárias não impactam tanto, porém atividades relacionadas ao turismo são mais marcantes. Tais praias se localizam na região sul do estado onde a base da economia são as atividades agropecuária, turística e pesqueira. A pesca na região é basicamente artesanal, realizada em locais mais próximos da costa, com exceção de Itaipava (SEAG, 2005).

Durante os meses de alta temporada, o lixo tanto da cidade quanto das praias é maior. O crescimento contínuo de resíduos sólidos descartados e a degradação lenta da maior parte desses resíduos levam ao aumento gradual da poluição nos oceanos, assoalhos marinhos e zonas costeiras (JURAS, 2012). Fato que contribui negativamente na vida de muitas espécies que utilizam esses ambientes, como as tartarugas-marinhas, principalmente a tartaruga-verde que devido aos seus hábitos alimentares tem sido vitima da ingestão desses resíduos, tendo seu desenvolvimento, reprodução e, em casos mais graves, sua vida colocada em risco.

Neste estudo o impacto direto foi o tipo predominante como causa primária da morte em tartarugas-verdes. Este tipo de impacto pode ser evidenciado pelas marcas da malha da rede nas nadadeiras, pelos cortes causados por fios de nylon, casco danificado e cortes graves na

cabeça (AWABDI; SICILIANO; DI BENEDITTO, 2012). Leite et al. (2005) em trabalho realizado no litoral do Rio Grande do Sul, relatou que dos animais que sofrem impacto direto com a pesca, 20% apresentam marcas oriundas do enredamento nos membros anteriores.

Segundo Braga (2011) em estudo realizado no litoral do Rio Grande do Sul a causa mais marcante do impacto direto da tartaruga-verde com a pesca é o afogamento por apreensão em rede de emalhe. Assim, a aspiração de água salgada pode causar pneumonia aspirativa, afetando o potencial de sobrevivência desses animais. Baptistotte et al. (2012) ao realizarem necropsias de animais encalhados nas praias da Bahia, Espírito Santo, São Paulo e Santa Catarina no período de 2009 a 2011, também atribuíram o afogamento como principal causa de morte das tartarugas-verdes, sendo responsável pela morte de 33% dos espécimes analisados. No Espírito Santo, entre 2013 e 2014 o afogamento relacionado às atividades pesqueiras foi responsável pelo óbito de 76% dos animais necropsiados. Redes que permanecem por longos períodos na água geram um nível alto de estresse e forçam as tartarugas a realizarem mergulhos forçados, resultando em estado letárgico e desmaios (BARRERA, 2009).

O impacto indireto também ocasionou a morte de muitos animais no litoral capixaba entre os anos de 2013 a 2014, tendo como principal causa à ingestão de resíduos sólidos ligados à pesca e a outros tipos de resíduos. A ingestão de resíduos sólidos está diretamente relacionada com a dieta e o modo de apreensão do alimento das tartarugas-verdes. Alguns autores acreditam que as tartarugas confundam os resíduos com seus alimentos naturais e por isso se alimentam deles, outros associam a ingestão desses resíduos a baixa seletividade das tartarugas, uma vez que há grande variedade dos tipos e cores de resíduos ingeridos (GRAMENTZ, 1988; MACEDO et al., 2010; TOMÁS et al., 2002; TOURINHO, 2007).

Grande quantidade de linhas, redes e outros artefatos da pesca são perdidos no mar a cada dia (KUVADA; TAKADO, 2011). Macedo et al. (2010) relataram a presença de resíduos de origem pesqueira no trato digestório de 62,9 % das *C. mydas* estudadas, sendo que o restante, 37,1% estava relacionado a resíduos diversos, como plástico, isopor, borracha, dentre outros. Dos animais necropsiados entre 2013 e 2014 no Espírito Santo, 24 % vieram a óbito devido a ingestão de resíduos sólidos, dentre esses resíduos os filamentos de nylon foram os mais encontrados, de 27 animais, 24 possuíam este tipo de resíduo no trato gastrointestinal.

Mascarenhas e Iverson (2008) encontraram grande quantidade de lixo plástico em estudo realizado no nordeste do Brasil. Segundo estes mesmos autores, o lixo é de origem continental gerado pelos usuários das praias, pois se encontram acima da linha da maré. Por outro lado, Lutz et al. (1997) citaram que a ingestão de material plástico por tartarugas não é acidental, estas quando se encontram famintas se alimentam do lixo.

A ingestão de resíduos sólidos pode ter efeitos letais, quando considerados a causa direta do óbito, ou subletais, quando indiretamente responsáveis. A obstrução do trato gastrointestinal é considerada uma causa direta mesmo quando são ingeridas pequenas quantidades. Efeitos subletais estão relacionados à diminuição do crescimento e alterações reprodutivas (BJORNDAL, 1997).

Este estudo, assim como o de Bertoldo Filho (2013) e Macedo et al. (2010) observou que os resíduos de origem pesqueira foram os mais abundantes. Macedo et al. (2010) relatam que a ingestão de fios de nylon pode levar o animal a óbito se interferir na função normal do trato digestório, impedindo a movimentação da ingesta, causando impactação, provocando volvos gástricos e intestinais.

Os resultados obtidos no presente trabalho corroboram com muitos outros que afirmam que atualmente as atividades pesqueiras (direta ou indireta) são a causa principal de morte em *C. mydas* (ALMEIDA et al., 2011; AWABDI; SICILIANO; DI BENEDITTO, 2012; BAHIA; BONDIOLI, 2010; MONTEIRO, 2004; POLI, 2011; PUPO; SOTO; HANAZAKI, 2006).

Tendo em vista que a principal causa de óbito destes animais é o colapso cardiorrespiratório, devido ao afogamento, medidas como vistorias frequentes nas redes e capacitação de pessoas para a retirada dos animais das redes de emalhe poderiam minimizar o número de óbitos. E adicional a isso, nota-se a importância da conscientização ambiental não só da população litorânea nativa, mas também de todos aqueles envolvidos nas atividades turísticas. Assim, trabalhos de educação ambiental que contribuam para a diminuição de resíduos antropogênicos despejados no oceano e nas praias se fazem necessário e são de grande importância para a conservação desta espécie que utiliza o litoral do Estado para se reproduzir e alimentar.

6 CONCLUSÃO

Das espécies de tartarugas-marinhas que utilizam à costa capixaba, a tartaruga-verde é a que mais sofre com os impactos oriundos de atividades antrópicas, em especial as atividades pesqueiras. A mortalidade destes indivíduos, na maioria das vezes, está associada à interação com a pesca direta ou indireta, sendo as praias com maior índice as que possuem maior representatividade na atividade pesqueira e turística.

7 REFERÊNCIAS

ALMEIDA, A. P. et al. Avaliação do Estado de Conservação da Tartaruga Marinha *Chelonia mydas* (Linnaeus, 1758) no Brasil. **Biodiversidade Brasileira**, n. 1, p. 12-19, 2011.

AWABDI, D. R.; SICILIANO, S.; DI BENEDITTO, A. P. M. Ingestão de resíduos sólidos por tartarugas-verdes juvenis, *Chelonia mydas* (L. 1758), na costa leste do estado do Rio de Janeiro, Brasil. **Biotemas**, v. 26, p. 197-200, 2012.

BAHIA, N. C. F. E.; BONDIOLI, A. C. V. Interação das tartarugas marinhas com a pesca artesanal de cerco-fixo em Cananéia, litoral sul de São Paulo. **Biotemas**, v. 23, p. 203-213, 2010.

BAPTISTOTTE, C. et al. **Anthropogenic threats to the sea turtle populations along the Brazilian coast**. In: ANNUAL SYMPOSIUM ON SEA TURTLE BIOLOGY AND CONSERVATION**.** Miami, 2012.

BARRERA, E. A. L. **Análise da captura acidental de tartarugas marinhas em artes de pesca artesanal na desembocadura sul da Baía de Paranaguá, litoral do Paraná**. 2009. 85 f. Dissertação (Mestrado em Sistemas Costeiros e Oceânicos) - Universidade Federal do Paraná. Pontal do Paraná, 2009.

BERTOLDO FILHO, V. J. **Interação entre tartarugas marinhas e a pesca artesanal no sul do município de Laguna, Santa Catarina, Brasil.** 2013. Monografia (Graduação em Ciências Biológicas) – Universidade do Extremo Sul Catarinense. Criciúma, 2013.

BJORNDAL, K. A. Fermentation in reptiles and amphibians. In: MACKIE, R. I. et al. **Gastrointestinal microbiology**. Springer US. p. 199-230, 1997.

BRAGA, C. S. **Principais achados em tartaruga-verde (Chelonia Mydas) encalhadas no litoral do Rio Grande do Sul, Brasil**. 2011. 32 f. Monografia (Graduação em Medicina Veterinária) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, 2011.
BUGONI, L.; KRAUSE, L.; PETRY, M. V. Diet of sea turtles in southern Brazil. **Chelonian Conservation and Biology**, v. 4, p. 685-688, 2003.

GEO BRASIL. **Perspectivas do Meio Ambiente**. 1. ed., Brasília: IBAMA, p. 447, 2002.

GRAMENTZ, D. Involvement of loggerhead turtle with the plastic, metal, and hydrocarbon pollution in the Central Mediterranean. **Marine Pollution Bulletin**, v. 19, p. 11-13, 1988.

INSTITUTO BRASILEIRO DE MEIO AMBIENTE E DOS RECURSOS NATURAIS RENOVÁVEIS – IBAMA. **Relatório da Reunião Técnica Sobre a Pesca de Emalhe no Litoral Brasileiro**. Itajaí. 2006.

INSTITUTO CAPIXABA DE PESQUISA, ASSISTÊNCIA TÉCNICA E EXTENSÃO RURAL - INCAPER. **Incaper apoia organização pesqueira no ES**. Disponível em: <http://www.incaper.es.gov.br/>. Acesso em: 18 ago. 2015.

INSTITUTO JONES SANTOS NEVES – IJSN. **Biblioteca**. [2016]. Disponível em: <http://www.ijsn.es.gov.br/bibliotecaonline/Record/321814/Similar>. Acesso em: 20 set. 2016.

IUCN. **Red List of Threatened Species**. Version 2015.2. <www.iucnredlist.org>. Acesso em: 18 ago. 2015.

JURAS, I. A.G. M. **Ecossistemas costeiros e marinhos: ameaças e legislação nacional aplicável**. Brasília: Câmara dos Deputados. 2012.

KNOX, W; TRIQUEIRO, A. **Saberes, Narrativas e Conflitos na Pesca Artesanal**. Vitória: Edufes, 2015.

KUVADA, J. T.; TAKANO, J. Y. **Avaliação da composição do lixo marinho oriundo da pesca de arrasto de fundo do litoral do Paraná**. Monografia (Graduação) – Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Curitiba. 2011.

LEITE, A. T. M. et al. **Reabilitação de Tartaruga-verde, *Chelonia mydas,* no CRAM-Museu Oceanográfico – FURG, RS, Brasil.** In: II JORNADA DE CONSERVAÇÃO E PESQUISA DE TARTARUGAS MARINHAS NO ATLÂNTICO SUL OCIDENTAL. Praia do Cassiano. 2005.

LUTCAVAGE, M. E. et al. Human impacts on sea turtle survival. In: LUTZ, P. L.; MUSICK, J. A. (eds.). **The Biology of Sea Turtles**, v. 1. Florida: CRC Press. 1997. p. 387-409.

LUTZ, P. L.; MUSICK, J. A. **The biology of sea turtles**. Florida: CRC Press, v.1, 1997.

MACEDO, G. R. et al. Ingestão de resíduos antropogênicos por tartarugas marinhas no litoral norte do estado da Bahia, Brasil. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 41. 2010.

MARCOVALDI, M. A. et al. Sea turtles and fishery interactions in Brazil: identifying and mitigating potential conflicts. **Marine Turtle Newsletter**, v. 112, p. 4-8, 2006.

MASCARENHAS, R.; IVERSON, P. J. Fibropapillomatosis in stranded green turtles (Chelonia mydas) in Paraiba State, Northeastern Brazil: evidence of a Brazilian epizootic? **Marine Turtle Newsletter**, v. 120: p. 3-6, 2008.

MONTEIRO, D. S. **Encalhes e interação de tartarugas marinhas com a pesca no litoral do Rio Grande do Sul**. 2004. 58 f. Monografia (Graduação do Curso de Ciências Biológicas) - Fundação Universidade Federal do Rio Grande. Rio Grande, 2004.

ORTIZ, L. C. **Resíduos Sólidos em Praias do Espírito Santo sob Diferentes Regimes de Uso**. 2010. 69 f. Monografia (Graduação em Oceanografia) - Universidade Federal do Espírito Santo. Vitória, 2010.

PIZETTA, G. T. **Avaliação Multidimensional dos Sistemas Pesqueiros da Região Sul do Espírito Santo, Brasil, e seus Indicadores de Sustentabilidade**. 2004. 72 f. Monografia (Graduação em Oceanografia) - Universidade Federal do Espírito Santo. Vitória. 2004.

POLI, C. **Ecologia e Conservação de Tartarugas Marinhas Através da Análise de Encalhes no Litoral Paraibano**. 2011. 85 f. Dissertação (Mestrado em Zoologia) - Universidade Federal da Paraíba. João Pessoa. 2011.

PUPO, M. M.; SOTO, J. M. R.; HANAZAKI, N. Captura incidental de tartarugas marinhas na pesca artesanal da Ilha de Santa Catarina, SC. **Biotemas**, v. 19, p. 63-72, 2006.

SECRETARIA DE ESTADO DA AGRICULTURA, ABASTECIMENTO, AQUICULTURA E PESCA DO ESPÍRITO SANTO - SEAG. **Relatório do Macrodiagnóstico da Pesca Marinha do Estado do Espírito Santo**. Vitória. 2005.

SILVA, G. C. da; VAZ-DOS-SANTOS, A. M.; MARACINO, P. Análise de encalhes de tartarugas marinhas (Tesdunines: Chleoniidae e Dermochelydae) nos municípios da Baixada Santista, Iguapé e Cananéia no período de 2004 à 2011. **Revista Ceciliana**, p. 9-15, 2012.

TEIXEIRA, J. B. et al. Potencialidade social e econômica da pesca e maricultura no Estado do Espírito Santo, Brasil. **Revista de Gestão Costeira Integrada**, v. 12, p. 569-575. 2012.

TOMÁS, J. et al. Marine debris ingestion in loggerhead sea turtles, Caretta caretta, from the Western Mediterranean. **Marine Pollution Bulletin**, v. 44, p.211-216, 2002.

TOREZANI, E. et al. Juvenile Green Turtles (Chelonia mydas) in the Effluent Discharge Channel of a Steel Plant, Espirito Santo, Brazil, 2000 - 2006. **Journal of the Marine Biological Association of the United Kindom**, v. 90, p. 233-246, 2010.

TOURINHO, P. S. **Ingestão de resíduos sólidos por juvenis de tartaruga-verde (Chelonia mydas) na costa do Rio Grande do Sul, Brasil**. Monografia (Graduação em Oceanografia) - Universidade Federal do Rio Grande. Rio Grande, 2007.

Capítulo

14

Lesões microscópicas em fígados bovinos condenados por fasciolose provenientes de região endêmica para *Brachiaria* spp. no Estado do Espírito Santo

Natalia Viana Tamiasso[1]
Isabella Vilhena Freire Martins[2]
Louisiane de Carvalho Nunes[3]

1 INTRODUÇÃO

Dentre os parasitos de animais domésticos a espécie *Fasciola hepatica* tem elevada importância devido à sua característica de parasitar a maior parte dos mamíferos, apesar de possuir maior relevância quando parasita ruminantes. Esse platelminto pertence à classe Trematoda e suas formas imaturas são encontradas no parênquima hepático, enquanto as formas adultas, que possuem formato característico achatado, são encontradas nos ductos biliares (FIGURA 1) (FORTES, 1997; URQUHART et al., 1998).

[1] Universidade Federal do Espírito Santo, e-mail: natalia_tamiasso@yahoo.com.br;
[2] Universidade Federal do Espírito Santo, e-mail: ivfmartins@gmail.com;
[3] Universidade Federal do Espírito Santo, e-mail: louisianecn@gmail.com.

Figura 1 - Fotomacrografia de *F. hepatica* (setas) parasitando fígado bovino.

Fonte: Arquivo do Laboratório de Parasitologia Veterinária da UFES.

O parasitismo dessa espécie dá origem à fasciolose (OLIVEIRA; SPÓSITO FILHA, 2009) e essa doença pode cursar com quadro agudo ou crônico. Em casos de evolução aguda o animal apresenta anemia, peritonite e morte súbita. Em casos crônicos, forma mais frequente da doença, observa-se perda de peso, queda no desempenho, anemia e hipoalbuminemia (JONES; HUNT; KING, 2000; URQUHART et al., 1998).

Os achados microscópicos mais frequentes em animais com fasciolose são espessamento de parede de ductos biliares, presença de formações acinares irregulares constituídas de epitélio colunar alto, áreas de necrose internamente ao epitélio de revestimento dos ductos, hiperplasia de ductos biliares dos espaços porta, proliferação de tecido conjuntivo fibroso, infiltrado inflamatório, fibrose difusa (BOSTELMANN et al., 2000), teleangectasia, fibrose capsular e necrose dos hepatócitos (MENDES; PILATI, 2007).

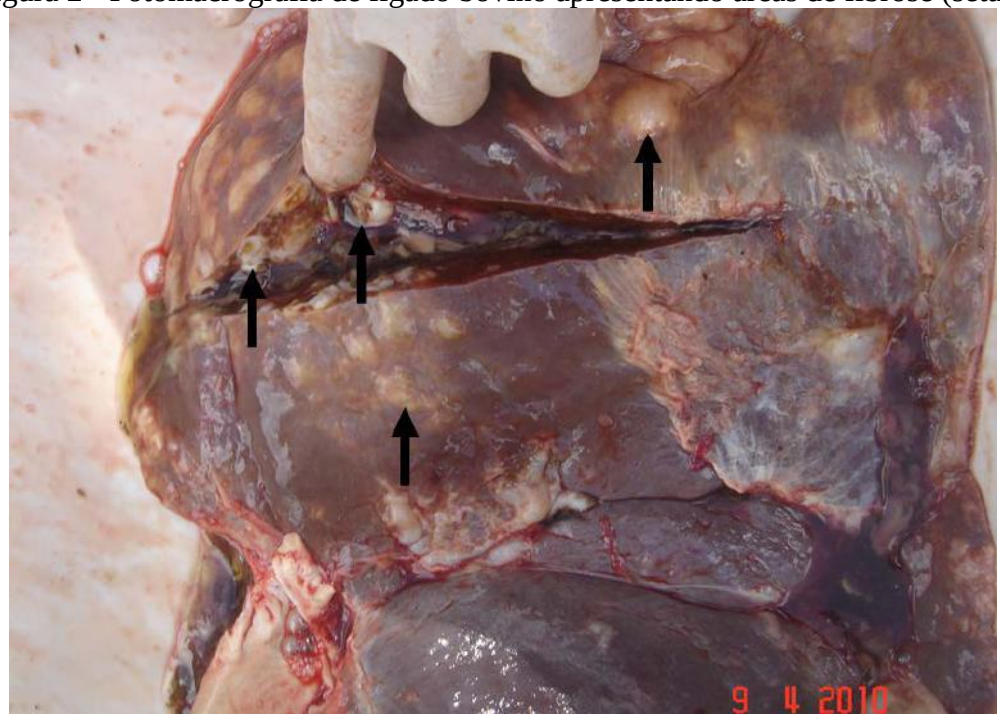
Com relação à epidemiologia, *F. hepatica* apresenta distribuição cosmopolita. Ao considerar a distribuição no território brasileiro, estudos indicam que temperatura elevada, umidade relativa adequada, baixa altitude, baixa declividade e existência de áreas alagadiças contribuem para a presença do parasito (MARTINS et al., 2012). O presente estudo foi realizado na região Sul do Espírito Santo, sendo que esta mesma região foi considerada por Alves et al. (2011) como local de grande importância epidemiológica para a fasciolose devido à localização entre duas bacias hidrográficas, secas prolongadas e muitas chuvas de verão.

Dentre as principais causas de condenação hepática em matadouros frigoríficos no

Espírito Santo, a fasciolose assumiu o posto de maior causa de condenação (BAPTISTA, 2008). Contudo, alguns autores questionam o diagnóstico baseado exclusivamente nos achados macroscópicos, critério este utilizado atualmente em matadouros frigoríficos, tendo em vista a dificuldade de diferenciar processos que possuem aparência semelhante (MENDES; PILATI, 2007).

Como exemplo desta utilização de características macroscópicas para condenação em matadouros frigoríficos, pode-se citar a fibrose. A fibrose é considerada a principal lesão macroscópica da fasciolose (GOMAR, 2002), contudo, o termo refere-se a qualquer proliferação excessiva de tecido conjuntivo em qualquer órgão, gerando endurecimento do mesmo (THOMSON, 1983) (FIGURA 2). Em linhas gerais, para que ocorra fibrose o organismo passa por três etapas que acontecem imediatamente após a injúria tecidual inicial: inflamação aguda, síntese de colágeno e síntese de matriz extracelular. Geralmente, fibrose ocorre como consequência de um dano persistente sobre o parênquima, fazendo com que ocorra um prolongamento do mecanismo de reparação tecidual, resultando nessa produção excessiva de matriz extracelular (PINZANI, 2000). Contudo, esta não é uma lesão patognomônica de nenhuma doença e diversos outros fatores além do parasitismo podem causar esse tipo de alteração macroscópica, como, por exemplo, intoxicação por plantas e excesso de medicamentos (JONES; HUNT; KING, 2000; ROZZA et al., 2007).

Figura 2 - Fotomacrografia de fígado bovino apresentando áreas de fibrose (setas).



Fonte: Arquivo do Laboratório de Patologia Animal da UFES.

Além de causar fibrose hepática, a intoxicação por plantas é considerada uma grande causa de prejuízos econômicos em animais de produção (ASSIS et al., 2010), pois ocorrem perdas econômicas tanto pela morte do animal propriamente dita quanto por redução dos lucros devido à queda de produção e desempenho. Destaca-se ainda que há aumento dos gastos de produção em consequência do custo gerado para controle das plantas tóxicas nas pastagens, do manejo para evitar intoxicação e da desvalorização da terra (HARAGUCHI, 2003).

Nesse contexto, encontram-se as forrageiras do gênero Brachiaria. Essa planta é muito comum no Brasil devido às características de fácil adaptação e necessidade de solo pouco fértil. Porém, a alimentação de ruminantes e equídeos com essa planta está relacionada com o estabelecimento de quadros de fotossensibilização em consequência do desenvolvimento de lesões hepáticas (SPINOSA; GÓRNIAK; PALERMO-NETO, 2008). Esse quadro de intoxicação que culmina em fotossensibilização é atribuído à ingestão de saponinas esteroides presentes na braquiária (BRUM et al., 2007; SPINOSA; GÓRNIAK; PALERMO-NETO, 2008). Estas saponinas esteroides são metabolizadas no rúmen em epismilagenina e episarsasapogenina, e essas são conjugadas em ácido glicurônico. O ácido glicurônico formado se combina com sais de cálcio e forma cristais nos ductos biliares e nas células presentes no parênquima hepático (BRUM et al., 2007; GRAYDON et al., 1991).

A formação dos cristais dentro dos ductos biliares e dos hepatócitos gera um quadro de hepatopatia associado a obstrução do fluxo biliar. Desta forma, o organismo não consegue eliminar via bile o pigmento filoeritrina, produzido no trato digestivo pela degradação da clorofila, ocorrendo acúmulo nos tecidos (MENDONÇA et al., 2008; SANTOS et al., 2008). O problema encontra-se no fato desse pigmento ser fotodinâmico, com capacidade de reagir com raios ultravioleta do sol causando dermatite, com dano vascular e epidérmico, principalmente em áreas de pele e pelo despigmentados e expostos à luz solar (SANTOS et al., 2008).

Do ponto de vista microscópico, as lesões mais frequentes em animais intoxicados por *Brachiaria* spp. são tumefação difusa e necrose dos hepatócitos, proliferação de ductos biliares, presença de colangiopatia associada a cristais e a presença de macrófagos espumosos (BRUM et al., 2007; LEMOS et al., 1996; MUSTAFA et al., 2012; SOUZA et al., 2010).

Considerando-se que os critérios macroscópicos de diagnóstico podem ser questionáveis devido à semelhança entre diferentes processos, acredita-se que a realização de um estudo aprofundado sobre as lesões microscópicas em fígados pode trazer dados importantes sobre as reais causas de condenação em matadouros frigoríficos, contribuindo assim com a redução das perdas econômicas e com a produção de dados epidemiológicos fiéis a realidade da região (MENDES; PILATI, 2007). Com base nesses dados, o objetivo deste

trabalho foi realizar um estudo retrospectivo microscópico de fígados condenados por fasciolose para verificar a ocorrência concomitante de lesões causadas por ingestão crônica de *Brachiaria* spp.

2 MATERIAL E MÉTODOS

Foi realizada no Laboratório de Patologia Animal do Hospital Veterinário da Universidade Federal do Espírito Santo (UFES) recuperação de lâminas histológicas e dos respectivos blocos de parafina de fígados condenados por fasciolose entre os anos de 2008 e 2012 coletados de matadouros frigoríficos localizados na região Sul do Espírito Santo. Essa região é endêmica para *Brachiaria* spp. e é confirmado pelos proprietários que há consumo crônico desta planta. Todo material foi reavaliado microscopicamente em aumentos de 100x ou de 200x. As amostras foram analisadas para identificar fibrose periductal, colangite e macrófagos espumosos/cristais. Também foi realizado levantamento do número de parasitos *F. hepatica* encontrados nos fígados coletados. Estes dados se encontravam dispostos em tabelas arquivadas em livros de registro do Laboratório. O número de parasitos obtido foi utilizado para verificar a ocorrência concomitante de macrófagos espumosos. A análise estatística foi feita pelo método descritivo com valores expressos em percentuais e pelo teste de Mann-Whitney com nível de 5% de probabilidade.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

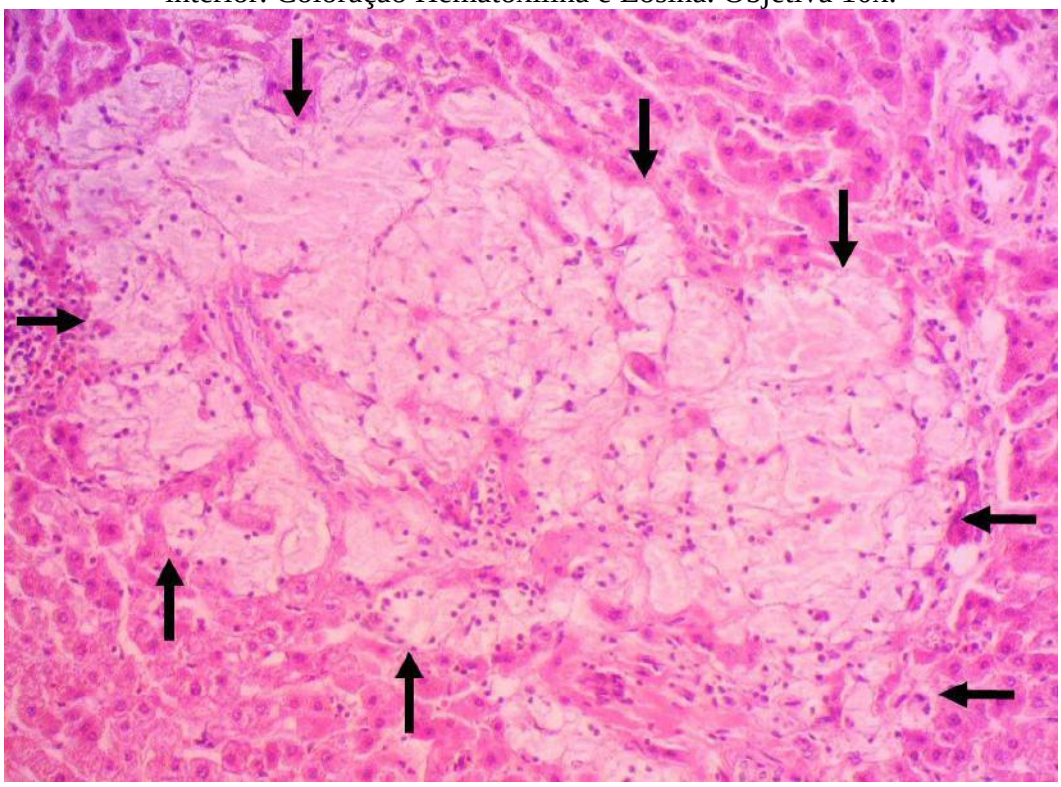
No total, 100 amostras foram recuperadas dos arquivos. Entretanto, para apenas 73% destas amostras havia o registro do número de parasitos encontrados no fígado no dia da coleta. Por meio de análise microscópica constatou-se que 100% dos fígados avaliados tinham fibrose no espaço porta e colangite. No entanto, essas lesões ocorrem tanto em animais intoxicados por plantas como a braquiária quanto em animais acometidos por fasciolose (BOSTELMANN et al., 2000; GOMAR, 2002). Portanto, esses dados indicam que embora essas alterações sejam frequentes, não devem ser associadas isoladamente ao diagnóstico de nenhuma doença específica.

Outro aspecto avaliado foi ocorrência de macrófagos espumosos. Dentre as lâminas analisadas, 17% das amostras apresentavam esse tipo celular (FIGURA 3). Estas células são descritas como achado frequente em fígados de animais intoxicados pela ingestão de *Brachiaria* spp. (GOMAR, 2002), não tendo relatos de associação com *F. hepatica*. Estes achados também

foram descritos em animais intoxicados por *Panicum* spp. e *Tribulus terrestris* que possuem saponinas em sua composição química (GRACINDO, 2010). Vale ressaltar que no estado do Espírito Santo não existem relatos de intoxicação por *Panicum* spp. e *Tribulus* sp., no entanto, são frequentes os casos de intoxicação por braquiária.

Não houve diferença significativa (P>0,05) em relação à presença dos macrófagos espumosos, colangite e fibrose periportal. Esses dados sugerem que a intoxicação por saponinas esteroidais decorrente do pastejo em áreas endêmicas para *Brachiaria* spp. causa essas lesões de forma independente, ou seja, não necessariamente quando se observa colangite ou fibrose periportal os macrófagos espumosos estarão presentes no fígado acometido. Por outro lado, não se sabe se as lesões fibróticas e inflamatórias observadas estão associadas exclusivamente ao parasitismo por *F. hepática* devido ao fato do quadro ser inespecífico e passível de ocorrer em diversas doenças.

Figura 3 - Fotomicrografia de fígado bovino condenado por fasciolose apresentando aglomerado de macrófagos espumosos (delimitado pelas setas) contendo cristais no seu interior. Coloração Hematoxilina e Eosina. Objetiva 10x.



Fonte: arquivo pessoal do autor.

Das 17 amostras em que foram encontrados macrófagos espumosos, 10 casos (58,8%) apresentavam parasitos. Em seis animais havia fibrose e macrófagos sem a presença de *F. hepatica*, abrindo assim espaço para considerar a possibilidade de a lesão ser decorrente da

intoxicação e não do parasitismo. Marcos et al. (2007) citaram que infecções hepáticas com mais de 38 espécimes causam cirrose hepática grave. No entanto, no presente estudo macrófagos espumosos foram observados em fígados com 32 parasitos ou menos e isso sugere que a fibrose periportal encontrada poderia ser decorrente de uma associação de fatores, nesse caso parasitismo e intoxicação. Contudo, deve-se considerar que o fato do animal não estar parasitado no momento do abate não exclui a possibilidade de uma grave infecção anterior.

As taxas de condenações de fígados bovinos por fasciolose no Espírito Santo são muito altas, contudo, percebe-se que o tema merece estudos aprofundados, pois fígados que apresentam o parasito são condenados por fasciolose mesmo com a presença de outra alteração, tal como teleangectasia, negligenciando assim o diagnóstico real (BAPTISTA, 2008; VIEIRA et al., 2011). Além disso, órgãos que não possuem lesões macroscópicas podem apresentar lesões microscópicas e vice-versa (MENDES; PILATI, 2007).

Considerando-se o caráter inespecífico da fibrose hepática, existe a preocupação de que esteja havendo classificação incorreta de lesões, conduzindo ao falso diagnóstico e consequentemente à geração de estatísticas imprecisas. Questiona-se para fins acadêmicos, epidemiológicos e preventivos que não apenas a lesão macroscópica de fibrose, que atualmente é um dos fatores utilizados para condenação dos fígados em matadouros frigoríficos, deveria ser considerada para determinar a etiologia. Acredita-se que a obtenção de outros parâmetros, como avaliação macroscópica mais detalhada do órgão (levando em consideração a presença ou ausência de parasitos, por exemplo) poderia ser alternativa para minimizar o armazenamento de dados equivocados. Vale ressaltar que em um matadouro frigorífico o principal objetivo da inspeção realizada por profissionais qualificados é evitar o consumo humano de órgãos e carcaças inapropriadas, independente de qual a causa que leva a essa inadequação; entretanto, para fins de conhecimento científico e para o estabelecimento de medidas preventivas que reduzem as perdas econômicas, a determinação da etiologia faz-se de extrema importância.

Outras alterações histológicas comumente encontradas nas amostras avaliadas foram tumefação com vacuolização dos hepatócitos, necrose individual dos hepatócitos e proliferação de ducto biliar. Essas lesões também foram descritas por Brum et al. (2007) e Mustafa et al. (2012), indicando que o fígado sofre diversas alterações celulares devido ao estresse contínuo sofrido pelo órgão.

4 CONCLUSÕES

Verificou-se ocorrência concomitante de lesões causadas por ingestão crônica de *Brachiaria* spp. nos fígados bovinos condenados por fasciolose. Estes dados sugerem que não apenas a lesão macroscópica de fibrose deve ser utilizada para fechar diagnóstico etiológico da lesão hepática.

5 REFERÊNCIAS

ALVES, D. P. et al. Distribution and factor associated with *Fasciola hepatica* infection in cattle in the south of Espírito Santo State, Brazil. **The Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, v. 17, n. 3, p. 271-276, 2011.

ASSIS, T. S. et al. Intoxicação por plantas diagnosticadas em ruminantes e equinos e estimativa de perdas econômicas na Paraíba. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 30, p. 13-20, 2010.

BAPTISTA, A. T. **Quantificações das condenações em vísceras de bovinos em 2007 nos matadouros-frigoríficos do estado do Espírito Santo registrados no Serviço de Inspeção Estadual**. 2008. 22 f. Monografia (Pós-graduação lato sensu em Higiene e Inspeção de Produtos de Origem Animal) – Programa de Pós-graduação em Higiene e Inspeção de Produtos de Origem Animal, Universidade Castelo Branco, Vitória, 2008.

BOSTELMANN, S. C. W. et al. Histopatologia comparativa em fígados de bovinos, bubalinos e ovinos infectados por *Fasciola hepatica*. **Archieves of Veterinary Science**, v. 5, p. 95-100, 2000.

BRUM, K. B. et al. Crystal-associated cholangiopathy in sheep grazing *Brachiaria decumbens* containing the saponin protodioscin. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 27, n. 1, p. 39-42, 2007.

FORTES, E. **Parasitologia veterinária**. 3. ed. São Paulo: Ícone, 1997.

GOMAR, M. S. **Características das células espumosas no fígado, linfonodos mesentéricos e intestino de bovinos associados ao consumo de *Brachiaria* spp.** 2002. 63 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) – Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2002.

GRACINDO, C.V. **Avaliação do desempenho da toxicidade em ovinos mantidos em pastagens de *Brachiaria decumbens, Brachiaria brizantha, Panicum maximum* var Aires e *Andropogon gayanus* var Planaltina**. 2010. 90 f. Dissertação (Mestrado em Saúde Animal) - Programa de Pós-Graduação em Saúde Animal, Universidade de Brasília, Brasília, 2010.

GRAYDON, R. J. et al. Photosensitization and crystal-associated cholangiohepatopathy in sheep grazing *Brachiaria decumbens*. **Astralian Veterinary Journal**, v. 68, n. 7, p. 234-236, 1991.

HARAGUCHI, M. Plantas tóxicas de interesse na pecuária. **Biológico**, v. 65, n. 1-2, p. 37-39, 2003.

JONES, T. C.; HUNT, R. D.; KING, N. W. **Patologia Veterinária**. 6. ed. São Paulo: Manole, 2000.

LEMOS, R. A. A. et al. Fotossensibilização e colangiopatia associada a cristais em ovinos em pastagem com *Brachiaria decumbens*. **Ciência Rural**, v. 26, n. 1, p. 109-113, 1996.

MARCOS, L. A. et al. Hepatic fibrosis and *Fasciola hepatica* infection in cattle. **Journal of Helminthology**, v. 81, n. 4, p. 381-386, 2007.

MARTINS, I. V. F. et al. Application of a geographical information system approach for risk analysis of fascioliasis in southern Espírito Santo state, Brazil. **Geospatial Health**, v. 6, n. 3, p. S87-S93, 2012.

MENDES, R. E.; PILATI, C. Estudo morfológico de fígado de bovinos abatidos em frigoríficos industriais sob inspeção estadual no Oeste e no Planalto de Santa Catarina, Brasil. **Ciência Rural**, v. 37, n. 6, p. 1728-1734, 2007.

MENDONÇA, F. S. et al. Aspectos clínicos e patológicos de um surto de fotossensibilização hepatógena em ovinos pela ingestão de *Brachiaria decumbens* (Gramineae) no município de Cuiabá, Mato Grosso. **Ciência Animal Brasileira**, v. 9, n. 4, p. 1034-1041, 2008.

MUSTAFA, V. S. et al. Intoxicação natural por *Brachiaria* spp. em ovinos no Brasil Central. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 32, n. 12, p. 1272-1280, 2012.

OLIVEIRA, S. M.; SPOSITO FILHA, E. Divulgação Técnica: fasciolose hepática. **Biológico**, v. 71, n. 1, p. 5-7, 2009.

PINZANI, M. Liver fibrosis. **Springer Seminars in Immunopathology**, v. 21, n. 4, p. 475-490, 2000.

ROZZA, D. B. et al. Intoxicação experimental por monensina em búfalos e bovinos. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 27, n. 4, p. 172-178, 2007.

SANTOS, J. C. A. et al. Patogênese, sinais clínicos e patologia das doenças causadas por plantas hepatotóxicas em ruminantes e eqüinos no Brasil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 28, n. 1, p. 1-14, 2008.

SOUZA, R. I. C. et al. Intoxicação por *Brachiaria* spp. em bovinos no Mato Grosso do Sul. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 30, n. 12, p. 1036-1042, 2010.

SPINOSA, H. S.; GÓRNIAK, S. L.; PALERMO-NETO, J. **Toxicologia aplicada à medicina veterinária**. 1. ed. São Paulo: Manole, 2008.

THOMSON, R. G. **Patologia geral veterinária**. 1. ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 1983.

URQUHART, G. M. et al. **Parasitologia veterinária**. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1998.

VIEIRA, N. P. et al. Condenação de fígados bovinos na região sul do estado do Espírito Santo. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 63, n. 6, p. 1605-1608, 2011.

Capítulo

15

Expressão de VEGF e CD31 na vasculatura vesical de bovinos com hematúria enzoótica: avaliação intra e extratumoral

Maria Aparecida da Silva[1]
Dyeime Ribeiro de Sousa[2]
Anderson Barros Archanjo[3]
Julio Lopes Sequeira[4]
Ana Paula Madureira[5]
Louisiane de Carvalho Nunes[6]

1 INTRODUÇÃO

A hematúria enzoótica bovina (HEB) é uma doença crônica, não-infecciosa causada pela intoxicação por *Pteridium aquilinum*, planta conhecida popularmente como samambaia (TOKARNIA; DÖBEREINER; PEIXOTO, 2000). Caracteriza-se pelo desenvolvimento de

[1] Universidade Federal do Espírito Santo, e-mail: mvmariaaparecida@gmail.com;
[2] Médica Veterinária Autônoma, e-mail: dyeimester@gmail.com;
[3] Universidade Federal do Espírito Santo, e-mail: andersonarchanjo@gmail.com;
[4] Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", São Paulo-SP, e-mail: sequeira@fmvz.unesp.br;
[5] Universidade Federal de São João Del Rei, São João Del Rei-MG, e-mail: ana_paulamad@hotmail.com;
[6] Universidade Federal do Espírito Santo, e-mail: louisianecn@yahoo.com.br.

neoplasmas na mucosa da bexiga dos bovinos quando ocorre a ingestão da planta por período prolongado (RADOSTITIS et al., 2007).

Além da intoxicação por samambaia o papilomavírus bovino (BPV) também pode estar envolvido na patogênese desta doença, e tem sido diagnosticado em casos de carcinoma do trato digestório superior, bem como na HEB (CAMPO et al., 1992; JARRETT et al., 1978; PATHANIA et al., 2011; WOSIACKI et al., 2005). O papel do papilomavírus bovino do tipo 2 (BPV-2) e da sua grande oncoproteína (E5) transformadora, em que ocorre naturalmente a carcinogênese urotelial foi esclarecida. A E5 interage *in vivo* com o receptor beta para o fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), confirmando que o vírus pode ter papel importante como desencadeador de processo neoplásico (BORZACCHIELLO et al., 2007).

As lesões hemangiomatosas que são observadas na parede da bexiga de animais com HEB podem estar relacionadas a diversos tipos de processos patológicos neoplásicos e não neoplásicos (PEIXOTO et al., 2003). Gabriel et al. (2009) comprovaram que em um mesmo animal pode existir mais de um tipo de neoplasma, e que a histogênese destes tumores é variada.

Segundo Oliveira (2009), uma maior intensidade de hemorragias em casos de HEB pode estar associada a proliferações hiperplásicas ou neoplásicas de vasos sanguíneos. Este mesmo autor verificou alterações em vasos sanguíneos em 72,2% dos casos de lesões de bexiga de animais com HEB caracterizadas por proliferações difusas ou multifocais na lâmina própria sem padrão organizacional.

Shigeru, Yasuyoshi e Hiroshi (2006) e Weidner e Folkman (1996) citaram que o estudo da vasculatura tecidual nos tumores é de fundamental importância e relataram que muitos trabalhos têm correlacionado à densidade dos microvasos (DMV) intratumorais, os níveis do fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF) e a incidência de metástases e/ou sobrevida do paciente em uma grande variedade de cânceres, inclusive o de bexiga. Vale ressaltar que o crescimento e metástase dos tumores sólidos dependem da habilidade para iniciar e sustentar o crescimento de novos vasos, isto é, angiogênese (FOLKMAN, 1995).

Neste contexto, a utilização de biomarcadores vasculares torna-se importante para a caracterização das lesões em casos de HEB (CARVALHO et al., 2009). Assim, o CD31, também conhecido como molécula de adesão celular endotelial plaquetária1(PECAM-1), responsável por manter a integridade endotelial através da adesão célula-célula ou célula-matriz extracelular e auxiliar na passagem das células sanguíneas para a luz dos vasos (BEHAR et al., 1996; BLANKENBERG; BARBAUX; TIRET, 2003; LISTI et al., 2004), pode se expressar na superfície de células endoteliais, plaquetas e leucócitos (ELRAYESS; TALMUD, 2005), como macrófagos e histiócitos (AKIBA et al., 2011) sendo, portanto, um importante biomarcador.

O CD31 já foi utilizado de forma eficiente em humanos para o diagnóstico de angiossarcomas (POHAR-MARINSEK; LAMOVEC, 2010) e como indicador da presença de metástases em casos de neoplasias mamárias (MARINHO et al., 2008). Em camundongos teve participação efetiva no processo de angiogênese (DELISSER et al., 1997) e no diagnóstico de hemangiossarcoma em macaco aranha de cara vermelha (CASAGRANDE et al., 2009). E por apresentar eficácia na reparação vascular cardíaca e periférica aumentou a sobrevivência de ratos com insuficiência cardíaca (KIM et al., 2014).

Outro biomarcador vascular que pode ser utilizado segundo Carvalho et al. (2008) é o fator de crescimento vascular endotelial (VEGF), glicoproteína que aumenta a permeabilidade microvascular, estimula a proliferação e migração de células endoteliais, promove a angiogênese (YLA-HERTTUALA et al., 2007) e participa efetivamente na patogênese de malformações vasculares (PAVLOV et al., 2011).

O VEGF foi utilizado em neoplasias colorretais e demonstrou correlação significativa com os diferentes aspectos clínicopatológicos tumorais, como o tamanho da lesão, presença de invasão vascular, presença de metástases linfonodais, diferenciação tumoral e, em especial, com prognóstico do paciente observado através de taxas de sobrevida após o tratamento (PINHO, 2005). Por outro lado, o VEGF tem sido utilizado para o tratamento de redução da cistite da radiação em ratos por causar aumento da vascularização (SOLER et al., 2011) enquanto que a sua inibição no tecido leva à redução de metástases de neoplasias colorretais em humanos (DIAZ-RUBIO; SCHMOLL, 2005).

Objetivou-se com este trabalho avaliar a expressão de VEGF e CD31 na vasculatura vesical de bovinos com hematúria enzoótica no tecido tumoral e extratumoral com o intuito de verificar a sua relação com a progressão tumoral.

2 MATERIAL E MÉTODOS

Para realização do experimento foram selecionadas 26 amostras que apresentaram lesões macroscópicas no matadouro frigorífico de Muniz Freire, ES, oriundas de propriedades localizadas em municípios da microrregião do Caparaó com histórico da presença de *Pteridium aquilinum*. As bexigas foram seccionadas no sentido caudo-cranial pela face ventral do órgão, para verificação de lesões macroscópicas na mucosa, que incluíram hemorragias focais e difusas e lesões hemangiomatosas e papilomatosas. Juntamente com as bexigas foi coletada, em tubos de 10 mL, a urina desses animais.

As bexigas foram transportadas inteiras, identificadas, acondicionadas separadamente em sacos plásticos transparentes e colocadas junto com a urina devidamente identificada em caixas isotérmicas com gelo para o Setor de Patologia Animal da Universidade Federal do Espírito Santo (UFES). No Setor de Patologia Animal, a urina foi centrifugada a 2500 rpm por 10 minutos e em seguida classificada quanto à existência de macro ou microhematúria, segundo o método descrito por Falbo et al. (2005). Após a confirmação da hematúria, todas as lesões macroscópicas observadas foram coletadas para a avaliação microscópica.

As amostras coletadas foram fixadas em formol a 10% e posteriormente submetidas ao processamento histológico de rotina para inclusão em parafina e microtomia para a secção de cortes histológicos de três micrômetros. Em seguida, os cortes foram depositados em lâminas histológicas e corados pelo método Hematoxilina-Eosina (HE).

A avaliação microscópica dos cortes corados pelo HE foi feita seguindo a descrição de Oliveira (2009) considerando-se a existência de lesões neoplásicas.

Cortes do mesmo material foram submetidos à técnica de imunoistoquímica com os anticorpos primários anti-CD31 (Rabbit Anti-Human CD31 Monoclonal Antibody (Clone SP38) Spring Biosciense®) e anti-VEGF (Rabbit Anti-Human VEGF Monoclonal Antibody (Clone EP1176Y) Biocare Medical®), previamente padronizados em cordão umbilical humano nas diluições de 1:200 e 1:100, respectivamente, no Laboratório de Patologia Animal da UNESP-Botucatu, SP.

Para esta técnica, os cortes histológicos foram depositados sobre lâminas de vidro com extremidade fosca, previamente imersas em cola líquida a base de organosilano (A3648 – SIGMA, St. Louis, E.U.A.). O bloqueio da peroxidase endógena foi feito utilizando-se solução de água oxigenada a 10 volumes em metanol (1:9). Para a recuperação antigênica do material foi utilizada a solução tampão de citrato10 mM, pH 6,04, em Pascal (panela de pressão microprocessada Dako Denmark A/S) 125 ºC. Em seguida foi realizado o bloqueio de proteínas inespecíficas com leite em pó Molico® a 3%.

A incubação com os anticorpos primários anti-CD31 e anti-VEGF foi realizada após a diluição (1:200 e 1:100, respectivamente) em solução de albumina sérica bovina a 0,1% em câmara úmida por 18 horas a 4 ºC. Após este procedimento utilizou-se o kit NovoLinkTM (Novocastra Laboratories Ltda. RE7140-K). Para visualização da reação, as lâminas foram tratadas com solução de 3,3´diaminobenzidina (Liquid DAB – K3466 Dako Cytomation). Os cortes foram contra-corados com hematoxilina de Harris, em seguida, as lâminas foram submetidas aos processos de desidratação e montagem em resina sintética.

A avaliação imunoistoquímica foi realizada de acordo com a expressão de cada biomarcador no tecido intra e extratumoral, isto é, presença ou ausência e intensidade da marcação. Para cada anticorpo utilizado, a reação foi estimada por método semi-quantitativo de acordo com sua expressão e um sistema de escores de intensidade foi feito por dois observadores. Em cada região onde a proteína foi observada, um valor para a intensidade de sua expressão foi adotado, a saber: 0 = negativo, 1 = expressão leve, 2 = expressão moderada e 3 = expressão acentuada. Após essa análise, foi obtido o valor médio para a intensidade da marcação de cada anticorpo utilizado.

A densidade dos microvasos intra e extratumorais foi realizada por meio da quantificação do número total de vasos marcados pelos biomarcadores CD31 e VEGF, no foco neoplásico e no tecido adjacente em grande aumento (objetiva de 40x). Nas neoplasias mesenquimais, os vasos intratumorais, foram contatos no tecido neoplásico, e nas epiteliais no estroma da neoplasia.

A análise estatística foi realizada por método descritivo para a classificação histomorfológica das lesões. Para a avaliação da expressão de cada biomarcador no foco neoplásico e no tecido adjacente foi utilizado o teste de Qui-quadrado ou o teste exato de Fisher, de acordo com o n amostral. A densidade dos microvasos intra e extratumorais foi avaliada pelo teste de Kruskal-Wallis acompanhado do teste post hoc de Dunn. A correlação entre o número de vasos marcados extra e intratumorais para cada biomarcador, assim como a correlação entre os dois biomarcadores nos diferentes tipos de neoplasia foi avaliada pelo teste de Spearman. Para todos os testes estatísticos realizados no trabalho foi utilizado o nível de 5% de significância para comparação dos resultados.

3 RESULTADOS

Das 26 bexigas avaliadas neste estudo 50% (13/26) apresentaram apenas um tipo neoplásico e 50% (13/26) apresentaram mais de um tipo de neoplasia. As neoplasias de origem epitelial encontradas foram: carcinoma urotelial em 34,61% (9/26), carcinoma *in situ* em 30,77% (8/26); adenocarcinoma em 15,38% (4/26) e as de origem mesenquimal foram: hemangioma em 50% (13/26), mixoma em 42,31% (11/26) e hemangiossarcoma em 7,69% (2/26) das bexigas.

A avaliação microscópica da vasculatura vesical revelou presença de proliferação vascular em 100% (26/26) das bexigas. Em 84,61% (22/26) os vasos proliferados apresentaram alterações, sendo que em 61,54% (16/26) foram observadas mais de uma alteração vascular. As

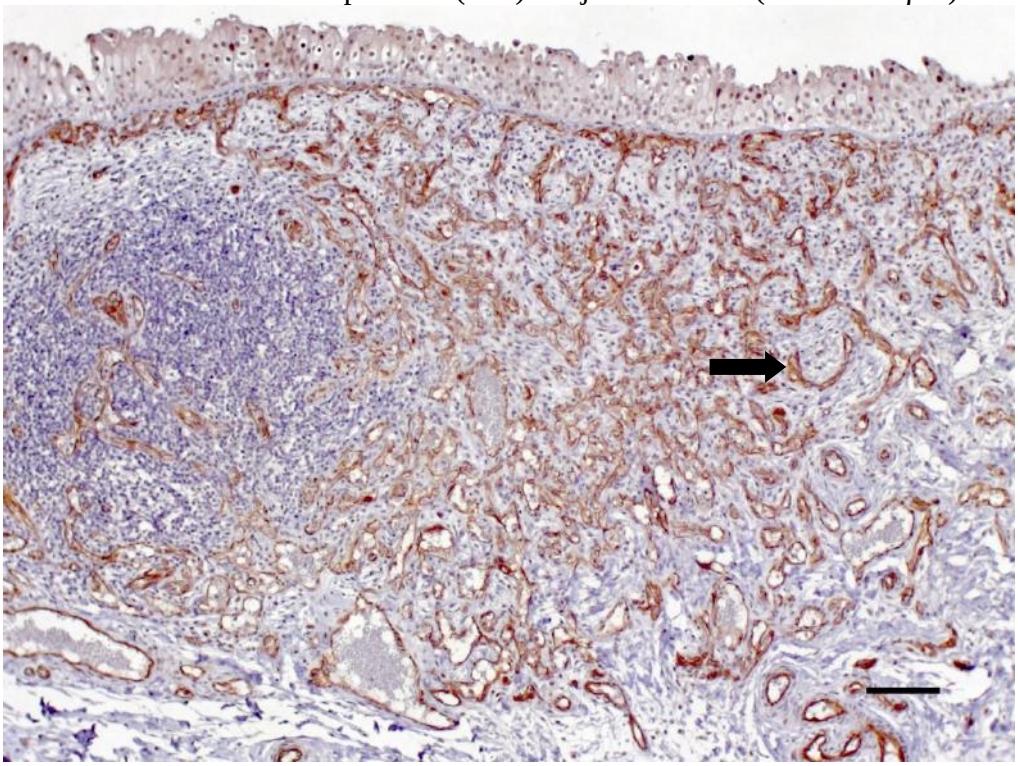
lesões vasculares observadas foram: espessamento da parede dos vasos em 76,92% (20/26), ectasia em 69,23% (18/26) e dilatação em 23,07% (6/26) das bexigas.

A expressão do CD31 nos vasos sanguíneos ocorreu em 96,15% (25/26) dos vasos intratumorais e em 100% (26/26) dos vasos extratumorais das bexigas. Em relação à intensidade da marcação notou-se que em 100% dos vasos extratumorais houve marcação acentuada. Também se verificou marcação acentuada em 100% dos vasos intratumorais nos neoplasmas mixoma, carcinoma urotelial e adenocarcinoma. Entretanto, nos hemangiomas houve marcação moderada em 69,23% (9/13) dos casos e leve em 30,77% (4/13). Enquanto que, nos hemangiossarcomas, a expressão do CD31 foi moderada em 100% (2/2) dos casos. No carcinoma *in situ* não houve expressão do CD31.

Em relação à intensidade de marcação, não houve diferença significativa ($p>0,05$) para CD31 na vasculatura vesical extratumoral em todos os diferentes tipos de neoplasias. Entretanto, quando avaliada a intensidade de marcação de CD31 intratumoral, observou-se que em neoplasias de origem vascular (hemangioma e hemangiossarcoma) a marcação foi menor do que nos carcinomas uroteliais, adenocarcinomas e mixomas, o que revelou diferença significativa ($p<0,05$) entre os tipos de neoplasia.

A Figura 1 ilustra a marcação do CD31 nos vasos intratumorais de bexiga de bovino com HEB.

Figura 1 - Fotomicrografia de bexiga bovina com hematúria enzoótica apresentando neoplasia vascular maligna (hemangiossarcoma, P 241/10). Expressão moderada de CD31 (1:200) em endotélio de vasos neoplásicos (seta). Objetiva de 10x (barra= 100µm).



Fonte: o autor.

A expressão do VEGF nos vasos sanguíneos extratumorais ocorreu em 96,15% (25/26) das bexigas. Nos vasos intratumorais o VEGF foi expresso em 84,62% (22/26) das bexigas e não expresso em 11,53% (3/26).

O grau de intensidade de marcação do VEGF na vasculatura extratumoral foi leve em 23,08% (6/26), moderada em 34,61% (9/26) e acentuada em 38,46% (10/26) dos casos. Em uma amostra 3,85% não foi possível realizar a avaliação de expressão e de intensidade por ausência de material.

A intensidade da marcação do VEGF nos vasos intratumorais variou entre os diferentes tipos de neoplasias e dentro do mesmo tipo de neoplasia, no entanto, no carcinoma *in situ*, não houve expressão do VEGF.

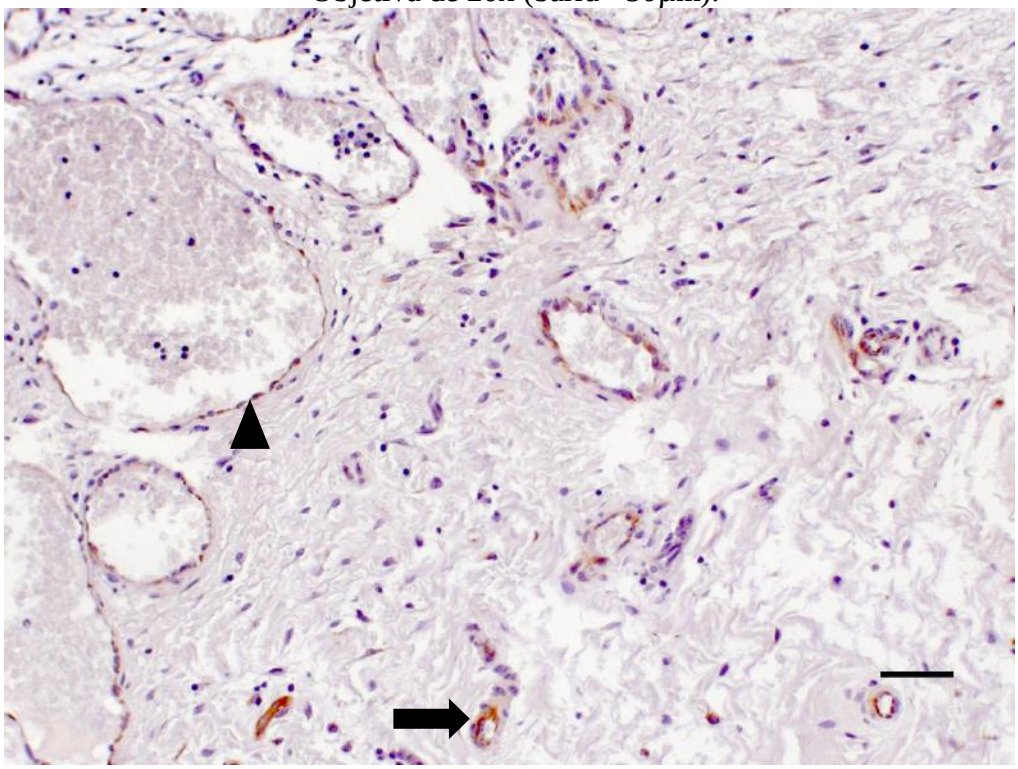
Nos carcinomas uroteliais, em 88,88% (8/9) dos casos a marcação foi leve e em 11,12% (1/9) moderada; nos adenocarcinomas a marcação foi leve em 50% (2/4) e moderada em 50% (2/4); nos hemangiomas houve marcação leve em 61,54% (8/13), moderada em 23,08% (3/13), acentuada em 7,69% (1/13) e não avaliada em 7,69% (1/13); nos mixomas a marcação foi leve em 27,27% (3/11), moderada em 9,09% (1/11), acentuada em 9,09% (1/11) e negativa em

54,55% (6/11); nos hemangiossarcomas houve marcação leve em 50% (1/2) e moderada em 50% (1/2) dos casos.

A intensidade de marcação do VEGF na vasculatura vesical extra e intratumoral não mostrou diferença ($p>0,05$) entre os diferentes tipos de neoplasias.

A Figura 2 ilustra a marcação do VEGF nos vasos intra e extratumorais de bexigas de bovinos com HEB.

Figura 2 - Fotomicrografia de bexiga bovina com hematúria enzoótica apresentando neoplasia vascular benigna (hemangioma, P244/10). Expressão leve de VEGF (1:100) em endotélio de vasos neoplásicos (cabeça de seta) e acentuada (seta) em endotélio de vasos não neoplásicos. Objetiva de 20x (barra= 50µm).



Fonte: o autor.

A avaliação da densidade dos microvasos extratumorais revelou que o número de vasos marcados pelo CD31 nos carcinomas uroteliais variou de 17 a 57 ($\bar{x}$ = 27,57), nos carcinomas *in situ* de 10 a 55 ($\bar{x}$ = 29,25), nos adenocarcinomas de 10 a 49 ($\bar{x}$ = 30,15), nos hemangiomas de 17 a 110 ($\bar{x}$ = 32,69), nos mixomas de 8 a 66 ($\bar{x}$ = 21,45) e nos hemangiossarcomas de 9 a 48 ($\bar{x}$ = 34,25).

Na avaliação dos vasos intratumorais observou-se que o CD31 marcou de 7 a 222 ($\bar{x}$ = 53,15) microvasos nos carcinomas uroteliais, 4 a 81 ($\bar{x}$ = 25,92) nos adenocarcinomas, 20 a 294 ($\bar{x}$ = 91,92) nos hemangiomas, 2 a 45 ($\bar{x}$ = 17,73) nos mixomas e 88 a 333 ($\bar{x}$ = 238,5) nos hemangiossarcomas.

O número de vasos sanguíneos extratumorais marcados pelo VEGF nos carcinomas uroteliais variou de 2 a 31 ($\bar{x}$ = 14,84), nos carcinomas *in situ* de 5 a 36 ($\bar{x}$ = 16,38), nos adenocarcinomas de 8 a 41 ($\bar{x}$ = 21,92), nos hemangiomas de 2 a 34 ($\bar{x}$ = 13,87), nos mixomas de 3 a 34 ($\bar{x}$ = 11,1) e nos hemangiossarcomas de 19 a 28 ($\bar{x}$ = 22,25).

Na avaliação dos vasos intratumorais marcados pelo VEGF observou-se que nos carcinomas uroteliais a quantidade de microvasos variou de 4 a 41 ($\bar{x}$ = 11,16), nos adenocarcinomas de 0 a 33 ($\bar{x}$ = 6,07), nos hemangiomas de 5 a 64 ($\bar{x}$ = 23,29), nos mixomas de 0 a 18 ($\bar{x}$ = 2,2) e nos hemangiossarcomas de 24 a 65 ($\bar{x}$ = 38).

A análise estatística mostrou que não houve diferença significativa no número de vasos extratumorais marcados pelo CD31 entre o carcinoma urotelial, carcinoma *in situ* e o adenocarcinoma ($p>0,05$). E que não houve diferença significativa no número de vasos intratumorais marcados pelo CD31 entre o carcinoma urotelial e o adenocarcinoma ($p>0,05$), mas que existiu diferença significativa entre ambos ($p<0,0001$; $p<0,001$, respectivamente) e o carcinoma *in situ*, uma vez que neste último não existem vasos intratumorais.

Para as neoplasias mesenquimais, a análise estatística mostrou que não houve diferença significativa no número de vasos extratumorais marcados pelo CD31 entre o hemangiossarcoma e o hemangioma e o mixoma ($p>0,05$), mas que existiu diferença significativa entre hemangioma e mixoma ($p<0,01$). A análise estatística mostrou ainda que houve diferença significativa no número de vasos intratumorais marcados pelo CD31 entre o hemangioma e o hemangiossarcoma e o mixoma (<0,001 para ambos), assim como houve diferença entre hemangiossarcoma e o mixoma (<0,0001).

A análise estatística mostrou que não houve diferença significativa no número de vasos extratumorais marcados pelo VEGF entre carcinoma *in situ*, carcinoma urotelial e adenocarcinoma ($p>0,05$). Assim como não houve diferença significativa no número de vasos intratumorais marcados pelo VEGF entre o carcinoma urotelial e o adenocarcinoma ($p>0,05$), mas existiu diferença significativa entre ambos ($p<0,0001$; $p<0,001$ respectivamente) e o carcinoma *in situ*.

Nas neoplasias mesenquimais, não houve diferença significativa no número de vasos extratumorais marcados pelo VEGF entre o hemangioma, o hemangiossarcoma e o mixoma ($p>0,05$), mas existiu diferença significativa entre hemangiossarcoma e o mixoma ($p<0,05$). Também, não houve diferença significativa no número de vasos intratumorais marcados pelo VEGF entre o hemangioma e o hemangiossarcoma ($p>0,05$), porém existiu diferença significativa entre ambos ($p<0,0001$; $p<0,001$ respectivamente) e o mixoma.

Ao avaliar a correlação entre o número de vasos extra e intratumorais marcados pelo CD31 nas diferentes neoplasias observou-se que esta foi positiva nos hemangiomas (r_s= 0,49, p= 0,05), nos hemangiossarcomas (r_s= 1,0, p= 0,05) e nos mixomas de (r_s= 0,50, p= 0,05). Estes resultados indicaram que nestas neoplasias quanto maior o número de vasos intratumorais marcados pelo CD31 maior foi o número de vasos extratumorais marcados. Para os carcinomas uroteliais, carcinomas *in situ* e adenocarcinomas não houve correlação.

A correlação entre o número de vasos extra e intratumorais marcados pelo VEGF nas diferentes neoplasias demonstrou que houve correlação positiva nos hemangiomas (r_s= 0,43, p= 0,05), nos mixomas (r_s= 0,47, p= 0,05) e nos adenocarcinomas (r_s= 0,62, p= 0,05). Estes resultados indicaram que nestas neoplasias quanto maior o número de vasos intratumorais marcados pelo VEGF maior foi número de vasos extratumorais marcados. Nos hemangiossarcomas, carcinomas uroteliais e carcinomas *in situ* não houve correlação.

A correlação entre a expressão dos biomarcadores CD31 e VEGF nos vasos extratumorais nos diferentes tipos de neoplasias foi negativa apenas nos hemangiossarcomas (r_s= -1,0, p= 0,05), ou seja, quando foi observada marcação do VEGF nos vasos extratumorais nos hemangiossarcomas não se observou marcação destes vasos pelo CD31.

4 DISCUSSÃO

O exame histopatológico de lesões na bexiga de bovinos com HEB neste estudo mostrou que em um mesmo animal é possível verificar a presença de diversos tipos de tumores, conforme já citado por Tokarnia, Döbereiner e Peixoto (2000). Esta histogênese variada também foi observada por Furlan et al. (2014), Gabriel et al. (2009), Pathania et al. (2011) e Peixoto et al. (2003).

Os tipos de tumores carcinoma urotelial, carcinoma *in situ*, adenocarcinoma, hemangioma, mixoma e hemangiossarcoma encontrados neste estudo são semelhantes aos encontrados por Carvalho, Pinto e Peleteiro (2006) e Cota et al. (2015). Estes autores ao avaliarem histologicamente tumores na bexiga de animais com HEB encontraram como principais tumores malignos e benignos de origem epitelial e mesenquimal, carcinoma de células de transição (41,4%), hemangioma (29,5%), papiloma (9,6%) e hemangiossarcoma (4,9%). Hemangiomas e hemangiossarcomas também foram encontrados nos estudos realizados por Gabriel et al. (2009) e Souto et al. (2006), carcinoma de células de transição e adenocarcinoma no de Pathania et al. (2011) e carcinoma *in situ*, hemangioma e hemangiossarcoma no estudo realizado por Furlan et al. (2014). Hemangiossarcoma,

hemangioma, carcinoma de células transicionais e cistite crônica foram diagnosticados na bexiga urinária de gamos (*Dama dama*) intoxicados pela ingestão crônica de *Pteridium aquilinum* (SCALA et al., 2014).

Oliveira (2009) verificou proliferações vasculares no estroma de pólipos e justapostas à lâmina basal do epitélio displásico, enquanto Furlan et al. (2014) observaram proliferação moderada e difusa de vasos sanguíneos. No presente trabalho, dados semelhantes foram encontrados, uma vez que, as proliferações vasculares estavam presentes em todas as amostras e revelaram predomínio de espessamento e ectasia dos vasos no tecido adjacente às neoplasias.

O CD31 é responsável por manter a integridade endotelial (BEHAR et al., 1996; BLANKENBERG; BARBAUX; TIRET, 2003; KIM et al., 2014; LISTI et al., 2004) que ocorre principalmente devido à sua ligação com proteoglicanos e glicosaminoglicanos do tecido conjuntivo adjacente (DELISSER et al., 1993). CD31 participa também na reparação vascular cardíaca e periférica e tem potencial anti-inflamatório (KIM et al., 2014). A utilização deste biomarcador foi preconizada por Albelda et al. (1991) que verificaram marcação na superfície de células endoteliais.

Desta forma, ao utilizar o CD31 neste experimento, observou-se que houve intensa marcação nos vasos extratumorais, embora, sem apresentar diferença significativa, independentemente do tipo tumoral observado. Enquanto que, nos vasos intratumorais houve diferença significativa entre os tipos de neoplasia. Nos vasos intratumorais dos hemangiomas e hemangiossarcomas, que são neoplasias de origem mesenquimal vascular que possuem células endoteliais modificadas, esta marcação foi de moderada a leve. Acredita-se que a diminuição na intensidade de marcação do CD31 nestas neoplasias esteja associada à redução da integridade das células endoteliais e perda de coesão celular. Estes elementos, isolados ou em conjunto, poderiam contribuir para o extravasamento de hemácias e a ocorrência de hematúria.

As hemorragias encontradas em bexigas de animais com HEB podem estar associadas à existência de proliferações vasculares, neoplasias vasculares ou neoplasias uroteliais, no entanto, na maioria dos casos, não há associação com lesão específica (OLIVEIRA, 2009). Por isto, mesmo com o fato de ter sido encontrada uma aparente integridade da parede vascular, demonstrada pela intensa marcação do CD31 na vasculatura extratumoral, é possível ainda que se observe hemorragia nestes vasos.

Ramos-Vara (2005) indicou maior especificidade do CD31 para os tumores vasculares e de origem mesenquimal. Isto foi comprovado por Casagrande et al. (2009) em hemangiossarcoma primário intrauterino em um macaco aranha de cara vermelha e por Akiba et al. (2011) em sarcoma histiocítico humano. Carvalho et al. (2009) encontraram positividade

para este marcador em 100% das lesões no tecido endotelial das bexigas de bovinos com HEB e observaram que o CD31 é mais específico para avaliação vascular do que o fator VIII.

A expressão de CD31 não ocorreu nas células neoplásicas epiteliais, semelhante aos achados de Giatromanolaki et al. (1997) em carcinoma de células escamosas e adenocarcinomas pulmonares, de Yilmazer, Han e Onal (2007) em carcinoma renal de humanos e de Cristina et al. (2010) em adenomas de hipófise, pelo fato de ser um marcador específico de células endoteliais, entretanto ocorreu a marcação dos vasos intratumorais em todas estas neoplasias. Entretanto, Chen et al. (2014) observaram que os níveis de CD31 foi significativamente elevados nos vasos intra e extratumorais de carcinoma de células escamosas recorrente.

Neste estudo, a expressão do VEGF nos vasos sanguíneos extratumorais ocorreu na maioria das amostras. Pavlov et al. (2011), ao realizarem estudo de malformações vasculares em humanos, observaram que tanto malformações arteriovenosas quanto venosas apresentaram aumento na expressão de VEGF quando comparadas com vasos intactos do tecido adjacente. Estes dados sugerem que os vasos extratumorais avaliados no presente trabalho possivelmente apresentavam algum tipo de malformação demonstrada pela acentuada marcação do VEGF.

Haixia et al. (2011) ao compararem, a expressão de VEGF em linhagens de células de humanos, ratos e camundongos, normais e neoplásicas, de diferentes tumores, constataram que a maioria das linhagens tanto neoplásicas quanto normais expressaram VEGF. Resultados semelhantes foram encontrados no presente estudo, em que ocorreu expressão de VEGF nos vasos extra e intratumorais.

Segundo Yla-Herttuala et al. (2007) o VEGF proporciona um aumento na permeabilidade microvascular, estimula a proliferação e migração de células endoteliais e promove a angiogênese. Vale ressaltar que a angiogênese representa um processo fundamental para o desenvolvimento tumoral, uma vez que fornece o aporte nutricional para as células neoplásicas proliferantes e estabelece condições favoráveis para a disseminação metastática (PINHO, 2005). Entretanto, neste estudo, a maioria dos tumores revelou intensidade de marcação do VEGF leve o que pode estar associado ao baixo grau de ocorrência de metástases observadas nas neoplasias de bexiga de animais com HEB, conforme já citado por Peixoto et al. (2003).

Cavazzola (2003) ao estudar a expressão do VEGF em adenocarcinomas de esôfago em humanos observou marcação em 47,2% dos indivíduos avaliados, no entanto, não houve associação entre a expressão e a sobrevida em longo prazo destes pacientes. Por outro lado, Yilmazer, Han e Onal (2007) concluíram que o VEGF pode orientar no prognóstico e no tempo de sobrevida de pacientes humanos com carcinoma renal.

A avaliação da densidade dos microvasos (DMV) intratumorais tem sido estudada em uma grande variedade de cânceres, inclusive o de bexiga (SHIGERU; YASUYOSHI; HIROSHI, 2006; WEIDNER; FOLKMAN, 1996). Neste estudo, a densidade dos microvasos foi avaliada extra e intratumoral e revelou que na metade dos casos o CD31 marcou maior número de vasos dentro do foco neoplásico do que no tecido adjacente. Isto pode ter ocorrido uma vez que os processos neoplásicos necessitam da formação de novos vasos, ou seja, da angiogênese, conforme já citado por Folkman (1995) ao afirmar que o crescimento e metástase dos tumores sólidos dependem da habilidade para iniciar e sustentar o desenvolvimento de novos vasos. No carcinoma *in situ* não foram observados vasos intratumorais e supõe-se que a nutrição das células neoplásicas seja realizada pelos vasos do tecido conjuntivo adjacente.

DeLisser et al. (1997) ao realizarem estudo de angiogênese em camundongos comprovaram que o CD31 exerce papel fundamental na formação de novos vasos por proporcionar adesão celular. Isto pode explicar a evidente marcação do CD31 nas neoplasias vasculares, hemangiomas e hemangiossarcomas, bem como nos carcinomas uroteliais, observadas neste estudo. Acredita-se que a explicação para maior angiogênese nas neoplasias vasculares esteja relacionada à sua origem embriológica e, portanto, na grande quantidade de vasos existentes. Já nos carcinomas uroteliais, acredita-se que exista maior angiogênese devido ao seu crescimento ser de aspecto expansivo e geralmente invadirem a lâmina própria.

Nas neoplasias epiteliais a densidade dos microvasos intratumorais marcados pelo CD31 foi diferente entre carcinoma *in situ* e os tipos neoplásicos carcinoma urotelial e adenocarcinoma. O fato do carcinoma *in situ* ser uma neoplasia epitelial, restrita ao urotélio, que não possui vasos sanguíneos, faça com que este não apresente vasos intratumorais.

Nas neoplasias mesenquimais houve diferença para a densidade de vasos extratumorias marcados nos hemangioma e mixoma, e para os vasos intratumorais houve diferença entre hemangiossarcoma e mixoma. Nos casos dos mixomas, é possível que haja menor número de vasos extra e intratumorais devido ao aspecto morfológico da neoplasia, caracterizada por pequena quantidade de fibroblastos e grande quantidade de material mucoide, enquanto que hemangioma e hemangiossarcoma que são neoplasias de origem vascular apresentam um maior número de vasos tanto extra quanto intratumoral.

A marcação pelo VEGF nos vasos extratumorais dos diferentes tipos neoplásicos epiteliais revelou que não houve diferença entre eles. No entanto, para os vasos extratumorais marcados pelo VEGF nas neoplasias mesenquimais existiu diferença entre hemangiossarcoma e o mixoma. A explicação para este fato pode estar na característica morfológica de cada neoplasia, conforme explicado anteriormente.

Neste estudo, a quantidade de vasos intratumorais marcados pelo VEGF variou entre os diferentes tipos tumorais. Nas neoplasias epiteliais houve diferença do carcinoma *in situ* para o carcinoma urotelial e o adenocarcinoma, e nas mesenquimais diferença entre o mixoma e o hemangioma e o hemangiossarcoma. Estes resultados devem-se, provavelmente, ao fato do carcinoma *in situ* não apresentar vasos em seu interior e dos hemangiomas e hemangiossarcomas serem neoplasias vasculares e apresentarem grande quantidade de vasos em crescimento. Estes dados concordam com os resultados de Carvalho et al. (2008) que encontraram receptores de VEGF em hemangiomas, hemangiossarcomas e carcinomas uroteliais encontrados em bexigas de bovinos. Estes mesmos autores relataram que em neoplasias vasculares a densidade de microvasos que expressam o VEGF é maior que em neoplasias epiteliais.

Fukumura et al. (1998) citaram que embora a principal fonte de VEGF sejam as células tumorais, este marcador também pode ser encontrado no estroma tumoral. Portanto, a presença de grande quantidade de vasos extra e intratumorais marcados pelo VEGF em bexigas de animais com HEB indicam um possível caminho para o tratamento desta doença. Em humanos, isto vem sendo estudado, uma vez que anticorpos monoclonais anti-VEGF têm ação específica sobre a angiogênese tumoral e têm sido utilizados com sucesso na quimioterapia de neoplasias colorretais metastáticas (DIAZ-RUBIO; SCHMOLL, 2005; FU et al., 2012), por proporcionar aumento da sobrevida e do intervalo livre de doença (DIAZ-RUBIO; SCHMOLL, 2005) e no tratamento de carcinoma pulmonar, glioblastoma recorrente, carcinoma de células renais metastático e neoplasias prostáticas (FU et al., 2012).

O VEGF também foi usado, através de injeções, como tratamento vascular para a cistite da radiação em ratos submetidos à radioterapia pélvica. Sua utilização reduziu a deposição de colágeno e induziu a neovascularização na bexiga, prevenindo o aparecimento de fibrose (SOLER et al., 2011).

Em relação à quantidade de vasos marcados, considerando-se o biomarcador utilizado, observou-se neste estudo que o número de vasos sanguíneos extra e intratumorais foi diferente e este fato deve-se a proteína que cada um destes biomarcadores se liga. O CD31 se liga à proteína de adesividade celular endotelial plaquetária 1, enquanto o VEGF se liga ao fator de

crescimento vascular endotelial. A PECAM-1 é essencial para a manutenção da integridade dos vasos sanguíneos e, portanto, deve estar presente em todos os vasos sanguíneos. O VEGF, por estar associado ao crescimento vascular é encontrado principalmente em vasos imaturos e, geralmente, ausentes em vasos maduros que já cessaram seu crescimento. Desta forma, o número de vasos sanguíneos extra e intratumorais marcados pelo VEGF foi menor quando comparado com o CD31 e indica a presença de um número maior de vasos sanguíneos maduros.

Neste estudo observou-se ainda que a marcação do CD31 em todas as neoplasias mesenquimais mostrou que quanto maior o número de vasos intratumorais maior é a quantidade destes extratumorais. Enquanto que para o VEGF, isto foi observado nos hemangiomas, mixomas e adenocarcinomas. Vale ressaltar que o VEGF é capaz de estimular o crescimento tumoral de forma parácrina e autócrina (BACHELDER et al., 2001; DIAS et al., 2000; SOKER et al., 2001) e, portanto, a estimulação parácrina pode ocorrer no tecido neoplásico bem como no tecido adjacente à neoplasia (intra e extratumoral). Desta forma, nos tumores que menos expressaram VEGF nos vasos intratumorais também houve menor expressão nos vasos extratumorais.

Por outro lado, a marcação do VEGF nos hemangiossarcomas revelou que quanto maior o número de vasos intratumorais menor é o extratumoral. Este fato pode ser devido à intensa proliferação vascular observada nestas neoplasias.

Este estudo revelou ainda que quando houve aumento da expressão de CD31 houve redução de VEGF nos vasos extratumorais, nos hemangiossarcomas. Vale lembrar que o VEGF participa na regulação da permeabilidade vascular e em alguns leitos vasculares pode levar ao surgimento de fenestrações (ROBERTS; PALADE, 1995) o que explicaria a correlação negativa entre estes biomarcadores. Entretanto, Miyata et al. (2015) ao analisarem a expressão de CD31 e VEGF na densidade de microvasos de carcinomas prostáticos observaram ausência de correlação entre os dois marcadores.

Cristina et al. (2010) encontraram resultados diferentes ao constatarem a expressão significativa de CD31 e VEGF nos vasos intratumorais em neoplasias epiteliais, assim como uma correlação positiva entre CD31 e VEGF, o que sugere participação de angiogênese em neoplasias epiteliais. Marinho et al. (2008) também obtiveram associação positiva entre a marcação do CD31 em vasos sanguíneos e a presença de metástase de carcinoma mamário em linfonodos axilares. Entretanto Souza, Freitas e Miranda (2007) encontraram baixa positividade de CD31 na avaliação da angiogênese em carcinomas de células escamosas de língua e lábio inferior de humanos e não indicaram este marcador como fator prognóstico para estes tumores.

5 CONCLUSÕES

Este estudo revelou que em bexigas de animais acometidos por HEB há expressão dos biomarcadores CD31 e VEGF nos vasos sanguíneos extra e intratumorais. Há variação na intensidade de marcação destes biomarcadores nos diferentes tipos tumorais e no tecido adjacente à neoplasia o que revela que quanto maior a expressão de CD31 com intensidade leve associada à maior expressão de VEGF o prognóstico pode ser desfavorável.

Além disto, nota-se que o estudo da vasculatura vesical extratumoral pode ser de grande importância para esclarecer a patogênese da HEB em processos não neoplásicos. Assim, a utilização destes biomarcadores torna-se uma ferramenta relevante para a avaliação da integridade dos vasos e do crescimento vascular em bexigas de bovinos com HEB.

6 AGRADECIMENTOS

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Espírito Santo e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior pelo suporte financeiro.

7 REFERÊNCIAS

AKIBA, J. et al. Histiocytic sarcoma of the parotid gland region. **Pathology International**, v. 61, p. 373-376, 2011.

ALBELDA, S. M. et al. Molecular and cellular properties of PECAM-1 (endoCAM/CD31): A novel vascular cell-cell adhesion molecule. **The Journal of Cell Biology**, v. 114, p. 1059-1068, 1991.

BACHELDER, R. E. et al. Vascular endothelial growth factor is an autocrine survival factor for neuropilin-expressing breast carcinoma cells. **Cancer Research**, v. 61, p. 5736-5740, 2001.

BEHAR, E. et al. Polymorphism of adhesion molecule CD31 and its role in acute graft-versus-host disease. **The New England Journal of Medicine**, v. 334, n. 5, p. 286-291, 1996.

BLANKENBERG, S.; BARBAUX, S.; TIRET, L. Adhesion molecules and atherosclerosis. **Atherosclerosis**, v. 170, n. 2, p. 191-203, 2003.

BORZACCHIELLO, G. et al. Expression of platelet-derived growth factor-β receptor and bovine papillomavirus E5 and E7 oncoproteins in equine sarcoid. **Journal of comparative pathology**, v. 139, n. 4, p. 231-237, 2008.

CAMPO, M. S. et al. Association of bovine papillomavirus type 2 and bracken fern with bladder cancer in cattle. **Cancer Research**, v. 52, p. 6898-6904, 1992.

CARVALHO, T.; PINTO, C.; PELETEIRO, M. C. Urinary bladder lesions in bovine enzootic haematuria. **Journal of Comparative Pathology**, v. 134, p. 336-346, 2006.

CARVALHO, T. et al. Chemo-angiogenic profile of bovine urinary bladder tumors distinguishes urothelial carcinomas from hemangiossarcomas. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 121, n. 344-358, 2008.

_____. Immunohistochemical evaluation of vascular urinary bladder tumors from cows with enzootic hematuria. **Veterinary Pathology**, v. 46, p. 211-221, 2009.

CASAGRANDE, R. A. et al. Hemangiossarcoma primário intrauterino em um macaco aranha de cara vermelha (*Atelespaniscus*). **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 37, n. 1, p. 59-63, 2009.

CAVAZZOLA, L. T. **Avaliação da expressão da proteína p53 e do VEGF (fator de crescimento do endotélio vascular) em pacientes com adenocarcinoma do esôfago**. 2003. 160 f. Tese (Doutorado em Ciências Médicas) – Programa de Pós-graduação em Ciências Médicas: Cirurgia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2003.

CHEN, Y. et al. Expression of basic fibroblast growth factor, CD31, and α-smooth muscle actin and esophageal cancer recurrence after definitive chemoradiation. **Tumor Biology**, v. 35, n. 7, p. 7275-7282, 2014.

COTA, J. B. et al. Detection and quantification of bovine papillomavirus type 2 in urinary bladders and lymph nodes in cases of bovine enzootic hematuria from the endemic region of Azores. **Veterinary Microbiology**, v. 178, p. 138-143, 2015.

CRISTINA, C. et al. VEGF and CD31 Association in pituitary adenomas. **Endocrine Pathology**, v. 21, p. 154-160, 2010.

DELISSER, H. M. et al. Platelet/Endothelial cell adhesion molecule-1 (CD31)-mediated cellular aggregation involves cell surface glycosaminoglycans. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 268, n. 21, p. 16037-16046, 1993.

_____. Involvement of endothelial PECAM-1/CD31 in angiogenesis. **American Journal of Pathology**, v. 151, n. 3, p. 671-677, 1997.

DIAS, S. et al. Autocrine stimulation of VEGFR-2 activates human leukemic cell growth and migration. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 106, p. 511-521, 2000.

DIAZ-RUBIO, E.; SCHMOLL, H. J. The future development of bevacizumab in colorectal cancer. **Oncology**, v. 69, n. 3, p. 34-45, 2005.

ELRAYESS, M. A.; TALMUD, P. J. Platelet endothelial cell adhesion molecule-1 (PECAM-1) e coronary heart disease. **Indian Journal of Medical Research**, v. 121, p. 77-79, 2005.

FALBO, M. K. et al. Alterações hematológicas, bioquímicas, urinárias e histopatológicas na intoxicação natural pela samambaia *Pteridium aquilinum* (L.) Kühn. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 16, n. 4, p. 547-558, 2005.

FOLKMAN, J. Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease. **Nature Medicine**, v. 1, p. 27-30. 1995.

FU, W. et al. Progress of molecular targeted therapies for prostate cancers. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1825, p. 140-152, 2012.

FUKUMURA, D. et al. Tumor induction of VEGF promoter activity in stromal cells. **Cell**, v. 94, n. 6, p. 715-725, 1998.

FURLAN, F. H. et al. Perfil de propriedades rurais com pastos invadidos por *Pteridium arachnoideum* na região norte de Mato Grosso e prevalência de hematúria enzoótica bovina. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 34, n. 8, p. 753-759, 2014.

GABRIEL, A. L. et al. Aspectos clínico-hematológicos e lesões vesicais na intoxicação crônica espontânea por *Pteridium aquilinum* em bovinos. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 29, n. 7, p. 515-525, 2009.

GIATROMANOLAKI, A. et al. Comparative evaluation of angiogenesis assessment with anti-factor-VIll and anti-CD31 immunostaining in non-small cell lung cancer. **Clinical Cancer Research**, v. 3, p. 2485-2492, 1997.

HAIXIA, D. et al. Gene expression of neuropilin-1 and its receptors, VEGF/Semaphorin 3a, in normal and cancer cells. **Cell Biochemistry and Biophysics**, v. 59, p. 39-47, 2011.

JARRETT, W. F. H. et al. Virus-induced papillomas of the alimentary tract of cattle. **International Journal of Cancer**, v. 22, n. 3, p. 323-328, 1978.

KIM, S. W. et al. Cultured human bone marrow–derived $CD31^+$ cells are effective for cardiac and vascular repair through enhanced angiogenic, adhesion, and anti-inflammatory effects. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 64, n. 16, p. 1681-1694, 2014.

LISTI, F. et al. Association between platelet endothelial cellular adhesion molecule 1 (PECAM-1/CD31) polymorphisms and acute myocardial infarction: a study in patients Sicily. **European Journal of Immunogenetics**, v. 31, p. 175-178, 2004.

MARINHO, V. F. Z. et al. Marcadores moleculares em câncer de mama preditivos de metástases axilares. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 54, n. 3, p. 203-207, 2008.

MIYATA, Y. et al. Pathological significance and prognostic role of microvessel density, evaluated using CD31, CD34, and CD105 in prostate cancer patients after radical prostatectomy with neoadjuvant therapy. **The Prostate**, v. 75, p. 84-91, 2015.

OLIVEIRA, L. G. P. **Novos aspectos patológicos e patogenéticos da hematúria enzoótica bovina**. 2009. 132f. Dissertação (Mestrado em Ciências Clínicas e Patológicas) – Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 2009.

PATHANIA, S. et al. Preliminary assessment of binary ethylenimine inactivated and saponized cutaneous warts (BPV-2) therapeutic vaccine for enzootic bovine haematuria in hill cows. **Vaccine**, v. 29, p. 7296-7302, 2011.

PAVLOV, K. A. et al. Vascular endothelial growth factor and type 2 receptor for this factor in vascular malformations. **Bulletin of Experimental Biology and Medicine**, v. 150, n. 4, p. 481-484, 2011.

PEIXOTO, P. V. et al. Histopathological aspects of bovine enzootic hematuria in Brazil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 23, p. 65-81, 2003.

PINHO, M. S. L. Angiogênese: o gatilho proliferativo. **Revista Brasileira de Coloproctologia**, v. 25, n. 4, p. 396-402, 2005.

POHAR-MARINSEK, Z.; LAMOVEC, J. Angiosarcoma in FNA smears: diagnostic accuracy, morphology, immunocytochemistry and differential diagnoses. **Cytopathology**, v. 21, p. 311-319, 2010.

RADOSTITIS, O. M. et al. Veterinary medicine. **A textbook of the diseases of cattle, horses, sheep, pigs and goats**. 10. ed. London: Saunders, 2007.

RAMOS-VARA, J. A. Imunoistoquímica, não tenha medo do marrom, vermelho e azul. In: I SIMPÓSIO BRASILEIRO DA FUNDAÇÃO C. L. DAVIS, 7., 2005, Belo Horizonte. **Anais...** Belo Horizonte, 2005.

ROBERTS, W. G.; PALADE, G. E. Increased microvascular permeability and endothelial fenestration induced by vascular endothelial growth factor. **Journal of Cell Science**, v. 108, p. 2369-2379, 1995.

SCALA, C. et al. Hematuria and urinary bladder lesions compatible with bracken fern (*Pteridium aquilinum*) intoxication in captive fallow deer (*Dama dama*). **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**, v. 45, n. 2, p. 380-385, 2014.

SHIGERU, K.; YASUYOSHI, M.; HIROSHI, K. Current status and perspective of antiangiogenic therapy for cancer: urinary cancer. **International Journal of Clinical Oncology**, v. 11, p. 90-107, 2006.

SOKER, S. et al. Vascular endothelial growth factor-mediated autocrine stimulation of prostate tumor cells coincides with progression to a malignant phenotype. **American Journal of Pathology**, v. 159, p. 651-659, 2001.

SOLER, R. et al. Vascular therapy for radiation cystitis. **Neurourology and Urodynamics**, v. 30, p. 428-434, 2011.

SOUTO, M. A. M. et al. Neoplasmas da bexiga associados à hematúria enzoótica bovina. **Ciência Rural**, v. 36, n. 5, p. 1647-1650, 2006.

SOUZA, G. F. M.; FREITAS, R. A.; MIRANDA, J. L. Angiogênese em carcinoma de células escamosas de língua e lábio inferior. **Ciência Odontológica Brasileira**, v. 10, n. 1, p. 12-18, 2007.

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

WEIDNER, N.; FOLKMAN, J. Tumoral vascularity as a prognostic factor in cancer. In: DEVITA, V. T.; HELLMAN, S.; ROSENBERG, S. A. (Eds). **Important Advances in Oncology**, Baltimore: Lippincott, 1996. p. 167-190.

WOSIACKI, S. R. et al. Semi-nested PCR for detection and typing of bovine Papillomavirus type 2 in urinary bladder and whole blood from cattle with enzootic haematuria. **Journal of Virological Methods**, v. 126, p. 215-219, 2005.

YILMAZER, D.; HAN, U.; ONAL, B. A comparison of the vascular density of VEGF expression with microvascular density determined with CD34 and CD31 staining and conventional prognostic markers in renal cell carcinoma. **International Urology and Nephrology**, v. 39, p. 691-698, 2007.

YLA-HERTTUALA, S. et al. Vascular endothelial growth factors: biology and current status of clinical applications in cardiovascular medicine. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 49, p. 1015-1026, 2007.

Capítulo

16

Lavado vesical de bovinos com hematúria enzoótica: expressão de p53 e uso do teste do cometa

Natalia Viana Tamiasso[1]
Marcel Arcanjo Silva Azevedo[2]
Eduardo Vargas de Oliveira[3]
Anderson Barros Archanjo[4]
José Augusto Oliveira David[5]
Julio Lopes Sequeira[6]
Louisiane de Carvalho Nunes[7]

1 INTRODUÇÃO

A hematúria enzoótica bovina (HEB) é uma síndrome provocada pela ingestão prolongada de samambaia (*Pteridium aquilinum* (L.)) (SMITH, 1997). Essa doença tem caráter inflamatório, metaplásico e proliferativo da mucosa da bexiga (SANTOS, 1975) e a intoxicação ocorre devido ao grande número de substâncias tóxicas presentes na planta, dentre eles o ptaquilosídeo, substância que possui ação indutora de mutações e de carcinogênese. Devido a

[1] Universidade Federal do Espírito Santo, e-mail: natalia_tamiasso@yahoo.com.br;
[2] Médico Veterinário autônomo, e-mail: marcel.arcanjo@hotmail.com;
[3] Médico Veterinário autônomo, e-mail: duvargass@hotmail.com;
[4] Universidade Federal do Espírito Santo, e-mail: andersonarchanjo@gmail.com;
[5] Universidade Federal de São Carlos, Campus Lagoa do Sino, Buri-SP, e-mail: joseaugustodavid@hotmail.com;
[6] Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", São Paulo-SP, e-mail: sequeira@fmvz.unesp.br;
[7] Universidade Federal do Espírito Santo, e-mail: louisianecn@gmail.com.

essas características, este componente da planta é capaz de induzir tumores de bexiga, pois é excretado pela urina (CARVALHO; PINTO; PELETEIRO, 2006). No Brasil, em locais onde *P. aquilinum* é abundante (SOUTO et al., 2006), a HEB tem sido responsável por perdas econômicas significativas (TOKARNIA et al., 2000).

O diagnóstico da HEB é realizado principalmente pelos sinais clínicos associados à identificação correta da planta e levantamento histórico de casos ocorridos, levando-se em consideração as características da região (CARVALHO G. D., 2009). Na medicina humana, a detecção e monitoração das neoplasias da bexiga são feitas por exames de imagem e citoscopia a partir de urina de colheita livre (MITRA; COTE, 2010). A citologia urinária é um exame não invasivo, com uma especificidade elevada, porém com baixa sensibilidade para tumores de baixo grau bem diferenciados (BUDMAN et al., 2008).

Em medicina veterinária, Azevedo et al. (2015) destacam que o exame citopatológico do lavado vesical de bovinos pode auxiliar no diagnóstico de lesões não neoplásicas, contudo, para identificar lesões pré-neoplásicas ou neoplásicas técnicas moleculares são mais indicadas. De forma semelhante, Sharma et al. (2009) apontam que a utilização de marcadores tumorais em amostras de urina pode contribuir para o diagnóstico dos tumores de bexiga. Neste contexto, a proteína p53 é um marcador que quando expresso provoca várias respostas celulares (VOUSDEN; LU, 2002). Estudos pesquisando a acumulação da p53 mutada em tumores de bovinos foram realizados por meio de métodos imunoistoquímicos (CARVALHO, T. et al., 2005; CARVALHO G. D., 2009), entretanto a utilização da imunocitoquímica nos casos de HEB ainda é pouco difundida.

O teste do cometa é um método que identifica fragmentações em DNA (COLLINS, 2004), desta forma, esse ensaio tem ganhado ampla utilização em várias áreas, incluindo a biomonitorização humana, genotoxicologia, monitoramento ecológico e como uma ferramenta para a investigação de danos no DNA ou sua reparação em geral (LIAO et al., 2009). Em medicina veterinária, este teste tem sido utilizado nos últimos anos para detectar problemas reprodutivos em bovinos gerados por danos no DNA espermático (RODRIGUES et al., 2015; SIMÕES, 2010; SIQUEIRA, 2011).

Com base nesses dados, objetivou-se com esta pesquisa avaliar a expressão da p53 em células obtidas por lavado vesical de bovinos com HEB por meio da imunocitoquímica e aplicar o ensaio do cometa visando o diagnóstico precoce de danos celulares provocados.

2 MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados, lavados vesicais de 10 fêmeas bovinas, adultas. Destes, cinco apresentavam clinicamente urina com sangue e eram provenientes de propriedades localizadas em municípios endêmicos para presença de *P. aquilinum* e de HEB da microrregião do Caparaó, Espírito Santo. A composição da amostragem foi feita por conveniência após o preenchimento do termo de consentimento e livre esclarecido assinado pelo proprietário do animal. Os demais animais eram hígidos, de propriedade do hospital veterinário da Universidade Federal do Espírito Santo sem nenhum histórico de HEB.

Inicialmente os animais passavam por um exame físico de inspeção geral. Em seguida era realizada a contenção física em bretes apropriados. Com auxílio de espéculo vaginal descartável localizava-se o meato urinário externo e introduzia-se a sonda de Folley Nº 24 (Rusch® 30-50 CC) umedecida com lidocaína spray. Após este procedimento foi acoplada uma seringa estéril descartável contendo 60 mL de ar para inflar o balão da sonda impedindo assim sua saída. Um volume de 300 mL de solução fisiológica (NaCl 0,9%) foi infundido pela extremidade da sonda no interior da bexiga. Em seguida, um processo de aspiração e infusão da solução foi repetido por dez vezes consecutivas utilizando-se uma seringa de 60 mL, para promover o turbilhonamento do líquido no interior da vesícula urinária.

Em cada animal, foi recuperado todo o líquido vesical obtido e armazenado em erlenmeyers estéreis com capacidade de dois litros, devidamente identificados, vedados e protegidos da luz. Todo material coletado foi acondicionado em caixas isotérmicas contendo gelo para o transporte até o Laboratório de Patologia Animal do Hospital Veterinário da Universidade Federal do Espírito Santo.

O material foi submetido à centrifugação a 1.500 rotações durante seis minutos em centrífuga refrigerada (Novatécnica NT 825). Após a centrifugação, o sobrenadante foi desprezado e o precipitado utilizado para uma nova centrifugação repetindo-se o processo por várias vezes até que o volume final fosse igual a 10 mL. A amostra foi homogeneizada com auxílio de pipeta de Pasteur e dividida em duas alíquotas. A primeira alíquota foi centrifugada em citocentrífuga (Teklab Citológica CT14). Em cada citobloco foi utilizado um volume de 350 μL para confecção da lâmina para imunocitoquímica. Foram preparadas três lâminas. Uma lâmina foi fixada em solução de metanol por três a cinco minutos e corada pelo método de Giemsa para classificação citopatológica utilizando-se adaptação dos critérios descritos por Peixoto et al. (2003). As outras lâminas foram fixadas em solução de álcool 95% para posterior

realização dos testes imunocitoquímicos e a segunda alíquota foi utilizada para realização do teste do cometa sendo depositada em lâminas pré-cobertas com gel de agarose.

Para a imunocitoquímica, o material foi submetido ao bloqueio da peroxidase endógena com solução 1:1 de água oxigenada e metanol, durante 20 minutos seguida da recuperação antigênica em solução tampão de citrato 10mM, pH 6,0, em forno de microondas (700w de potência), durante 15 minutos. A incubação com o anticorpo primário anti-p53 (NCL-p53-CM1, NOVOCASTRA) foi realizada na concentração 1:100 com solução a 0,1% de albumina sérica bovina em câmara úmida por 18 horas a 4 ºC. A amplificação da reação foi feita pelo sistema "NovoLink". Para observação da reação, as lâminas foram tratadas com solução de 3,3´diaminobenzidina (Liquid DAB – K3466 DakoCytomation) durante três minutos e contra-coradas com hematoxilina de Harris. O material foi avaliado sob microscópio óptico (aumento 40x). Para o controle positivo, utilizou-se carcinoma mamário canino e o negativo com a omissão do anticorpo primário em lavado vesical bovino.

O ensaio cometa foi realizado utilizando o protocolo de Singh et al. (1988), com adaptações. A agarose de ponto normal foi dissolvida em PBS (Phosphate Buffer Solution) e aplicada para compor a primeira camada de agarose. A agarose de baixo ponto de fusão foi também dissolvida em PBS e utilizada para compor a segunda camada. Uma fração de sete microlitros do material vesical coletado foi adicionado a 75 µL de agarose "low melting" (ponto de fusão 0,5 %) e colocada imediatamente sobre a lâmina contendo a primeira camada de agarose, sendo coberta com uma lamínula de 24 x 32 mm. Após solidificação por cinco minutos a 5 ºC, a lamínula foi retirada, e as lâminas foram imersas em solução de lise.

As lâminas foram dispostas em cubeta horizontal, coberta com solução de lise gelada (NaCl 2,5 M, EDTA 100 mM, Tris-HCl 10 mM, Triton X-100 1%, DMSO 10%), e mantidas imersas a 4 ºC por 24 horas protegidas da luz. Após a lise, uma solução alcalina (NaOH 300 mM, EDTA 1mM), refrigerada a 5 °C, e recém preparada, foi utilizada para a etapa de desnovelamento do DNA, durante 20 minutos. As lâminas foram submetidas à eletroforese sob condições de 1,0 V/cm (35 V), amperagem ajustada para 300 mA, com tempo de corrida de 20 minutos. A neutralização foi feita com água destilada em três banhos de dez minutos. Após a secagem foram imersas em álcool etílico absoluto durante 10 minutos, coradas com brometo de etídio e observadas em microscópio de fluorescência. Os dados obtidos foram analisados por estatística descritiva, expressos em percentuais.

Esta pesquisa foi aprovada pela comissão de ética no uso de animais sob protocolo nº 094/2011.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Todas as amostras provenientes de animais com HEB avaliadas foram classificadas como não neoplásicas e, 60% destas, foram do tipo inflamatório. Dados semelhantes foram encontrados por Silva et al. (2013) que também encontraram lesões não neoplásicas em 100% das amostras avaliadas em animais na mesma região. Também, segundo Peixoto et al. (2003), em bovinos com HEB é possível encontrar lesões não neoplásicas como: hiperplasia, formações metaplásicas, infiltrado inflamatório, hemorragia, displasia, cistite cística, ninhos de Brunn, proliferação vascular, fibrose e cistite hemorrágica.

McGavin e Zachary (2009) citaram que condições inflamatórias crônicas aumentam o risco de neoplasias nos órgãos afetados. Por outro lado, Franco et al. (2010), afirmaram que lesões como displasia, metaplasia e inflamação são lesões pré-neoplásicas e que podem evoluir para neoplasias em bexiga. Entretanto, Silva et al. (2013) destacaram somente as lesões de displasia, metaplasia de células claras, inflamação e espessamento vascular como alterações associadas aos processos neoplásicos em bexigas. Acredita-se que embora tenham sido observadas mais lesões inflamatórias neste estudo, estas também podem ser indicativas de lesões pré-neoplásicas.

Nas amostras oriundas de animais sadios não se verificou lesões epiteliais ou inflamatórias. Vale ressaltar que os animais considerados hígidos não estavam em áreas com samambaia.

Em relação à imunomarcação da p53 observou-se positividade em apenas 20% das amostras. Verificou-se uma amostra com marcação positiva proveniente de animal sadio e uma amostra imunomarcada oriunda de animal com HEB. Estes dados indicam que é possível observar a expressão da p53 em amostras de células normais e neoplásicas de bexiga. A explicação para este achado pode ser o fato de que a mutação do gene p53 resulta na perda da sua função normal ou aquisição de funções anormais de seu produto proteico, podendo contribuir para a proliferação celular desordenada por vários mecanismos (GAMBLIN et al., 1997; ORAM et al., 1994). Na maior parte dos casos de mutação do gene p53, a proteína traduzida tem uma alteração na conformação e acumula-se nos núcleos de células tumorais em quantidades detectáveis por imunoistoquímica (TEIFKE; LÖHR, 1996).

Também, em resposta a estímulos de estresse celular, como lesões no DNA, hipóxia, choque de calor, alterações metabólicas, ou exposição a certas citoquinas, o gene codificador da p53 é ativado, levando à acumulação da proteína no núcleo, iniciando cascatas moleculares que terminam na suspensão do ciclo celular ou na apoptose (HALL et al., 1996). Desta forma,

acredita-se que esses fatores, associados ou não, foram responsáveis pela expressão da p53 nas amostras de células dos animais normais e também dos com HEB utilizadas neste estudo.

As mutações no gene da p53 são encontradas em 50 a 55% de todos os tumores humanos (HOLLSTEIN et al., 1994). Os tumores de bexiga não são exceção, tendo sido descritas 270 mutações diferentes associadas aos carcinomas do urotélio (OLIVIER et al., 2002). Sidransky et al. (1991) citaram que as mutações do gene p53 são comuns no carcinoma de células transicionais da bexiga em humanos e estudos realizados por Serth et al. (1995) mostraram uma correlação entre a expressão do p53 e a progressão dos tumores de bexiga.

Alterações genéticas do gene TP53 (que codifica a proteína p53), como mutações intragênicas, deleções e rearranjos estruturais, determinam acúmulo nuclear da proteína e são comuns em tumores de bexiga. A superexpressão da proteína p53 foi correlacionada com progressão tumoral independente do grau, presença de invasão vascular ou carcinoma *in situ* no câncer de bexiga. Além disso, a sobrevida específica em relação à doença foi associada aos padrões de expressão do p53. Estudos estabeleceram o p53 como marcador de prognóstico de lesão invasiva sendo encontrada alta percentagem de morte relacionada ao câncer. Em outro estudo, foi verificado que em pacientes com carcinoma de células transicionais de bexiga, o acúmulo nuclear de p53 apresentou correlação com risco significativamente maior de recorrência e morte relacionada ao tumor (SARKIS; ARAP, 2004).

Achados semelhantes foram encontrados por Dias Neto et al. (2002) que observaram a expressão nuclear do p53 em carcinoma de células transicionais da bexiga de humanos, concluindo que a expressão da p53 mostrou valor preditivo para grau tumoral, estádio, incidência de metástases e sobrevida dos pacientes, mas não para recidiva vesical dos tumores superficiais. Resultados diferentes foram verificados por Suzano (2007) que afirmou não existir relação entre a marcação do p53 e o grau de malignidade das neoplasias, entretanto, os tumores em fases mais avançadas mostraram maior expressão de p53.

Pelo fato de terem sido encontradas apenas lesões inflamatórias, não foi possível, neste estudo, associar a marcação de p53 à existência de neoplasia ou à progressão tumoral, no entanto, a expressão nuclear deste biomarcador em uma amostra de animal com HEB e lesão não neoplásica sugere, neste caso, uma possível ocorrência de mutação, porém, acredita-se que a quantidade acumulada nos núcleos das células não tenha sido suficiente para ser detectada pela técnica de imunocitoquímica ou talvez o dano celular seja muito discreto a ponto de não ser evidenciado.

Dados semelhantes foram descritos por Schulz (2006) que citou que a correlação entre as mutações e a acumulação nuclear da p53 mutada é positiva, mas não é perfeita no caso dos

tumores de bexiga em humanos, devido a algumas dificuldades da técnica de imunoistoquímica. As questões metodológicas como diferenças entre protocolos e a sua interpretação, bem como, amostras inadequadas são apontadas como fatores para as discordâncias entre estudos (GOEBELL et al., 2010).

Neste estudo embora tenha sido utilizada a técnica de imunocitoquímica, de acordo com Suzano (2004), um dos pontos fundamentais desta técnica para que se obtenham resultados confiáveis é a padronização dos procedimentos laboratoriais, sendo extremamente importante a fixação do material e seu armazenamento. Segundo Fisher et al. (1995), os esfregaços devem ser fixados em acetona e estocados congelados entre -20 ºC e -70 ºC, por no máximo 15 dias. Por outro lado, Vernau et al. (2001) relataram que artefatos de técnica que alteravam os núcleos celulares foram prevenidos pela fixação rápida em álcool.

No presente estudo optou-se pela fixação imediata e estocagem dos esfregaços em álcool 95º. Este procedimento permite que o material fique armazenado por um tempo maior, evitando a produção de artefatos de técnica indesejáveis. Este armazenamento prolongado permite processar um número maior de esfregaços na mesma reação, o que otimiza o trabalho e leva a redução do consumo de reagentes.

Em relação ao anticorpo anti-p53 utilizado neste experimento, a escolha foi por um reagente que marcasse a p53 mutante (inativa) que segundo Milner e Medcalf (1991) é mais estável e menos degradável, consequentemente mais detectado no estudo imunoistoquímico. Desta forma, acredita-se que a baixa marcação observada neste estudo não esteja relacionada à técnica empregada ou ao anticorpo utilizado, mas sim, devido à baixa sensibilidade do exame citopatológico do lavado vesical no diagnóstico de tumores (BUDMAN et al., 2008). Schulz (2006) também relatou que esta marcação é difícil em tumores de bexiga.

No que diz respeito ao teste do cometa observou-se que tanto nas amostras de animais sadios quanto dos animais positivos para HEB não houve observação da migração de fragmentos nucleares não sendo possível estabelecer relação dos animais com HEB que apresentem apenas lesões não-neoplásicas com a existência de danos de DNA.

O princípio desta técnica se baseia no fato de que o DNA da célula que não possuir dano migrará em conjunto formando um círculo. Caso ocorra dano ao DNA, serão formados fragmentos de diversos tamanhos. Os fragmentos menores tendem a migrar mais rapidamente do que os maiores. Ocorrendo um dano muito intenso em uma célula, muitos fragmentos de diversos tamanhos serão formados e migrarão em velocidades diferentes, formando-se então a figura típica de um cometa (COLLINS et al., 2008; OLIVE et al., 1990).

O DNA contido em células de organismos eucariotos possui alguns centímetros de comprimento. Para que o DNA seja acomodado no interior do núcleo que possui entre cinco mm e 10 mm de largura, este DNA tem que ser fortemente condensado. Danos impostos à molécula de DNA provocam um relaxamento desta condensação e ocasionalmente quebras na estrutura molecular (COLLINS et al., 2008; ROJAS et al., 1999).

De acordo com Mitchelmore e Chipman (1998), como o ensaio cometa analisa as células individualmente, estas têm que ser avaliadas isoladas. Por esta razão, surgem algumas limitações de ordem prática que devem ser consideradas. Na separação das células, a partir de seu tecido original, por meio de processos de fragmentação ou por meio do uso da tripsina podem ocorrer incrementos no número de quebras do DNA. Outra consideração feita pelos mesmos autores é a de que incrementos no número de quebras podem estar associados a situações de estresse.

No presente estudo, foram avaliadas células uroteliais oriundas de lavado vesical que sofreram diversos processos de centrifugação. Além disso, estas células possuem como característica variação de tamanho. Acredita-se que estes fatores associados ou não poderiam causar sobreposição das células e dificultar a observação da migração dos fragmentos nucleares.

Ferraro (2009) citou que, ao se escolher o tecido ou células que servirão como unidades no ensaio, estas devem ser separadas por meios que não causem danos a estas células, mas que permitam a individualização delas. No caso de células sanguíneas estas podem ser diluídas em soro bovino fetal ou em uma solução fisiológica. Qualquer que seja o meio a ser utilizado, todo processamento das células deve obrigatoriamente ser executado sem que danos adicionais ao DNA possam ocorrer. Desta maneira, as células devem ser manipuladas ao abrigo da luz, uma vez que esta causa danos ao DNA.

Neste estudo, embora tenha sido difícil a individualização das células, desde o momento da coleta, as amostras foram protegidas da luz e acondicionadas de maneira a minimizar o estresse térmico. Da mesma forma, todas as soluções utilizadas foram preparadas previamente ou, no momento do ensaio, conforme o protocolo estabelecido, evitando que estes fatores prejudicassem o resultado. No entanto, a explicação para a ausência de danos de DNA expressos pela migração de fragmentos nucleares pode estar associada à ausência de lesões neoplásicas nos animais com HEB avaliados e, por isto, esta técnica mostrou-se inviável em casos de lesões não neoplásicas.

Diante disto, a utilização de técnicas moleculares em amostras citológicas de lavado vesical necessita de maiores estudos visando o diagnóstico precoce de danos celulares provocados pela HEB.

4 CONCLUSÕES

Os dados deste estudo permitiram concluir que a técnica de imunocitoquímica com a expressão de p53 bem como o teste do cometa não revelaram danos celulares importantes visto que os animais utilizados no experimento não apresentavam lesões neoplásicas.

5 REFERÊNCIAS

AZEVEDO, M. A. S. et al. Lavado vesical de bovinos com hematuria enzoótica: padronização de técnica de colheita, obtenção de amostras e avaliação citopatológica. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 82, p. 1-8, 2015.

BUDMAN, L. I. et al. Biomarkers for detection and surveillance of bladder cancer. **Canadian Urological Association Journal**, v. 2, p. 212-221, 2008.

CARVALHO, G. D. Quadro clínico-patológico das intoxicações por Samambaia (*Pteridium aquilinum*) em bovinos. **Pubvet**, v. 3, n. 4, Art. 499, 2009.

CARVALHO, T.; PINTO, C.; PELETEIRO, M. C. Urinary bladder lesions in bovine enzootic haematuria. **Journal of Comparative Pathology**, v. 134, n. 4, p. 336-346, 2006.

CARVALHO, T. et al. Immunohistochemical studies of epithelial cell proliferation and p53 mutation in bovine ocular squamous cell carcinoma. **Veterinary Pathology**, v. 42, p. 66-73, 2005.

_____. Immunohistochemical evaluation of vascular urinary bladder tumors from cows with enzootic hematuria. **Veterinary Pathology**, v. 46, p. 211-221, 2009.

COLLINS, A. R. The comet essay for DNA damage and repair: principles, applications, and limitations. **Molecular Biotechnology**, v. 26, p. 249-261, 2004.

COLLINS, A. R. et al. The comet assay: topical issues. **Mutagenesis**, v. 23, 3, p. 143-151, 2008.

DIAS NETO, J. A. et al. Expressão nuclear do p53 em carcinoma de células transicionais da bexiga. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v. 17, n. 3, 2002.

FERRARO, M. V. M. **Avaliação de três espécies de peixes – *Rhamdia quelen, Cyprinus carpio* e *Astyanax bimaculatus*, como potenciais bioindicadores em sistemas hídricos através dos ensaios: cometa e dos micronúcleos**. 2009. 189 f. Tese (Doutorado) - Curso de Pós-Graduação em Genética, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2009.

FISHER, D. J. et al. Immunophenotyping lymphomas in dogs: a comparison of results from fine needle aspirate and needle biopsy sample. **Veterinary Clinical Pathology**, v. 24, n. 4, p. 118-123, 1995.

FRANCO, M. et al. **Patologia:** Processos gerais. 5. ed. São Paulo: Atheneu, 2010.

GAMBLIN, R. M. et al. Overexpression of p53 tumor suppressor protein in spontaneously arising neoplasms of dogs. **American Journal Veterinary Research**, v. 58, p. 857-863, 1997.

GOEBELL, P. J. et al. International Study-Initiative on Bladder Cancer (ISBC) p53 immunohistochemistry in bladder cancer-a new approach to an old question. **Urologic Oncology**, v. 28, p. 377-388, 2010.

HALL, P. A. et al. p53--integrating the complexity. **The Journal of Pathology**, v. 180, p. 1-5, 1996.

HOLLSTEIN, M. et al. Database of p53 gene somatic mutations in human tumors and cell lines. **Nucleic Acids Research**, v. 22, p. 3551-3555, 1994.

LIAO, W. et al. The comet assay: A sensitive method for detecting DNA damage in individual cells. **Methods**, v. 48, p. 46-53, 2009.

MCGAVIN, M. D.; ZACHARY, J. F. **Bases da patologia em veterinária**. 4. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2009.

MILNER, J.; MEDCALF, E. A. Cotranslation of activated mutant p53 with wild type drives the wild-type p53 protein into the mutant conformation. **Cell**, v. 65, p. 765-74, 1991.

MITCHELMORE, C. L.; CHIPMAN, J. K. DNA strand breakage in aquatic organisms and the potential value of the comet assay in environmental monitoring. **Mutation Research – Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 399, p. 135-147, 1998.

MITRA, A. P.; COTE, R. J. Molecular screening for bladder cancer: progress and potential. **Nature Reviews Urology**, v. 7, p. 11-20, 2010.

OLIVE, P. L. et al. Heterogeneity in radiation-induced DNA damage and repair in tumor and normal cells measured using the “comet” assay. **Radiation Research**, v. 122, p. 86-94, 1990.

OLIVIER, M. et al. The IARC TP53 database: new online mutation analysis and recommendations to users. **Human Mutation**, v. 19, p. 607-614, 2002.

ORAM, Y. et al. p53 protein expression in squamous cell carcinomas from sun-exposed and non-sun-exposed sites. **Journal of the American Academy Dermatology**, v. 31, p. 417-422, 1994.

PEIXOTO, P. V. et al. Histopathological aspects of bovine enzootic hematuria in Brazil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 23, n. 2, p. 65-81, 2003.

RODRIGUES, M. P. et al. Perfil oxidativo e funcional de sêmen bovino criopreservado em diferentes estações do ano. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 52, n. 2, p. 134-140, 2015.

ROJAS, E. et al. Single cell gel electrophoresis assay: methodology and applications. **Journal of Chromatography**, v. 722, p. 225-254, 1999.

SANTOS, J. A. **Patologia especial dos animais domésticos (mamíferos e aves)**. 1. ed. Rio de Janeiro: Instituto Interamericano de Ciências Agrícolas, 1975.

SARKIS, A. S; ARAP, M. A. Câncer de bexiga. In: FERREIRA, C. G.; ROCHA, J. C. **Oncologia Molecular**. São Paulo: Atheneu, p. 203, 2004.

SCHULZ, W. A. Understanding urothelial carcinoma through cancer pathways. **International Journal of Cancer**, v. 119, p. 1513-1518, 2006.

SERTH, J. et al. p53 immunohistochemistry as an independent prognostic factor for superficial transitional cell carcinoma of the bladder. **British Journal of Cancer**, v. 71, p. 201-207, 1995.

SHARMA, S. et al. Diagnosis and treatment of bladder cancer. **American Family Physician**, v. 80, p. 717-723, 2009.

SIDRANSKY, D. et al. Identification of p53 gene mutations in bladder cancers and urine samples. **Science**, v. 252, p. 706-709, 1991.

SILVA, M. A. et al. Caracterização imunoistoquímica de neoplasias de bexigas associadas à hematúria enzoótica bovina. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 34, n. 1, p. 281-292, 2013.

SIMÕES, R. **Influência da fragmentação de DNA espermático na produção *in vitro* de embriões bovinos**. 2010. 106 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Programa de Pós-Graduação em Reprodução Animal, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

SINGH, N. P. et al. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. **Experimental Cell Research**, v. 175, p. 184-191, 1988.

SIQUEIRA, A. F. P. **Efeito do laser de baixa potência sobre a viabilidade espermática e a produção *in vitro* de embriões bovinos**. 2011. 125 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Programa de Pós-Graduação em Reprodução Animal, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

SMITH, B. L. The toxicity of bracken fern (Genus *Pteridium*) to animals and its relavance to man. In: FELIX D'MELLO, J. P. **Handbook of Plant and Fungal Toxicants**. Boca Raton: CRC Press, 1997. p. 63-76.

SOUTO, M. A. et al. Neoplasmas da bexiga associados à hematúria enzoótica bovina. **Ciência Rural**, v. 36, n. 5, p. 1647-1650, 2006.

SUZANO, S. M. C. **Classificação Citológica e Imunocitoquímica dos Linfomas Caninos**. 2004. 110 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2004.

_____. **Avaliação da proliferação celular, índice apoptótico e da expressão do p53 nos linfomas caninos**. 2007. 110 f. Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2007.

TEIFKE, J. P.; LOHR, C. V. Immunohistochemical detection of p53 overexpression in paraffin wax-embedded squamous cell carcinoma of cattle, horses, cats and dogs. **Journal Comparative Pathology**, v. 114, p. 205-210, 1996.

TOKARNIA, C. H. et al. **Plantas tóxicas do Brasil**. 1. ed. Rio de Janeiro: Helianthus, 2000.

VERNAU, K. M. et al. Primary canine and feline nervous tumors: intraoperative diagnosis using the smear technique. **Veterinary Patholology**, v. 38, n. 1, p. 47-57, 2001.

VOUSDEN, K. H.; LU, X. Live or let die: the cell's response to p53. **Nature Reviews Cancer**, v. 2, p. 594-604, 2002.

Capítulo

17

Xenotransplantes e o uso de células e órgãos de suínos na medicina humana

Talita Pinheiro Bonaparte[1]
José Geraldo Vargas Júnior[2]
Danilo de Vargas Gonçalves Vieira[3]
Drielly Gomes Bizarria[4]
Hugo da Silva Nascimento[5]
Natália Oliveira Cabral[6]
Elizabêth Fonseca Processi[7]
Dione Henrique Breda Binoti[8]

1 INTRODUÇÃO

As mais diferentes espécies de animais vertebrados e invertebrados têm sido utilizadas como objeto de experimentação, desde os primórdios da Medicina até os dias atuais. Cada vez mais a prática é empregada para desenvolver métodos e técnicas que possam curar ou aliviar os

[1] Universidade Federal do Espírito Santo, e-mail: talitabonaparte@gmail.com;
[2] Universidade Federal do Espírito Santo, e-mail: josegeraldovargas@yahoo.com.br;
[3] Universidade Federal do Tocantins, Araguaína-TO, e-mail: danilovargaszoo@hotmail.com;
[4] Universidade Federal do Espírito Santo, e-mail: drielly.bizarria@hotmail.com;
[5] Universidade Federal do Espírito Santo, e-mail: hugonas@gmail.com;
[6] Universidade Estadual do Norte Fluminense, Campos dos Goytacazes -RJ, e-mail: nataliacabral@zootecnista.com.br;
[7] Doutora em Ciência Animal, Campos dos Goytacazes-RJ, e-mail: processi@zootecnista.com.br;
[8] Universidade Federal do Espírito Santo, e-mail: dionebinoti@hotmail.com.

males que acometem o homem e outros animais. Dentre as várias espécies utilizadas em experimentação biomédica destaca-se o suíno (*Sus scropha*) (MARIANO, 2003).

Devido à semelhança genética do suíno com o homem, várias partes do organismo desses animais podem ser utilizadas em medicina humana. Além do fornecimento de substâncias vitais à vida do homem, até a doação de órgãos, os suínos são a grande opção da medicina para aumentar a sobrevivência das pessoas.

A predileção pelo uso dos suínos nas pesquisas ocorre em função das similaridades com a genética humana, tornando-se assim, segundo Tumbleson (1986), um modelo eficaz para estudos em pesquisas biomédicas, pois, além de apresentar estrutura e funções semelhantes ao humano, apresenta similaridade com o tamanho, padrão de alimentação, fisiologia digestiva, hábitos dietéticos, estrutura e funções dos rins, estrutura vascular do pulmão, distribuição das artérias coronárias, propensão para a obesidade, frequência respiratória e comportamento social, sendo ainda, modelo ideal para determinar as exposições crônicas e agudas ao álcool, cafeína, tabaco, aditivos alimentares e poluentes do ambiente.

2 IMPORTÂNCIA DOS SUÍNOS NA MEDICINA HUMANA

O uso do suíno em pesquisas científicas é uma prática antiga (SWINDLE, 1983), em 1628, Willian Havey descreveu os mecanismos que regem a circulação sanguínea utilizando o suíno como animal modelo para melhor compreender a fisiologia humana.

Bustard e McClellan (1965) afirmaram que o suíno (*Sus scrofa domesticus*) apresenta similaridades com o homem no que diz respeito à odontologia, morfologia e fisiologia renal, acuidade visual, estrutura dos olhos, fisiologia e morfologia da pele, fisiologia e anatomia cardiovascular, fisiologia e anatomia digestiva e imunologia. Tais características são mais distantes se os modelos de comparação forem com o cão, o rato, os camundongos e outras espécies utilizadas em pesquisas (MARIANO, 2003). Segundo Tumbleson (1986) o suíno é excelente modelo para avaliar alcoolismo, diabetes, absorção, nutrição parental total, transplante de órgãos, arteriosclerose, hipertensão, hemorragia, hipertensão, melanoma, gengivite, nefropatia obstrutiva e refluxo, osteocondrose e choque séptico.

Devido as grandes similaridades anatômicas e fisiológicas os suínos são os animais de eleição para os estudos de xenotransplantes, seja para aplicação de órgãos de suínos em transplantes, além de sua aplicação em cirurgias plásticas e reconstitutivas.

3 XENOTRANSPLANTES

A xenotransplantação, cujo prefixo xeno deriva da palavra grega “estranho” refere-se ao transplante, de órgãos vivos, tecidos e/ou células de animais, geneticamente modificados ou não, entre espécies diferentes.

O principal objetivo dos xenotransplantes se refere à possibilidade de fornecimento ilimitado de órgãos para uso em transplantes humanos. Pesquisas com as ilhotas pancreáticas de suínos têm se destacado para xenotransplantes. Contudo, os suínos apresentam um epítopo de galactose em suas glicoproteínas e glicolipídeos, o qual é reconhecido pelo sistema imunológico humano. Por isso, esta sequência é responsabilizada pelo fenômeno de rejeição aguda dos xenotransplantes.

As pesquisas com embriões de mamíferos, focando em células tronco de embriões de suínos, podem servir como informação para a produção de animais transgênicos para o uso de doadores de xenotransplantes, e assim diminuir a taxa de rejeição (KIM et al., 2010).

Para realizar o transplante de uma espécie para outra são necessárias duas etapas fundamentais, primeiramente a produção de suínos transgênicos e, posteriormente, sua clonagem. Com a introdução de genes de outra espécie animal, ou do próprio homem é possível obter suínos transgênicos com a sua carga genética alterada. É selecionado um gen humano específico que se deseja copiar que é introduzido no núcleo de um óvulo fecundado de suíno, sendo o suíno gerado a partir deste óvulo alterado geneticamente, com o gen humano e a produção de substâncias compatíveis com o homem.

Com o suíno transgênico, a próxima etapa, é a técnica da clonagem, ao se criar cópias idênticas do mesmo indivíduo, permitindo a produção em grande quantidade de uma determinada substância, medicamento ou até mesmo de órgãos.

4 FONTE DE MEDICAMENTOS, DE CÉLULAS E ÓRGÃOS:

ACTH: Da glândula pituitária do suíno pode-se obter o hormônio adrenocorticotrófico, utilizado na medicina humana para o tratamento de artrites e doenças inflamatórias.

HEMOGLOBINA: Suínos modificados geneticamente podem produzir hemoglobina humana que poderá ser estocado por meses, ao contrário do sangue normal, que se conserva apenas por semanas.

HEPARINA: A heparina é obtida da mucosa intestinal dos suínos e tem propriedades anticoagulantes, usada em casos de trombose na medicina humana.

INSULINA: Durante muitos anos o pâncreas dos suínos foi utilizado para obter insulina, um hormônio essencial para os diabéticos. A insulina também é produzida através da multiplicação bacteriana, porém a um custo mais caro. A estrutura básica da insulina é comum a várias espécies de animais, havendo diferenças em alguns aminoácidos de cada uma das cadeias (NOLTE; KARAM, 2001). A insulina bovina e a humana diferem em três aminoácidos, enquanto que a suína difere em um único aminoácido (trigésimo aminoácido), sendo por isso a insulina bovina mais antigénica para o homem do que a suína (AZEVEDO, 2006).

SURFACTANTE: Do pulmão dos suínos, pode ser retirada uma substancia chamada surfactante, que é indispensável ao tratamento de bebês nascidos com a síndrome da imaturidade pulmonar.

TIREÓIDE: A tireóide é utilizada para obter medicamentos que serão usados por pessoas que possuem glândulas tireóides pouco ativas.

DENTES: A partir de células dos dentes de suínos e de técnicas da engenharia de tecidos que reproduzem fielmente a matéria dentária, composta por esmalte e dentina, para criar estruturas que um dia poderão chegar a ser substitutos biológicos dos dentes humanos. Células dentais imaturas retiradas de porcos com seis meses foram cultivadas e implantadas em ratos, obtendo resultados positivos.

PELE: Por muitos anos tem se realizado testes laboratoriais, por cientistas americanos, para produzir bocados de pele humana a partir da pele dos suínos, devido a semelhança das mesmas. São necessárias duas semanas para, a partir de células epidérmicas, criar 60 centímetros quadrados de pele. Até 1998 os testes foram efetuados em suínos com resultados encorajadores, muito especialmente, para os indivíduos que sofreram queimaduras graves. A pele dos suínos pode ser usada em transplantes temporários, ela não serve para transplantes definitivos, devido à sua rejeição.

VÁLVULAS CARDÍACAS: Do coração dos suínos são removidas as válvulas cardíacas e utilizadas na cirurgia cardíaca de humanos há cerca de 30 anos. As válvulas dos suínos possuem menos rejeição do que as mecânicas, além de terem a mesma estrutura que a dos humanos e resistirem mais às infecções.

ILHOTAS DE LANGHERANS: No tratamento da diabetes o pâncreas dos suínos é utilizado para extração das ilhotas pancreáticas para implantes em pessoas diabéticas que não as possuem.

RECUPERAÇÃO DE IMPULSOS NERVOSOS: A transmissão de impulsos nervosos na medula da espinha dorsal danificada de ratos foi restaurada através do transplante de células

de suínos, responsáveis pelos impulsos olfatórios ao cérebro em Yale (EUA) por estimular a formação de novas ligações nervosas e a produção de nova mielina.

TRANSPLANTES DE FÍGADO: O transplante é com fígado artificial, produzido à base de células modificadas de suíno apenas temporariamente, até que seja encontrado um fígado humano para o transplante definitivo.

MAL DE PARKINSON: Em Boston (EUA) células de embriões de suínos foram implantadas no cérebro de 12 pessoas, em estado avançado da doença, na tentativa de aumentar a produção de Dopamina, dos quais, dez registraram melhora de até 19 % na sua mobilidade.

EPILEPSIA: Na Universidade de Havard (EUA) células de fetos de suínos que continham substância inibidora de convulsões foram implantadas no cérebro de pacientes epilépticos com convulsões intratáveis, observando redução de 40% na frequência do problema, segundo o do Dr. S. Schachter, do Departamento de Neurologia.

RECONSTRUÇÃO DE TECIDOS DANIFICADOS: Na Universidade de Purdue (EUA) foi isolado do intestino dos suínos um fragmento constituído de colágeno, proteínas e fatores de crescimento e utilizado em humanos com intuito de reconstituir tecidos danificados, sendo comprovada sua eficácia no tratamento de ferimentos crônicos e incontinência urinária.

5 CÉLULAS TRONCO

Muito se tem falado e pesquisado a respeito de células tronco, em virtude de sua capacidade de recapitular o desenvolvimento de tecidos embrionários e adultos e reparar injúrias, defeitos congênitos e/ou degenerativos. A capacidade de auto renovação ilimitada, diferenciação em outros tipos de células tornam essas células únicas (WEST et al., 2006; ALVES; CARRONDO; CRUZ, 2007).

As primeiras pesquisas com células tronco de suínos foram na década de 90 (NOTARIANNI et al., 1989). Estudos com células tronco de suínos são relevantes devido a semelhança na fisiologia e imunologia além de assegurarem a eficácia do transplante de células tronco mesenquimais.

Quanto ao estudo das células tronco do tecido adiposo, o uso dos suínos como modelo experimental é ideal, devido as semelhanças com o humano e por apresentarem uma grande reserva de gordura, (TUMBLESON, 1986) facilitando o isolamento das células tronco de tecido adiposo e o transplante autólogo ou heterólogo (transplantes de órgãos ou células entre a mesma espécie), a fim de avaliar o mecanismo de ação das células de suínos e humanos (ZUTTION et al. 2013).

Em diversas pesquisas com células tronco do tecido adiposo de suínos ficou comprovada a capacidade de diferenciação em diferentes linhagens mesodermais como osso, cartilagem, gordura, músculo e cardiomiócitos, e expressaram diferentes marcadores de CT, apresentando similaridades com células tronco do tecido adiposo de humanos (QU et al., 2007; WANG et al., 2008).

Apesar de o suíno ser bastante utilizado para implante de dispositivos endovasculares, como os "stents" (LEMOS et al., 2007; GALON et al., 2012), tem se tornado ótimo modelo pré-clínico para testar o efeito das células tronco, especificamente na área doenças cardiovasculares, tendo sido para isso, parcialmente caracterizados em relação à expressão dos marcadores de célula tronco semelhante ao organismo humano (ZUTTION et al. 2013).

Na Universidade da Califórnia (UC), em Davis, pesquisadores injetam células-tronco humanas em embriões de suínos para produzir embriões híbridos que terão um órgão composto de células humanas. Na estrutura genética do embrião suíno foram injetadas células-tronco humanas, capazes de se desenvolver como qualquer tecido no corpo. Espera-se que as células-tronco humanas gerem um pâncreas com tecido humano no feto suíno. O desenvolvimento dos fetos nas matrizes suínas ocorre apenas por 28 dias, conforme determinado por lei, após isso, as gravidezes são interrompidas e o tecido é removido para análise (WALSH, 2016).

6 DIFICULDADES

Segundo alguns autores o uso de primatas não humanos como dadores de órgãos não é aceitável do ponto de vista ético pela ligação emocional que os humanos têm para com eles, e pelo fato de serem filogeneticamente próximos do homem, o que aumenta o risco de infecção (DAAR, 1999). Do ponto de vista ético é importante considerar a colheita de órgãos no caso de espécies em perigo de extinção (LOUREIRO, 1996),

O suíno se destaca entre as espécies consideradas como potenciais doadores de órgãos xenogénicos, devido possuir qualidades, como a domesticação e as importantes semelhanças na dimensão dos órgãos entre suínos e humanos (SQUINTO, 1997). No que se refere ao doador animal deve-se ter em consideração critérios essenciais como as regras de boas práticas para a reprodução e cruzamento de animais, assim como assegurar o bem-estar dos animais, não os expondo a sofrimentos desnecessários (VALLOTTON; WEIBEL, 2001), e considerar também aspectos culturais e religiosos (WEBSTER, 1998). Devem, neste contexto, ser seguidas "*guidelines*" no âmbito do uso de animais, a fim de que o sofrimento possa ser evitado e todo o processo de transplantação possa ser dignificado (MELO et al., 2001).

Para utilizar com maior frequência os suínos geneticamente modificados como potenciais doadores é necessário entender os mecanismos da genética, mas, principalmente, estabelecer as normas éticas para esse procedimento (EMED, EMED, 2003). Uma questão a ser ponderada é não transformar os receptores em objetos de pura experimentação, respeitando sua decisão de recusa ao tratamento, no caso, o transplante (FLOR, 2004).

Outra dificuldade encontrada no transplante de células, tecidos ou órgãos não-humanos para humanos é a de expor, potencialmente, o paciente à patógenos zoonóticos. Transmissão de infecções zoonóticas (por exemplo, triquinose de tecidos de suínos) constitui uma preocupação. Além disso, há a possibilidade do transplante transmitir zoonoses previamente desconhecidas (xenozoonoses) para receptores humanos imunodeprimidos. Infecções que podem acompanhar o transplante de órgãos de suínos foram descritas e devido a isso, vêm sendo desenvolvidas diretrizes do Serviço de Saúde Pública dos Estados Unidos descrevendo muitas doenças infecciosas e medidas de controle de infecção relacionadas ao xenotransplante.

Um entrave encontrado nos recentes estudos sobre xenotransplantes é a rejeição que o organismo humano exerce contra o novo órgão. Os mamíferos não primatas possuem glicoproteínas na superfície celular que ativam o sistema imune a produzir células de defesa, os xeno-anticorpos (anticorpos naturais). A hemorragia intersticial e a necrose e trombose causadas nos vasos podem levar à perda do enxerto em poucas horas. O problema pode ser resolvido com a utilização de drogas imunossupressoras que quebrem esta barreira mantida pelos anticorpos naturais ou a obtenção de animais que não expressem os epítopos imunogênicos, através da manipulação pela engenharia genética (suínos transgênicos), enganando o sistema imunológico e impedindo a rejeição.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O uso de células, tecidos e órgãos de animais doadores de órgãos em seres humanos doentes (receptores) deverá ser analisado devido o surgimento de problemas éticos, sociais, culturais, médicos, científicos e legais. Devem-se reconhecer os riscos e dialogar para harmonizar as investigação e métodos de vigilância. Os princípios éticos têm de ser constantemente adaptados aos novos conhecimentos médicos e técnicos com conhecimentos amplos inseridos nas mais diversas áreas multidisciplinares.

8 REFERÊNCIAS

ALVES, P. M. M.; CARRONDO, M. J. T.; CRUZ, P. E. Introdução à tecnologia de cultivo de células animais. In: MORAES, A. M.; AUGUSTO, E. F. P.; CASTILHO, L.R. **Tecnologia do cultivo de células animais: de biofármacos a terapia celular**. São Paulo: Roca, 2007. p. 2-14.

AZEVEDO, I. Insulina e outros Antidiabéticos. In: GUIMARÃES, S., MOURA, D. E SILVA, P. S. (Ed.). **Terapêutica Medicamentosa e as suas Bases Farmacológicas**. 5. ed. Porto: Porto Editora, 2006. p. 574-579.

BUSTARD, L. K.; MCCLELLAN, R. O. Use of pigs in biomedical research. **Nature**, v. 208, p. 531-535, 1965.

DAAR, A. S. Animal-to-human organ transplants - a solution or a new problem? **Bulletin of the World Health Organization**, v. 77, n. 1, p. 54-61, 1999.

EMED, L. S.; EMED, L. G. M. Aspectos éticos da doação de órgãos. In: URBAN, C. A. (Org). **Bioética clínica**. Rio de Janeiro: Reventer, 2003. p. 479-485.

FLOR, P. E. A. Transplantes: uma leitura constitucional. In: SPAREMBERGER, R. F. L.; AUGUSTIM, S. **Direito ambiental e bioética**. Caxias do Sul: EDUCS, 2004. p. 157-169.

GALON, M. Z. et al. Evolução temporal da proliferação neointimal após implante de dois tipos de stent farmacológico com polímeros biodegradáveis em modelo porcino: avaliação qualitativa por tomografia de coerência óptica sequencial. **Revista Brasileira Cardiologia Invasiva**, v. 20, n. 4, p. 413-419, 2012.

KIM, S. et al. Establishment and characterization of embryonic stem-like cells from porcine somatic cell nuclear transfer blastocysts. **Zygote**, v. 18, n. 2, p. 93-100, 2010.

LEMOS, P. A. et al. Stent coronário de liga cobalto-cromo concebido no Brasil: achados histológicos preliminares em modelo experimental porcino. **Revista Brasileira Cardiologia Invasiva**, v. 15, n. 4, p. 378-85, 2007.

LOUREIRO, J. **Terapêuticas de transplantação**. Lisboa: Editorial Verbo, 1996.

MARIANO, M. Minisuíno (minipig) na pesquisa biomédica experimental: o Minipig br1. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v.18, n. 5, p. 387-391, 2003.

MELO, H. et al. Ethical and Legal Issues in Xenotransplantation. **Bioethics**, v. 15, n. 5-6, p. 427-442, 2001.

NOLTE, M. S.; KARAM, J. H. Pancreatic Hormones and Antidiabetic Drugs. In: Katzung, B.G. (Ed.). **Basic and Clinical Pharmacology**. 8. ed. United States of America: The McGraw-Hill companies, 2001. p. 711-723.

NOTARIANNI, E. et al. Maintenance and differentiation in culture of pluripotencial embryonic cell lines from pig blastocysts. **Journal of reproduction and fertility. Supplement**, v. 41, p. 51-56, 1989.

QU, C. Q. et al. Osteogenic and adipogenic potential of porcine adipose mesenchymal stem cells. **In Vitro Cellular & Developmental Biology Animal**, v. 43, n. 2, p. 95-100, 2007.

SQUINTO, S. P. Genetically modified animal organs for human transplantation. **World journal of surgery**, v. 21, n. 9, p. 939-942, 1997.

SWINDLE, M. M. **Basic surgical exercises using swine**. Praeger Publishers, 1983.

TUMBLESON, M. E. **Swine in biomedical research**. 1. ed. New York: Plenum Press, 1986.

VALLOTTON, M.; WEIBEL, E. R. Medical-ethical principles on xenotransplantation. **Swiss Medical Weekly**, v. 131, n. 25-26, p. 388-394, 2001.

WALSH, F. **Cientistas criam órgãos humanos em porcos para transplante**. 2016. Disponível em: <http://www.bbc.com/portuguese/geral-36459781>. Acesso em: 07 out. 2016.

WANG, K. H. et al. Optimizing proliferation and characterization of multipotente stem cells from porcine adipose tissue. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, v. 51, n. 4, p. 159-166, 2008.

WEBSTER, N. R. Animal tissues into humans. **British Journal of Anaesthesia**, v. 80, n. 3, p. 281-282, 1998.

WEST, J. A. et al. In vitro generation of germ cells from murine embryonic stem cells. **Nature Protocols**, v. 1, n. 4, p. 2026-2036, 2006.

ZUTTION et al. Células-tronco de tecido adiposo e a importância da padronização de um modelo animal para experimentação pré-clínica. **Revista Brasileira Cardiologia Invasiva**, v. 21, n. 3, p. 7-281, 2013.

Capítulo

18

Mastite bovina

Joelly Mariano Barbosa[1]
Jacymara Dutra Santos[2]
Julianne Almeida Rodrigues[3]
Ulysses Rodrigues Vianna[4]

1 INTRODUÇÃO

Uma das principais doenças que acometem os bovinos leiteiros é a mastite, que nada mais é a inflamação da glândula mamária, que pode ser acompanhada ou não de infecção, que se não tratada pode evoluir para um quadro mais severo com perda irreversível da função da área afetada, causando vários impactos econômicos como a queda na produção leiteira, maior custo de produção, perda na qualidade do leite e o descarte prematuro de vacas por perda de função de um ou mais quartos mamários. A magnitude da doença varia conforme o tipo da mastite, a intensidade do quadro e o agente causador (PEREIRA NETO, 2010). É importante ressaltar também, a importância da mastite, no que se refere à saúde pública, devido ao envolvimento de bactérias patogênicas que podem colocar em risco a saúde humana (UNIVERSIDADE FEDERAL DE LAVRAS - UFLA, 2012).

A interação entre os agentes causadores, as vacas e o ambiente, somada à ação do homem e possíveis erros de manejo, criam condições favoráveis à contaminação da glândula

[1] Universidade Federal do Espírito Santo, e-mail: joellymariano@hotmail.com;
[2] Universidade Federal do Espírito Santo, e-mail: jacydutra28@gmail.com;
[3] Universidade Federal do Espírito Santo, e-mail: julianne_ar@hotmail.com;
[4] Universidade Federal do Espírito Santo, e-mail: ulyssesvianna@hotmail.com.

mamária e o desenvolvimento das mastites (PEREIRA NETO, 2010). E segundo estudos epidemiológicos prévios sobre fatores de riscos foi identificado que, além disso, características relacionadas ao animal, como a conformação de úbere e tetos, podem também, estarem associadas à mastite bovina e à variação da contagem de células somáticas (CCS) do leite, que é o indicador mais usado em programas de controle e prevenção da mastite em todo o mundo (COENTRÃO et al., 2008).

Em gado de leite, as características de conformação do úbere assumem grande importância em função de sua associação com características produtivas, e com a possível associação com a mastite (TEODORO et al., 2000).

Sabendo da importância econômica da mastite, dos prejuízos acarretados para o produtor de leite, esta revisão tem como objetivo demostrar os tipos de mastite, as principais causas, correlacionar alguns fatores de risco, bem como demonstrar os métodos de diagnóstico e de prevenção desta enfermidade.

1.1 O ÚBERE DOS BOVINOS

O úbere consiste em um conjunto de quatro glândulas mamárias que se encontram fundidas, sendo que sua maior parte situa-se abaixo da parte caudal do abdome e parte estende-se abaixo do assoalho da pelve. O aspecto do úbere varia muito conforme a idade do animal (maturidade), a raça (aptidão), o estado funcional e as características individuais (DYCE; SACK; WENSING, 1997; LIBONI, 2003).

Glândula mamária corresponde a uma glândula sudorípara modificada que secreta leite para nutrição da prole (MORAES, [2014]). O úbere é dividido em quatro quartos, que equivalem a quatro glândulas. Cada quarto possui uma teta, podendo também em alguns casos haver a presença de tetas acessórias, algumas vezes associadas ao tecido glandular funcional. Porém estas são indesejáveis, pois dependo da posição que ficam podem prejudicar a ordenha, predispondo assim a problemas futuros, como a mastite (DYCE; SACK; WENSING, 1997).

Estima-se que 500 litros de sangue devem percorrer o úbere para que um litro de leite seja secretado, deixando bem claro a necessidade que os arranjos vasculares sejam bem concebidos. Os grandes ductos drenam o leite em uma cisterna no interior da glândula, que por sua vez drena para uma cisterna no interior da teta na cisterna da teta e daí para um canal único que se abre na porção final da teta (DYCE; SACK; WENSING, 1997; MORAES, [2014]).

1.2 MASTITE: CONCEITO E DEFINIÇÃO

A palavra mastite, derivada do grego "*mastos*", ou mamite, do latim "*mammae*", designa uma doença de grande importância econômica (DIAS, 2007). A mastite se caracteriza pela inflamação do parênquima da glândula mamária independente da causa, caracterizando-se por uma série de alterações físicas, químicas e microbiológicas do leite bem como modificações patológicas no tecido glandular. As alterações que ocorrem na composição e qualidade do leite oriundo de vacas com mastite, dependem da intensidade da resposta inflamatória do animal, dos fatores de virulência do agente etiológico da doença e da extensão do tecido afetado. As modificações comumente encontradas no leite com mastite são a presença de coágulos, descoloração e um grande número de leucócitos. Ao mesmo tempo, representa um risco potencial à saúde pública, em decorrência da eliminação de patógenos causadores de zoonoses e toxinas produzidas pelos microrganismos do leite (RADOSTITS et al., 2002; UFLA, 2012; ZAFALON et al., 2005).

A mastite bovina é o problema de saúde que mais afeta o gado leiteiro em todas as áreas produtoras do mundo. Estudos relatam que, em rebanhos sem programa específico para o controle dessa enfermidade, 50% dos quartos mamários de 50% das vacas em lactação podem estar afetados, provocando assim, significativas perdas econômicas. Isso ocorre devido às lesões causadas nas células epiteliais secretoras da glândula mamária, diminuindo a produção e secreção da glândula como um todo. Além disso, pode interferir no processamento do leite nos laticínios (OLIVEIRA, 2006; OLIVEIRA et al., 2011; OLIVEIRA et al., 2012).

A mastite pode ser causada por injúria química, mecânica ou infecção por microrganismos diversos, sendo esta última, a mais comum. Existem duas formas de apresentação: uma que se denomina mastite clínica, quando as alterações são visíveis macroscopicamente e outra mastite subclínica, quando as alterações não são visíveis a olho nu, necessitando de testes mais específicos para a detecção da mesma (UFLA, 2012).

1.3 TIPOS DE MASTITE

As alterações patológicas que ocorrem no úbere mastítico são bastante variáveis e dependem de fatores como: o tipo de microrganismo envolvido e a resistência individual dos animais, podendo se apresentar nas formas clínica e subclínica (VEIGA et al., 1994).

1.3.1 Mastite Clínica

A mastite clínica caracteriza-se pelo aparecimento de alterações inflamatórias bem visíveis como edema, aumento de temperatura, vermelhidão, endurecimento e dor na glândula mamária ou aparecimento de grumos, pus ou quaisquer alterações das características físicas do leite (UFLA, 2012; VEIGA et al., 1994).

As formas clínicas da doença são classificadas de acordo com a gravidade em hiperaguda, aguda, subaguda, crônica e gangrenosa (RADOSTITS et al., 2002; UFLA, 2012).

Casos hiperagudos, geralmente são de curta duração, e estão associados com a infecção por agentes ambientais do grupo dos coliformes e se caracterizam por inflamação grave com tumefação, dor e com a presença de sinais sistêmicos, tais como febre, hipotensão, prostração e anorexia. Na forma aguda, há uma inflamação grave, mas sem reação sistêmica acentuada. A forma subaguda se caracteriza pela presença de grumos no teste da caneca, sendo mais moderados os demais sinais inflamatórios (BURVENICH et al., 2003; RADOSTITS et al., 2002; UFLA, 2012) A forma crônica se caracteriza por infecção persistente do úbere, geralmente ocorre quando a terapia é inadequada, podendo durar de dias a anos, e pode apresentar sinais de fibrose dos quartos acometidos e até presença de fístulas. Na mastite gangrenosa, o quarto mamário afetado apresenta-se frio, de cor alterada, úmido, variando de escuro ao púrpuro-azulado e sem sensibilidade. Esta última é um tipo de mastite mais raro e pode ser causada pelo *Clostridium perfringens* tipo A que se caracteriza pela necrose do parênquima mamário, acompanhadas de fluxo hemorrágico e fétido (GONÇALVES et al., 2006; UFLA, 2012).

1.3.2 Mastite Subclínica

A mastite subclínica se caracteriza pelo não aparecimento de sinais visíveis da infecção, diferente do que ocorre na forma clínica (OLIVEIRA, 2006). E por ser silenciosa e passar despercebida pelos proprietários, à doença pode alastra-se no rebanho, infectando outras vacas. Além disso, pode ocorrer destruição da capacidade funcional da glândula mamária, causando diminuição da produção de leiteira e prejuízos à saúde do animal (DIAS, 2007). O leite também tem sua composição e qualidade alteradas quando oriundo de vacas com mastite subclínica, observando-se, principalmente, um aumento na Contagem de Células Somáticas (CCS) e alterações nos teores de caseína, cálcio, gordura e lactose, sendo a intensidade destas alterações dependentes da resposta inflamatória do animal, dos fatores de virulência do agente etiológico

da doença e da extensão do tecido afetado (RIBEIRO et al., 2003; ZAFALON et al., 2005). O resultado destas alterações no leite é o menor rendimento na produção dos seus derivados e a diminuição do tempo de prateleira dos produtos (DIAS, 2007).

A mastite clínica determina perdas elevadas por descarte do leite, gastos com o medicamento, mão de obra, perda funcional de glândulas e até por morte do animal, inclusive, recentemente, estudos feitos no Paraná indicaram que 15,8% das causas de morte das vacas são devido à mastite. Mas a mastite subclínica é a que causa mais prejuízos, pela sua maior incidência no rebanho, por ser silenciosa e, logo não chama a atenção do proprietário (FERREIRA, 2008; UFLA, 2012; VEIGA et al., 1994).

1.4 ETIOLOGIA

A mastite bovina pode ser causada por mais de 140 tipos de microrganismos infecciosos diferentes, que incluem algas, fungos, bactérias, micoplasmas e protozoários. Dentre os principais destacam-se as bactérias, sendo 80 a 90% dos casos diagnosticados da doença atribuídos às espécies *Staphylococcus aureus* e outros estafilococos, *Streptococus agalactiae*, *Streptococous dysgalacti.ae*, *Streptococous uberis* e coliformes (LANGONI et al., 2011; VEIGA et al., 1994).

Esses agentes causadores de mastite são, geralmente, classificados quanto à sua origem e ao modo de transmissão em dois grupos: os causadores de mastite contagiosa e os promotores de mastite ambientais (RADOSTITS et al., 2002).

Radostits et al. (2002) relataram também sobre a mastite traumática, que nada mais é que qualquer lesão que envolva úbere ou tetas e que penetrem nas cisternas ou ductos lactíferos e, por conseguinte abram as portas para a invasão de qualquer tipo de patógeno, causando, geralmente, infecções mistas.

1.4.1 Mastite Contagiosa

A mastite contagiosa é causada por microrganismos contagiosos, adaptados a sobreviverem dentro do hospedeiro e que estão presentes no corpo do animal com ou sem mastite (BRADLEY, 2002)

Os principais patógenos envolvidos são *Streptococcus agalactiae*, *Staphylococcus aureus*, *Corynebacterium bovis* e *Mycoplasma bovis*, sendo transmitidos principalmente durante a ordenha, através das mãos dos ordenadores, de tetos infectados para outros, por meio

do equipamento da ordenha, bezerro e até pela utilização de toalhas e esponjas contaminadas de uso múltiplo (RADOSTITS et al., 2002; VEIGA et al., 1994). Devido às suas características, na maioria das vezes, determina infecções subclínicas, de longa duração, resultando em mastites crônicas (BRESSAN, 2000).

1.4.2 Mastite Ambiental

A mastite ambiental é causada por dois grupos de patógenos: os coliformes, como Escherichia coli, *Klebsiella* spp., *Citrobacter* spp., *Enterobacter* spp., *Enterococcus faecalis* e *Enterococus faecium*; e algumas espécies do *Streptococcus*, *como Streptococcus uberis* e o *Streptococcus dysgalactiae* (RADOSTITS et al., 2002).

A fonte de infecção é o ambiente da vaca, sendo que o principal meio de transmissão é do ambiente para a vaca pelo manejo inadequado do mesmo. Exemplos disso são as camas úmidas, água contaminada, áreas sujas de fezes destinadas à permanência dos animais, ordenha de úberes molhados, higiene inadequada dos tetos, entre outros. Os patógenos ambientais, descritos como invasores oportunistas da glândula mamária, não estão adaptados à sobrevivência no hospedeiro e, por isso, normalmente, desencadeiam infecções clínicas hiperagudas graves (BRADLEY 2002; RADOSTITS et al., 2002)

Esses alguns microrganismos, denominados oportunistas estão inseridos na classe das infecções ambiental. Estão incluídas, nesse grupo, as espécies de bactérias *Nocardia sp*., *Pseudomonas aeruginosa*, *Arcanobacterium pyogenes*, algas do gênero *Prototheca* e várias espécies de leveduras. Esses microrganismos, geralmente, causam mastite clínica e são de difícil tratamento (BRESSAN, 2000). Mas segundo alguns trabalhos, a infecção por *Prototheca zopfii*, pode desenvolver um quadro subclínico da mastite, que se caracteriza apenas pela baixa produção de leite e contagem de células somáticas elevadas (YAMAMURA et al., 2008).

Em geral, microrganismos ambientais determinam casos clínicos hiperagudos de evolução rápida, com maior concentração no pós-parto e maior taxa de infecção durante os períodos chuvosos. O autor comenta que a transmissão dos microrganismos patogênicos na mastite ambiental se faz diretamente do ambiente para o interior da glândula mamária, ocorrendo, principalmente, entre as ordenhas (UFLA, 2012).

1.5 FATORES DE RISCO

Os fatores predisponentes ou de risco devem ser analisados com cautela, visto que se estima que práticas erradas de ordenha possam contribuir com mais de 70% dos casos de mastite (VEIGA et al., 1994).

Estudos epidemiológicos prévios sobre fatores de risco identificaram características relacionadas ao animal, ao ambiente, aos procedimentos de manejo e ao equipamento de ordenha, associadas à mastite bovina e à variação da CCS (PEELER et al., 2000).

Coentrão et al. (2008) observaram que o único fator de risco associado às características individuais da vaca foi a profundidade do úbere, onde animais com a base do úbere abaixo ou junto ao jarrete apresentaram 1,73 vezes mais chances de terem a CCS acima de 200.000 células/ml. Provavelmente, isso ocorre pelo aumento da exposição das extremidades dos tetos aos microrganismos ambientais. Peeler et al. (2000) identificaram fatores de risco para mastite subclínica e clínica associados com o aumento do número de parições, início e final de lactação, escape de leite pelos tetos observado durante a ordenha e alta produção de leite. Veiga et al. (1994) ressaltam outros fatores predisponentes como idade das vacas; a presença de doenças como brucelose, tuberculose, dentre outras; e presença de feridas no úbere e tetos.

Segundo Radostits et al. (2002) a morfologia do úbere e das tetas podem predispor à mastite. Por exemplo, em seu estudo observaram que o diâmetro do canal da teta e o extravasamento do leite estão associados à alta contagem de células somáticas e ocorrência de mastite. A altura do úbere; a presença de edema perinatal; e uma pequena distância entre a extremidade da teta e o solo, podendo estar associada a uma maior incidência de lesões na teta, também configuram fatores de risco de grande importância para a enfermidade.

As condições físicas das tetas também devem ser levadas em conta, visto que a extremidade da teta é a primeira barreira contra os patógenos invasores, e a eficiência da defesa depende da integridade do tecido. A espessura da teta também é um parâmetro que deve ser avaliado, visto que a ordenha pode induzir ao aumento ou diminuição da espessura desta teta após o procedimento, e o autor revela que um aumento superior a 5% é significativamente associado à presença e ao aparecimento de infecções intramamárias (RADOSTITS et al., 2002).

Os fatores de risco relacionados ao equipamento de ordenha, segundo Coentrão et al. (2008), foram existência de rachaduras nas partes de borracha do equipamento, estado inadequado das teteiras e deficiência na limpeza dos pulsadores. O segundo maior risco identificado foi a inexistência de programas de treinamento dos ordenhadores para a realização

da ordenha. Veiga et al. (1994) estimam que práticas erradas de ordenha possam contribuir com mais de 70% dos casos de mastite.

Em seu trabalho Coentrão et al. (2008), identificaram que os fatores de risco associados ao manejo foram a imersão do conjunto de teteiras em solução desinfetante entre as ordenhas, devido ao fato da matéria orgânica residual como leite e sujidades, ao entrarem em contato com o desinfetante, neutralizar o princípio ativo do mesmo; e a inserção total da cânula da bisnaga de antibiótico como via de aplicação intramamária, visto que a inserção total da cânula pode aumentar o canal do lúmen, levando à maior penetração de bactérias, além de contribuir para que as bactérias presentes no canal do teto sejam introduzidas na cisterna da teta. Veiga et al. (1994) e Radostits et al. (2002) relataram como fator de risco a alimentação deficiente em vitamina A, E e selênio, por diminuíram a capacidade defensiva dos epitélios do úbere; presença de leite residual como resultado de ordenha incompleta; e a introdução de animais como mastite crônica no rebanho.

Radostits et al. (2002) relataram outros fatores de risco como a raça, visto que a incidência de mastite é maior na raça holandesa do que no Jérsei; a resistência genética, visto que diversos fatores morfológicos, fisiológicos e imunológicos contribuem para a resistência ou suscetibilidade à mastite; a viabilidade dos patógenos, visto que os agentes causadores de mastite contagiosa são mais susceptíveis à desinfecção; e os fatores de virulência do patógeno como, capacidade de colonização e produção de toxinas.

Vacas leiteiras são descartadas por uma infinidade de razões. Entretanto, as causas predominantes para descarte são baixa produção, problemas reprodutivos e mastite e/ou problemas de úbere (ALLAIRE; STERWERF; LUDWICK, 1976; BASCOM; YOUNG, 1998). Estas causas totalizam aproximadamente 75% de todos os descartes em uma típica propriedade leiteira (FERREIRA, 2008). Mastite foi à razão primária de descarte para 15% das vacas descartadas no levantamento de Bascom e Young (1998). Este número assume maior importância quando agregamos os descartes por alta contagem de células somáticas (CCS) e os descartes por inadequada conformação de úbere, razões estas intimamente relacionadas à mastite, o que revela que a conformação do úbere pode ser um importante fator de risco, devendo esta característica receber mais atenção durante a seleção dos animais para a formação do rebanho (FERREIRA, 2008).

1.6 DIAGNÓSTICO

A detecção de casos de mastite é fundamental, e é necessário que tanto produtor quanto ordenhadores definam corretamente o que é a mastite, que se caracteriza por alterações nas características do leite e sistêmicas nos casos clínicos, e que o leite se apresenta normal visivelmente em casos subclínicos, entretanto, com aumento de CCS/ mL de leite ao exame complementar (LANGONI, 2013).

Portanto, existem vários métodos que podem ser utilizados no diagnóstico de mastites em geral. A detecção da mastite clínica é possível por meio da palpação da glândula mamária e da observação do aspecto do leite, sendo este último por meio do uso da caneca de fundo telado ou caneca de fundo preto. Já na mastite subclínica, são necessários testes auxiliares, tais como Contagem de Células Somáticas (CCS), California Mastite Teste (CMT) e Wisconsin Mastite Teste (WMT) (UFLA, 2012).

1.6.1 Contagem de Células Somáticas

As células de defesa, geralmente leucócitos, são aquelas que migram da corrente sanguínea para os alvéolos, em resposta a uma reação inflamatória, quando a glândula mamária sofre algum tipo de agressão, como uma infecção por alguns patógenos (SANTOS, 2001). Dessa forma, como ocorre aumento da quantidade de células somáticas no leite na medida em que a infecção progride, a CCS no leite é um excelente parâmetro de monitoramento de mastite no rebanho (BRESSAN, 2000).

A contagem de células somáticas no leite é uma ferramenta importante no diagnóstico da mastite subclínica, sendo aceita internacionalmente como medida padrão para determinar a qualidade do leite cru e, logo, para monitorar a sanidade da glândula mamária (LANGONI et al., 2011).

Obtém-se do leite produzido por uma glândula mamária bovina saudável uma contagem de células somáticas inferior a 50.000 células/mL de leite, já vacas com CCS superiores a 200.000 células/ml de leite são consideradas como mastite subclínica. A CCS poderá ser realizada a partir de amostras de leite retiradas diretamente do tanque ou por amostragem individual e enviadas a um laboratório (LANGONI, 2013; UFLA, 2012). Vale ressaltar que não é possível, pela contagem das células somáticas do leite do tanque de resfriamento, determinar quantos animais estão cursando a enfermidade, mas é possível estimar razoavelmente, o número

de tetos acometidos. Por exemplo, se contagem for de 200.000 células/ml de leite, estima-se que há 6% de quartos no rebanho (RADOSTITS et al., 2002).

1.6.2 Califórnia Mastite Teste

O CMT foi o primeiro teste indireto desenvolvido, sendo um teste prático, popular e de baixo custo. Os resultados são imediatos e eficientes. Para realizá-lo deve-se misturar o leite com o reagente em nas proporções adequadas em um reservatório branco, este reagente rompe as membranas das células somáticas presentes na amostra, liberando o DNA que, em contato com a água, se hidrata e torna-se viscoso. O resultado é lido e classificado como negativo, traço ou reações dos tipos 1 (+) fracamente positivo, 2 (++) positivo ou 3 (+++) fortemente positivo, conforme a quantidade de gel formada (RADOSTITS et al., 2002; RIBEIRO et al., 2003).

De acordo com Santos (2001), o teste de CMT também detecta alterações de pH do leite. No caso de mastite, o leite se torna alcalino e, ao entrar em contato com o reagente, apresenta coloração púrpura intensa.

1.6.3 Wisconsin Mastite Teste

O WMT é o resultado do aprimoramento do CMT, tendo a finalidade de eliminar a subjetividade da interpretação dos resultados deste teste. É realizado em tubo graduado, ao qual se adicionam quantidades exatas de leite e do reagente utilizado no CMT, porém este deve ser diluído em água destilada. Deve-se diluir o reagente em água destilada 1:1, utilizando-se dois mL desse e dois mL da amostra do leite (LANGONI, 2000).

1.6.4 Caneca de Fundo Escuro ou Telada

A fase inicial da mastite clínica pode ser facilmente diagnosticada utilizando-se o teste da caneca de fundo escuro ou caneca telada, antes de cada ordenha. Utilizam-se os primeiros jatos de leite, de cada teto, e depois são observados para detectar possíveis alterações de cor, consistência ou presença de pus, grumos ou sangue (CAMPOS; LIZIEIRE, 1993).

1.6.5 Outros métodos diagnósticos

Nas vacas com mastite clínica, também podem ser realizados a cultura do leite o teste de sensibilidade antimicrobiana (antibiograma) (RADOSTITS et al., 2002).

A pesquisa do teor de cloretos e da condutividade elétrica do leite são métodos que podem ser utilizados como auxiliares no diagnóstico da mastite subclínica. O íon cloreto está presente na circulação sanguínea e, durante os processos inflamatórios, atravessa os capilares sanguíneos e direciona-se ao lúmen dos alvéolos da glândula mamária, devido ao aumento da permeabilidade. Quando um animal é acometido pela doença, a concentração de potássio no leite diminui, enquanto as concentrações dos íons sódio e cloreto elevam-se (NIELEN et al., 1992).

1.7 CONTROLE E PREVENÇÃO

Há motivos mais que suficientes para se preocupar com a ocorrência de mastites em propriedades leiteiras, visto que a presença desta enfermidade no rebanho, leva à diminuição da produção, menor rendimento na produção de derivados lácteos, diminuição do tempo de prateleira dos produtos, custos com medicamentos, honorários profissionais, descarte do leite durante o tratamento e período de carência, possibilidade de perda de tetos e muitas vezes da vaca. Além de todos esses pontos levantados, tem que se considerarem os aspectos de saúde pública, pois muitos patógenos causadores de mastites oferecem riscos ao consumidor de leite e derivados (LANGONI, 2013).

Por isto é de suma importância que as propriedades produtoras de leite adotem um programa de controle de mastite, com o intuito de diminuir a duração das infecções e evitar a ocorrência de novas infecções (LARANJA; MACHADO, 1994).

Para isso, segundo Laranja e Machado (1994) e Radostits et al. (2002), o National Institute for Research in Dairying, estabeleceram o Programa dos Cinco Pontos, e envolve as seguintes práticas:

a) Utilização correta de um equipamento de ordenha em bom funcionamento;

b) Bom manejo da ordenha com ênfase na desinfecção dos tetos pré e pós-ordenha;

c) Tratamento imediato de todos os casos de mastite clínica;

d) Tratamento de todas as vacas durante o período seco;

e) Descarte de vacas com mastite.

Segundo Radostits et al. (2002), este programa de cinco pontos vem sendo altamente bem sucedido no controle da mastite contagiosa, mas não é suficiente para evitar a mastite ambiental. Pensando nisso, cinco práticas de manejo adicionais, foram recomendadas, particularmente para o melhor controle da mastite ambiental e monitoramento do rebanho, com isso formou-se um plano de 10 pontos, sendo os demais:

f) Manutenção de um ambiente adequado;

g) Bom sistema de registro de dados;

h) Monitorização do estado de saúde do úbere;

i) Revisão periódica do manejo sanitário do úbere;

j) Determinação de metas para o estado sanitário do úbere.

Rupp, Beaudeau e Boichard (2000) afirmaram que o primeiro passo do programa é verificar o status de mastite dentro do rebanho antes de realizar qualquer alteração do manejo, e ressaltaram também que um dos pontos mais importantes no controle da mastite é a conscientização dos produtores das perdas econômicas e a educação sanitária dos tratadores e ordenhadores.

2 REFERÊNCIAS

ALLAIRE, F. R.; STERWERF, H. E.; LUDWICK, T. M. Variations in Removal Reasons and Culling Rates with Age for Dairy Females. **Journal of Dairy Science**, v. 60, n. 2, 1976.

BASCOM, S. S.; YOUNG, A. J. A Summary of the Reasons Why Farmers Cull Cow. **Journal of Dairy Science**, v. 81, n. 8, 1998.

BRADLEY, A. J. Bovine Mastitis: An Evolving Disease. **Veterinary Journal**, Les Ulis, v. 164, n. 2, p. 116-128, 2002.

BRESSAN, M. **Práticas de manejo sanitário em bovinos de leite**. Juiz de Fora: Embrapa Gado de Corte, 2000.

BURVENICH, C. et al. Severity of E. coli mastitis is mainly determined by cow factors. **Veterinary Research**, v. 35, n. 2, p. 521-564, 2003.

CAMPOS, O. F.; LIZIEIRE, R. S. **O produtor pergunta, a Embrapa responde**. Coronel Pacheco: Embrapa Gado de Leite, 1993.

COENTRÃO, C. M. et al. Fatores de risco para mastite subclínica em vacas leiteiras. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Niterói, v. 60, n. 2, p. 284, 2008.

DIAS, R. V. da C. Principais métodos de diagnóstico e controle da mastite bovina. **Acta Veterinária Brasílica**, v. 1, n. 1, p. 23-27, 2007.

DYCE, K. M.; SACK, W. O.; WENSING, C. J. G. O úbere dos ruminantes. In:_____. **Tratado de anatomia veterinária**. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogans, 1997. p. 542-629.

GONÇALVES, L. A. et al. Primeiro relato no Brasil de mastite necrótica bovina por *Clostridium perfringens* tipo A. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 36, n. 4, p. 1331-1333, 2006.

FERREIRA, D. F. **Identificação das principais causas de descarte e de morte em vacas leiteiras na região de Arapoti, Paraná.** Relatório apresentado por ocasião da conclusão das atividades de Iniciação Científica - Edital 2007-2008, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2008.

LANGONI, H. Tendências de modernização do setor lácteo: monitoramento da qualidade do leite pela contagem de células. **Revista de Educação Continuada em Medicina Veterinária e Zootecnia**, São Paulo, v. 3, n. 3, p. 57 - 64, 2000.

LANGONI, H. et al. Aspectos microbiológicos e de qualidade do leite. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 31, n. 12, p. 1059-1065, 2011.

_____. Qualidade do leite: utopia sem um programa sério de monitoramento da ocorrência de mastite bovina. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 33, n. 5, p. 620-626, 2013.

LARANJA, L. F.; MACHADO, P. F. Avaliação da efetividade de um programa de controle de mastite bovina em fazendas produtoras de leite b do estado de são paulo. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 51, n. 2, p. 569-577, 1994.

LIBONI, M. **Fatores que influenciam o desenvolvimento da glândula mamária nos bovinos de leite.** São Paulo: MilkPoint, 2003**.** Disponível em: <http://www.milkpoint.com.br/radar-tecnico/sistemas-de-producao/fatores-que-influenciam-o-desenvolvimento-da-glandula-mamaria-nos-bovinos-de-leite-16819n.aspx>. Acesso em: 17 nov. 2014.

MORAES, I. A. **Glândulas mamárias**. Niterói: UFF, 2014. Disponível em: <http://www.uff.br/fisiovet/Conteudos/glandula_mamaria.htm>. Acesso em: 17 nov. 2014.

NIELEN, M. et al. Electrical Conductivity of Milk: Measurement, Modifiers, and Meta Analysis of Mastitis Detection Performance. **Journal of Daily Science**, v. 75, n. 2, p. 606-614, 1992.

OLIVEIRA, C. M. et al. Prevalência e etiologia da mastite bovina na bacia leiteira de Rondon do Pará, estado do Pará. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 31, n. 2, p. 104-110, 2011.

OLIVEIRA, J. M. B. et al. Fatores de risco associados à mastite bovina na microrregião Garanhuns, Pernambuco. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 32, n. 5, p. 391-395, 2012.

OLIVEIRA, M. C. de S. Doenças infecciosas em sistemas de produção de leite. **Embrapa Pecuária Sudeste**, São Carlos, n. 50, 2006.

PEELER, E. J. et al. Risk Factors Associated with Clinical Mastitis in Low Somatic Cell Count British Dairy Herds. **Journal of Dairy Science**, v. 83, n. 11, 2000.

PEREIRA NETO, Octaviano Alves. **Fundamentos da mastite bovina e seus impactos na produção**. São Paulo: MilkPoint, 2010. Disponível em: <http://www.milkpoint.com.br/anuncie/novidades-dos-parceiros/fundamentos-da-mastite-bovina-e-seus-impactos-na-producao-65933n.aspx>. Acesso em: 15 maio 2014.

RADOSTITS, O. M. et al. Mastite. In:_____. **Clínica veterinária**: um tratado de doenças dos bovinos, ovinos, caprinos e equinos. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002. p. 541-629.

RIBEIRO, M. et al. Relação entre mastite clínica, subclínica, infecciosa e não infecciosa em unidades de produção leiteiras na região sul do Rio Grande do Sul**. Revista Brasileira de Agrociência**, v. 9, n. 3, p. 287-290, 2003.

RUPP, R.; BEAUDEAU, F.; BOICHARD, D. Relationship between milk somatic-cell counts in the first lactation and clinical mastitis occurrence in the second lactation of French Holstein cows. **Preventive Veterinay Medicine**, v. 46, n. 2, p. 99-111, 2000.

SANTOS, M. C. **Curso sobre manejo de ordenha e qualidade do leite**. Vila Velha: UVV, 2001.

TEODORO, R. L. et al. Estudo de Características do Sistema Mamário e suas Relações com a Produção de Leite em Vacas da Raça Gir. **Revista brasileira de zootecnia**, v. 29, n. 1, p. 131-132, 2000.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE LAVRAS. **Mastite bovina**: controle e prevenção. Lavras: UFLA, 2012, 27 p.

VEIGA, V. M. O. et al. Controle da mamite dos bovinos. In: FURLONG, J. **Manejo sanitário, prevenção e controle de parasitoses e mamite em rebanhos de leite**. Coronel Pacheco: Embrapa, 1994. p. 8-20.

YAMAMURA, A. A. M. et al. Fatores de risco associados à mastite bovina causada por *Prototheca zopfii*. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 38, n. 3, p. 755-760, 2008.

ZAFALON, L. F. et al. Comportamento da condutividade elétrica e do conteúdo de cloretos do leite como métodos auxiliares de diagnóstico na mastite subclínica bovina. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 25, n. 3, p. 159-163, 2005.

Capítulo

19

Excipientes para medicamentos anti-helmínticos destinados a uso de ruminantes

Marcelle Temporim Novaes[1]
Vagner Tebaldi de Queiroz[2]
Adilson Vidal Costa[3]

1 INTRODUÇÃO

Excipiente é qualquer substância que dá consistência adequada ou forma ao medicamento, é farmacologicamente inerte, utilizada também para assegurar a estabilidade química, física, microbiológica e organoléptica ao produto, melhorar a aceitabilidade do paciente e, além disso, promover atributo relacionado à segurança e efetividade do medicamento (FERREIRA, 2010; VILLANOVA et al., 2012). Exercem também outras funções como a de diluente, preenchedor e solvente, assumindo assim a função de veículo para uma determinada via de administração ou até mesmo como transportador de ingrediente ativo ao local de absorção desejado (FERREIRA, 2010).

Os excipientes devem ser destituídos de atividade farmacológica, porém na prática não são, sendo responsáveis por inúmeras reações adversas, um problema que não está sendo abordado de forma adequada nos momentos das avaliações de casos como a de reações adversas

[1] Universidade Federal do Espírito Santo, email: marcelle_temporim@hotmail;
[2] Universidade Federal do Espírito Santo, email: vagnertq@gmail.com;
[3] Universidade Federal do Espírito Santo, email: avcosta@hotmail.com.

aos medicamentos, este fato e a ausência de estudos nesta área, justificam a necessidade de se conhecer os excipientes utilizados nas formulações (NAPKE, 2004; SILVA et al., 2008).

Os excipientes podem interagir com o fármaco e com outros medicamentos, e essas interações podem ser físicas ou químicas (PIFFERI; RESTANI, 2003).

Efeitos adversos relacionados aos excipientes são relatados desde 1930, e permanecem até os dias atuais visto que a Resolução da Diretoria Colegiada nº 47 de 2009 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), preconiza que a bula do medicamento deve informar apenas a concentração do fármaco sendo os excipientes apresentados de forma qualitativa. Neste capítulo será discutida a origem, as funções nas formulações bem como os principais problemas enfrentados ao se utilizar um excipiente.

2 MANIPULAÇÃO DE PRODUTOS VETERINÁRIOS

A legislação do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) de 1969 dispõe sobre a fiscalização de produtos de uso veterinário nos estabelecimentos que os fabriquem em todo território nacional, obrigando a fiscalização nos estabelecimentos que manipulam produtos veterinários, os quais precisam de registro no MAPA (BRASIL, 1969). Sendo assim os estabelecimentos devem apresentar instalações e equipamentos adequados que atendam as Boas Práticas de Fabricação (BPF) exigidas pelo MAPA, além de possuir controle de qualidade e biossegurança e normas de higiene e segurança no trabalho. Além disso, é necessário a presença de um responsável técnico podendo ser um médico veterinário ou um farmacêutico (BRASIL, 2004).

O medicamento veterinário pode ser produzido nas mesmas instalações em que o medicamento para humanos é produzido, desde que o produto veterinário contenha os mesmos insumos utilizados para uso humano. Caso contrário, as instalações devem ser separadas e específicas para cada uso, para que não ocorra nenhum tipo de contaminação (ANVISA; MAPA, 2012).

Para ocorrer a comercialização dos produtos veterinários, o decreto 5.053, 22 de abril de 2004 estabelece requisitos quanto a obrigatoriedade de prescrição do médico veterinário para comercialização do produto (BRASIL, 2004). A manipulação de produtos veterinários se torna importante devido a limitação de fórmulas disponíveis no mercado para animais, o que faz com que os médicos veterinários prescrevam em grande parte dos casos, medicamentos humanos para este propósito (BARBOSA, 2010). Diante disto, recorrer a fórmula magistral é uma boa

alternativa, uma vez que a produção do produto será personalizada para cada espécie animal e não haverá desperdício do medicamento.

3 EXCIPIENTES

3.1 ORIGEM

Os fármacos precisam ser transformados numa forma farmacêutica final para que ocorra a adesão do animal ao medicamento, a consistência da dose, de forma a melhorar o aspecto final da formulação. No mercado existem diversas formulações de excipientes, mas ainda existe a necessidade de que sejam formulados novos excipientes devido aos novos medicamentos que são lançados no mercado (ABRANTES, 2015).

Os excipientes podem ser de origem animal (lactose, gelatina, ácido esteárico), mineral (fosfato de cálcio, sílica) ou de síntese (polissorbatos, povidona, polietilenoglicóis) (FERREIRA, 2010).

Ao compararmos as substâncias novas que foram lançados no mercado com as já existentes, observa-se que houve uma melhora nas propriedades físicas, químicas e mecânicas resolvendo problemas já existentes como a fluidez, compressibilidade, higroscopicidade, dissolução e desagregação (ABRANTES, 2015).

3.2 FUNÇÕES NAS FORMULAÇÕES

Os excipientes são substâncias auxiliares envolvidas na composição de diversas formulações farmacêuticas, são inseridos à formulação com o objetivo de facilitar sua preparação viabilizando o sucesso da forma farmacêutica final, garantindo a aceitabilidade por parte do usuário do produto e a segurança do funcionamento da formulação. São classificados de acordo com a função que irão desempenhar na formulação, os mais significativos são os tensoativos e os agentes doadores de viscosidade, como as macromoléculas (RAMOS; MORAIS, 2013; SCHIMITT, 2015).

Na escolha de um excipiente farmacêutico na manipulação é importante ressaltar o tipo de estabilidade e os fatores genéricos que afetam a forma farmacêutica, além de escolher um excipiente que não tenha interação com a formulação (ALLEN JUNIOR; ANSEL; POPOVICH, 2007). Foi relatado, na literatura, casos de diferentes formulações de cápsulas e

comprimidos que tiveram diferenças de biodisponibilidade por impedir o efeito farmacológico (FERREIRA, 2000).

Os excipientes de medicamentos de uso interno podem ser: conservantes, corantes, flavorizantes, edulcorantes, espessantes, emulsificantes, estabilizantes ou antioxidantes, que irão prevenir os medicamentos da degradação dos microrganismos e torná-los mais palatáveis (BALBANI; STELZER; MONTOVANI, 2006).

Os excipientes que estão em formulações semissólidas assumem a função de base carregadora de ativos, auxiliam durante a fabricação, administração e absorção, sendo destituídos de atividade farmacológica (CROWLEY; MARTINI, 2001).

Alguns destes excipientes são glicerídeos, ceras, hidrocarbonetos, silicones polioxietilenoglicóis e homólogos, géis de produtos minerais, bentonita e silício, géis de polímeros orgânicos, alginatos, gelose, pectina, metilcelulose e carboximetilcelulose sódica, amido (STORPIRTIS et al., 2011).

Os excipientes destinados para formas farmacêuticas de sólidos podem ser divididos em: diluentes, absorventes, aglutinantes, desagregantes, lubrificantes, molhantes, corantes, tampões, aromatizantes e edulcorantes (PRISTA et al., 2003).

Os excipientes que são utilizados para aplicações veterinárias por via injetável e “pour-on” não são informados pelas indústrias que os comercializam. A exemplo são as formulações contendo sulfóxido de albendazol (Ricobendazole 10®) via subcutânea, o cloridrato de levamisol (Ripercol®) via subcutânea ou intramuscular, ivermectina (Ivomec® (via injetável e oral) e Genesis (“pour on”)). Abaixo encontram-se listados alguns exemplos de excipientes e suas funções nas formulações:

a) Diluente: É definido como um material inerte que é adicionado a formulação para facilitar sua manipulação. Possui diferentes naturezas (solúvel, insolúvel e mista). Os mais comuns são: lactose, amido, manitol, celulose microcristalina, óxido de magnésio, Caulim (FERREIRA, 2010).

b) Absorventes: São substâncias que tem a finalidade de absorver a água ou, às vezes, incorporar substâncias higroscópicas, evitando que a umidade provoque alterações na formulação (PRISTA, 2002).

c) Aglutinante: É usado para promover adesão das partículas durante a granulação e compressão de formas farmacêuticas sólidas, além de diminuir a força da máquina utilizada (PRISTA, 2002).

d) Desagregantes: São utilizados para acelerar a desagregação dos comprimidos na água ou nos líquidos do organismo (RAMOS; MORAIS, 2013).

e) Lubrificantes: Os agentes lubrificantes estearato de magnésio e talco reduzem a adesão entre os pós e as partes metálicas (FERREIRA, 2010).

f) Molhantes: Os agentes molhantes lauril sulfato de sódio, docusato sódico e polissorbatos fazem com que a água penetre nas partículas sólidas, favorecendo a desintegração e a dissolução de fármacos que são poucos solúveis (FERREIRA, 2010).

g) Tampões: São utilizados para manter o pH de uma determinada solução estável. Os mais comuns são: carbonato de cálcio, citrato, fosfato, acetato, borato (PRISTA, 2002).

h) Corantes: São utilizados para melhorar a aparência do medicamento, podem ser orgânicos sintéticos, orgânicos naturais e substâncias minerais (ARAUJO; BORIN, 2010).

i) Edulcorantes: São substâncias doces utilizadas nos medicamentos que auxiliam na correção do gosto da preparação (sacarina, aspartamo, ciclamatos de sódio e de cálcio) (PRISTA, 2002).

j) Aromatizantes: São utilizados para aromatizar as formulações, podendo se apresentar na forma de líquido ou pulverulenta (essência de limão, laranja, morango) (RAMOS; MORAIS, 2013).

4 PRINCIPAIS VIAS DE ADMINISTRAÇÃO UTILIZADA EM MEDICAMENTOS ANTI-HELMÍNTICOS PARA RUMINANTES

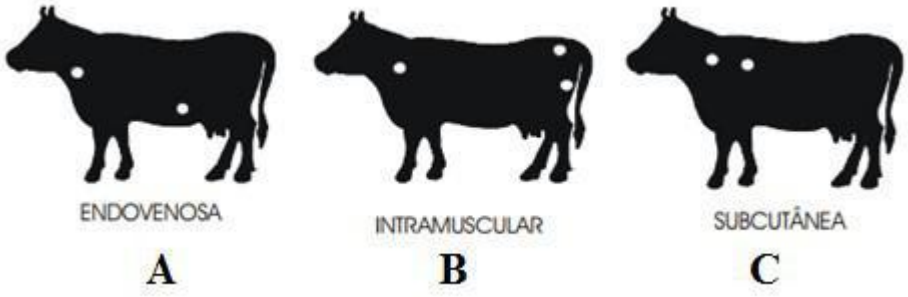
Os excipientes são empregados em diversas formulações anti-helmínticas para ruminantes, como: cápsulas, comprimidos, géis, suspensões, injetáveis, sendo a via de administração mais comum para anti-helmínticos a via oral. A via de administração do medicamento que será aplicada em bovinos vai depender da rapidez com que se deseja a ação da droga, sua natureza, ao tipo de efeito (sistêmico ou localizado) que se deseja e a condição do animal.

Existem diversas formulações que a indústria farmacêutica fornece para aplicações de medicamentos anti-helmínticos, entre elas, a via oral (suspensão, gel e comprimido), a via injetável (intravenosa, intramuscular, subcutânea) e a via tópica conhecida como “pour-on” que tem aplicação no dorso do animal (da parte do cupim até o rabo) (AGROLINE®, 2016; LUQUETTI et al., 2013).

A via oral é a via mais comum de prescrição de um medicamento, além de ser mais segura e econômica e ter a possibilidade de ser acrescentada na ração, mas possui uso restrito a medicamentos com ação no rúmen como os anti-helmínticos (CENTRO DE PRODUÇÕES TÉCNICAS E EDITORA LTDA - CPT, 2016). A via endovenosa é a que irá proporcionar ação

mais rápida do medicamento por ser aplicada diretamente na corrente sanguínea, a mais utilizada em bovinos é a veia jugular (pescoço) ou a mamária (barriga) (FIGURA 1A) e quando o animal está desidratado, utiliza-se a veia safena (FUNDAÇÃO CECIERJ, 2016).

Figura 1- Principais vias de administração em ruminantes: A – Via intravenosa (pescoço e mamária). B - Regiões onde são aplicados a injeção intramuscular. C - Região da paleta onde é aplicada a injeção subcutânea.



Fonte: Embrapa (2016).

A injeção intramuscular é aplicada diretamente no músculo com agulhas de calibre grosso. Neste caso, deve-se tomar cuidado para que a agulha não ultrapasse o músculo do animal. As regiões mais utilizadas são os músculos da coxa, ou da tábua do pescoço e na parte detrás da coxa (FIGURA 1B) (CPT, 2016; EMBRAPA, 2016).

A injeção subcutânea é dada debaixo da pele e pode ser aplicada em qualquer região do corpo, sendo a região conhecida por paleta (FIGURA 1C) a mais segura de ser aplicada recomendando-se dobrar a pele para a agulha entrar com mais facilidade (EMBRAPA, 2016).

5 PRINCIPAIS PROBLEMAS ENFRENTADOS COM OS EXCIPIENTES

Os excipientes que são utilizados nas formulações podem ser adicionados em baixas (agentes estabilizantes) ou altas concentrações (agentes diluentes). Mesmo em pequenas concentrações vem ocorrendo casos de toxicidade direta, imunotoxicidade, alergia ou reações metabólicas indesejáveis, além de incompatibilidade na formulação (CROWLEY, 1999).

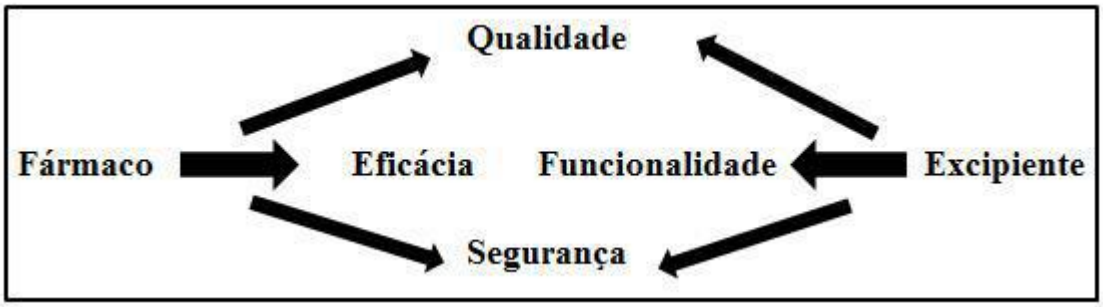
Existem relatos na literatura da relação entre excipientes e reação adversa, diante disto foram identificadas algumas substâncias que trazem riscos para a saúde humana, entre eles, álcool benzílico, lactose, amarelo de tartarazina, sulfitos, sorbitol, cloreto de benzalcônio, benzoato de sódio, metilparabeno, propilparabeno e bissulfito de sódio (PESSANHA et al., 2012; SILVA et al., 2008). Estes riscos foram relatados inicialmente para humanos e, apresentam grande probabilidade de ocorrer em qualquer espécie animal.

Um exemplo de que os componentes dos excipientes podem afetar a segurança dos medicamentos, é a tragédia ocorrida em 1937 nos Estados Unidos. Neste episódio mais de 100 pessoas, incluindo crianças, vieram a óbito devido à exposição de uma grande quantidade de dietilenoglicol que é um solvente utilizado para produzir xarope de sulfanilamida (SENA et al., 2014).

Para tentar controlar casos de alergias em relação aos excipientes, pode-se formular um medicamento sem o excipiente ao qual o paciente é suscetível a efeitos adversos. Este fato deve ser levado em conta na hora em que for prescrito o medicamento. Caso a formulação não esteja disponível no mercado, pode-se recorrer à farmácia de manipulação (TONAZIO; VILELA; JESUS, 2011; URSINO et al., 2011).

A figura 2 mostra que a qualidade dos medicamentos depende dos princípios ativos, dos processos empregados e, principalmente, do desempenho dos excipientes. Escolher um excipiente adequado para um tipo de formulação deve ser baseado nas características dos princípios ativos contidas nas formas farmacêuticas e na possibilidade de interação destas substâncias com os excipientes (FERREIRA; VILLANOVA, 2006; PESSANHA et al., 2012).

Figura 2 – Principais requisitos para um excipiente.



Fonte: Pifferi e Restani (2003).

Os excipientes conseguem exercer influência na biodisponibilidade dos fármacos que são incorporados em formas farmacêuticas de uso oral sólida. A natureza e o tipo de excipiente utilizada na preparação de sólidos de uso oral são dois fatores que determinam a velocidade e a extensão na qual o fármaco vai ser absorvido, pois limitam a liberação e a dissolução do princípio ativo (VILLANOVA; SÁ, 2009).

Quando ocorre alguma alteração no processo produtivo, como uma mudança em uma mistura de excipientes, pode-se ter como resultado final a biodisponibilidade do princípio ativo diferente da esperada que venha a atingir níveis considerados tóxicos (GOLIGHTLY et al., 1998).

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os excipientes são substâncias auxiliares que tem a finalidade de favorecer a manipulação do medicamento, além de garantir maior estabilidade e adesão do animal ao tratamento, tendo que ser farmacologicamente inerte. Entretanto, observa-se que os excipientes, em geral, não são inertes podendo ocorrer casos de intoxicações e reações adversas. Utilizar excipiente é de extrema importância, pois além das funções de conservante ou antioxidante, pode ser empregado para fins estéticos no caso de produtos cosméticos. Por serem utilizados pela indústria farmacêutica em nível mundial, cabe as agências reguladoras fiscalizarem a origem e o uso correto dos excipientes, para que não ocorram possíveis falhas no processo de fabricação do medicamento. Isto se faz necessário uma vez que grande parte dos excipientes não é citada detalhadamente nas bulas dos medicamentos, apesar de serem mostrados para a ANVISA quando forem se registrar.

No Brasil a ANVISA é responsável pelo registro do medicamento. Neste processo as empresas de interesse devem apresentar a composição química exata da formulação. Embora os medicamentos comercializados tenham a certificação da ANVISA, a legislação não obriga o detalhamento do excipiente, o que faz com que os pacientes apresentem alergia a uma determinada substância que não está expressa na bula do medicamento.

7 REFERÊNCIAS

ABRANTES, C. F. G. **Seguranças dos excipientes utilizados pela indústria farmacêutica.** 2015. 121 f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias. Lisboa, 2015.

ALLEN JUNIOR, L. V.; ANSEL, H. C.; POPOVICH, N. G. **Formas farmacêuticas e sistemas de liberação de fármacos**. 8. ed. Porto Alegre: Artmed, 2007.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA - ANVISA; MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO - MAPA (Brasil). **Nota Técnica conjunta**: Necessidade de instalações segregadas para fabricação de medicamentos para uso veterinário e para uso humano. Brasília, DF, 23 abr. 2012. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/aa0a7f804b296c28a760afa337abae9d/Microsof >. Acesso em: 13 set. 2016.

AGROLINE®. **Pour-on**. Disponível em: < http://www.agroline.com.br/categoria/pour-on/42 >. Acesso em: 20 set. 2016.

ARAUJO, A. C. F.; BORIM, M de F. **Influência de excipientes farmacêuticos em reações adversas a medicamentos**. Brasília: Associação Médica de Brasília, 2010.

BALBANI, A. P. S.; STELZER, L. B.; MONTOVANI, J. C. Excipientes de medicamentos e as informações da bula. **Revista Brasileira de Otorrinolaringologia.** São Paulo, v. 72, n. 6, 2006.

BARBOSA, C. **Novas formas farmacêuticas para uso veterinário**. 2010. 62 f. Monografia (Licenciatura em Ciências Farmacêuticas) - Faculdade de Ciências da Saúde - Universidade Fernando Pessoa. Porto, 2010.

BRASIL. Decreto-Lei nº 467, 13 de fevereiro de 1969. **Dispõe sobre a fiscalização de produtos de uso veterinário, dos estabelecimentos que os fabriquem e dá outras providências**. Diário Oficial da União, 14 fev. 1969. Seção 1, p. 1465.

BRASIL. Decreto 5.053, 22 de abril de 2004. **Aprova o Regulamento de Fiscalização de Produtos de Uso Veterinário e dos Estabelecimentos que os Fabriquem ou Comerciem, e dá outras providências**. Diário Oficial da União, 23 abr. 2004. Seção 1, p. 1.

BRASIL. ANVISA. **Estabelece regras para a elaboração, harmonização, atualização, publicação e disponibilização de bulas de medicamentos para pacientes e para profissionais de saúde**. Resolução da Diretoria Colegiada nº 47 de 8 de setembro de 2009.

CENTRO DE PRODUÇÕES TÉCNICAS E EDITORA LTDA - CPT. **Como aplicar medicamentos em bovinos**. Viçosa, Minas Gerais, 2016. Disponível em: < http://www.cpt.com.br/cursos-bovinos-gadodeleite/artigos/como-aplicar-medicamentos-em-bovinos>. Acesso em: 08 set. 2016.

CROWLEY, P. J. Excipients as stabilizers. **Pharmaceutical Science & Technology Today**, v. 2, n. 6, p. 237-243, 1999.

CROWLEY, R.; MARTINI, L. Excipients interactions. **Pharmaceutical Technology.** v. 13. n. 3, p. 26, 2001.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA - EMBRAPA. **Instrução Técnica para o Produtor de Leite**. n. 35. Juiz de Fora, MG. 2016

FERREIRA, A. de O. **Guia Prático de Farmácia Magistral. Boas práticas de manipulação. Farmacotécnica. Aspectos Biofarmacêuticos. Controle de qualidade**. Juiz de Fora: Pharmabooks, 2000, p. 109.

FERREIRA, A. de O. **Guia Prático da Farmácia Magistral**. v. 1-4. São Paulo: Pharmabooks, 2010. p. 736.

FERREIRA, A. O.; VILLANOVA, J. **Excipientes e adjuvantes farmacotécnicos**. São Paulo. 2006. Disponível em: < http://www.acessomagistral.com.br/technosupport/documentos/curso_ excipientes_farmacotecnicos_revisado.doc>. Acesso em: 20 set. 2016.

FUNDAÇÃO Cecierj. **Vias de administração.** Disponível em: <http://extensao.cecierj.edu.br/material_didatico/sau2203/pdfs/aula03.pdf>. Acesso em: 08 set. 2016.

GOLIGHTLY, L. K. et al. Pharmaceutical excipients. Adverse effects associated with inactive ingredients in drug products (Part I). **Medical toxicology and adverse drug experience,** v. 3, n. 2, p. 128-165, 1988.

LUQUETTI, B. C. et al. Eficácia anti-helmíntica da ivermectina sob diferentes vias de administração em bovinos. **Ciências agrárias Saúde**, v. 9, p. 61-66, 2013.

NAPKE, E. A commitment to pharmacovigilance: 40 years on Ed Napke reflects on his life in pharmacovigilance. **Uppsala Reproduktion**, v. 25, p. 1-15, 2004.

PESSANHA, A. F de V. et al. Influência dos excipientes multifuncionais no desempenho dos fármacos em formas farmacêuticas. **Revista Brasileira de Farmácia**, v. 2, n. 92, p. 136-145, 2012.

PIFFERI, G.; RESTANI, P. The safety of pharmaceutical excipients. **Farmaco**, v. 58, n. 8, p. 541-50, 2003.

PRISTA, L. V. N. et al. **Tecnologia farmacêutica.** 6. ed. v. 1. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 2003.

PRISTA, L. N. **Tecnologia farmacêutica.** 6. ed v. 1. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 2002.

RAMOS, G.; MORAIS, D. C. M de. Revisão de Literatura sobre Excipientes em Farmácia de Manipulção. **Foco**, v. 4, n. 5, p. 11-26, 2013.

SCHIMITT, P. de O. **Influência de excipientes farmacêuticos sobre a eficácia de sistemas conservantes.** 2015. 91 f. Dissertação (Mestrado). Universidade Vale do Itajaí. Itajaí. 2015.

SENA, L. C. S. Excipientes farmacêuticos e seus riscos à saúde: uma revisão da literatura. **Revista Brasileira de Farmácia Hospitalar e Serviços de Saúde**, v. 5, n. 4, p. 25-34, 2014.

SILVA, A. V. A de. et al. Presença de excipientes com potencial para indução de reações adversas em medicamentos comercializados no Brasil. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**. v. 44. n. 3, p. 397-405, 2008.

STORPIRTIS, S. et al. **Biofarmacotécnica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2011.

TONAZIO, L.; VILELA, M. M. P.; JESUS, R. R. Reações adversas dos adjuvantes farmacêuticos presentes em medicamentos para uso pediátrico. **HU Revista-UFJF**, v. 37, n. 1, p. 63-68, 2011.

URSINO, M. G. et al. Excipients in me- dicinal products used in gastroenterology as a possible cause of side effects. **Regulatory Toxicology and Pharmacology - Journal**, v. 60, n. 1, p. 93-105, 2011.

VILLANOVA, J. C. O. et al. Síntese e caracterização de *beads* acrílicos preparados por polimerização em suspensão visando aplicação como excipiente farmacêutico para compressão direta. **Química Nova**, v. 35, n. 1, p. 124-131, 2012.

VILLANOVA, J. C. O.; SÁ, V. R. **Excipientes: guia prático para padronização.** Pharmabooks: São Paulo, 2009.

Capítulo

20

Métodos de controle do carrapato *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *microplus*

Nayara Camatta Campos[1]
Vagner Tebaldi de Queiroz[2]
Adilson Vidal Costa[3]

1 INTRODUÇÃO

O Brasil é o líder mundial nas exportações de carne bovina, buscando incessantemente sua autossuficiência em produção de leite. Detém o segundo maior rebanho comercial do mundo, com 212,8 milhões de cabeças, atrás apenas dos Estados Unidos. Com condições de clima, de solo e de áreas muito favoráveis, além do crescente uso de tecnologias em melhoramento, nutrição e sanidade, a pecuária de corte corresponde por cerca de 11% do Produto Interno Bruto (PIB) do agronegócio nacional. Em 2013 produziu em torno de 9,5 milhões de toneladas de carne bovina e exportou mais de 1,5 milhões de toneladas. Ao mesmo tempo, o segmento leiteiro produziu 35 bilhões de litros de leite, o que representa 2,8% do PIB do agronegócio. No *ranking* de produção mundial, o País figura entre os seis maiores

[1] Universidade Federal do Espírito Santo, e-mail: ncamattavet@gmail.com;
[2] Universidade Federal do Espírito Santo, e-mail: vagnertq@gmail.com;
[3] Universidade Federal do Espírito Santo, e-mail: avcosta@hotmail.com.

(INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA - IBGE, 2016; PORTAL BRASIL, 2015; SANTOS, 2016).

O *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *microplus* é um dos ectoparasitas que causam maior prejuízo econômico a bovinocultura. Por ser hematófago pode acarretar ao seu hospedeiro anemia, ocorrendo assim baixa conversão alimentar, desencadeando uma diminuição da produção de leite e carne, além de transmissão de patógenos e predisposição a míiases. No mundo, aproximadamente 75% dos bovinos são parasitadas por carrapatos (CORDOVÉS, 1997). No Brasil, estima-se que os problemas causados por esse parasita podem gerar um prejuízo de até 3.236,35 milhões de dólares por ano (GRISI et al., 2014).

O manejo desse carrapato é um dos maiores entraves de produtores, indústrias de agroquímicos e pesquisadores, devido à resistência aos principais produtos químicos (BARROS-BATTESTI et al., 2006; GONZALES, 1974; GONZALES, 1995).

Atualmente, o controle desse parasita tem sido feito pelo uso de carrapaticidas sintéticos (método convencional), geralmente conduzidos com falta de conhecimento técnico, sem orientação correta e com o manejo inadequado, desde a preparação da solução até o momento da aplicação, comprometendo assim a eficácia do produto, provocando o desenvolvimento de populações de carrapatos resistentes. Isso gera uma busca constante em pesquisas sobre métodos alternativos de controle acaricida, com a finalidade de apresentarem baixo poder residual e baixo custo econômico (FURLONG; MARTINS; PRATA, 2003).

Nesse contexto, objetiva-se com esse capítulo discutir os métodos de controle por carrapaticidas sintéticos (método convencional), a resistência causada por eles e o uso de óleos essenciais como método alternativo no controle do carrapato do boi, *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *microplus*.

2 CARRAPATO DO BOI, *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *microplus*

2.1 TRANSMISSÃO DE PATÓGENOS, DESORDENS METABÓLICAS E PREJUÍZOS ECONÔMICOS

Os carrapatos são provenientes da Índia e se espalharam pelo mundo durante as expedições marítimas, onde se transportavam animais e produtos (GOMES, 1998). Em geral pertencem ao Filo Arthropoda, Classe Arachnida, Ordem Acarina, Família Ixodidae envolvendo as quatro espécies principais *Rhipicephalus sanguineus*, *Amblyomma* sp., *Amblyomma triste* e *R.* (*B.*) *microplus*. Esse último destaca-se por parasitar principalmente os

bovinos e de forma singular, búfalos, ovinos, caprinos, equinos, animais domésticos como cães e gatos e silvestres, bem como o homem (GONZALES, 1974; MONTEIRO, 2011).

Os prejuízos causados pelos carrapatos em seus hospedeiros refletem diretamente na economia do país. As perdas ocorrem em função da ação de irritabilidade pela picada além de inoculação de substâncias estranhas que podem gerar inflamação local, hiperemia, hemorragia, edema e prurido. O desenvolvimento de ferimentos e processos com infecção secundária podem manifestar-se de acordo com a proporção da infestação. Lesões na pele também predispõem ao abrigo de míiases, que mesmo cicatrizadas comprometem estruturalmente o local atingido causando uma desvalorização econômica do couro, particularmente no seu trabalho industrial, afetando sua firmeza e aparentando aspectos indesejáveis. Essa matéria prima é o elemento base para confecções de alguns tipos de vestuários, bolsas, carteiras entre outros (CORDOVÉS, 1997; GOMES, 1998; GONZALES, 1974; GONZALES, 1995).

Os problemas causados por esse parasita, não se restringe ao grau de infestação, mas também, por outros fatores que influenciam na intensidade das patologias adquiridas como a idade, o estresse, a sensibilidade ou resistência ao carrapato, para qual o tipo de serviço o animal é usado, o tipo de alimentação, o estado nutricional e fisiológico (CORDOVÉS, 1997; GONZALES, 1974; GONZALES, 1995).

Esse ectoparasita está envolvido na transmissão de doenças causadas por bactérias, vírus e protozoários. Podem acarretar problemas no crescimento e desenvolvimento dos bovinos, diminuição da produção leiteira e conversão de peso. Além disto, são responsáveis por prejuízos na reprodução, como abortos, esterilidade, prolongamento de gestação e até levando a óbito (BARROS-BATTESTI et al., 2006; GONZALES, 1974).

Uma doença transmitida por *R.* (*B.*) *microplus* é anaplasmose bovina. Essa doença é desenvolvida pela bactéria intracelular *Anaplasma marginale*, podendo causar quadros anêmicos, hipertermia, icterícia, constipação, taquipinéia, sialorréia e depressão (BARROS-BATTESTI et al., 2006).

Os carrapatos também podem transmitir o protozoário da espécie *Babesia bovis* ou *B. bigemina* por via transovariana, as quais infectam as hemácias dos bovinos causando a doença ababesiose. *B. bovis*, passam para os hospedeiros quando os carrapatos estão no estágio de larvas enquanto a *B. bigemina*, em ninfas e adultos. Essa doença pode ocasionar anemia, hemolítica pela ruptura dos eritrócitos, hipertermia, sangue na urina, sendo capaz de até levar a morte. Há casos de aderência das células infectadas em capilares sanguíneos cerebrais causando sintomatologia nervosa. Quando a infecção ocorre de forma concomitante entre *A. Marginale*, *B. bovis* e *B. bigemina* é denominada tristeza parasitária bovina, causando grandes problemas

de anemia e podendo acarretar óbito ao parasitado (BARROS-BATTESTI et al., 2006; CORDOVÉS, 1997; REY, 2001).

A queda na produção de leite pode alcançar valores entre 10 e 15%, dependendo do grau de infestação dos animais (GRISI et al., 2002). Vale ressaltar que outros problemas de manejo influenciam diretamente nesses números, além daqueles causados pelo carrapato (GONZALES, 1995). Segundo Grisi et al. (2014), no ano de 2011 as perdas na produção de leite chegaram a 2.096,28 milhões de litros no Brasil. Em outro estudo, Rodrigues e Leite, (2013) estimaram as perdas na produção de leite por consequência das cargas parasitarias do *R.* (*B.*) *microplus* em Minas Gerais. A análise durou um ano e foi observado aproximadamente de 71 a 123 carrapatos por animal, causando perdas de 6.678 litros no total e 90,24 litros por vaca, sendo uma redução de 2,7% na produção.

Estima-se que anualmente, no Brasil, os prejuízos econômicos na produção pecuária por parasitoses bovinas, sendo as moscas, piolhos, sarnas, mosquitos e carrapatos, sejam em torno de 2.650 bilhões de dólares (BARROS-BATTESTI et al., 2006; GRISI et al.,2014). Somente o carrapato *R.* (*B.*) *microplus*, foi responsável em causar um prejuízo de 3.236,35 milhões de dólares em 2014 (GRISI et al., 2014).

2.2 CONTROLE CONVENCIONAL

No controle convencional são aplicados carrapaticidas sintéticos que são divididos em tópicos (contato) ou sistêmicos (atuação pela circulação sanguínea). Os tópicos são aplicados por meio de pulverização, imersão ou *pour on* e pelo contato com o parasito, penetram pelos orifícios naturais ou mesmo pela cutícula, intoxicando-o e causando a morte do mesmo. São classificados em cinco grupos: 1) organofosforados: foi o primeiro grupo sintético a ser utilizado como carrapaticida sendo utilizado até hoje, na maioria das vezes, em associação com os piretróides, com o intuito de aumentar a potencialidade desses; 2) amidínicos: possuem poder residual maior, sendo uma atuação de forma mais prolongada comparada ao organofosforado, possibilitando assim, aumentar o tempo de espaçamento entre uma aplicação e outra; 3) piretróides sintéticos: substâncias com maior poder residual e menor toxicidade aos seres vivos e ao meio ambiente, tendo como principais representantes dessa classe a deltametrina, cipermetrina e alfametrina; 4) fenilpirazóis: o princípio ativo desse grupo é o fipronil e são aplicados na forma *pour on* e atuam no sistema nervoso do carrapato, levando a paralização. São contraindicados em animais em lactação pelo fato de que o resíduo no leite ser prolongado

e 5) naturalyte: o princípio ativo é o spinosad, oriundo da fermentação de um fungo actinomiceto, sendo permitido em vacas lactantes (FURLONG; PRATA; MARTINS, 2007).

Os carrapaticidas sistêmicos são administrados por pulverização na parte dorsal, *pour on* ou até mesmo de forma intramuscular ou subcutânea. Após serem metabolizados são levados ao corpo do carrapato via circulação levando a intoxicação do mesmo. Os grupos que representam esses carrapaticidas são: 1) lactonas macrocíclicas: além de apresentarem maior poder residual que os piretróides sintéticos, são também eficientes contra vermes e bernes, sendo por isso chamados de "endectocidas" e 2) benzofenilureas: apresentam a capacidade de inibir a produção de quitina, o maior componente da cutícula dos carrapatos. Essas substâncias não permitem que os carrapatos mudem de fase e cresçam, além de impedir que as larvas eclodam dos ovos, controlando a população de carrapatos na pastagem (FURLONG; PRATA; MARTINS, 2007).

Segundo Furlong, Prata e Martins (2007) o uso dos acaricidas não deve se prolongar por mais de seis (6) sucessivas aplicações sendo que a base química deve ser trocada baseado em: 1) escolher o produto com modo de ação diferente ao usado e 2) ser um grupo químico distinto ao empregado. Apesar de ser o aconselhado para diminuir as chances de instalação de resistência, se realizada de forma correta, a falta de conhecimento científico e farmacêutico necessário de alguns proprietários ou até mesmo de vendedores em casas agropecuárias desses produtos, fica difícil optar por qual acaricida escolher para realizar esse controle.

2.3 RESISTÊNCIA ACARICIDA

A definição de resistência dada pela *World Health Organization Scientific Group*, (1965) é quando um organismo mesmo absorvendo e tendo contato com o produto, sendo usado em sua posologia e administração correta, consegue se desintoxicar e permanecer vivo. É importante realizar métodos específicos em laboratório, para se comprovar a real resistência. Testes da sensibilidade *in vitro* de acaricidas tento como resultado, uma inibição de 50 % da postura de ovos viáveis e a morte de 50% das larvas, pode ser considerado algum tipo de resistência (GONZALES, 1974).

A gênese da resistência nesses animais não é muito bem esclarecida. Acredita-se que mesmo como uso de algum acaricida, ainda que de acordo com o protocolo técnico do fabricante, exemplares de carrapatos podem acabar sobrevivendo posteriormente, reproduzindo-se e gerando descendentes possivelmente resistentes as drogas, continuando a sempre selecionar os que conseguem sobreviver. Porém quando a resistência já foi adquirida,

mesmo com o desuso por um tempo, não o devolve a capacidade de matar, sendo assim, inconvertível. Acredita-se que quando em contato com o acaricida o próprio organismo do carrapato desenvolve mecanismos, ações enzimáticas e até mutações genéticas, para a desintoxicação (GONZALES, 1974).

No Brasil não existe um programa nacional de combate dos ectoparasitas, portanto critérios para esse controle são delimitados pelos proprietários, sendo a principal estratégia o uso de acaricidas sintéticos (ANDREOTTI, 2010).

Geralmente o uso desses produtos fica restrito a popularidade comercial, ao custo mais acessível, sendo que muitas vezes, pouco informado na correta posologia e uma aplicação inadequada do carrapaticida, pode promover a seleção de carrapatos mais resistentes e de difícil controle. Outro fator é a utilização de bases acaricidas para outros fins, como o uso de piretroide em pulverizações para o controle da mosca *Haematobia irritans* no gado que se faz com uma dosagem menor do que a acaricida, auxiliando o desenvolvimento de resistência pelos carrapatos (ANDREOTTI, 2010; BARROS-BATTESTI et al., 2006; FURLONG; MARTINS; PRATA, 2003).

Algumas condutas equivocadas para tentar solucionar os problemas dos ectoparasitas são optadas. O aumento da concentração do produto, diminuição no intervalo de uso e ou a associação de um ou mais grupos comerciais, de forma imprudente, pode ser capaz de levar a outros problemas, como a intoxicação do animal, possivelmente levando-o a óbito e promovendo assim, mais custo ao produtor. É importante salientar que alguns produtos comerciais possuem várias bases químicas nas quais estão em concentrações adequadas para atuarem de forma sinérgica e segura (FURLONG; PRATA; MARTINS, 2007).

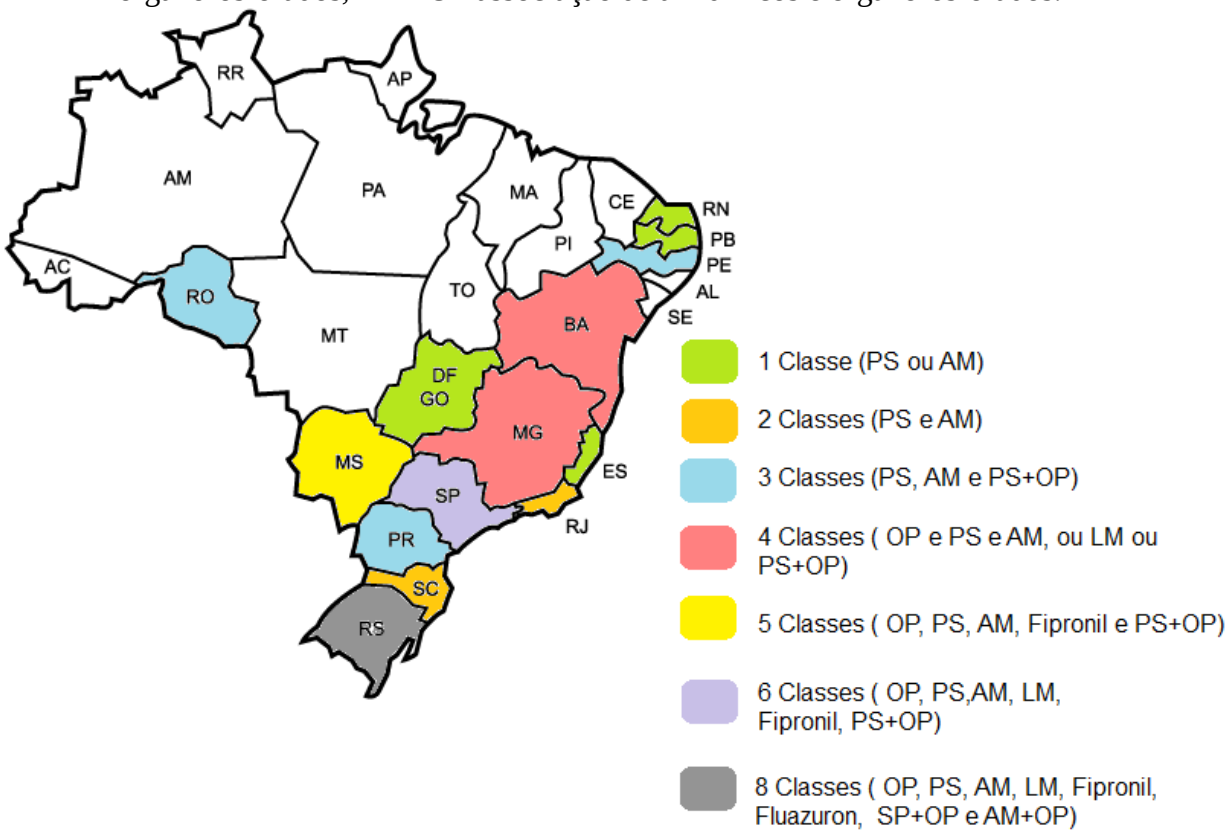
Um dos primeiros carrapaticidas usados foi o arsênico cuja a eficácia contra parasitas foi descoberta em 1896, por intermédio de um fazendeiro australiano, aplicando o produto em solução com êxito no controle dos carrapatos. Porém, o protocolo do seu uso foi descontinuado pelos altos índices de toxicidade e resistência. No Brasil também houve relatos de resistência ao arsênico, sendo sua primeira publicação em 1949, no Rio Grande do Sul (FURLONG; MARTINS; PRATA, 2003; GONZALES, 1974; GONZALES, 1995).

No Brasil estudos sobre a resistência dos ectoparasitas são mais concentradas na região Sudeste, Sul e Centro-Oeste onde a pecuária é mais desenvolvida. Em menor número tem-se relatos no Nordeste e poucos na região Norte. A Figura 1 representa um esquema de 32 publicações relatando o problema da resistência em várias localidades no Brasil. No Espírito Santo um relato de Higa et al. (2015), mostra na região de Montanha-ES a resistência a classe dos Amidínicos. Uma (1) classe de acaricidas, sendo piretróides ou amidínicos, em que os

carrapatos estão resistentes foram observados nos estados do Rio Grande do Norte, Goiáis, Paraíba e Espírito Santo. Duas (2) classes, piretróides e amidínicos, encontram-se em Santa Catarina e Rio de Janeiro. Três (3) classes, piretróides, amidínicos e a associação de piretróides com organofosforados, estão presentes no Paraná e Rondônia. Quatro (4) classes, organofosforado, piretróides, amidínicos e lactonas macrocíticas ou a associação de piretróides com organofosforados, em Minas Gerais, e Bahia. Com cinco (5) classes, organofosforados, piretróides, amidínicos, fipronil epiretróides com organofosforados, em Mato Grosso do Sul. O estado de São Paulo há relatos de 6 classes resistentes. O Rio Grande do Sul há 8 bases já relatadas (ANDREOTTI, 2010; HIGA et al., 2015).

Os acaricidas possuem poder residual que corresponde a duração que a substância permanece no organismo do animal, sendo proibido o consumo de carne e leite durante esse período, trazendo malefícios tóxicos e problemas de saúdes as pessoas que não cumprem essa regra (GONZALES, 1974).

Figura 1- Número de classes de acordo com um levantamento bibliográfico de resistência dos acaricidas comerciais e algumas associações em combate ao *R. (Boophilus) microplus.* As classes analisadas são OP-organofosforado, PS-piretróides sintéticos, AM- amidínicos, LM-lactonas macrocíticas, fipronil, fluazurin, PS+OP associação de piretróides com organofosforados, AM+OP associação de amidínicos e organofosforados.



Fonte: Andreotti et al. (2011); Brito et al. (2011); Camillo et al. (2009); Campos Júnior e Oliveira (2005); Castro-Janer et al. (2010); Coelho et al. (2013); Cruz et al. (2015); Domingues et al. (2012); Farias, Ruas e Santos (2008); Faza et al. (2013); Fernandes (2001); Flausino, Gomes e Grisi (1995); Gomes, Koller e Barros (2011); Higa et al. (2015); Higa et al.(2016); Klafke et al. (2006); Koller, Gomes e Barros (2009); Lopes et al.(2014); Machado et al. (2014); Martins e Furlong (2001); Mendes et al. (2011); Mendes, Mendes e Sato (2013); Mendes, Silva e Bracco (2001); Pereira (2006); Raynal et al. (2013); Reck et al.(2014); Santana et al. (2013); Santana et al. (2015); Santos et al. (2008); Silva, Sobrinho e Linhares (2000); Silva et al. (2005); Souza et al. (2003); Veiga et al (2012).
Nota: Modificado pelo autor.

3 CONTROLE ALTERNATIVO

3.1 ÓLEOS ESSENCIAIS

De acordo com a Resolução - RDC nº 2, de 15 de janeiro de 2007, os óleos essenciais são substâncias voláteis, obtidos de partes de plantas, sendo extraídos por processos físicos como a destilação por arraste com vapor de água, destilação a pressão reduzida ou outro método mais adequado. Podem se apresentar isoladamente ou misturados entre si, retificados, desterpenados ou concentrados. Entende-se por retificados, os produtos que foram submetidos

a um processo de destilação fracionada, para concentrar determinados componentes. Por concentrados, os que parcialmente foram desterpenados. E os produtos que tenham sido retirados quase totalmente os terpenos, denomina-se desterpenados (BRASIL, 2007).

Os óleos essenciais estão localizados em diversos órgãos de muitas espécies vegetais, tais como: folhas, frutos ou até mesmo em raízes. Segundo a *International Standard Organization* (ISO), os óleos essenciais ou voláteis são conjuntos complexos de substâncias voláteis, lipofílicas, geralmente odoríferas e caráter líquido (SIMÕES et al., 2003), sendo sua principal característica a volatilidade, distinguindo dos óleos fixos, que são apenas misturas de lipídicas adquiridas geralmente de sementes, como, por exemplo o girassol, azeite de oliva e mamonas. Por isso, são conhecidos como essências, óleos voláteis ou óleos etéreos, pois são solúveis em solventes apolares como éteres (PINHEIRO, 2003)

Esses óleos são misturas complexas de diversas classes, sendo desde éteres, fenóis, cetonas, aldeídos, ésteres, óxidos, lactonas, ácidos orgânicos, furanos, cumarinas, alcoóis terpênicos e até compostos contendo peróxidos e enxofre. Que apresentam componentes em diferentes concentrações, sendo que, usualmente é encontrado um constituinte de maior concentração, denominado majoritário. Há também outros, com menores proporções de concentrações, denominados de traços, devido ao baixo teor encontrado. A grande maioria dos óleos essenciais é composta por derivados de terpenóides e/ou fenilpropanóides (SIMÕES et al., 2003).

A produção nas plantas está envolvida com a sua proteção contra micro-organismos, insetos e herbívoros. Em alguns casos, podem também atrair animais polinizadores, favorecendo a maior dispersão de pólen e sementes. Bem como, repelir insetos que sejam indesejados (OLIVEIRA et al., 2011).

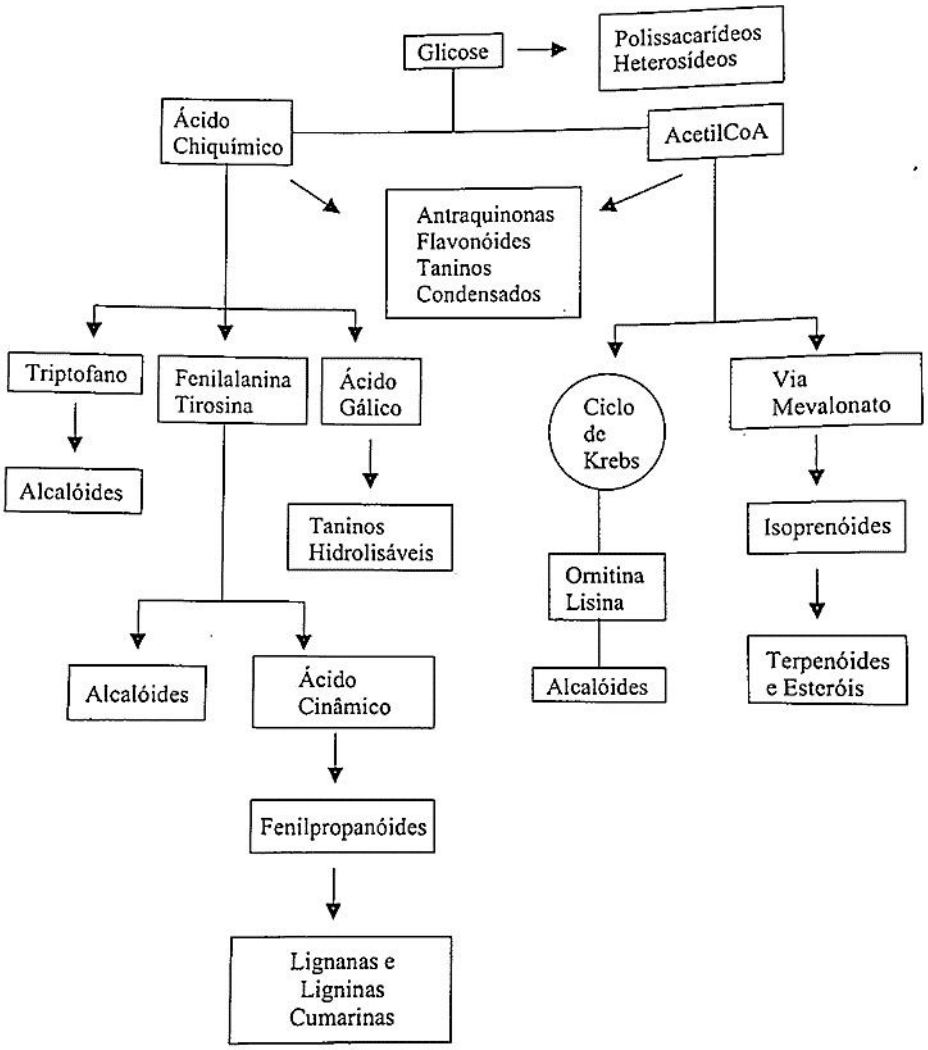
Os óleos voláteis podem ocorrer em estruturas secretoras especializadas, como pelos glandulares (Lamiaceae), células parenquimáticas diferenciadas (Laureaceae, Piperaceae, Poaceae), canais oleíferos (Apeaceae) e em bolsas lisígenas ou esquizolisígenas (Pinaceae, Rutaceae). Os óleos voláteis podem estar presentes em certos órgãos, como nas flores, folhas, cascas, tronco, galhos, raízes, rizomas, frutos ou sementes. Embora todos os órgãos de uma planta possam acumular esses óleos, sua composição química, características físico-químicas e odores, podem mudar de acordo com o local encontrado, sendo capaz de apresentar composição bem distintas. Vale ressaltar que a composição química extraída do mesmo órgão de uma mesma espécie vegetal, também pode variar de modo significativo de acordo com fatores ambientais, interações entre planta/planta, planta/ microrganismos, plantas/ insetos e outros fatores como idade, estágio de desenvolvimento, fatores abióticos como luminosidade,

temperatura, pluviosidade, nutrição, época e horário de coleta (MORAIS, 2009; SIMÕES et al., 2003).

3.2 METABÓLITOS SECUNDÁRIOS

Os vegetais sintetizam grande número de compostos orgânicos que aparentemente não são utilizados diretamente para sua nutrição e desenvolvimento. Essas substâncias são denominadas metabólitos secundários, produtos secundários ou produtos naturais. De modo geral, esses compostos não apresentam funções diretas nos processos de fotossíntese, respiração, transporte de solutos, translocação, síntese de proteínas, assimilação de nutrientes, diferenciação ou síntese de carboidratos, proteínas e lipídeos (TAIZ; ZEIGER, 2013).

Figura 2 - Ciclo biossintético dos metabólitos secundários



Fonte: Venzon, Paula Júnior e Pallini (2010).

Os metabólitos secundários, embora não necessariamente essenciais para que uma planta complete seu ciclo de vida, desempenham importante papel na interação das plantas com o meio ambiente. Eles podem atuar, por exemplo, na defesa contra herbívoros, ataque de patógenos, competição entre plantas e atração de organismos benéficos como polinizadores, dispersores de semente e nas simbioses plantas-microrganismos. Apresentam também ação protetora em relação a mudanças de temperatura, conteúdo de água, níveis de luz, exposição aos raios ultravioleta (UV) e deficiência de nutrientes minerais (PERES, 2004). A origem dos metabólitos secundários pode ser resumida a partir do metabolismo da glicose, gerando dois intermediários principais, sendo o ácido chiquímico e o acetato (FIGURA 2). O ácido chiquímico origina os aminoácidos aromáticos, precursores da maioria dos metabólitos secundários aromáticos. Alguns metabólitos secundários não derivam de um dos intermediários mencionados, mas são resultantes da combinação de uma unidade de ácido chiquímico e uma ou mais unidades de acetato ou derivados deste, como é o caso das antraquinonas, dos flavonóides e dos taninos condensados. Os metabólitos derivados do acetato podem ser classificados, segundo a via-metabólica seguida, em: via ciclo do ácido cítrico, via mevalonato ou produtos da condensação do acetato (SIMÕES et al., 2003).

3.3 ATIVIDADE ACARICIDA DE ÓLEOS ESSENCIAIS

Em função da resistência de carrapatos diante das substâncias sintéticas disponíveis no mercado, existe uma busca incansável por métodos alternativos no controle desses parasitas. A atividade acaricida tem sido averiguada para diversas espécies de óleos essenciais. O potencial acaricida de óleo essencial de folhas e de frutos de *Xylo piasericea* St. Hill foi avaliada sobre o ácaro rajado (*Tetranychus urticae* Koch). A maioria dos componentes identificados nos referidos óleos foram classificados como monoterpenos e sesquiterpenos. Os componentes majoritários encontrados nas folhas foram cubenol (57,43%) e α-epi-murolol (26,09%) e nos frutos os principais componentes detectados foram β-pineno (45,59%) e α-pineno (17,18%). Os valores de CL_{50} calculados para os óleos das folhas e frutos foram de 4,08 $\mu L\ L^{-1}$ de ar e de 20,60 $\mu L\ L^{-1}$ de ar, respectivamente no período de 72h (PONTES et al., 2007).

Os efeitos acaricidas foram estudados para os óleos essenciais de folhas de orégano mexicano (*Lippia graveolens* Kunth), folhas de alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.) e de bulbos de alho (*Allium sativum* L.) sobre larvas de *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *microplus* (Acari: Ixodidae). As concentrações usadas foram de 1,25% a 20%. Os óleos essenciais de orégano e de alho foram os mais ativos, reduziram de 90 a 100% as larvas em todas as concentrações

testadas. Os principais componentes encontrados no óleo de orégano foram o timol (24,59%), carvacrol (24,54%), p-cimeno (13,6%) e γ-terpineno (7,43%), no óleo de alecrim foram o α-pineno (31,07 %), verbenona (15,26%) e 1,8-cineol (14,2%) e o óleo volátil de alho era composto de organossulfurados: trisulfuretodialilo (33,57%), o dissulfureto de dialilo (30,93%) e trisulfureto metilo de alilo (11,28%) (MARTINEZ-VELAZQUEZ et al., 2011).

Pamo et al. (2004) avaliaram o efeito acaricida do óleo essencial de flores de agerato (*Ageratum houstonianum*) sobre *Rhipicephalus lunulatus*, o valor de DL_{50} foi de 0,06653 µL cm^{-2} no primeiro dia da aplicação.

Os óleos essenciais de orégano (*Origanum onites* L.), de tomilho (*Timbra spicata* L. subsp. spicata), de lavanda (*Lavandula stoechas* L. stoechas subsp.) e de hortelã (*Menthaspicata* L.) foram avaliados contra o ácaro carmim aranha (*Tetranychus cinnabarinus* Boisd.) (Acarina: Tetranychidae). Os valores de CL_{50} calculados para os óleos essenciais de tomilho, orégano, hortelã e de lavanda foram de 0,53; 0,69; 1,83 e 2,92 µg ml^{-1} de ar, respectivamente (SERTKAYA; KAYA; SOYLU, 2010).

Clemente e colaboradores (2007), realizaram um estudo e testaram o óleo essencial de eucalipto da espécie *Eucalyptus citriodora* H, em carrapatos provenientes da região de Alvinópolis-MG. O ensaio acaricida foi realizado *in vitro* sobre fêmeas ingurgitadas nas concentrações de 50% e 25% e obtiveram mortalidade de 93,98% e 80,23% respectivamente.

Outra espécie da família Myrtacea é o *Syzygium aromaticum* (L.), conhecida também como cravo-da-índia e têm como principal componente o eugenol, possuindo ação antifúngica e antibacteriana (LORENZI; MATOS, 2008). Santos, Oliveira e Albuquerque (2012) realizaram testes em laboratório sobre fêmeas ingurgitadas utilizando uma concentração de 5% do óleo essencial de cravo da índia e observaram mortalidade de 84% em 48 horas. Em outro trabalho realizado por De Mello et. al. (2014) testando o óleo essencial de cravo da índia na mesma concentração, foi encontrado um resultado com eficácia de 100%.

Estudo *in vitro* de Farias et al. (2007), com o uso do óleo de *Carapa guianensis* Aubl. (andiroba) sobre as teleóginas de *R. (B.) microplus*, com o objetivo de analisar o efeito na mortalidade e na reprodução. Foi usado as concentrações de 100, 50, 30, 20 e 10%. Verificando alta mortalidade, postura reduzida, sendo de ovos inférteis, obtivendo assim uma eficácia na atividade acaricida de 100%.

O óleo essencial de manjericão (*Ocimum basilicum*) foi testado por Santos, Vogel e Monteiro (2012), em laboratório, sobre fêmeas teleóginas. Observando que na concentração de 50% e 100%, obtiveram eficácia máxima na inibição de postura e na eclosão dos ovos.

O problema econômico que o carrapato do boi gera é de preocupação de governantes, produtores e veterinários, pois seu controle torna-se difícil pela resistência desenvolvida aos acaricidas químicos comumente empregados.

Com isso, a utilização de produtos vegetais mostra-se alternativa para o controle dos carrapatos, pois ao mesmo tempo em que traz benefícios semelhantes aos obtidos com o uso de acaricidas sintéticos, causa menos danos para os organismos não-alvo e ao meio ambiente.

Assim, mais estudos envolvendo testes *in vivo* bem como *in vitro* são importantes para analisar a eficácia de diversas espécies de plantas, em diferentes concentrações, para serem utilizadas como potencial acaricida.

5 REFERÊNCIAS

ANDREOTTI, R. **Situação atual da resistência do carrapato-do-boi *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* aos acaricidas no Brasil**. Campo Grande, MS: Embrapa Gado de Corte, 2010.

_____. et al. Acaricide resistance of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* in State of Mato Grosso do Sul, Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 20, n. 2, p. 127-133, 2011.

BARROS-BATTESTI, D. M. et al. **Carrapatos de importância médico-veterinária da Região Neotropical:** um guia ilustrado para identificação de espécies. São Paulo: ICTTD; Instituto Butantan, 2006.

BRASIL. ABIMA, **Resolução nº 2, de 15 de janeiro de 2007**, 2007

BRITO, L. G. et al. Evaluation of the efficacy of acaricides used to control the cattle tick, *rhipicephalus microplus*, in dairy herds raised in the brazilian southwestern amazon. **Veterinary Medicine International**, v. 201, n. 6, p. 2-13, 2011.

CAMILLO, G. et al. Eficiência in vitro de acaricidas sobre carrapatos de bovinos no Estado do Rio Grande do Sul, Brasil. **Ciência Rural**, v. 39, p. 490-95, 2009.

CAMPOS JÚNIOR, D. A.; OLIVEIRA, P. R. de. Avaliação in vitro da eficácia de acaricidas sobre *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887) (Acari: Ixodidae) de bovinos no município de Ilhéus, Bahia, Brasil. **Ciência Rural**, v. 35, p.1386-92, 2005.

CASTRO-JANER, E. et al. Diagnoses of fipronil resistance in Brazilian cattle ticks (*Rhipicephalus (Boophilus) microplus*) using in vitro larval biossays. **Veterinary Parasitology**, v. 173, p. 300–306, 2010.

CLEMENTE, M. A. et al. Avaliação do Potencial de Plantas Medicinais no Controle de *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae). **Revista Brasileira de Biociências**, v. 5, p. 516-518, 2007.

COELHO, W. A. C. et al. Resistência de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* frente à cipermetrina e amitraz em bovinos leiteiros no nordeste do Brasil. **Acta veterinária Brasilica**, v. 7, p. 229-232, 2013.

CORDOVÉS, C. O. **Carrapato:** controle ou erradicação. 2. ed. Porto Alegre: Agropecuária, 1997.

CRUZ, B. C. et al. Susceptibility of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* to ivermectin (200,500 and 630 μg/kg) in field studies in Brazil. **Veterinary Parasitology,** v. 207, p. 309-317, 2015.

DE MELLO, V. et al. Acaricidal properties of the formulations based on essential oils from *Cymbopogon winterianus* and *Syzygium aromaticum* plants. **Parasitology Research**, v.113, n.12, p. 4431-4437, 2014.

DOMINGUES, L. N. et al. Survey of pyrethroid and organophosphate resistance in Brazilian field populations of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*: detection of C190A mutation in domain II of the para-type sodium channel gene. **Veterinary Parasitolology,** v. 189, p. 327-332, 2012.

FARIAS, M. P. O. et al. Eficácia in vitro do óleo da *Carapa guianensis* Aubl. (andiroba) no controle de Boophilus microplus (Acari: Ixodidae). **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, Botucatu, v. 9, n. 4, p. 68-71, 2007.

FARIAS, N. A.; RUAS, J. L.; SANTOS, T. R. B. Análise da eficácia de acaricidas sobre o carrapato *Boophilus microplus*, durante a última década, na região sul do Rio Grande do Sul. **Ciência Rural**, v. 38, p. 1700-1704, 2008.

FAZA, A. P. et al. A new approach to characterization of the resistance of populations of *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae) to organophosphate and pyrethroid in the state of Minas Gerais, Brazil. **Experimental Parasitology**, v. 134, p. 519-523, 2013.

FERNANDES, F. F. Toxicological effects and resistance to pyrethroids in *Boophilus microplus* from Goiás, Brazil. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia,** v. 53, n. 5, p. 538-543, 2001.

FLAUSINO, J. R. N.; GOMES, C. C. G.; GRISI, L. Avaliação da resistência do carrapato *Boophilus microplus* ao amitraz e a piretróides, no município de Seropédica, Rio de Janeiro. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 4, p. 45, 1995.

FURLONG, J.; MARTINS, J. R. S.; PRATA, M. C. A. **Carrapato dos bovinos**: controle estratégico nas diferentes regiões brasileiras. Comunicado Técnico 36, Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora, MG, Dezembro, 2003.

FURLONG, J.; PRATA, M. C. A.; MARTINS, J. R. O carrapato dos bovinos e a resistência: temos o que comemorar? **A Hora Veterinária**, v. 27, n. 159, p. 26-32, 2007.

GOMES, A. **Controle do carrapato do boi:** um problema para quem cria raças européias. Campo Grande/MS: Embrapa, nº 31, Ago, 1998.

GOMES, A.; KOLLER, W. W.; BARROS, A. T. M. Suscetibilidade de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* a carrapaticidas em Mato Grosso do Sul, Brasil. **Ciência Rural**, v. 41, n. 8, p. 1447-1452, 2011.

GONZALES, J. C. **O carrapato do boi**. São Paulo: Mestre Jou, 1974.

_____. **O controle do carrapato do boi**. 2. ed. Porto Alegre: Edição do autor, 1995.

GRISI, L. et al. Impacto econômico das principais ectoparasitoses em bovinos no Brasil. A hora veterinária, v. 21, n. 125, p. 8-10, 2002.

_____. Reassessment of the potential economic impact of cattle parasites in Brazil. **Brazilian Journal of Veterinary Parasitology**, v. 23, p. 150-156, 2014.

HIGA, L. O. S. et al. Acaricide resistance status of the *Rhipicephalus microplus* in Brazil: a literature overview. **Journal of Medical Chemystry**, v. 5, n.7, p. 326-333, 2015.

_____ et al. Evaluation of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae) resistance to different acaricide formulations using samples from Brazilian properties. **Brazilian Journal of Veterinary Parasitology**, v. 25, n. 2, p. 163-171, 2016.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA - IBGE. **Estatística da Produção Pecuária**. IBGE, 2016. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria/producaoagropecuaria/abate-leite-couro-ovos_201504_publ_completa.pdf >**.** Acesso em: 22 de jun. 2016.

KLAFKE, G. M. et al. Larval immersion tests with ivermectin in populations of the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae) from State of Sao Paulo, Brazil. **Veterinary Parasitology**. v. 142, p. 386-390, 2006.

KOLLER, W. W.; GOMES, A.; BARROS, A. T. M. **Diagnóstico da resistência do carrapato-do-boi a carrapaticidas em Mato Grosso do Sul**. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento. MS: Embrapa Gado de Corte, 2009.

LOPES, W. D. et al. Efficacy of fipronil (1.0 mg/kg) against *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* strains resistant to ivermectin (0.63 mg/kg). **Preventive Veterinary Medicine**, v. 115, p. 88-93, 2014.

LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. **Plantas medicinais no Brasil:** nativas e exóticas. 2. ed. Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum, 2008.

MACHADO, F. A. et al. *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* in the western-central region of Rio Grande do Sul, Brazil: multi resistant tick. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 23, p. 337-342, 2014.

MARTINEZ-VELAZQUEZ, M. et al. Efeito acaricida de óleos essenciais de *Lippia graveolens* (Lamiales: Verbenaceae), *Rosmarinus officinalis* (Lamiales: Lamiaceae) e *Allium sativum* (Liliales: Liliaceae) contra *Rhipicephalus* (Boophilus) *microplus* (Acari: Ixodidae). **Journal of Medical Entomology**, v. 48, n. 4, p. 822-827, 2011.

MARTINS, J. R.; FURLONG, J. Avermectin resistance of the cattle tick *Boophilus microplus* in Brazil. **The Veterinary Record**, v. 149, p. 64, 2001.

MENDES, E. C.; MENDES, M. C.; SATO, M. E. Diagnosis of amitraz resistance in Brazilian populations of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae) with larval immersion test. **Experimental and Applied Acarology**, v. 61, p. 357-369, 2013.

MENDES, M. C. et al. Resistance to cypermethrin, deltamethrin and chlorpyriphos in populations of *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *microplus* (Acari: Ixodidae) from small farms of State of São Paulo, Brazil. **Veterinary Parasitolology**, v. 178, p. 383- 388, 2011.

MENDES, M. C.; SILVA, M. X.; BRACCO, J. E. Biochemical test to determine the resistance of two strains of the tick *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887). **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 10, p. 61-65, 2001.

MONTEIRO, S. G. **Parasitologia na medicina veterinária**. São Paulo: Roca, 2011. 356 p.

MORAIS, L. A. S. Influência dos fatores abióticos na composição química dos óleos essenciais. **Horticultura Brasileira,** v. 27, n. 2, 2009.

OLIVEIRA, M. M. M. et al. Rendimento, composição química e atividade antilisterial de óleos essenciais de espécies de *Cymbopogon.* **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v. 13, p. 8-16, 2011.

PAMO, T. E. et al. The acaricidal effect of the essential oil of *Ageratum houstonianum* Mill. flowers on ticks (*Rhipicephalus lunulatus*) in Cameroon. **South African Journal of Animal Science,** v. 34, p. 244-247, 2004.

PERES, L. E. P. **Metabolismo Secundário**. Piracicaba – São Paulo: Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz – ESALQ/USP, 2004.

PINHEIRO, A. L. **Produção de Óleos Essenciais**. Viçosa-MG: CPT, 2003.

PEREIRA, J. R. Eficácia *in vitro* de formulações comerciais de carrapaticidas em teleóginas de *Boophilus microplus* coletadas de bovinos leiteiros do Vale do Paraíba, Estado de São Paulo. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 15, n. 2, p. 45-48, 2006.

PONTES, W. J. T. et al. Atividade acaricida dos óleos essências de folhas e frutos de *Xylopia sericea* sobre o ácaro rajado (*Tetranychus urticae* KOCH). **Química Nova**, v. 30, n. 4, p. 838-841, 2007.

PORTAL BRASIL. **Rebanho bovino brasileiro cresce e chega a 212,3 milhões de cabeças de gado**, 2015. Disponível em: <http://www.brasil.gov.br/economia-e-emprego/2015/10/rebanho-bovino-brasileiro-cresce-e-chega-a-212-3-milhoes-de-cabecas-de-gado>. Acesso em: 22 de jun. 2016.

RAYNAL, J. T. et al. Acaricides efficiency on *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* from Bahia state North-Central region. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 22, p. 71-77, 2013.

RECK, J. et al. First report of fluazuron resistance in *Rhipicephalus microplus*: a field tick population resistant to six classes of acaricides. **Veterinary Parasitolology**, v. 201, p. 128-136, 2014.

REY, L. **Parasitologia**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001. p. 752-759.

RODRIGUES, D. S.; LEITE, R. C. Impacto econômico de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*: estimativa de redução de produção de leite. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 65, n. 5, p. 1570-1572, 2013.

SANTANA, B. B. et al. Evaluation of the efficacy of cypermethrin and amitraz against *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, in the State of Pernambuco, Brazil. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 82, p. 1-4, 2015.

_____. et al. Susceptibility of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae) to pyrethroids and their associations in Pernambuco, Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária,** v. 22, p. 276-280, 2013.

SANTOS, A. V.; OLIVEIRA, R. A.; ALBUQUERQUE, G. R. Efeito *in vitro* do extrato de nim (*azadirachta indica)* e óleo essencial de cravo *(Syzygium aromaticum)* sobre *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, v. 34, n. 2, p. 111-115, 2012.

SANTOS, C. E. D. **Anuário brasileiro do gado de corte**. Santa Cruz do Sul: Editora Gazeta Santa Cruz, 2016.

SANTOS, F. C. C.; VOGEL, F. S. F.; MONTEIRO, S. G. Efeito do óleo essencial de manjericão (*Ocimum basilicum* L.) sobre o carrapato bovino *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* em ensaios *in vitro*. **Ciências Agrárias**, v. 33, n. 3, p. 1133-1140, 2012.

SANTOS, T. R. B. et al. Uso de acaricidas em *Rhipicephalus (B.) microplus* de duas regiões fisiográficas do Rio Grande do Sul. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 36, n. 1, p. 25-30, 2008.

SERTKAYA, E.; KAYA, K.; SOYLU, S. Acaricidal activities of the essential oils from several medicinal plants against the carmine spider mite (*Tetranychu scinnabarinus* Boisd.) (Acarina: Tetranychidae). **Industrial Crops and Products**, v. 31, p. 107-112, 2010.

SILVA, M. C. L.; SOBRINHO, R. N.; LINHARES, G. F. C. Avaliação in vitro da eficácia do clorfenvinfós e da cialotrina sobre o *Boophilus microplus,* colhidos em bovinos da bacia leiteira da microrregião de Goiânia–Goiás. **Ciência Animal Brasileira**, v. 2, p. 143-148, 2000.

SILVA, W. W. et al. Resistência de fêmeas ingurgitadas de *Boophilus microplus* e *Riphicephalus sanguineus* (ACARI: IXODIDAE) a carrapaticidas no semi-árido paraibano: efeito da cipermetrina e do amitraz. **Agropecuária Científica no Semiárido**, v. 1, p. 59-62, 2005.

SIMÕES, C. M. O. et al. **Farmacognosia:** da planta ao medicamento. 5. ed. Porto Alegre/Florianópolis. Editora UFRGS/ Editora UFSC, 2003. p. 467-495

SOUZA, A. P. et al. Eficácia de carrapaticidas em rebanhos de bovinos leiteiros de municípios da região centro sul do Paraná. **Revista de Ciências Agroveterinária**, n. 2, p.131-135, 2003.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 5. ed. Porto Alegre: Artmed, 2013.

VEIGA, L. P. et al. Resistance to cypermethrin and amitraz in *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* on the Santa Catarina Plateau, Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 21, p. 133-136, 2012.

VENZON, M.; PAULA JÚNIOR. T. J.; PALLINI, A. **Controle alternativo de pragas e doenças na agricultura orgânica**. Viçosa, MG: EPAMIG, 2010.

Capítulo

21

Potencial fitoterapêutico de *Punica granatum* L. (romãzeira) em medicina veterinária

Thays de Carvalho Amorim[1]
Andressa Ribeiro Vicentini[2]
Winner Duque Rodrigues[3]
Juliana Aparecida Severi[4]
Marcos Santos Zanini[5]

1 INTRODUÇÃO

Atualmente plantas medicinais têm sido estudadas para evidenciar o emprego de técnicas farmacológicas recentes, a fim de se preconizar e validar o uso popular de fitoterápicos e produzir fármacos com propriedades terapêuticas com reduzida toxicidade (KANERIA; BAPODARA; CHANDA, 2012; BARATHIKANNAN et al., 2016).

O uso de plantas medicinais se mantém em evidência nos estudos atuais de interesse na Medicina Veterinária. Visto que é um tratamento alternativo, este precisa ser validado e preconizado, pois é imprescindível que se estabeleça a farmacodinâmica das drogas vegetais nos animais.

[1] Universidade Federal do Espírito Santo, e-mail: mv.thaysamorim@gmail.com;
[2] Universidade Federal do Espírito Santo, e-mail: andry.ribeiro@hotmail.com;
[3] Universidade Federal do Espírito Santo, e-mail: winnerduque@gmail.com;
[4] Universidade Federal do Espírito Santo, e-mail: juseveri@yahoo.com.br;
[5] Universidade Federal do Espírito Santo, e-mail: zaninims@gmail.com.

As atividades terapêuticas de variados componentes do *Punica granatum* (Romãzeira) sugerem uma ampla gama de aplicações clínicas para a prevenção e tratamento de doenças. Extratos do fruto e casca possuem uma relevante atividade antioxidante. Além disso, apresenta atividades antibacterianas, anticonvulsivantes, antiinflamatórias, antifúngicos, imunomoduladores, cardioprotetoras, antimutagenicos, antiespasmódico e antidiabéticas (SINGH; CHIDAMBARA MURTHY; JAYAPRAKASHA, 2002).

A Medicina Veterinária atualmente é capaz de diagnosticar e tratar uma abordagem abrangente de doenças em variadas espécies de animais. Semelhante a medicina humana, os animais podem ser acometidos por distúrbios gastrointestinais, afecções de pele, doenças parasitárias, problemas do sistema nervoso, enfermidades parasitarias entre outras. A Romã apresenta atividades farmacológicas em ambos os distúrbios apresentados, dado a importância de se elucidar suas ações em animais como modelo de estudo.

O objetivo desse estudo é apresentar uma revisão de literatura sobre estudos recentes envolvendo as mais diversas aplicações terapêuticas da *Punica granatum* e sua aplicabilidade em Medicina Veterinária.

1.1 ASPECTOS BOTÂNICOS DE *Punica granatum* L.

Punica granatum L., pertencente à família Punicaceae, é conhecida popularmente como Romãzeira. É originária da Ásia, entretanto encontra-se cultivada em várias partes do mundo, inclusive no Brasil (LORENZI; MATOS, 2008). Apresenta-se na forma de arbusto ramificado ou arvoreta de até 3 metros de altura (FIGURA 1). Contém folhas simples, pequenas, resistentes e membranáceas. Suas flores são solitárias e se dispõem nas extremidades dos ramos, possuem coloração de vermelho à laranja com um cálice esverdeado e duro. Os frutos são globóides, podendo atingir 12 centímetros, com muitas sementes envolvidas em camadas de um arilo polposo de cor rósea e sabor adocicado (LORENZI; SOUZA, 2001; LORENZI; MATOS, 2008).

Figura 1 - *Punica granatum* L. na forma adulta (A), fruto (B), sementes (C) e flores (D).

Fonte: Mifsud (2013).
Nota: Adaptado pelo autor.

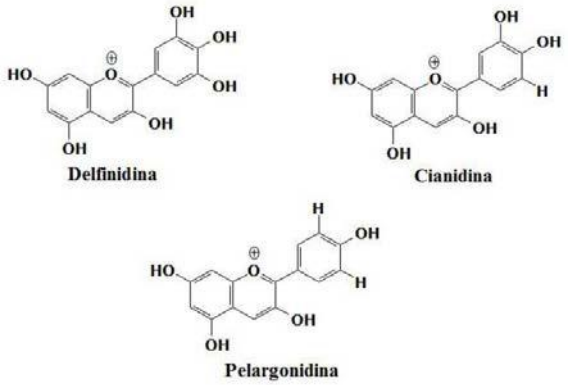
1.2 COMPOSIÇÃO QUÍMICA E AÇÕES FARMACOLÓGICAS

Estudos demonstram que as variadas atividades biológicas descritas para a *P. granatum* estão estritamente relacionadas à sua composição química. Assim, estudos fitoquímicos vem sendo realizados para elucidar os componentes presentes nos extratos de Romã. Dentre as principais classes de compostos destacam-se os taninos, flavonoides, alcaloides e ácidos fenólicos, dentre outros (WANG et al., 2010).

1.2.1 Fruto

Sendo a parte desta espécie mais utilizada popularmente, o fruto apresenta uma diversidade de compostos químicos. Possui alta concentração de flavonoides, tais como, antocianinas do tipo delfinidina, cianidina e pelargonidina (FIGURA 2); taninos, tais como derivados monoméricos do ácido elágico e formas poliméricas derivadas tanto de taninos hidrolisáveis, quanto de taninos condensados (proantocianidinas) (TYAGI et al., 2012; JARDINI; FILHO, 2007; QU et al., 2012; SANTOS-BUELGA; SCALBERT, 2000; CLIFFORD; SCALBERT, 2000).

Figura 2 - Estrutura das antocianinas encontradas nos frutos de Romã.



Fonte: Jardini e Filho (2007).

As antocianinas têm grande destaque na composição do Romã. Sua presença confere ao fruto atividade antioxidante, um dos atributos mais importantes dessa espécie. Além disso, essas substâncias ainda possuem outras atividades como evitar a peroxidação, podem ser usados como anti-inflamatórios, dentre outras. Ainda, as antocianinas em pH ácido como caso do Romã, conferem ao fruto sua coloração característica, o vermelho (RIBEIRO et al., 2004).

Segundo Pandey e Madhuri (2008), os frutos de Romã contêm ainda alcaloides e vitamina C atuando contra tumores induzidos em ratos albinos.

1.2.2 Cascas

As cascas dos frutos de *P. granatum* também são ricas em polifenóis, os quais atuam principalmente como agentes antioxidantes. Dentre os polifenóis incluem-se: ácidos fenólicos (ácido ferúlico), elagitaninos, galotaninos, e flavonóides, tais como catequinas, antocianinas e quercetina (LANSKY; NEWMAN, 2007). Outros estudos evidenciaram a presença de outros metabólitos secundários, tais como, polissacarídeos e alcalóides (OZCAL; DINC, 1993; JAHFAR; VIJAYAN; AZADI, 2003; VIDAL et al., 2003). Estudos mais recentes corroboram com a identificação de taninos (punicalagina), flavonóides, saponinas, antraquinonas e antocianinas alguns como cianidina e delfinidina (LI et al., 2006; FISCHER et al., 2011; ARUN; SINGH, 2012).

1.2.3 Sementes e Flores

Para as sementes foram relatados a presença de principalmente de polifenóis e ácidos graxos, compostos responsáveis por sua ação anti-inflamatória (SCHUBERT; LANSKY;

NEWMAN, 1999). Já para o extrato das flores foram identificados taninos pirogálicos, fenóis, tritepernos, flavonóides e ácidos fixos fortes (LEITE et al., 2008).

1.3 ANÁLISE POR ESPECTROMETRIA DE MASSAS

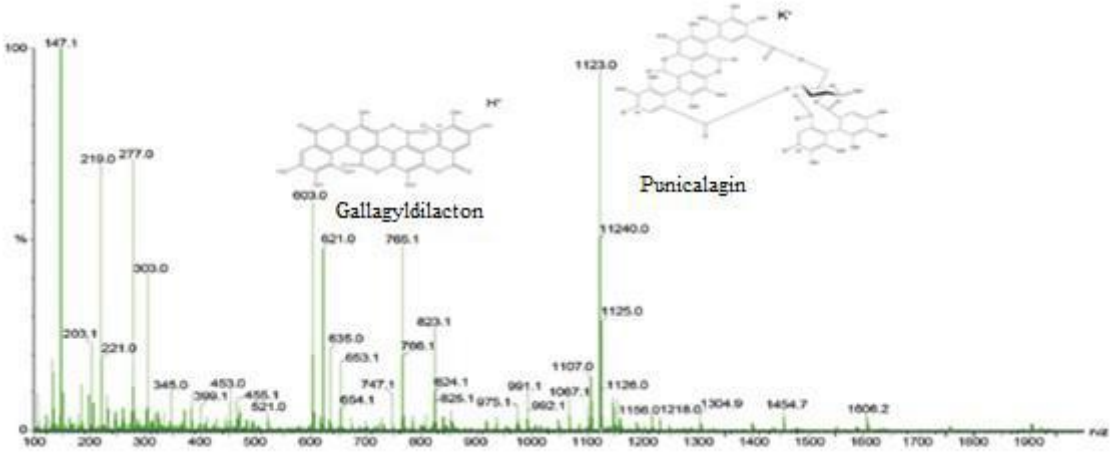
Segundo uma pesquisa feita por Anibal et al. (2013), utilizando um espectrômetro de massas em diferentes parte de *Punica granatum* foram evidenciados vários compostos presentes, que foram caracterizados pela sua estrutura, peso molecular e dados da literatura. As figuras abaixo ilustram o cromatograma obtido do extrato do pericarpo (FIGURA 3) revelando a presença de mais de 30 compostos e do extrato das cascas (FIGURA 4) também com mais de 30 compostos.

1.4 USOS POPULARES

A *Punica granatum* L., por ser uma planta de fácil cultivo e estar disseminada em grande parte do Brasil, é muito utilizada na medicina popular há muitos anos para tratar diversos problemas de saúde, desde a assepsia bocal (SANTOS et al., 2009) até doenças relacionadas ao trato gastrintestinal (WERKMAN et al., 2008).

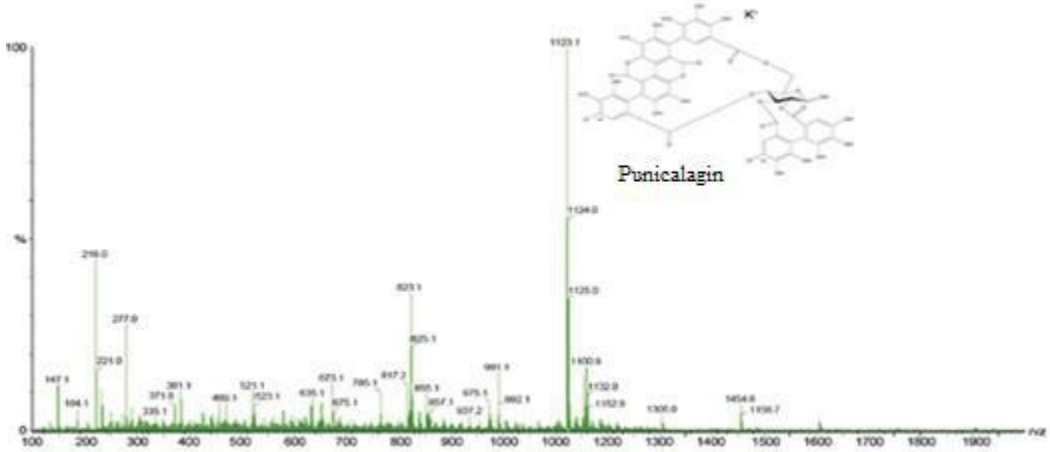
O sumo extraído do fruto é usado contra úlceras na boca, aftas, o herpes simples, a leucoplasia e a candidíase, além de úlceras nas genitálias, como as decorrentes de herpes genital. O sumo também é usado para aliviar dores de ouvido e garganta, rouquidão, no tratamento de dispepsia, disenteria e benéfico contra a lepra. As flores são empregadas para tratamento da gengiva, prevenindo a perda dentária e consequente periodontite; além de possuir atividade adstringente e hemostática e auxilia no tratamento de diabetes mellitus. Os brotos das flores, secos e pulverizados, são comumente usados para a bronquite (LANGLEY, 2000). Além de atuar em processos inflamatórios da mucosa oral e a casca do caule é também usada como vermífugo (MATOS, 2002).

Figura 3 - Acompanhamento de classes químicas por ESI (+) - MS da amostra pericarpo



Fonte: Anibal et al. (2013).

Figura 4 - Acompanhamento de classes químicas por ESI (+) - MS da amostra de casca



Fonte: Anibal et al. (2013).

No México a *P. granatum* é empregada para o tratamento de diarreia, doenças parasitárias, abscessos, tosse, angina, inflamação urinária e injúrias da pele (NAVARRO et al., 1996). Outras propriedades como imunomodulação, arteriosclerose, antimicrobiana, antifúngica, anti-helmíntica, doenças periodontais (LONGTIN, 2003) e antivirais (MATOS, 2002) estão sendo associadas aos extratos de *P. granatum*. Aos poucos os estudos relacionados às propriedades farmacológicas da Romã vêm sendo confirmando o que já se tem de conhecimento empírico.

1.5 OUTRAS POTENCIALIDADES DAS PRINCIPAIS CLASSES E SUBSTÂNCIAS PRESENTES NA ROMÃZEIRA

Os Taninos são classificados de acordo com seu esqueleto molecular, representando por dois grandes grupos de compostos polifenólicos: taninos hidrolisáveis e taninos condensados. Esses compostos têm como principal característica organoléptica a adstringência das frutas (SANTOS; MELLO, 1999).

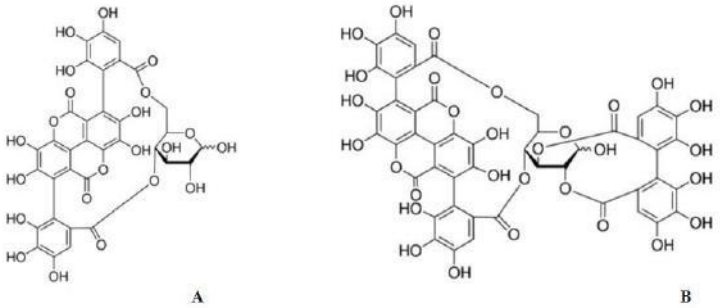
Estudos em relação à atividade dos taninos presentes em extratos vegetais verificam-se importantes aplicabilidades terapêuticas: ação antibacteriana, ação sobre protozoários, na reparação de tecidos, regulação enzimática e proteica. Tais efeitos dependem da concentração e do tipo de tanino utilizado (MELLO; SANTOS, 2001). Rathia, Rajput e Singha (2014) observaram através de análises fitoquímicas a presença de taninos nos extratos da casca de *Punica granatum*, onde verificaram atividade antimicrobiana com amplo espectro em bactérias Gram positivas e Gram negativas.

1.5.1 Punicalagina

A punicalagina (FIGURA 5) é um polifenol, classificado como tanino hidrolisável (elagitanino) de alto peso molecular, com elucidadas atividades: antioxidante e antiinflamatória, se destacando como uma promissora molécula com várias funções benéficas à saúde (GONZÁLEZ-MOLINA, MORENO; GARCÍA-VIGUERA, 2009). Os taninos, como a punicalagina representam a classe predominante de substâncias bioativas da *P. granatum*, onde se estabelece em maior parte na casca e no mesocarpo do fruto (FISCHER et al., 2011).

Fleck et. al., (2016) observaram que a punicalagina obtida de extratos etanólicos biotivos de *P. granatum* na formula de hidrogel se mostrou eficaz e excelente prognóstico como terapêutica no tratamento de cicatrização de ferida crônica. Corroborando com o estudo feito por Nayak et al., (2013) em que o extrato obtido da casca da *Punica granatum* foi avaliado para a sua atividade de cicatrização de feridas em ratos. Os autores demonstraram que os animais tratados com extrato tiveram epitelização mais rápida quando comparadas aos controles positivos, exibindo uma taxa de redução de 95% da área ferida.

Figura 5 - A estrutura química da punicalagina



Fonte: Fleck et al. (2016).
Nota: Adaptado pelo autor.

1.5.2 Flavanóides

Os flavonoides possuem atividades antioxidantes e podem interferir na produção de radicais livres (ZUANAZZI; MONTANHA, 1999). Barathikannan et al. (2016) observaram que o extrato acetato de etila da casca do Romã *in vitro* continham altos níveis de fenóis e flavonoides que são responsáveis pela inibição da enzima α-glicosidase (antidiabética) e efeito antioxidante. Observaram que o extrato teve a capacidade de reduzir a acumulação de lipídeos em nematódeos *Caenorhabditis elegans* e demonstrou efeito antimicrobiano.

1.5.3 Antraquinonas

As antocianinas, subclasse dos flavonoides, formam o maior grupo de pigmentos hidrossolúveis na natureza. São responsáveis pelo atrativo espectro de cor que varia do vermelho ao azul, apresenta-se também como uma mistura de ambas as cores, o que resulta em tons de púrpura (BROUILLARD, 1982; DEGÁSPARI; WASZCZYNSKYJ, 2004). As antocininas delfinidina e cianidina são compostos químicos típicos do suco da Romã que caracterizam a cor violeta e a cor vermelha, respectivamente. Portanto a cianidina prevalece, o que predomina a coloração vermelha do suco da Romã. (SANTIAGO, 2014; TÜRKYILMAZ et al., 2013). Há escassos estudos relacionados à ação biológica das antocianinas encontrada na literatura.

1.5.4 Saponinas

Kaiser, Pavei e Ortega (2010) analisaram atividades relacionadas ao aumento da resposta imune e a atividades hemolíticas na Romã. A atividade hemolítica das saponinas, que

faz parte do metabolismo secundário de proteção contra ataques de predadores (insetos, vírus, fungos e bactérias), está ligada a muitas das atividades antibacteriana, antifúngica e espermicida apresentada por uma variedade de plantas (LACAILLE-DUBOIS; WAGNER, 1996; WINA; MUETZEL; BECKER, 2005). Álvares (2006) em seu estudo verificou a tendência de diminuição nos parâmetros sanguíneos de hemácias e hematócrito após a adição de extrato de *Yucca schidigera* na ração de cães adultos, sugerindo que pode ter ocorrido hemólise devido à presença da saponina na composição química da *Y. Schidigera*, contudo os parâmetros permaneceram dentro dos valores de normalidade quando utilizado a dose de 2 g/kg durante 60 dias. São necessários mais estudos relacionados às atividades hemolíticas das saponinas em animais de companhia, a fim de se padronizar qual a relação de vias de administração e concentrações são seguras para se utilizar sem que prejudique a fisiologia dos animais.

1.6 EFEITOS ADVERSOS

O extrato etanólico de *P. granatum* apresenta baixa toxicidade em altas doses (VIDAL, 2003; VIEIRA, 2014) o que garante uma janela terapêutica segura para o uso em terapias que utilizam a Romã. Cerda et al. (2003) utilizaram, constantemente, altas doses de elagitanina e punicalagina, um dos princípios ativo de Romã, via administração oral, em ratos durante 37 dias. Os resultados mostraram a ausência de efeitos tóxicos no período. No entanto, há ainda poucos estudos etnobotânicos, de farmacognosia e toxicológicos suficientes para elucidar os mecanismos de ação e efeitos dos constituintes químicos derivados da Romã (WERKMAN et al., 2008).

2 REFERÊNCIAS

ÁLVARES, A. A. A. Influência da adição de extrato de *Yucca schidigeranos* parâmetros bioquímicos e hematológicos de cães adultos consumindo duas rações comerciais. 2006. 47 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) - Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2006.

ANIBAL P. C. et al. Antifungal activity of the ethanolic extracts of *Punica granatum* L. and evaluation of themorphological and structural modifications o fitscompounds up on the cells of *Candida* spp. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 44, n. 3, p. 839-848, 2013.

ARUN, N.; SINGH, D. P. *Punica granatum*: A Review on pharmacological and therapeutic properties. **International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research.** v. 3, n. 5, p. 1240-1245, 2012.

BARATHIKANNAN, K. et al. Chemical analysis of Punica granatum fruit peel and its in vitro and in vivo biological properties. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 16, n. 1, p. 264, 2016.

BROUILLARD, R. Chemical structure of anthocyanins. In: MARKAKIS, P. **Anthocyanins as Food Colors**. 1. ed. New York: Academic Press, 1982. p. 1-40.

CERDA, B. et al. Repeated oral administration of high doses of the pomegranate ellagitannin punicalagin to rats for 37 days is not toxic. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, n. 11, p. 3493-501, 2003.

CLIFFORD, M. N.; SCALBERT, A. Ellagitannins- nature occurrence and dieta ryburden. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 80, p. 1118-25, 2000.

DEGÁSPARI C. H.; WASZCZYNSKYJ, N. Propriedades antioxidantes de compostos fenólicos. **Visão Acadêmica**, v. 5, n. 1, p. 33-40, 2004.

FISCHER, U. A. et al. Impact of processing and storage on the phenolic profiles andcontents of pomegranate (*Punica granatum L.*) juices**. European Food Research Technology**. v. 233, n. 5, p. 797-816, 2011.

FLECK, A. et al. *Punica granatum* L. Hydrogel for wound care treatment: from case study to phytomedicine standardization. **Molecules**, v. 21, n. 1059, p. 2-13, 2016.

GONZÁLEZ-MOLINA, E.; MORENO, D. A.; GARCÍA-VIGUERA, C. A. A new drink rich in healthy bioactives combining lemon and pomegranate juices. **Food Chemistry**, v. 115, n. 4, p. 1364-1372, 2009.

JARDINI, F. A.; FILHO, M. J. Avaliação da atividade antioxidante em diferentes extratos da polpa e sementes da romã (*Punica granatum*, L.). **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 43, n. 1, p. 137-147, 2007.

KAISER, S.; PAVEI, C.; ORTEGA, G. G. Estudo da relação estrutura-atividade de saponinas hemolíticas e/ou imunoadjuvantes mediante uso de análise multivariada. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 20, n. 3, p. 300-309, 2010.

KANERIA, M. J.; BAPODARA, M. B.; CHANDA, S. V. Effect of extraction techniques and solvents on antioxidant activity of pomegranate (*Punica granatum* L.) leaf and stem. **Food Analytical Methods**. v. *5*, n. 3, p. 396-404, 2012.
LACAILLE-DUBOIS, M. A.; WAGNER, H. A review of the biological and pharmacological activities of saponins. **Phytomedicine**, v. 2, n. 4, p. 363-386, 1996.

LANGLEY, P. Why a pomegranate? **British of Medicine Journal**, v. 321, n. 4, p. 1153-4, 2000.

LANSKY, E. P.; NEWMAN, R. A. Punica granatum (pomegranate) and its potential for preventionandtreatmentofinflammationandcancer. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 109, n. 2, p. 177-206, 2007.

LEITE, L. R. et al. Abordagem fitoquímica das flores de *Punica granatum*linn. In: ASSOCIAÇÃO NORTE NORDESTE DE QUÍMICA. **Resumos...** 2008. Disponível em: <http://www.annq.org/congresso2008/resumos/Resumos/T23.pdf >. Acesso em: 04 nov. 2016.

LI, Y.; et al. Evaluation of antioxidant properties of peel extract in comparison with pomegranate pulp extract. **Food Chemistry**. v. 96, n. 2, p. 60-254, 2006.

LONGTIN, Robert. The pomegranate: nature's power fruit? **Journal of the National Cancer Institute**, v. 95, n. 5, p. 346-348, 2003.

LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. **Plantas medicinais no Brasil**: nativas e exóticas, 2. ed. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2008.

LORENZI, H.; SOUZA, H. M. **Plantas ornamentais no Brasil**: arbustivas, herbáceas e trepadeiras. 3. ed. Nova Odessa: Plantarum, 2001.

MATOS, F. J. A. **Farmácias Vivas**. 4. ed. Fortaleza:UFC, 2002.

MELLO, J. C.P.; SANTOS, S. C. Taninos. In: SIMÕES, C. M. et al. **Farmacognosia**: da planta ao medicamento. 3. ed. Porto Alegre: UFGRS, 2001. p. 517-543.

MIFSUD, S. **Pomegranate: *Punica granatum* L**. 2013 Disponível em: <maltawildplants.com>.

NAVARRO, V. et al. Antimicrobial evaluation of some plants used in Mexican traditional medicine for the treatment of infectious diseases**. Journal of ethnopharmacology**. v. 53, n. 3, p. 143-147, 1996.

NAYAK, S. B. et al. Wound healing activity of the fruit skin of *Punica granatum*. **Journal of Medicinal Food**, v. 16, n. 9, p. 857-861, 2013.

OZCAL, N.; DINC, S. Evaluation of thepomegranate (*Punica granatum* L.) peels from the standpoint of pharmacy. **Eczacılık Fak¨ultesi Dergisi**, v. 22, p. 21-29, 1993.

PANDEY, G.; MADHURI, S. Some anticancer agents from plantorigin. **Journal Plant Archives**, v. 8, n. 2, p. 527-532, 2008.

QU, W. et al. Quantitative determination of major polyphenol constituents in pomegranate products. **Food Chemistry**, v. 132, n. 3, p. 1585-1591, 2012.

RATHIA P.; RAJPUT, C. S.; SINGHA, S. Evaluation of total phenolic contents, antioxidant and antibacterial capacity of aqueous methanolic extracts obtained from Punica granatum peel. **International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research**, v. 25, n. 2, p. 4-92, 2014.

JAHFAR, M.; VIJAYAN, K. K.; AZADI, P. Studies on a polysaccharide from the fruit rind of *Punica granatum*. **Research Journal of Chemistry and Environment**, v. 7, n. 1, p.43–50, 2003.

RIBEIRO, J. N. et al. Avaliação da Toxicidade da Antocianina de Uva, Através da Quantificação Espectrofotométrica de Constituintes do Sangue, e Medida de Massa Corporal de Coelhos Saudáveis. **Revista Analytica**, v. 12, p. 50-55, 2004.

SANTIAGO, M. C. P. D. A. Avaliação de processos para obtenção deprodutos ricos em antocianinas utilizando suco de romã (*Punica granatum L.*). 2014. 135f. Tese (Doutorado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Escola de Química, Rio de Janeiro, 2014.

SANTOS, E. B. et al. Estudo etnobotânico de plantas medicinais para problemas bucais no município de João Pessoa, Brasil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 19, n. 1B, p. 321-324, 2009.

SANTOS, S. D. C.; MELLO, J. C. P. **Farmacognosia**: da Planta ao Medicamento. 6. Ed. Porto Alegre: UFRGS, 1999.

SANTOS-BUELGA, C.; SCALBERT, A. Proanthocyanidins and tannin-like compounds nature, occourence, dietaryintake and effects on nutricion and health. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 80, n. 7, p. 1094-117, 2000.

SCHUBERT, S. Y.; LANSKY, E. P.; NEWMAN, I. Antioxidant and ecosainoidenzym einhibiti on properties of pomegranates eedoiland ferment edjuice flavonoids. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 66, n. 1, p. 11-17, 1999.

SINGH, R. P.; CHIDAMBARA MURTHY, K. N.; JAYAPRAKASHA, G.K. Studies on the antioxidant activity of pomegranate (*Punica granatum*) peel and seed extract susing in vitro models. **Journal of Agriculture and Food Chemistr**y, v. 50, n. 1, p. 81-6, 2002.
TÜRKYILMAZ, M. et al. Effects of various pressing programs and yields on theantioxidant activity, antimicrobial activity, phenolic content and colour of pomegranate juices. **Food Chemistry**, v. 138, n. 2, p. 1810-1818, 2013.

TYAGI, S. et al. Punicalagins - A Large Polyphenol Compounds Found in Pomegranates: A Therapeutic Review. **Academic Journal of Plant Sciences**, v. 5, n. 2, p. 45-49, 2012.

VIDAL, A. et al. Studies on the toxicity of *Punica granatum* L. (Punicaceae) whole fruit extracts. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 89, n. 2, p. 295–300, 2003.

_____. Studies on the toxicity of *Punica granatum* L.(Punicaceae) whole fruit extracts. **Journal of ethnopharmacology**, v. 89, n. 2, p. 295-300, 2003.

VIEIRA, A. C. S. **Avaliação da atividade antinociceptiva e anti-inflamatória do extrato etanólico de *Punica granatum* L. (ROMÃ)**. 2014. 61 f. Dissertação (Mestrado em Enfermagem) – Escola de Enfermagem e Farmácia, Programa de Pós Graduação em Enfermagem, Universidade Federal de Alagoas, Maceió, 2014.

WANG, R. et al. Pomogranate: constituents, bioactivities and Pharmacokinetics Fruit. **Vegetable and Cereal Science and Biotechnology**. v. 4, n. 2, p. 77-87, 2010.

WERKMAN, C. et al. Aplicações terapêuticas da *Punica granatum* L. (romã). **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v. 10, n. 3, p. 104-111, 2008.

WINA, E.; MUETZEL, S.; BECKER, K. The Impact of Saponins or Saponin Containing Plant Materials on Ruminant Production A Review. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, n. 21, p. 8093-8105, 2005.

ZUANAZZI, J. A. S.; MONTANHA, J. A. Flavonóides. In: SIMÕES, C. M .O. et al. **Farmacognosia:** da planta ao medicamento. Porto Alegre: Ed. da UFRGS. 1999. p. 577-614.

Capítulo

22

Maturação oocitária bovina

Larissa Marchiori Sena[1]
Ítalo Câmara de Almeida[2]
Nara Clara Lazaroni e Merchid[3]
José de Oliveira Carvalho[4]
Carla Braga Martins[5]

1 INTRODUÇÃO

O processo de maturação oocitária nos mamíferos inclui todas as modificações que permitem ao oócito ser fecundado, gerando um embrião com qualidade, capaz de levar uma gestação a termo. Para isto, ocorrem modificações no oócito que interferem nos momentos que antecedem ou sucedem a fecundação. Em bovinos a maturação pode ocorrer tanto *in vivo* como *in vitro*, sendo que para a maturação *in vitro*, os oócitos podem ser recuperados pelas técnicas de aspiração folicular *post-mortem* ou pela técnica de *ovum pick up* (OPU) (HOSHI, 2003).

Durante a maturação oocitária, acontecem alterações nucleares e citoplasmáticas, conhecidas respectivamente como maturação nuclear e citoplasmática. No decorrer destes

[1] Universidade Federal do Espírito Santo, e-mail: lmsmvet@gmail.com;
[2] Universidade Federal do Espírito Santo, e-mail: almeidaicvet@gmail.com;
[3] Universidade Federal do Espírito Santo, e-mail: nara.merchid@ufv.br;
[4] Universidade Federal do Espírito Santo, e-mail: joseocneto@hotmail.com;
[5] Universidade Federal do Espírito Santo, e-mail: cbmvt@hotmail.com.

processos, ocorrem eventos complexos que dependem da dinâmica correta de separação cromossomial e retomada da meiose a partir do estágio de diplóteno da prófase I até a fase de metáfase II (MII). Além disto, é necessária a redistribuição das organelas citoplasmáticas, armazenamento de RNA e síntese proteica. (WATSON, 2007).

Dentre estes fatores, a transcrição de RNA e a tradução de proteínas, são fundamentais para fertilização o desenvolvimento embrionário inicial. Estes transcritos serão utilizados até a ativação do genoma embrionário, o que em bovinos, ocorre em um embrião de aproximadamente 8 células (MEIRELLES et al., 2004).

Todos os conhecimentos dos eventos fisiológicos relacionados a maturação oocitária, permitiram grandes avanços da produção *in vitro* de embriões, tornando esta biotecnologia amplamente utilizada. Portanto, o objetivo do presente trabalho é revisar os principais eventos e alterações celulares que ocorrem durante a maturação oocitária bovina e aquisição de competência meiótica.

2 OOGÊNESE E FOLICULOGÊNESE

A oogênese refere-se à sequência de eventos em que as células germinativas primordiais diferenciam-se em ovogônias, a qual dará origem aos oócitos primários e secundários, terminando com a fecundação do oócito maturo (HAFEZ, 2004). A diferenciação das células da linhagem germinativa (CGP) feminina ocorre quase inteiramente na fase embrionária/fetal, podendo ocorrer variações entre as espécies (GONÇALVES; FREITAS; FIGUEIREDO, 2008).

As CGP migram do epitélio do saco vitelínico para as cristas genitais colonizando as gônadas em formação (VAN DEN HURK; ZHAO, 2005). Em ruminantes, esse evento ocorre por volta do 20° e 30° dia de gestação. As CGP, no interior do ovário, multiplicam-se ativamente, diferenciando-se em ovogônias (MCLAUGHLIN; MCIVER, 2009).

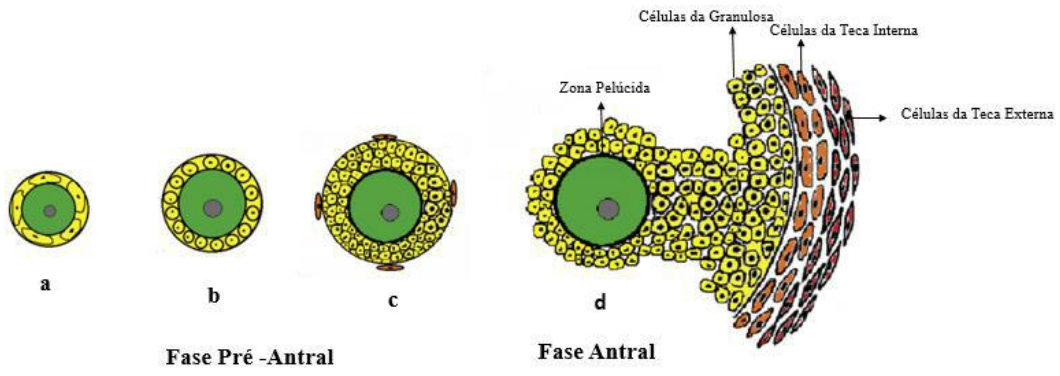
A transformação da ovogônia em oócito é marcada pela replicação final do DNA durante o estágio de pré-leptóteno. Os oócitos passam então, pelos estágios da prófase I (leptóteno, zigóteno, paquíteno e diplóteno) da primeira divisão meiótica. Ao atingir o estágio de diplóteno ou vesícula germinativa da prófase I, ocorre a primeira interrupção da divisão meiótica e formação dos oócitos primários, que permanecem neste estágio até a puberdade (VAN DEN HURK; ZHAO, 2005).

O mecanismo de ativação para modificação dos folículos primordiais em folículos primários ainda não está totalmente elucidado. No entanto, acredita-se que ocorra a participação

de fatores inibitórios e estimulatórios de caráter sistêmico ou local, envolvidos na ativação e posterior crescimento do folículo, tais como: fatores de crescimento tumorais da família β (TGF-β), hormônio anti-mülleriano (AMH), ativinas, proteína morfogenética óssea-15 (BMP), fator do crescimento e diferenciação do tipo 9 (GDF-9), fator de crescimento de fibroblasto do tipo 2 (FGF-2), fator de crescimento epidermal (EGF), entre outros (VAN DEN HURK; ZHAO, 2005). De modo geral, esses fatores agem em receptores presentes nas células da granulosa do oócito, estimulando a proliferação e diferenciação desse tipo celular no folículo (SILVA; VAN DEN HURK; FIGUEIREDO, 2016).

Após a ativação, os folículos primordiais, progridem para folículos primários, secundários, caracterizando a fase de crescimento folicular pré-antral (WANDJI; FORTIER; SIRARD, 1992) (Figura 1). Durante a fase pré-antral são formadas estruturas que se projetam para dentro do oócito, permitindo a sua comunicação com as células que o envolvem, as chamadas junções gap. Essas comunicações permitem o transporte bidirecional de íons, metabólitos, aminoácidos, glicose, nucleotídeos e pequenas moléculas reguladoras para o crescimento do oócito (GILCHRIST; LANE; THOMPSON, 2008).

Figura 1 – Esquema representativo da foliculogênese em bovinos, elucidando as fases pré-antral e antral, sendo: a) Folículo Primordial, b) Folículo Primário, c) Folículo Secundário e) Folículo Terciário.



Fonte: Silva, Van Den Hurk e Figueiredo (2016).
Nota: adaptado pelo autor.

Os folículos primários possuem diâmetro de cerca de 100 µm apresentando oócito esférico, com aproximadamente 30 µm, uma única camada de células da pré-granulosa, de formato cuboide e início da formação da zona pelúcida (LIMA-VERDE; ROSSETTO; FIGUEIREDO, 2011). Os folículos secundários possuem duas ou mais camadas de células da

granulosa também em formato cuboide, medindo cerca de 200 μm de diâmetro ou mais, zona pelúcida espessa e células da teca interna formadas (SANTOS et al., 2013).

Com o desenvolvimento e organização das células da granulosa em diversas camadas, após a formação dos folículos secundários, tem início a formação do antro, dando origem aos folículos terciários e a chamada fase antral. O fluido folicular que preenche esta cavidade contém água, eletrólitos, proteínas séricas e alta concentração de hormônios esteroides secretados pelas células da granulosa (BARNETT et al., 2006).

3 MATURAÇÃO NUCLEAR

O processo de aquisição da competência de um oócito está relacionado a sua capacidade de sofrer alterações, entre elas a maturação nuclear, que em mamíferos, refere-se à progressão da meiose a partir do estádio dictiato (diplóteno da prófase da primeira meiose - prófase I) até a fase de metáfase II (MII) (WATSON, 2007).

Uma complexa cascata de eventos está envolvida na retomada da meiose em mamíferos de forma que, a ação das proteínas denominadas: Fator promotor de meiose (MPF), Proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPK), Proteína quinase A (PKA) e as concentrações de monofosfato adenil ciclase (AMPc) são os componentes encarregados pelo início da maturação oocitária (GORDO et al., 2001).

Sob a influência dos picos de hormônio luteinizante (LH), o oócito recomeça seu ciclo celular com a progressão meiótica. Esse hormônio se liga aos receptores presentes nas células da granulosa, levando a ativação da uma enzima amplificadora chamada adenilato cilase, que transforma (adenosina trifosfato) ATP em AMPc. Isso provoca um aumento nos níveis, os de AMPc intracelular. Estimulando atividade à produção de fator de crescimento epidermal (EGF), consequente ativação de MAPK. A MAPK promoverá então o rompendo as junções gap oocitária, com quebra da comunicação entre células do cumulus e o oócito, ocorrendo assim, a diminuição nos níveis intracelulares de AMPc (KAWAMURA et al., 2011).

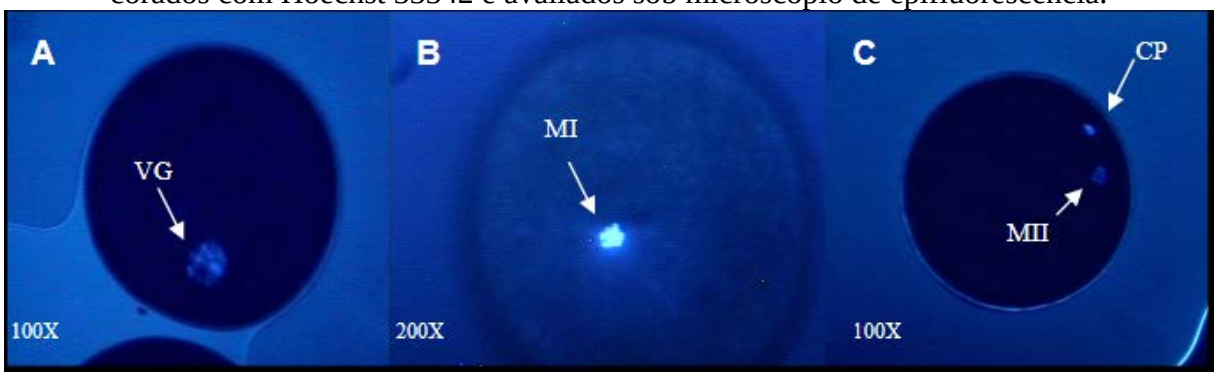
Além da diminuição nos níveis de AMPc, também ocorre aumento nas concentrações de cálcio (Ca^{2+}) gerados pelo pico de LH. Ambos os componentes estimulam a síntese de ciclinas e, possivelmente, de outras proteínas do ciclo celular (ROSE et al., 2013). É proposto que essas modificações das ciclinas sejam os fatores requerentes para a ativação completa do MPF, sendo esse o componente crucial para a retomada da meiose. (VAN DEN HURK; ZHAO, 2005).

O MPF é um dos principais reguladores das alterações que ocorrem durante a maturação oocitária, regulando a condensação dos cromossomos, o rompimento do envelope nuclear, a reorganização do citoesqueleto e algumas alterações em organelas citoplasmáticas. As MAPK também têm sua atividade requerida nessa fase, auxiliando a manutenção da atividade do MPF, formação do fuso meiótico e a preservação da parada da meiose em metáfase II (TROUNSON; ANDERIESZ; JONES, 2001).

Na sequência, após o rompimento da VG, os cromossomos homólogos são divididos em dois grupos, sendo que metade do número de cromossomos permanece no oócito, formando então uma célula haploide e a outra metade é incorporada ao primeiro corpúsculo polar (FIGURA 2). Com o término da maturação nuclear, o oócito permanece nesse estágio do ciclo celular (MII) até a fecundação (MAYES; SIRARD, 2001).

Com a fecundação, o oócito faz a segunda retomada da meiose, completando sua divisão meiótica, integração do material genético do espermatozoide e liberação do segundo corpúsculo polar. Forma-se então o zigoto (FIGURA 3), o qual após a primeira clivagem origina o embrião (CHOHAN; HUNTER, 2004).

Figura 2 – Fotomicrografia de diferentes fases da maturação nuclear de oócitos bovinos corados com Hoechst 33342 e avaliados sob microscópio de epifluorescência.



Fonte: Gottardi (2009).

Nota: Adaptado pelo Autor. A) Oócitos em VG; B) Oócitos em metáfase I; C) Oócitos em metáfase II: destacando cromossomos condensados na placa metafásica e liberação do primeiro corpúsculo polar (CP).

4 MATURAÇÃO CITOPLASMÁTICA

Os complexos eventos que ocorrem durante a maturação oocitária dependem não só da dinâmica de separação dos cromossomos durante a maturação nuclear, mas também de diversos eventos que ocorrem no citoplasma do oócito. Dentre estes eventos, podemos destacar a

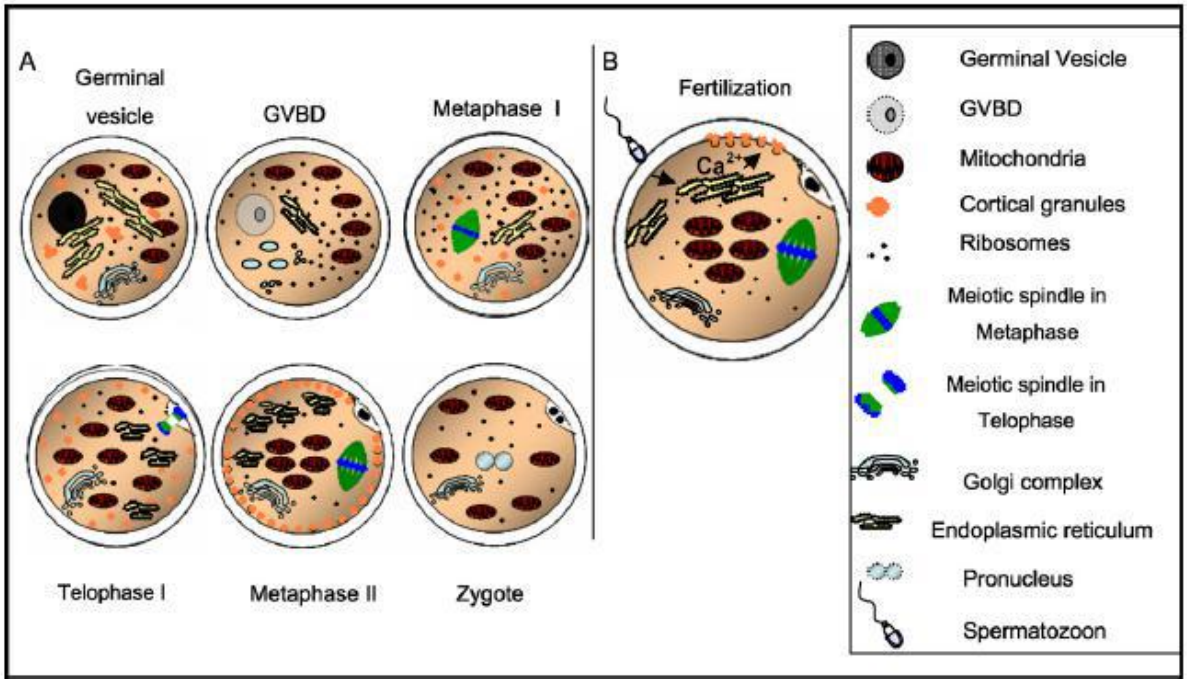
redistribuição das organelas citoplasmáticas, armazenamento de RNAm e tradução de proteínas (MEIRELLES et al., 2004).

A ativação de vias metabólicas envolvidas nos processos de síntese de proteínas é indispensável para a ocorrência da maturação citoplasmática. Dentro deste contexto, as mitocôndrias possuem papel extremamente importante, sendo o componente metabólico responsável pelo fornecimento da energia que é consumida durante o processo de maturação (KRISHER; BAVISTER, 1998).

Dessa forma, durante a maturação citoplasmática, as mitocôndrias se deslocam a partir da região periférica (onde se encontram na fase de VG) para a região central na fase de MII (FIGURA 3). Esta movimentação ocorre, para que ocorra uma aproximação das mitocôndrias para as áreas de alto consumo de energia, fornecendo o ATP necessário para síntese proteica e outras reações (STOJKOVIC et al., 2001). *In vitro*, a migração mitocondrial ocorre após aproximadamente 12 a 18 horas de cultivo, sendo semelhante ao que ocorre *in vivo*, com aproximadamente 19 h após a o pico de LH (HYTTEL et al.,1997).

A síntese de proteínas que ocorre durante a maturação oocitária é indispensável não só para oócito, mas também para a formação de zigoto e embriogênese. Para este fim, uma adequada quantidade de ribossomos deve estar presente durante a maturação (TOMEK; TORNER; KANITZ, 2002). Para isso, ocorrem modificações na quantidade ribossomal durante o avanço do processo de maturação (HYTTEL et al., 2001).

Figura 3 – Visão esquemática da distribuição das organelas citoplasmáticas durante a maturação, fecundação e formação do zigoto bovino. A. Progressão nuclear da maturação e movimentação de organelas citoplasmática a partir da fase de VG para o estágio de MII e formação do zigoto. B. Distribuição do mecanismo de libertação do conteúdo dos grânulos corticais, secundária a liberação de cálcio intracelular (Ca2 +) após a entrada do espermatozoide no oócito durante a fecundação.



Fonte: Ferreira et al. (2009).
Nota: Adaptado pelo Autor.

O nucléolo é o local no núcleo das células eucariontes, onde são formadas as subunidades ribossomais. O oócito de um folículo primordial está transcricionalmente em repouso e o nucléolo é composto exclusivamente por uma porção granular, sinalizando uma ausência de subunidades ribossomais, que reflete na não existência de síntese proteica (FAIR et al., 2001). Durante as fases de crescimento folicular e ativação do genoma embrionário, o nucléolo se modifica, apresentando-se na forma fibrinogranular, refletindo em uma elevada atividade de síntese de subunidades ribossomais e, portanto, síntese de proteínas (TOMEK; TORNER; KANITZ, 2002).

Além da atividade mitocondrial, e ribossômica, outras organelas apresentam papéis importantes na maturação citoplasmática. Estudos em roedores (FITZHARRIS; MARANGOS; CANROLL, 2007), seres humanos (MANN; LOWTTER; MENLMANN, 2010) e bovinos (PAYNE; SCHATTER, 2003), mostraram a importância de modificações que ocorrem em retículo endoplasmático (RE) e grânulos corticais (GC).

Alterações bioquímicas e estruturais sofridas pelo RE durante o processo de maturação são críticas para o adequado funcionamento da célula, promovendo a regulação dos níveis de Ca^{2+} intracelular (LIPPINCOTT-SCHWARTZ et al., 2000).

Nos oócitos de bovinos como de outros mamíferos, o RE na fase de VG está uniformemente distribuído por todo o citoplasma, com a progressão da maturação, no estágio de MII, o mesmo sofre redistribuições, localizando-se então na região cortical e formação de alguns pequenos aglomerados pelo citoplasma (FITZHARRIS; MARANGOS; CARROEL, 2007; KLINE, 2000).

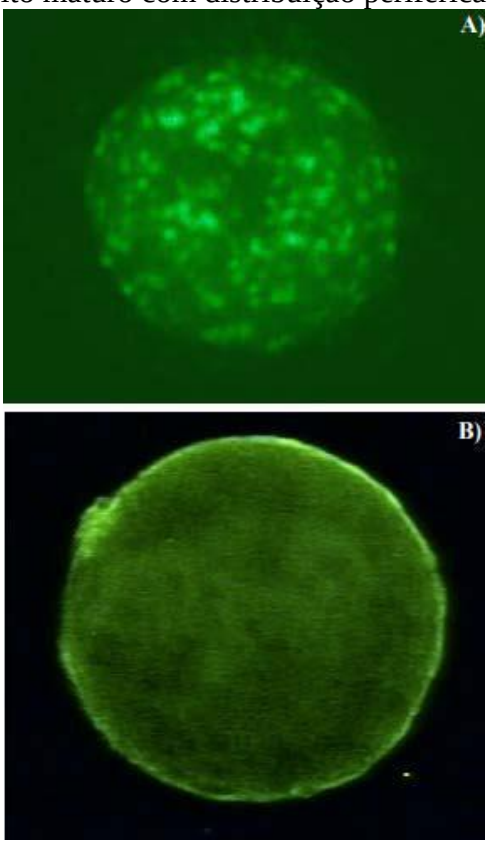
A formação desses aglomerados ocorre de forma estratégica, de maneira a promover uma maior liberação de Ca^{2+}, já que no processo de fecundação, a entrada do espermatozoide no oócito leva a uma liberação marcada desse íon pelo RE, na etapa de bloqueio lento a polispermia (DUMOLLARD et al., 2002).

Além da importância da liberação de Ca^{2+}, na fecundação, os GC também atuam de forma a auxiliar o bloqueio à polispermia. Os GC presentes no ooplasma são denominados vesículas secretoras não renováveis, produzidos a partir do Complexo de Golgi, e encontrados em todos os mamíferos (STRICKER, 2006). Seu conteúdo é constituído de uma população variada de moléculas que inclui proteases, enzimas, glicosaminoglicanos, proteínas estruturais, entre outras.

Durante o processo de maturação, os GC que estão localizados centralmente no citoplasma, migram e passam a se instalar na periferia do ooplasma. Dessa forma, quando o oócito atinge o estágio de MII, os GC estão distribuídos no córtex, próximos à membrana plasmática (FIGURA 4) (ADONA et al., 2008). No momento da fecundação, uma cascata sinalizadora se desenvolve, sendo esta responsável pela exocitose dos GC e liberação do seu conteúdo, promovendo assim, modificações na zona pelúcida (ZP) e desencadeamento da reação cortical (WANG; DAY; WU, 2003). Esses eventos contribuem, para o bloqueio lento a polispermia (HOSOE; SHIOYA, 1997).

Toda essa movimentação das organelas é realizada pelos microtúbulos do citoesqueleto, que são estruturas dinâmicas e adaptáveis que podem permanecer inalterados ou se submeterem a modificações de acordo com as necessidades da célula. Pela ação desses microtúbulos é formado o sistema responsável pela segregação cromossômica que ocorre durante a maturação nuclear, assim como a estática que auxilia na reorganização de organelas durante a maturação citoplasmática (SUN; SCHATTEN, 2006).

Figura 4 – Fotomicrografia da distribuição dos GC de oócitos bovinos observados sob microscópio de epifluorescência (aumento 200×). A) Oócito imaturo com distribuição geral dos GC. B) Oócito maturo com distribuição periférica dos GC.



Fonte: Gottardi (2009).
Nota: Adaptado pelo Autor.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A maturação oocitária ainda apresenta diversos mecanismos que não estão bem elucidados. Desta forma, diversos estudos encontram-se em andamento, na busca de uma melhor compreensão de todos os mecanismos envolvidos neste processo.

O incentivo as pesquisas têm sido fundamentais para o avanço das descobertas, sejam essas em aspectos básicos do oócito e de biologia folicular, como o fornecimento de informações mais avançadas sobre a regulação das vias moleculares, metabólicas, bioquímica e de síntese proteica que são determinantes para a correta progressão meiótica.

6 REFERÊNCIAS

ADONA, P. R. et al. Prematuration of bovine oocytes with butyrolactone I: Effects on meiosis progression, cytoskeleton, organelle distribution and embryo development. Gottardi e Mingoti. **Animal Reproduction Science**, v. 108, p. 49-56, 2008.

BARNETT, K. R. et al. Ovarian follicle development and transgenic mouse models. **Human Reproduction Update**, v. 12, p. 537-355, 2006.

CHOHAN, K. R.; HUNTER, A. G. *In vitro* maturation, fertilization and early cleavage rates of bovine fetal oocytes. **Theriogenology**, v. 61, p. 373-380, 2004.

DUMOLLARD, R. et al. Calcium wave pacemakers in eggs, **Journal of Cell Science**, v. 115, p. 3557-3564, 2002.

FAIR, T. et al. Immunolocalization of nucleolar proteins during bovine oocyte growth, meiotic maturation and fertilization. **Biology of Reproduction**, v. 64, p. 1512-1526, 2001.

FERREIRA, E. M. et al. Cytoplasmic maturation of bovine oocytes: Structural and biochemical modifications and acquisition of developmental competence. **Theriogenology**, v. 71, p. 836-848, 2009.

FITZHARRIS, G.; MARANGOS, P.; CARROLL, J. Changes in endoplasmic reticulum structure during mouse oocyte maturation are controlled by the cytoskeleton andcytoplasmic dynein. **Developmental Biology**, v. 305, p. 133-144, 2007.

GILCHRIST, R. B.; LANE, M.; THOMPSON, J. G. Oocyte-secreted factors: regulators of *cumulus* cell function and oocyte quality. **Human Reproduction Update**, v. 14, p. 159-177, 2008.

GONÇALVES, P. B. D.; FREIRAS, V. J. F.; FIGUEIREDO, J. R. **Biotécnicas aplicadas a reprodução animal**. 2. ed., São Paulo: Editora Roca, 2008. 395p.

GORDO, A. C. et al. Mitogen activated protein kinase plays a significant role in metaphase II arrest, spindle morphology, and maintenance of maturation promoting factor activity in bovine oocytes. **Molecular Reproduction and Development**, v. 59, p. 106-114, 2001.

GOTTARDI, F. P. **Inibição da maturação nuclear pela Butirolactona I durante o transporte de oócitos bovinos destinados à produção in vitro de embriões (PIV)**. 2009. 74 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal, 2009.

HAFEZ, E. S. E. **Reprodução Animal**. 7. ed., São Paulo: Editora Manole, 2004. 513p.

HOSHI, H. In vitro production of bovine embryos and their application for embryo transfer. **Theriogenology**, v. 59, p. 675-685, 2003.
HYTTEL, P. et al. Oocyte growth, capacitation and final maturation in cattle. **Theriogenology**, v. 47, p. 23-32, 1997.

HYTTEL, P. et al. Ribosomal RNA gene expression and chromosome aberrations in bovine oocytes and preimplantation embryos. **Reproduction**, v. 122, p. 21-30, 2001.

HOSOE, M.; SHIOYA, Y. Distribution of cortical granules in bovine oocytes classified by cumulus complex. **Zygote**, v. 5, p. 371-376, 1997.

KAWAMURA, K. et al. Pre-ovulatory LH/hCG surge decreases C-type natriuretic peptide secretion by ovarian granulosa cells to promote meiotic resumption of pre-ovulatory oocytes, **Human Reproduction**, v. 26, p. 3094–3101, 2011.

KLINE, D. Attributes and dynamics of the endoplasmic reticulum in mammalian eggs. Curr Top. **Developmental Biology**, v. 50, p. 125-154, 2000.

KRISHER, R. L.; BAVISTER, B. D. Responses of oocytes and embryos to the culture environment. **Theriogenology**, v. 59, p. 103-114, 1998.

LIMA-VERDE, I. B.; ROSSETTO, R.; FIGUEIREDO, J. R. Influência dos hormônios esteroides na foliculogênese. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 35, p. 472-482, 2011.

LIPPINCOTT-SCHWARTZ, J. et al. Protein trafficking and organelle dynamics in living cells. **Annual Review of Cell and Developmental Biology**, v. 16, p. 557-589, 2000.

MANN, J. S.; LOWTHER, K. M.; MEHLMANN, L. M. Reorganization of the endoplasmic reticulum and development of Ca2+release mechanisms during meiotic mat-uration of human oocytes. **Biology of reproduction**, v. 10, n. 83, p. 578–83, 2010.

MAYES, M.; SIRARD, M. A. The influence of cumulus-oocyte complex morphology and meiotic inhibitors on the kinetics of nuclear maturation in cattle. **Theriogenology**, v. 55, p. 911-922, 2001.

MCLAUGHLIN, E. A.; MCIVER, S. Awakenig the oocyte: controlling primordial follicle development. **Reproduction**, v. 137, p. 1-11, 2009.

MEIRELLES, F. V.et al. Genome activation and developmental block in bovine embryos. **Animal Reproduction Science**, v. 82, n. 83, p. 13-20, 2004.

PAYNE, C.; SCHATTEN, G. Golgi dynamics during meiosis are distinct from mitosis and are coupled to endoplasmic reticulum dynamics until fertilization. **Developmental Biology**, v. 264, p. 50-63, 2003.

ROSE, R. D. et al. Regulation of sheep oocyte maturation using cAMP modulators. **Theriogenology**, v. 9, p. 1-20, 2013.

SANTOS, S. S. D. et al. Characterization of folliculogenesis and the occurrence of apoptosis in the development of the bovine fetal ovary. **Theriogenology**, v. 79, p. 344-350, 2013.

SILVA, J. R. V.; VAN DEN HURK, R.; FIGUEIREDO, J. R. Ovarian follicle development in vitro and oocyte competence: advances and challenges for farm animals. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 55, p. 123-135, 2016.

STOJKOVIC, M. et al. Mitochondrial distribution and adenosine triphosphate content of bovine oocytes before and after in vitro maturation: correlation with morphological criteria and developmental capacity after in vitro fertilization and culture. **Biology of Reproduction**, v. 64, p. 904-909, 2001.

STRICKER, S. A. Structural reorganizations of the endoplasmic reticulum during egg maturation and fertilization. In: **Seminars in cell & developmental biology**. Academic Press, 2006. p. 303-313.

SUN, Q. Y.; SCHATTEN, H. Regulation of dynamic events by microfilaments during oocyte maturation and fertilization. **Reproduction**, v. 131, p. 193-205, 2006.

TOMEK, W.; TORNER, H.; KANITZ, W. Comparative analysis of protein synthesis, transcription and cytoplasmic polyadenylation of mRNA during maturation of bovine oocytes in vitro. **Reproduction Domestic Animals**, v. 37, p. 96-91, 2002.

TROUNSON, A.; ANDERIESZ, C.; JONES, G. Maturation of human oocytes in vitro and their developmental competence. **Reproduction**, v. 121, p. 51-75, 2001.

VAN DEN HURK, R.; ZHAO, J. Formation of mammalian oocytes and their growth, differentiation and maturation within ovarian follicles. **Theriogenology**, v. 63, p. 1717-1751, 2005.

WANDJI, S. A.; FORTIER, M. A.; SIRARD, M. Differential response to gonodotrophins and prostaglandin E2 in ovarian tissue during prenatal and postnatal development in cattle. **Biology of Reproduction**, v. 46, p. 1034-1041, 1992.

WANG, W.; DAY, B. N.; WU, G. How does polyspermy happen in mammalian oocytes? **How does polyspermy happen in mammalian oocytes**, v. 61, n. 4, p. 335-341, 2003.

WATSON, A. J. Oocyte cytoplasmic maturation: a key mediator of oocyte and embryo developmental competence. **Journal Animal of Science**, v. 85, p. 1-13, 2007.

Capítulo

23

Espermatogênese e fatores que podem alterar a produção e qualidade de sêmen em touros

Amanda Pereira dos Anjos[1]
Nara Clara Lazaroni e Merchid[2]
Thadeu de Castro[3]
Fabrício Albani Oliveira[4]
Alessandra Cunha Lopes[5]

1 INTRODUÇÃO

Dentre os elementos mais importantes para viabilidade econômica na pecuária bovina a reprodução destaca-se como a mais importante. Além de uma genética favorável, para se obter um ótimo desempenho reprodutivo, é necessário, boas condições nutricionais e de sanidade, assim como instalações e manejo adequado (CHRISTOVÃO; FREITAS, 2012).

O desempenho reprodutivo do touro é o fator de maior influência na fertilidade do rebanho, pois espera que um touro acasale com no mínimo 25 fêmeas (FRANCO; FONSECA; GASTE, 2006). Ao mesmo tempo, o touro é o responsável pelo maior ganho genético do

[1] Universidade Federal do Espírito Santo, e-mail: amandaveterinaria@gmail.com;
[2] Universidade Federal do Espírito Santo, e-mail: naramerchid@hotmail.com;
[3] Universidade Federal do Espírito Santo, e-mail: thadeudecastro@hotmail.com;
[4] Instituto Federal do Espírito Santo, e-mail: fabricio.oliveira@ifes.edu.br;
[5] Instituto Federal do Espírito Santo, e-mail: alessandra.lopes@ifes.edu.br.

rebanho, devido a possibilidade de um animal com alto valor genético se tornar pai de maior número de produtos (FRANCO; FONSECA, GASTE, 2006), além do fato de que o conhecimento da aptidão sexual dos reprodutores é princípio básico na produção de sêmen bovino (CHRISTOVÃO; FREITAS, 2012).

Outro aspecto importante a ser considerado é a subutilização dos reprodutores de alta fertilidade, sendo que alguns destes animais têm capacidade de cobrir um número maior de fêmeas. A utilização consciente dos reprodutores permite a minimização do número de touros em uma propriedade, possibilitando a redução de custos com machos, permitindo a mantença de uma fêmea produtiva em seu lugar (FRAGNANI et al., 2011).

Além das características, tais como comportamento sexual, habilidade de monta e interação social durante o acasalamento (CHENOWETH, 1983), o desempenho reprodutivo pode ser comprometido por fatores como estresse, temperatura, peso, idade e fatores nutricionais (HAFEZ, 1982) que irão levar a atrasos no desenvolvimento do aparelho genital, crescimento do animal e início da puberdade (MARTIN et al., 2010) bem como interferir na espermatogênese desse animal, consequentemente na qualidade do sêmen (HAFEZ, 1982).

O comprometimento na formação das células germinativas desencadeará uma baixa concentração espermática, baixa motilidade, e maior quantidade de defeitos morfológicos nos espermatozóides ejaculados desses animais acometidos (WENKOFF, 1989).

Variações raciais afetam de forma direta o perímetro escrotal (CYRILLO et al., 2001), idade de entrada na puberdade (GUIMARÃES, 1993) e pré-disposição a estressantes ambientais (SANTIAGO, 2006).

Dessa forma, são necessárias medidas de prevenção, com realização periódica de avaliações andrológicas completas, adotadas em todos os rebanhos, com finalidade de evitar problemas de fertilidade no plantel (NUNES, 2001). Nesse capítulo será descrito como acontece à espermatogênese nos touros e fatores que podem interferir na produção e qualidade do sêmen.

2 ESPERMATOGÊNESE

A espermatogênese é o processo no qual acontece à produção dos espermatozoides nas células de Sertoli controlado pelo FSH (KUDRYAVTSEV; SAFRONOVA; KUDRYAVTSEV, 2003), que é dividida em duas fases: espermatocitogênese e espermiogênse (BALL; PETERS, 2006).

A primeira é o processo da divisão mitótica celular das espermatogônias que estão situadas na periferia dos lóbulos testiculares que vão até o lúmen conforme vão sofrendo as divisões, formando os espermatócitos primários. Posteriormente são formados os espermatócitos secundários, a partir da divisão meiótica, nos quais os cromossomos são reduzidos de diploide para haploide. Após essa divisão a partir de cada espermatócito secundário são formadas duas espermátides. A segunda fase, a espermiogênese, é caracterizada pela diferenciação das espermátides em espermatozoides, no qual acontecem condensação da cromatina nuclear, formação da cauda espermática ou aparelho flagelar, e desenvolvimento da cauda acrossomal (BALL; PETERS, 2006). Essa diferenciação acontece em quatros fases: Fase de golgi, fase de capa, fase de acrossomo, fase de maturação (KNOLBIL; NEIL, 1993).

2.1 FASE DE GOLGI

Nessa fase acontece a formação de grânulos proacrossomáticos com a junção dentro de apenas um grânulo acrossomático com aderência ao envelope nuclear e desenvolvimento da cauda do lado oposto ao da aderência. Por fim com migração do centríolo proximal, no qual será fixada a cauda à cabeça (HAFEZ, 1982).

2.2 FASE DE CAPA

Ocorrerá a difusão dos grânulos acrossomais que estão aderidos no núcleo da espermátide. Dois terços de cada núcleo da espermátide é recoberto por uma membrana fina de dupla camada que se adere ao envelope nuclear. Os axonemas da cauda que se desenvolvem que se formam através do centríolo distal, ultrapassam a periferia do citoplasma celular. A princípio o axonema aparenta-se com a estrutura de um cílio, constituído com a presença de dois túbulos centrais circundados perifericamente por nove pares de túbulos (HAFEZ; HAFEZ, 2004).

2.3 FASE DE ACROSSOMO

Modificações maiores acontecem nos núcleos, acrossomos, e nas caudas das espermátides. Acontece a rotação das espermátides, em que o acrossomo é voltado para a parede externa do túbulo seminífero e a cauda em direção ao lúmen. A cromatina dos núcleos se

condensam, e passam a ter um formato achatado e alongado. O acrossomo também sofrerá uma condensação e assumirá a mesma forma do núcleo (HAFEZ; HAFEZ, 2004).

De acordo com o mesmo autor, o citoplasma se direciona para a região caudal do núcleo, onde ele circunda a porção proximal da cauda. E que posteriormente seus microtúbulos irão se unir para formar uma bainha cilíndrica, o qual é direcionada para a parte caudal do acrossomo, nessa bainha está presente uma estrutura denominada corpo cromatóide que irá se condensar formando um anel, chamado de “annulus”. Que vai se formar primeiramente ao centríolo proximal e então durante o desenvolvimento haverá a migração para a cauda. A peça intermediária da cauda se formará a partir das mitocôndrias que são distribuídas através do citoplasma, que ficam próximas ao axonema, formando a bainha.

2.4 FASE DE MATURAÇÃO

Será caracterizada pela transformação das espermátides em espermatozoides, que serão conduzidas para luz dos túbulos seminíferos. A cromatina sofre condensação tornando-se homogênea e preenchendo todo o núcleo, com formação de uma bainha fibrosa com presença de nove fibras grosseiras formando-se ao redor do axonema que se associam aos nove pares de microtúbulos e continua no colo da peça de conexão da espermátide e que irá cobrir o axonema desde o “annulus" até o início da peça terminal (HAFEZ; HAFEZ, 2004).

O “annulus” irá migrar distalmente ao longo da cauda e vai separar a peça intermediária da peça principal da cauda. Vai formar uma bainha mitocondrial que cobre as fibras grosseiras que são depositadas desde o colo até o “annulus”. A maturação termina, no final da espermiogênese, no qual é formado um “corpúsculo residual”, provindo da célula de Sertoli devido ao desaparecimento da bainha fibrosa e a processos de divisões incompletas durante a espermatocitogênese (HAFEZ; HAFEZ, 2004).

Em seguida ocorrerá o evento de espermiação, que será a passagem das células germinativas para dentro do lúmen dos túbulos seminíferos, acompanhados do processo de fagocitose dos corpos residuais e células em degeneração pelas células de Sertoli (HAFEZ; HAFEZ, 2004).

3 FATORES QUE AFETAM A QUALIDADE SEMINAL

3.1 ESTRESSE, TEMPERATURA E MEIO AMBIENTE

O transporte inadequado, enfermidades infecciosas, processos inflamatórios, estresse calórico, privação de alimento e água fazem parte da relação de agentes estressores capazes de atuar sobre o eixo hipotálamo-hipofisário-gonadal e prejudicar seu perfeito funcionamento (DOBSON et al., 2001).

O estresse prolongado provoca quadros de degeneração testicular, podendo causar danos leves, ou até aplasia completa do epitélio seminífero, de acordo com o tempo e sua intensidade (BARTH; BO; TRIBULO 2000). Isso acontece, pois, a glândula adrenal será responsável por liberar excesso de cortisol, secundário ao estresse, o que irá reduzir a produção de hormônio luteinizante (LH) pela hipófise, e consequentemente levando a uma queda na produção de testosterona pelas células de Leydig (BERDUGO; AVELLA, 1994; HAFEZ, 1982).

Os mamíferos são animais homeotérmicos, isto é, possuem a capacidade de manter a temperatura corpórea constante, independente da variação ambiental. Para que isso ocorra alterações de âmbito metabólico e fisiológico são necessários, além de mudanças comportamentais, de forma a sustentar a homeostase e reduzir as implicações adversas oriundas da queda ou elevação da temperatura. Entretanto, elevada intensidade e persistência do estresse calórico de forma a ultrapassar as habilidades compensatórias dos animais, atingem de forma direta o bem-estar e funções não essenciais ao organismo, como produção e reprodução (BERTIPAGLIA, 2007). Os touros carecem de apresentar temperatura testicular entre 2 a 6 graus célsius inferior a corporal, e possuir temperatura média de 35.5, 34.6, 33.1 graus célsius respetivamente para cabeça, corpo e cauda do epidídimo (BRITO et al., 2002).

Em regiões de clima quente, o aumento da temperatura pode levar a redução da fertilidade do touro, devido à elevação da temperatura testicular depreciando assim o ciclo espermatogênico e consequentemente a qualidade do sêmen (ROBERTS, 1986). Diversos mecanismos podem ser responsabilizados pelos efeitos adversos causados pelo calor sobre as células espermatogênicas (RAHMAN et al., 2011). De acordo com Spitzar (2000) temperaturas elevadas causam hipóxia testicular, em reflexo do aumento do metabolismo exigido no mecanismo de perda de calor, concomitantemente maior necessidade de oxigênio associado à manutenção do fluxo sanguíneo.

Com a formação da hipóxia observa-se disfunção mitocondrial, que passa a produzir espécimes reagentes a oxigênio (ROS) assim que a oferta de oxigênio é reestabelecida e as

mitocôndrias retornam a suas funções (WILHELM FILHO et al., 2004). O excesso de ROS causa danos à qualidade do sêmen, aumenta a porcentagem das patologias morfológicas espermáticas maiores e totais, interferindo na capacidade fecundante dos espermatozoides (ANDRADE et al., 2010; HAMILTON et al., 2016). Rahman et al. (2011) observaram que o aumento da temperatura testicular de touros afetou principalmente espermatozoides que estavam em estágios de meiose e espermiogênese, devido à ocorrência de defeitos na remodelação da cromatina, que podem estar relacionados à falta de protaminação do DNA.

Animais expostos a estresse térmico possuem propensão em apresentar degeneração testicular leve ou moderada. Mesmo após o restabelecimento dessa condição e consequentemente o retorno à espermatogênese, será produzido espermatozoides de baixo potencial fertilizante podendo haver elevada incidência de mortalidade embrionária (BURFENING; ULBERG, 1968). Para Brito (2007), a forma mais amena de degeneração testicular não irá fornecer sintomatologias que possam ser simples de identificar, e se expressa através do aumento da fabricação de espermatozoides morfologicamente anormais.

O sêmen do animal comprometido apresentará baixa concentração espermática, baixa motilidade e número moderado de células com defeitos morfológicos, como gotas protoplasmáticas proximais, diadema, vacúolos e outros defeitos nucleares (WENKOFF, 1989).

3.2 FATORES NUTRICIONAIS

A nutrição está diretamente ligada à função endócrina no animal. Uma alimentação deficiente causa retardo no crescimento dos testículos, estes por sua vez, são responsáveis pela produção de hormônios androgênicos, principalmente a testosterona que é o hormônio responsável pelas caraterísticas masculinas, libido, desenvolvimento e funcionamento das glândulas acessórias. Sendo assim, haverá supressão da atividade hormonal, retardando também a puberdade, seu crescimento e produção de espermatozoides (CHACÓN; PÉREZ; RODRÍGUEZ – MARTÍNEZ, 2002). A alimentação com baixos níveis de energia, proteínas, vitaminas e minerais vão diminuir a produção de testosterona e consequentemente a libido (BARTH; BO; TRIBULO, 2000).

A espermatogênese é influenciada pelo estado de nutrição. No período de crescimento, as deficiências alimentares atrasam o desenvolvimento do aparelho genital e o início da puberdade (MARTIN et al., 2010).

A dieta atua na síntese e concentração de hormônios e em outros metabólitos relacionados à reprodução (ROBINSON et al., 2006). De acordo com Scaramuzzi e Murray

(1994) a nutrição está intimamente envolvida no processo de gametogênese dos animais, com melhora na eficiência reprodutiva.

Receptores de insulina estão presentes no hipotálamo (BLACHE; ADAM; MARTIN, 2002), sendo responsáveis por desempenhar um papel importante na reprodução, atuando na regulação da síntese de neurotransmissores de hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH) e, consequentemente, controlando a secreção das gonadotrofinas, principalmente a liberação de LH pela hipófise, juntamente aos fatores de crescimento semelhante à insulina do tipo I e II (IGF-I e IGF-II) (KAWAUCHI; SOWER, 2006).

Touros bem nutridos tiveram frequência de pulsos de LH mais precocemente, atingindo um pico de maior magnitude que aqueles submetidos à dieta deficiente, elevando dessa forma a concentração de testosterona compreendendo uma maior resposta ao GnRH e elevado nível de IGF-I (DANCE et al., 2015). Inferiu-se que o IGF-I relaciona-se com a regulação do aumento precoce de gonadotropina (LH), sugerindo que o primeiro pode estar potencializando o efeito gonadotrófico agindo como um mensageiro do estado nutricional ao hipotálamo, uma vez que durante o devenvolvimento sexual os receptores de IGF-I nos hipotálamos aumentam em número, e por afetar diretamente a células somáticas dos testículos. O LH parece não ser um fator mitogênico direto para as células de Leydig, mas em vez disso, age por meio do IGF-I (DANCE et al., 2015).

Kendall et al., (2000) observaram benefícios de uma alimentação rica em minerais superiores (Zn, Co, e SE) na motilidade dos espermatozoides, porcentagem de espermatozoides vivos e integridade da membrana espermática em ovinos. Deficiência de vitaminas (ROBINSON et al., 2006), toxicidades de metais pesados, ou desequilíbrios em aminoácidos essenciais ou ácidos graxos, têm sido conhecidos por afetar a função reprodutiva masculina negativamente (LEATHAM, 1975).

Para bom desenvolvimento do touro a dieta deve ter energia e teor de proteínas adequado, além de correta suplementação mineral. Estudos têm demonstrado que a espermatogênese em carneiros é sensível ao aumento de ingestão de proteínas. A produção de sêmen, bem como o número total de espermatozóides por ejaculação, pode ser influenciada pelo aumento do consumo de alimentos (TUFARELLI et al., 2011). Já é de conhecimento que o nitrogênio das proteínas e elementos nitrogenados não proteicos fornece o material nitrogenado para a formação das bactérias e protozoários da flora microbiana do rúmen, que constituem a base de aminoácidos dos ruminantes (MARTIN et al., 2010).

Prada (2005) cita que a carência quantitativa de proteínas e, principalmente, no que se refere aos aminoácidos, como a lisina e o triptofano, provocava a formação de espermatozoides

anormais, motilidade diminuída, atingindo, às vezes, até a azoospermia. A quantidade de energia disponível para a reprodução depende da diferença entre a quantidade de energia gasta, incluindo as exigências para manutenção, e o conjunto de energia produzida. A energia disponível inclui a energia derivada da ingestão de alimentos, mais a energia armazenada no organismo, tecidos, especialmente o tecido adiposo, fígado e músculo. Animais com alimentação mais rica em energia e metabolicamente saudável possuem elevados níveis de glicose, insulina e IGF-I, provocando a secreção de GnRH, o que por sua vez aumenta a síntese e liberação de LH (SCHILLO, 1992).

3.3 EFEITO DA IDADE E PESO

A espermatogênese relaciona-se diretamente com a idade do animal. Bezerros recém-nascidos possuem no tecido testicular apenas células germinativas primordiais ou gonócitos. As células de Leydig primitivas são desenvolvidas durante o período fetal e degeneram aproximadamente 8 semanas após o nascimento, sendo substituidas por células de Leydig adultas que tem seu número abruptamente aumentado até a 30° semana de idade (WROBEL, 1990).

Células indiferenciadas de Sertoli proliferam a partir de 4° até 20° semanas após o nascimento, estas células se diferenciam em células de Sertoli madura (ORTH, 1984). Os tamanhos dos tubulos seminíferos relacionam-se com o tamanho dos testículos e o número de células de Sertoli. Em touros, a multiplicação de células de Sertoli cessa entre a 20° e 25º semanas de idade (BAGU et al., 2004). A maturação de células de Sertoli chega ao fim aproximadamente na 40° semana de idade (BAGU et al., 2006).

O perimetro escrotal é fortemente relacionado à prematuridade sexual do touro (ARIAS; MANUNTA; SLOBODZIAN, 1991), seu desenvolvimento acontece linearmente até próximo a 18 meses de idade (SESENA et al., 2007) ou cerca de 300 kg (LARREAL et al., 1988).

Em touros, a puberdade é comumente definida como o momento em que a circunferência escrotal (CE) é de pelo menos 28 cm, concentração de ejaculado de pelo menos 50 milhões de espermatozóides / mL, 10% de espermatozoides progressivamente móveis, e maturação sexual é definida como o primeiro momento em que a ejaculação consiste em 70% de espermatozóides morfologicamente normais (WOLF; ALMQUIST; HALE, 1965).

Touros que possuem acesso a boa nutrição durante a estação reprodutiva obtiveram aumento das concentrações séricas de colesterol (GRESSLER et al., 2015), contribuindo para o ganho de peso (DANCE et al., 2015; GOTTARDI et al., 2014; GRESSLER et al., 2015;

TUFARELLI et al., 2011) e aumento do escore de condição corporal (ECC), o que consequentemente leva a um melhor desempenho reprodutivo (GOTTARDI et al., 2014). Animais que apresentam bom escore corporal possuem elevadas concentrações séricas de LH quando comparado a animais magros (GIL, 2003). Possivelmente a restrição alimentar estendida proporciona uma supressão da liberação de GnRH, o que culmina em menor estimulo na hipófise e consequentemente secreção de LH diminuída (DENNISTON et al., 2003). Quando a deficiência alimentar é duradoura induzindo a perda de massa corporal de mais 30%, o animal terá comprometimento da libido, podendo não expressar interesse sexual (PARKER; THWAITES, 1972).

3.4 VARIAÇÕES RACIAIS

Assim como fatores genéticos individuais, sabe-se que raças ou subespécies apresentam algumas caraterísticas sexuais e comportamentais próprias. Animais da raça zebuína possuem termorregulação escrotal e corporal mais eficiente, pois exibem ampla superfície de pele e maior número de glândulas sudoríparas quando se comprado a raças taurinas, tornando-os resistentes ao estresse calórico (SANTIAGO, 2006).

Animais das raças zebuínas possuem concentração espermática inferior aos touros taurinos, tendendo a apresentarem concentrações ainda menores na época das águas (ANCHIETA et al., 2005).

Reis (2013) observou comprimento e largura maiores nos testículos, assim como maiores epidídimos em touros das raças taurinas. Além disso, houve a variação do eixo do comprimento testicular nas diferentes subespécies em diferentes estações do ano, levando a crer que tal variação está relacionada com a adaptação e plasticidade anatômica dos testículos. Nos zebuínos o volume testicular é maior na época chuvosa, possibilitando uma maior facilidade do testículo em realizar trocas de temperatura, conseguida através volumetria testicular.

Considerando as características seminais é observada uma motilidade diminuída na estação de seca, seguida de defeitos de morfologia espermática totais maiores em taurinos durante a fase de chuvas, além de maior volume do ejaculado, provavelmente devido ao tamanho das glândulas sexuais acessórias, às quais são anatomicamente maiores nesses animais, colaborando com uma expressiva parte do volume seminal (REIS, 2013).

Animais de raças taurinas, por terem sido selecionados e adaptados a ambientes de clima temperado, são menos resistentes a temperaturas elevadas, sendo mais susceptível a degeneração testicular. Demostrando que existem raças que são mais predispostas a sofrerem

com agentes estressantes do meio ambiente. Além disso, a nutrição e manejo que os animais criados no Brasil são submetidos se diferem em relação ao seu país de **(**SILVA et al., 1993).

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Vários fatores podem influenciar a espermatogênese dos touros, como o estado nutricional, estresse, temperatura, peso, idade e variações raciais. Dessa forma, são necessárias medidas preventivas como planejamento alimentar, manejo adequado, instalações confortáveis a fim de minimizar o estresse térmico, escolha ideal da raça de acordo com a necessidade do produtor e as condições da região, além da realização de exame andrológico periodicamente, com finalidade de evitar problemas de fertilidade no plantel, tornando-se indispensáveis na seleção dos reprodutores.

5 REFERÊNCIAS

ANCHIETA, M. C. et al. Descarte e congelabilidade do sêmen de touros de raças zebuínas e taurinas em central de inseminação artificial no Brasil. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 57, n. 2, p. 196-204, 2005.

ANDRADE, E. R. et al. Consequências da produção das espécies reativas de oxigênio na reprodução e principais mecanismos antioxidantes. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v. 34, n. 2, p. 79-85, 2010.

ARIAS, A.A.; MANUNTA, O.; SLOBODZIAN, A. **E l mejoramiento genetico del ganado bovino de carne em Corrientes**. Série técnica Produccion Animal n. 5. Corrientes: INTA, E.E.A., 1991. 81 p.

BAGU, E. T. et al. Postnatal changes in testicular gonadotropin receptors, serum gonadotropin, and testosterone concentrations and functional development of the testes in bulls. **Reproduction**, v. 132, n. 3, p. 403-411, 2006.

_____. Effects of treatment with LH or FSH from 4 to 8 weeks of age on the attainment of puberty in bull calves. **Theriogenology**, v. 62, n. 5, p. 861-873, 2004.

BALL, P. J. H.; PETERS, A. R. **Reprodução em Bovinos**. 3ed. Editora Roca. 2006.

BARTH, A.; BO, G.; TRIBULO, H. **Curso de avaliação de touros e controle da qualidade seminal.** 1 ed. Córdoba (Argentina),v.3, n.10, p.55, 2000.

BERDUGO, J. A.; AVELLA, F. **Produção espermática de touros no trópico.** Colômbia: **Cebu**, 1994.

BERTIPAGLIA, E. C. A. **Efeitos das características do pelame e da taxa de sudação sobre parâmetros reprodutivos em vacas da raça Braford**. 2007. 163 f. Tese (Doutorado em

Medicina Veterinária – Produção Animal) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias Câmpus de Jaboticabal, Universidade Estadual Paulista Julio de Mesquita Filho, Jaboticabal – São Paulo, 2007.

BLACHE, D.; ADAM, C. L.; MARTIN, G. B. The mature male sheep: a model to study the effects of nutrition on the reproductive axis. **Reproduction Cambridge Supplement**, p. 219-233, 2002.

BRITO, L. F. C. Evaluation of stallion sperm morphology. **Clinical Techniques in Equine Practice**. v. 6, n. 4, p. 249-264, 2007.

BRITO, L.F.C. et al. Effect of age and genetic group on characteristics of the scrotum, declare and testicular vascular cones, and on sperm production and semen quality in AI bulls in Brazil. **Theriogenelogy**. v. 58, p. 1175-1186, 2002.

BURFENING, P. J.; ULBERG, L. C. Embryonic survival subsequent to culture of rabbit spermatozoa at 38 and 40 C. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 15, n. 1, p. 87-92, 1968.

CHACÓN, J.; PÉREZ, E.; RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, H. Seasonal variations in testicular consistency, scrotal circumference and spermiogramme parameters of extensively reared Brahman (*Bos indicus*) bulls in the tropics. **Theriogenology**, v. 58, n. 1, p. 41-50, 2002.

CHENOWETH, P. J. Examination of bulls for libido and breeding ability. **The Veterinary clinics of North America. Large animal practice**, v. 5, n. 1, p. 59-74, 1983.

CHRISTOVÃO, F. G.; FREITAS, P.I.; Utilização dos carotenoides (vitamina a) na alimentação de bovinos e suas interferências na reprodução. **Caderno de pós-graduação da FAZU**, v. 3, 2012.

CYRILLO, J. N. S. G. et al. Estimativas de tendências e parâmetros genéticos do peso padronizado aos 378 dias de idade, medidas corporais e perímetro escrotal de machos nelore de Sertãozinho, SP. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 30, n. 1, p. 56-65, 2001.

DANCE, A. et al. Enhanced early-life nutrition promotes hormone production and reproductive development in Holstein bulls. **Journal of dairy science**, v. 98, n. 2, p. 987-998, 2015.

DENNISTON, D. J. et al. Effect of neuropeptide Y on GnRH-induced LH release from bovine anterior pituitary cell cultures derived from heifers in a follicular, luteal or ovariectomized state. **Animal reproduction science**, v. 78, n. 1, p. 25-31, 2003.

DOBSON, H. et al. Is stress really all that important?. **Theriogenology**, v. 55, n. 1, p. 65-73, 2001.

FRAGNANI, J. B. et al. Avaliação andrológica de reprodutores bovinos da raça Devon no estado de Santa Catarina. In: V CONGRESSO INTERNACIONAL DE EDUCAÇÃO UNIBAVE CRIATIVIDADE E INOVAÇÃO, 2011. Santa Catarina. **Anais...** Santa Catarina: UNIBAVE, 2011.

FRANCO, C. S.; FONSECA, V.O.; GASTE, L. Potencial reprodutivo de touros Nelore acasalados coletivamente na proporção de um touro para 100 vacas. **Arquivo Brasileiro Medicina Veterinária Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 58, n. 6, p. 1156-1161, 2006.

GIL, C. V. **Effect of nutrition on follicle development and ovulation rate in the ewe**. 2003. 56 f. Thesis (Doctoral) – Department of Clinical Chemistry, Swedish University of Agricultural Science, Uppsala. 2003.

GOTTARDI. F.P. et al. Efeito do flushing sobre o desempenho reprodutivo de ovelhas Morada Nova e Santa Inês submetidas à inseminação artificial em tempo fixo. **Arquivo Brasileiro Medicina Veterinária Zootec**nia, v. 66, n. 2, p. 329-338, 2014.

GRESSLER. M.A.L. et al. Respostas bioquímicas de ovelhas submetidas a flushing de curto prazo em região subtropical. **Revista Brasileira de Saúde Produção Animal,** Salvador, v. 16, n. 1, p. 210-222, 2015.

GUIMARÃES, J. D. **Puberdade e maturidade sexual em touros da raça Gir criados em condições semiextensivas**. 1993. 98 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Escola de Veterinária, UFMG, Belo Horizonte. 1993.

HAFEZ, E. S. E. Secreções do Trato Reprodutivo Masculino e Plasma Seminal. In: HAFEZ, E. S. E.; HAFEZ, B. **Reprodução Animal**, 4. ed. São Paulo: Editora Manole, 1982.

HAFEZ, E. S. E.; HAFEZ, B. **Reprodução Animal**. 7. ed., São Paulo: Editora Manole, 2004.

HAMILTON, T. R. S. et al. Induced lipid peroxidation in ram sperm: semen profile, DNA fragmentation and antioxidant status.**Reproduction**, v. 151, n. 4, p. 379-390, 2016.

KAWAUCHI, H.; SOWER, S. A. The dawn and evolution of hormones in the adenohypophysis. **General and comparative endocrinology**, v. 148, n. 1, p. 3-14, 2006.

KENDALL, N.R. et al. The effect of zinc, cobalt and selenium soluble glass bolus on trace element status and semen quality of ram lambs. **Animal Reproduction Science**, v. 62, n.4, p. 277–283, 2000.

KNOLBIL, E; NEILL, J. D. The Physiology of reproduction. **New York: Raven Press**. p. 1174-1290, 1993.

KUDRYAVTSEV, I. V.; SAFRONOVA, L. D.; KUDRYAVTSEV, P. I. Genetic control of spermatogenesis and sex determination in mammals. **Russian Journal of Developmental Biology**, v. 34, n. 6, p. 337-346, 2003.

LARREAL, H. et al. Scrotal circumference, testicular consistency, body weight and semen traits in Nellore bulls. **Journal of Animal Science**, v. 66, n. 1, p. 446, 1988.

LEATHAM, J.H. Nutritional influences on testicular composition and function in mammals. **Endocrinology**, v. 5, p. 225–232. 1975.

MARTIN, G.B. et al. Interactions between nutrition and reproduction in the management of the mature male ruminant Animal. **The Animal Consortium**. v. 4, n.7, p. 1214–1226, 2010.

NUNES, I. J**. Andrologia – Parte 1:** Cadernos Técnicos de Médicina Veterinária e Zootecnia. Belo Horizonte: Editora FMPZ, 2001. 83 p.

ORTH, J. M. The Role of Follicle-Stimulating Hormone in Controlling Sertoli Cell Proliferation in Testes of Fetal Rats*. **Endocrinology**, v. 115, n. 4, p. 1248-1255, 1984.

PARKER, G. V.; THWAITES, C. J. The effects of undernutrition on libido and semen quality in adult Merino rams. **Crop and Pasture Science**, v. 23, n. 1, p. 109-115, 1972.

PRADA, F. Influência da nutrição animal na reprodução de touros: revisão. **Revista de Educação Continuada em Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 8, n. 1, p. 68-76, 2005.

RAHMAN, M. B. et al. Scrotal insulation and its relationship to abnormal morphology, chromatin protamination and nuclear shape of spermatozoa in Holstein-Friesian and Belgian Blue bulls. **Theriogenology**, v. 76, n. 7, p. 1246-1257, 2011.

REIS, J. D. A. **Influência das estações do ano nas características morfométricas do conteúdo escrotal e perfil protéico seminal por meio da eletroforese SDS–PAGE em Nelore e Simental.** 2013, 72 f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - Universidade do Oeste Paulista – Unoeste, Presidente Prudente, SP, 2013.

ROBERTS, S. J. Infertility in male animals. In: ROBERTS, S. J. (Ed.). **Veterinary obstetrics and genital diseases**. Michigan: Edwards Brothers, p. 752–793, 1986.

ROBINSON, J. J. et al. Nutrition and fertility in ruminant livestock. **Animal Feed Science and Technology**, v. 126, n. 3, p. 259-276, 2006.

SANTIAGO, L. L. Distúrbios produtivos e reprodutivos em rebanho submetido ao estresse térmico. **Agrolink**, 2006. Disponível em: <http://www.agrolink.com.br>

SCARAMUZZI, R. J.; MURRAY, J. F. The nutrient requirements for the optimum production of gametes in assisted reproduction in ruminant animals. **X° Réunion A.E.T.E.** 9-10- Lyon (France), p. 85-103, 1994.

SCHILLO, K. K. Effects of dietary energy on control of luteinizing hormone secretion in cattle and sheep. **Journal of Animal Science**, v. 70, n. 4, p. 1271-1282, 1992.

SESENA, R. C. et al. Estimativas de herdabilidade e correlação genética do perímetro escrotal, medido em diferentes idades, en animais Nelore. **Reunião de Sociedade Brasileira de Zootecnia**, v. 44, 2007.

SILVA, A. E. D. F. et al. **Capacidade reprodutiva do touro de corte: funções, anormalidades e outros fatores que a influenciam.** Campo Grande: EMBRAPA, 1993. 128 p.

SPITZAR, J. C. **Avaliação de saúde reprodutiva do touro**: estado atual. International Veterinary Information Service, Ithaca. 2000.

TUFARELLI, V. et al. Influence of feeding level on live body weight and semen characteristics of Sardinian rams reared under intensive conditions. **Tropical animal health and production**, v. 43, n. 2, p. 339-345, 2011.

WENKOFF, M. S. The evaluation of bulls for breeding soundness. **Canadian Veterinary Journal**, v. 30, p. 203, 1989.

WILHELM FILHO, D. et al. Spermatic cord torsion, reactive oxygen and nitrogen species and ischemia–reperfusion injury. **Molecular aspects of medicine**, v. 25, n. 1, p. 199-210, 2004.

WOLF, F. R.; ALMQUIST, J. O.; HALE, E. B. Prepuberal behavior and puberal characteristics of beef bulls on high nutrient allowance. **Journal Animal Science**, v. 24, n. 3, p. 761-765, 1965.

WROBEL, K.H. The postnatal development of the bovine Leydig cell population. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 25, n. 2, p. 51-60, 1990.

Capítulo

24

Ultrassonografia doppler: princípios e principais utilizações na reprodução da fêmea equina

Thadeu de Castro[1]
Nara Clara Lazaroni e Merchid[2]
Amanda Pereira dos Anjos[3]
Fabrício Albani Oliveira[4]
Alessandra Cunha Lopes[5]

]

1 INTRODUÇÃO

No âmbito da medicina tanto humana quanto veterinária, a ultrassonografia têm ocupado destaque entre os mais eficazes métodos modernos de diagnóstico não invasivo e com resultados em tempo real (GOLDSTEIN, 2006). Em éguas a ultrassonografia é considerada uma atividade de rotina, principalmente para avaliação da atividade ovariana, qualidade uterina e na realização do diagnóstico de gestação (GINTHER; UTT, 2004).

Adicionalmente a ultrassonografia convencional (modo-B) e a ultrassonografia Doppler colorida, fornecem detalhes anatômicos e informações imediatas sobre a hemodinâmica do

[1] Universidade Federal do Espírito Santo, e-mail: thadeudecastro@hotmail.com;
[2] Universidade Federal do Espírito Santo, e-mail: naramerchid@hotmail.com;
[3] Universidade Federal do Espírito Santo, e-mail: amandaveterinaria@gmail.com;
[4] Instituto Federal do Espírito Santo, e-mail: fabricio.oliveira@ifes.edu.br;
[5] Instituto Federal do Espírito Santo, e-mail: alessandra.lopes@ifes.edu.br.

fluxo sanguíneo de tecidos e órgãos, além de ser uma técnica para avaliação de folículos, corpo lúteo, útero e concepto, auxiliar para o diagnóstico de distúrbios na hemodinâmica do sistema reprodutor feminino (GINTHER, 2007).

Durante a última década a ultrassonografia Doppler se tornou o método utilizado para avaliação do fluxo sanguíneo do trato reprodutivo de mulheres, sendo agora utilizada para avaliação em grandes animais (GINTHER, 2007). Dessa forma, estudos sobre o uso da ultrassonografia Doppler estão sendo realizados na espécie equina para ampliar o conhecimento fisiológico e patológico do trato reprodutiva de éguas, assim como, para que seja utilizado na rotina veterinário. Portanto, este trabalho tem por objetivo descrever os princípios da ultrassonografia Doppler colorida e descrever os seus principais usos na reprodução de éguas.

2 ULTRASSONOGRAFIA

O aparelho de ultrassonografia produz ondas sonoras de alta frequência que não são audíveis ao ser humano (GOLDSTEIN, 2006). Essas ondas são produzidas por vibração de cristais piezoelétricos presentes no transdutor, que interagem com os tecidos onde podem ser refletidas, refratadas ou absorvidas. As ondas que retornam ao transdutor formam as imagens de acordo com a impedância acústica do tecido, que na ultrassonografia modo-B as imagens são produzidas em escala de cinza (GINTHER, 1995).

Fundamentalmente, sabe-se que som é uma onda mecânica de forma longitudinal, que se propaga de modo circunscrito nos meios sólido, líquido ou gasoso, por possuir massa e elasticidade, não se propagando no vácuo. Com base no fato que as ondas sonoras não são ionizantes e, portanto, inoculas aos seres vivos, têm sido usadas amplamente para fins de diagnóstico, terapêuticos e de pesquisas (GOLDSTEIN, 2006).

Após o primeiro uso na medicina veterinária na avaliação de órgãos reprodutivos de éguas (PALMER; DRIANCOURT, 1980), a ultrassonografia tem sido uma ferramenta indispensável nos diagnósticos terapêuticos e em pesquisas que envolvem tanto animais de grande e pequeno porte (GOLDSTEIN, 2006).

2.1 ULTRASSONOGRAFIA DOPPLER COLORIDA

A ultrassonografia transretal modo-B tem revolucionado o diagnóstico e a monitorização de eventos reprodutivos biológicos e patológicos, na pesquisa e clínica veterinária. O modo-B não é usado somente para identificar e medir estruturas, mas também

para ser associado a eventos reprodutivos (GINTHER, 1995). A ultrassonografia Doppler, por sua vez, adiciona informações fisiológicas sobre o fluxo sanguíneo, possibilitando avaliar a hemodinâmica do tecido de interesse (GINTHER; UTT, 2004).

Em 1842, o pesquisador austríaco Johann Christian Doppler descreveu o efeito Doppler como a alteração na frequência de uma onda emitida ou refletida por um objeto que se encontra em movimento em relação ao observador (HOUSTO, 1989). Quando a fonte de onda e o objeto que recebe a onda estão estacionários, a frequência de onda é constante. No entanto, se a fonte de onda estiver movendo-se para perto ou longe do objeto, a frequência de onda diminui ou aumenta, respectivamente. Quando o efeito Doppler é utilizado na ultrassonografia, o observador estático é o transdutor e o objeto em movimento são as células sanguíneas (hemácias), que refletem as ondas ultrassonográficas emitidas pelo transdutor. A frequência das ondas refletidas varia de acordo com a velocidade e sentido do fluxo sanguíneo (GINTHER, 2007).

Nos animais de grande porte a ultrassonografia Doppler é uma tecnologia não invasiva com resultado em tempo real, sendo a via transretal utilizada para avaliação do sistema reprodutivo (FERREIRA; IGNÁCIO; MEIRA, 2011). Essa tecnologia é efetiva e útil para a avaliação *in vivo*, possibilitando uma acurácia no diagnóstico de patologias, monitoração dos eventos reprodutivos e no estudo da capilaridade das estruturas, assim como, dos órgãos do sistema reprodutor (GINTHER; UTT, 2004), ainda podendo predizer condições futuras dos eventos reprodutivos (GINTHER, 2007).

A técnica de ultrassonografia Doppler é dividida em dois modos: Doppler colorido e espectral ou pulsado. Ambos os dois modos são utilizados com o objetivo de avaliar a perfusão sanguínea, a escolha de qual modo utilizar depende do tecido a ser estudado (GINTHER, 2007; FERREIRA; IGNÁCIO; MEIRA, 2011).

2.1.1 Modo espectral

O modo espectral analisa o fluxo sanguíneo de um vaso específico de forma quantitativa, onde a velocidade do fluxo sanguíneo é representada por um gráfico em forma de onda denominado espectrum, representando cada onda um ciclo cardíaco completo. O espectrum promove informação de valores como velocidade de pico sistólico (PSV), velocidade diastólica final (EDV) e velocidade máxima média (TAMV). Por esse modo é possível também identificar a direção do fluxo sanguíneo. A formação da onda abaixo da linha base do monitor é considerada fluxo em direção oposta ao transdutor. Portanto, formação da onda acima da linha

base do monitor é considerada fluxo em direção ao transdutor (FERREIRA; IGNÁCIO; MEIRA, 2011).

A adequada mensuração das velocidades de fluxo sanguíneo durante o exame espectral é feita por imagem do modo-B ou do modo colorido, pela colocação do cursor (Gate) no lúmen do vaso sanguíneo. Deve ser formada uma angulação entre o cursor e o lúmen do vaso, denominado ângulo de insonação ou ângulo Doppler (GINTHER, 2007). Portanto, recomenda-se a utilização de um ângulo de 30º a 60º entre o cursor e o vaso sanguíneo (GINTHER; UTT, 2004).

No entanto, devido à grande tortuosidade das artérias presentes no mesométrio, ovários e útero, não é possível determinar os seus respectivos ângulos Doppler. Uma alternativa usada para avaliar esses vasos tortuosos é pelo índice Doppler, que consiste em índice de resistência vascular (RI) e o índice de pulsatilidade (PI) (SILVA et al., 2005). Esses índices são bons indicadores da perfusão vascular e são obtidos independentemente do ângulo de insolação (GINTHER; UTT, 2004). Ambos RI e PI apresentam correlação negativa com a perfusão vascular do tecido irrigado pela artéria em questão, ou seja, quanto menores RI e PI maior será a perfusão vascular no tecido suprido por aquele vaso (GINTHER, 2007). A escolha de qual índice Doppler a ser utilizado vai depender da predileção do pesquisador.

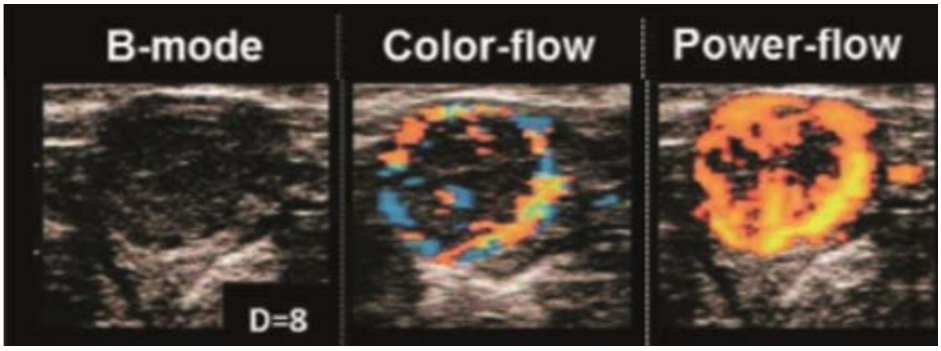
Segundo Ginther (2007), os índices Doppler são calculados pelas seguintes fórmulas: $RI = \frac{PSV-EDV}{PSV}$; $PI = \frac{PSV - EDV}{TAMV}$.

2.1.2 Modo Doppler colorido

O modo Doppler colorido prove imediatamente uma avaliação qualitativa do fluxo sanguíneo de diferentes órgãos e tecidos. A vascularidade da estrutura é estimada subjetivamente considerando a extensão do tecido com pixels coloridos. Diferente do modo espectral, o modo Doppler colorido é um método de avaliação simples, rápido e funcional, não dependendo do ângulo Doppler. Este modo ainda é subdividido em: Modo Color-Flow e Power-Flow (GINTHER, 2007).

O modo Color-Flow prove a imagem em duas cores, normalmente variando entre azul e vermelho, representando a perfusão vascular sanguínea da estrutura e a direção do fluxo sanguíneo (Figura 1). Onde, pixels vermelhos indicam que o fluxo sanguíneo está indo em direção ao transdutor, enquanto pixels na cor azul indica que o fluxo sanguíneo está indo em direção oposta ao transdutor (GINTHER, 2007).

Figura 1 - Exame ultrassonográfico Doppler do Corpo lúteo: modo-B, modo Color-Flow e modo Power-Flow.



Fonte: Ginther (2007)
Nota: Adaptado pelo autor.

No modo Power-Flow, o movimento do fluxo sanguíneo é graduado utilizando uma única cor (vermelho; Figura 1) e a intensidade de cores de pixel varia de acordo com a força de sinal do Doppler (FERREIRA; IGNÁCIO; MEIRA, 2011). Segundo Ginther (2007), imagens geradas através do modo Power-Flow possui maior sensibilidade para um fluxo sanguíneo fraco e é independente do ângulo Doppler. Também, o modo Power-Flow é o modo indicado para avaliação de vasos com pequenos diâmetros e com pouco fluxo sanguíneo, vasos presentes no útero (mesométrio, endométrio e miométrio) e no ovário (mesovário, corpo lúteo e parede folicular).

2.2 AVALIAÇÃO DO STATUS FUNCIONAL DO CORPO LÚTEO (CL)

O corpo lúteo (CL) é uma glândula que tem como principal função a produção de progesterona (P4), que por sua vez é responsável por pela manutenção da gestação (WEBB; WOAD; ARMSTRONG, 2002). A função do CL pode ser determinada através da mensuração dos níveis plasmáticos de progesterona, que aumenta a partir do primeiro dia após a ovulação atingindo um pico ao redor do oitavo dia do ciclo estral (GINTHER et al., 2007).

Também, a P4 é utilizada para determinar a ocorrência da luteólise nessa espécie, pois quando ocorre a luteólise a concentração circulante de P4 atinge um valor menor do que 1ng/mL (GINTHER, 1992). Contudo, a mensuração de P4 nas amostras de sangue possui inconvenientes como o custo e o intervalo de tempo entre a coleta da amostra e o resultado (HERZOG et al., 2010), tornando essa prática inviável para a rotina a campo, com uso quase que estritamente para fins de pesquisa.

Uma segunda forma de avaliação da função do CL é através da avaliação com ultrassonografia Doppler colorida (GINTHER, 2007). Na qual, a atividade do CL é avaliada de forma qualitativamente, levando em consideração a quantidade de pixels presente sobre a superfície do CL. Também, a avaliação do CL com ultrassonografia Doppler é feita em tempo real sem causar qualquer tipo de danos ao animal (CASTRO et al., 2016).

Segundo Ginther et al. (2007), existe uma correlação positiva entre os níveis séricos de P4 e o fluxo sanguíneo do CL. Portanto, considerando a relação entre a perfusão vascular do CL e a concentração plasmática de P4, a ultrassonografia Doppler pode ser empregada para determinar a fase do ciclo estral, e no momento da inovulação do embrião para avaliar a funcionalidade do CL, dessa forma, selecionar a receptora com perfil progesterônico mais adequado.

2.3 SEXAGEM FETAL

O diagnóstico do sexo fetal equino é uma prática muito útil, que tem substancial interesse científico e comercial (HAN et al., 2010). Portanto, o conhecimento do sexo fetal permite implementar diferente estratégias na equideocultura, tais como: aumentar o valor estimado da gestação, tomada de decisão de futuros acasalamento do feto, na programação de formação de futuros planteis (BUCCA, 2005).

Uma das maneiras de determinar o sexo fetal equino é pela identificação e localização do tubérculo genital, que é realizado em torno de 59 a 68 dias de gestação (HOLDER, 2000). Nessa idade já foi iniciado a migração do tubérculo genital, que na fêmea dará origem ao clitóris e no macho o pênis (CURRAN; GINTHER, 1989). Contudo, esta técnica possui algumas limitações na espécie equina, como: requerer grande experiência do operador; um intervalo de tempo relativamente pequeno para a identificação da estrutura (59 - 68 dias); e devido à grande quantidade de líquido alontoidiano, alta motilidade fetal e cordão umbilical muito longo, é dificulta a identificação do tubérculo.

Portanto, uma segunda forma de determinação do sexo fetal equino é através da identificação das gônadas fetais, realizado entre 90 a 150 dias (RENAUDIN, 2000). Permitindo assim, um maior tempo para que o exame seja realizado.

O diagnóstico do tubérculo genital assim como das gônadas é feito com ambos ultrassonografia modo-B e modo Doppler (RESENDE et al., 2012). Contudo, em gestações mais avançadas (> 150 dias) não é possível fazer o diagnóstico do feto macho com uso da ultrassonografia modo-B, o que não acontece na ultrassonografia Doppler (RESENDE et al.,

2014). Tornando assim, a ultrassonografia Doppler mais eficaz na determinação da sexagem fetal equina do que a ultrassonografia modo-B.

2.4 AUXILIAR NO DIAGNÓSTICO DE DISTÚRBIOS NA OVULAÇÃO

Falha na ovulação de folículos dominantes pode ser fisiológico (durante períodos de transição) ou patológico (durante estação reprodutiva; GINTHER, 1992). Esta falha tem sido reportada em aproximadamente 8,2 % dos ciclos estrais em éguas (MCCUE; SQUIRES, 2002).

Uma das falhas mais comum no processo da ovulação é a formação de folículos hemorrágicos anovulatório (FHA), seguida pela formação de um hematoma no antro folicular de éguas, que resulta em ciclo reprodutivos inférteis (GINTHER; PIERSON, 1984). O folículo que resultará em FHA apresenta intensa vascularização ao longo de sua circunferência comparado com folículos de ovulação normais, e pode ser identificado antes da sua formação em FHA pela ultrassonografia Doppler (GINTHER et al., 2006). Portanto, com o diagnóstico precoce do FHA, pode-se evitar gastos desnecessários com tratamentos de indutores da ovulação e transporte de sêmen ao longo da estação reprodutiva, assim como, identificar e tratar os animais para que possam retornar à atividade reprodutiva mais cedo.

Outro distúrbio da ovulação é a evacuação septada do folículo, com prolongada e/ou não ovulação completa do folículo pré-ovulatório (CARNEVALE et al., 1988). Esta deficiência está associada com aumento da circulação sanguínea da área apical e da parede folicular uma hora antes da ovulação quando comparado com a ovulação normal (GINTHER et al., 2007). Mostrando que a ultrassonografia Doppler é eficiente na identificação desse distúrbio.

2.5 AVALIAÇÃO DO ESTADO UTERINO

É de súbita importância para um ótimo desempenho reprodutivo um ambiente uterino saudável e funcional. Na espécie equina não é diferente, as éguas devem estar em excelentes condições uterinas a fim de poderem desempenhar seu papel de forma eficiente, levando a gestação a termo, ou não comprometer a viabilidade dos espermatozoides e evitar a luteólise precoce (FERREIRA; MEIRA, 2011).

Segundo Ferreira, Gastal e Ginther (2008), distúrbios vasculares são potenciais causadores de alterações degenerativas do endométrio, relacionando-se intimamente com a infertilidade em éguas (TANNUS; THUN, 1995). Estudo realizado em mulheres demonstra que

a baixa perfusão uterina durante a fase luteal está associada com uma baixa taxa de concepção (BOLLWEIN et al., 1998).

2.6 AUXILIAR EM PATOLOGIAS UTERINAS

2.6.1 Endometrite

A endometrite é definida como um processo inflamatório e/ou infeccioso do endométrio, é uma das principais causas de redução de fertilidade em éguas (TROEDSSON, 2006). Antes da utilização de exames ultrassonográficos, os métodos de detecção de endometrite variavam desde a detecção de corrimento cervical e/ou vaginal até a obtenção de amostras microbiológicas, celulares e histopatológicas do endométrio (LIU; TROEDSSON, 2008).

Segundo Pereira et al. (2014) a utilização da ultrassonografia modo Doppler permite uma avaliação mais precisa da condição da perfusão vascular do endométrio e capaz de confirmar a presença da inflamação pela observação das alterações vasculares, sendo uma ferramenta válida para o diagnóstico complementar da endometrite bacteriana.

2.6.2 Cisto uterino

Outra alteração uterina encontrada em éguas que pode ser analisada com ultrassonografia Dopller são os cistos uterinos, podendo associar ao seu efeito no trato reprodutivo, a eficácia de tratamentos e métodos preventivos (FERREIRA; GASTAL; GINTHER, 2008). Que ao verificar a incidência de cistos internos e externos no útero de éguas e sua relação com a perfusão sanguínea observaram que regiões do útero com cistos apresentaram vascularidade diminuída quando comparadas com regiões uterinas adjacentes sem cistos. Levando a especulações de que as formações de cistos uterinos estão relacionadas a danos vasculares, devido ao pobre retorno venoso e degeneração arterial presentes naquele segmento uterino (SCHOON; SCHOON; KLUG, 1999).

2.6.3 Previsão de ovulação

Segundo Gastal, Gastal e Ginther (2006) após avaliarem as variações do fluxo sanguíneo folicular durante as 36 horas que antecedem a ovulação natural ou induzida por gonadotrofina

coriônica humana (hCG), observaram que, em casos de ovulação de forma natural, o fluxo sanguíneo folicular é máximo entre as horas 36 e 12 que antecedem a ovulação, e que a vascularização sanguínea diminui subitamente durante as últimas quatro horas pré-ovulação. Já em éguas tratadas com hCG, ocorreu um aumento progressivo da vascularização do folículo durante as primeiras 24 horas pós-tratamento e diminuiu nas quatro últimas horas pré-ovulatória. Portanto, através da ultrassonografia Doppler é possível obter maiores informações envolvendo a maturação folicular final e o momento mais próximo da ovulação, permitindo um melhor acompanhamento do desenvolvimento folicular de éguas, principalmente quando se utiliza sêmen congelado e/ou sêmen de baixa fertilidade (FERREIRA; MEIRA, 2011).

2.6.4 Detecção do início da atividade reprodutiva

A detecção precoce do início da atividade cíclica é uma ferramenta valiosa no manejo reprodutivo de equinos, pois possibilita começar mais cedo a estação de monta e consequentemente produzir mais animais por estação reprodutiva (FERREIRA; MEIRA, 2011).

Na espécie equina, o fluxo sanguíneo na parede folicular dos folículos que irão estabelecer dominância, aumenta um dia antes de o folículo atingir seu diâmetro de desvio folicular, próximo de 22,5 mm de diâmetro, já os folículos anovulatórios, independentemente do diâmetro, possuem baixa vascularização. O incremento do aporte sanguíneo folicular tem início ao passo que ocorre o aumento da sua resposta às gonadotrofinas, fazendo com que o folículo continue crescendo mesmo com baixas concentrações de hormônio folículo estimulante (GINTHER, 2007).

Portanto, a avaliação da vascularização da parede folicular através da ultrassonografia Doppler torna-se um bom meio de identificação do potencial ovulatório do folículo, além disso, a identificação precoce do início da atividade cíclica pode levar uma maior produção por estação de monta, além de evitar manejos desnecessários, como coberturas e administração de indutores de ovulação (FERREIRA; IGNÁCIO; MEIRA, 2011).

2.6.5 Diagnóstico de gestação e viabilidade embrionária

A regressão do CL ou luteólise representa uma diminuição em progesterona e do fluxo sanguíneo a partir da secreção de PGF2α proveniente do endométrio (GINTHER, 1992), fazendo com que o CL perca sua integridade funcional e concomitantemente diminua de

tamanho, causando uma degradação estrutural irreversível. Na espécie equina a luteólise tem início em média no dia 14 do ciclo estral (GINTHER; BEG, 2012). Caso não ocorra a luteólise, o corpo lúteo proveniente da ovulação se mantem ativo e também responsável pela produção de P4 até a formação dos corpos lúteos acessórios (~ 32 dias) (GINTHER, 1992).

Também, durante a fase de reconhecimento fetal, onde ocorre à mobilidade embrionária em éguas, acontecem alterações na perfusão vascular endometrial, sendo essa alteração migratória e local correspondendo à posição do concepto (SILVA et al., 2005). Segundo Ferreira, Ignácio e Meira (2010) ocorre maior perfusão vascular entre o terceiro e sexto dia após a ovulação em éguas prenhes.

Portanto, a mensuração da atividade funcional do CL pela ultrassonografia Doppler e identificação da perfusão vascular entre o terceiro e sexto dia após a ovulação em animais prenhez são métodos que auxiliam no diagnóstico de gestação na espécie equina.

Além disso, a ultrassonografia Doppler pode ser usada para avaliar viabilidade fetal por imagens dos vasos do coração e pela obtenção da taxa cardíaca fetal, fluxo sanguíneo umbilical, vasos da placenta e fluxo sanguíneo da artéria uterina (MCCUE; DASCANIO, 2014).

3 CONCLUSÃO

A ultrassonografia Doppler é uma técnica de grande utilidade para ser usada a determinar diferenças na resistência vascular do aparelho reprodutivo de éguas. Fornece detalhes anatômicos e informações imediatas sobre a hemodinâmica do fluxo sanguíneo de tecidos e órgãos, além de ser uma técnica para avaliação de folículos, corpo lúteo, útero e concepto, além de auxiliar no diagnóstico de distúrbios na hemodinâmica do sistema reprodutor feminino.

4 REFERÊNCIAS

BOLLWEIN, H. et al. Transrectal color Doppler sonography of the a. uterine. **Theriogenology**, v. 49, p. 1483-1488, 1998.

BUCCA, S. Equine fetal gender determination from mid- to advanced-pregnancy by ultrasound. **Theriogenology**, v. 64, p. 568-571, 2005.

CARNEVALE, E. M. et al. Ultrasonographic characteristics of the preovulatory follicle preceding and during ovulation in mares. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 8, p. 428-431, 1988.

CASTRO, T. et al. Stimulation of LH, FSH, and luteal blood flow by GnRH during the luteal phase in mares. **Theriogenology**, v. 85, p. 740-746, 2016.

CURRAN, S. S.; GINTHER, O. J. Ultrasound diagnosis of equine fetal sex by location of the genital tubercle. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 9, p. 77-83, 1989.

FERREIRA, J. C.; GASTAL, E. L.; GINTHER, O. J. Uterine blood flow and perfusion in mares with uterine cysts: effect of the size of the cystic area and age. **Reproduction**, v. 135, p. 541-550, 2008.

FERREIRA, J. C.; IGNÁCIO, F. S.; MEIRA, C. Uterine vascular perfusion and spectral-Doppler measurements during the early gestation in mares: news concepts of evaluation. **Animal Reproduction Science**, v.1, p.281-283, 2010.

FERREIRA, J. C.; MEIRA, C. Aplicação da ultrassonografia colorida doppler em programas de transferência de embriões equinos. **Ciência Rural**, v.41, p.1063-1069, 2011.

FERREIRA, J. C.; IGNÁCIO, F. S.; MEIRA, C. Doppler ultrasonography principles and methods of evaluation of the reproductive tract in mares. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.39, p.105-111, 2011.

GASTAL, E. L; GASTAL, M. O.; GINTHER, O.J. Relationships of changes in B-mode echotexture and colour-Doppler signals in the wall of the preovulatory follicle to changes in systemic oestradiol concentrations and the effects of human chorionic gonadotrophin in mares. **Reproduction**, v. 131, p. 699-709, 2006.

GINTHER, O. J. **Reproductive biology of the mare: basic and applied aspects**. 2. ed., Cross Plains, WI: Equiservices Publishing, 1992.

_____. **Ultrasonic imaging and animal reproduction: Fundamentals.** Book 1. Cross Plains, WI: Equiservices Publishing, 1995. 225p.

_____. **Ultrasonic imaging and animal reproduction: color-Doppler ultrasonography.** Book 4. Cross Plains, WI: Equiservices Publishing, 2007. 258p.

GINTHER, O. J.; PIERSON, R. A. Ultrasonic anatomy of the equine ovaries. **Theriogenology**, v. 21, p. 471-483, 1984.

GINTHER, O. J.; UTT, M. D. Doppler ultrasound in equine reproduction: principles, techniques, and potential. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 24, p. 516-526, 2004.

GINTHER, O. J; BEG, M. A. Dynamics of circulating progesterone concentrations before and during luteolysis: a comparison between cattle and horses. **Biology of Reproduction**, v. 86, p. 1-12, 2012.

GINTHER, O. J. et al. Spatial Relationships between Serrated Granulosa and Vascularity of the Preovulatory Follicle and Developing Corpus Luteum. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 27, p. 20-27, 2006.

_____. Luteal blood flow and progesterone production in mares. **Animal reproduction science**, v. 99, n. 1, p. 213-220, 2007.

GOLDSTEIN, J. R. Ultrasound-guided peripheral venous access. **Israeli Journal Emergency Medicine**, v. 6, n. 4, p. 46-52, 2006.

HAN, S. H. et al. Lengenital tubercleh difference between equine ZFX and ZFY genes and its application for molecular sex determination. **Journal of Assisted Reproduction and Genetics**, v. 27, n. 12, p. 725-728, 2010.

HOUSTO, P. L. Correlated Photochemistry: The Legacy of Johann Christian Doppler. **Accounts of Chemistry Research**, v. 22, p. 309-314, 1989.

HERZOG, k. et al. Luteal blood flow is a more appropriate indicator for luteal function during the bovine estrous cycle than luteal size. **Theriogenology**, v. 73, p. 691-697, 2010.

HOLDER, R. D. **Fetal sex determination in the mare between 55 and 150 days gestation.** In: ANNUAL CONVENTION OF THE AMERICAN ASSOCIATION OF EQUINE PRACTITIONERS, 46. 2000. p. 321-324.

LIU, I. K. M.; TROEDSSON, M. H. T. The diagnosis and treatment of endometritis in the mare: Yesterday and today, **Theriogenology,** v. 70, p. 415-420, 2008.

MCCUE, P. M.; SQUIRES, E. L. Persistent anovulatory follicles in the mare. **Theriogenology**, v. 58, p. 541-543, 2002.

MCCUE, P.; DASCANIO, J. **Equine reproductive procedures**. Iowa: John Wiley & Sons, 2014.

PEREIRA, R. R. et al. Utilização de ultrassonografia modo doppler como diagnóstico complementar da endometrite em éguas: relato de caso. **Revista Científica de Medicina Veterinária**, v. 23, n. 1, 2014.

RENAUDIN, C. D. Ultrasonographic determination of equine fetal gender. **International Veterinary Information Service**. 2000.

RESENDE, H. L. et al. Sexagem fetal em equinos através das gônadas fetais. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 43, p. 4-6, 2012.

_____. Determination of equine fetal sex by Doppler ultrasonography of the gonads. **Equine Veterinary Journal,** v. 46, p. 56-758, 2014.

PALMER, E.; DRIANCOURT, M. A. Use of ultrasonic echography in equine gynecology. **Theriogenology**, v. 13, p. 206-216, 1980.

SILVA, L. A. et al. Changes in vascular perfusion of the endometrium in association with changes in location of the embryonic vesicle in mares. **Biology of Reproduction**, v. 72, p. 755–761, 2005.

SCHOON, D., SCHOON, H.A., KLUG, E. Angioses in the equine endometrium – pathogenesis and clinical correlations. **Pferdeheilkunde**, v. 15, p. 541-546, 1999.

TANNUS, R. J.; THUN, R. Influence of endometrial cysts on conception rate of mares. **Zentralbl Veterinarmed A**, v. 42, p. 275-283, 1995.

TROEDSSON, M. H. T. Breeding-Induced Endometritis in Mares, **Veterinary Clinics of North America: Equine Practice,** v.22, p. 705-712, 2006.

WEBB, R; WOAD, K. J; ARMSTRONG, D. J. Corpus luteum function: local control mechanisms. **Domestic Animal Endocrinology**, v.23, p.277-285, 2002.

Capítulo

25

Dieta 100% concentrado para bovinos de corte

Sâmila Esteves Delprete[1]
Letícia Mária Costa Fregulhia[2]
Gercílio Alves de Almeida Junior[3]
Luciano Bertolani Filho[4]
Ingrid Ney Kramer de Mello[5]
Gisele Rodrigues Moreira[6]

1 INTRODUÇÃO

O rebanho bovino brasileiro é o segundo maior do mundo e está se estabilizando, como ocorreu na Austrália e nos EUA. Em geral, essa condição se dá quando a rentabilidade passa a depender mais de tecnologias que tornem a atividade economicamente viável (ANUALPEC, 2013).

Segundo Silva (2009), torna-se necessário desenvolver estratégias nutricionais com altos níveis de concentrados, devido às grandes transformações em que vive a pecuária brasileira, sobretudo com o crescimento dos grandes confinamentos, visando obter como

[1] Universidade Federal do Espírito Santo, e-mail: samiladelprete@hotmail.com;
[2] Universidade Federal do Espírito Santo, e-mail: lefregulhia@hotmail.com;
[3] Universidade Federal do Espírito Santo, e-mail: gerciliozootec@uol.com.br;
[4] Universidade Federal do Espírito Santo, e-mail: lucianobertolanifilho@hotmail.com;
[5] Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-MG, e-mail: ingkramer@yahoo.com.br;
[6] Universidade Federal do Espírito Santo, e-mail: gisele.moreira@ufes.br.

benefícios a melhoria no desempenho, manipulação na deposição de gordura e marmoreio, com efeitos no aumento do tamanho da carcaça e na qualidade de carne de animais confinados.

Tem-se observado o surgimento de dietas destituídas de volumosos em sistemas de confinamento, denominadas dietas 100% concentrado, sendo estas constituídas por cerca de 80% de grãos inteiros de milho e o remanescente por núcleo proteico-vitamínico-mineral. Desse modo, os bovinos em terminação confinados submetidos a esta dieta, recebem ração exonerada de fibra proveniente de alimentos volumosos, promovida pela exclusão total desta fração na dieta.

Segundo Santos (2014), o balanceamento da dieta do gado é um fator muito importante para a saúde do animal, visto as influências que exerce diretamente sobre o ganho de peso. A dieta do gado é constituída em sua maior parte por alimentos volumosos e concentrados. Ao regular a proporção destes alimentos na dieta é possível garantir aumento significativo de peso, de modo que quanto maior for a proporção de concentrados na dieta, até determinado limite, maior será o ganho.

Embora, para muitos pecuaristas, represente uma novidade, a tecnologia é praticada desde a década de 70 pelos norte-americanos, sendo que em nosso continente é mais explorada em países como a Argentina. Neste país, é utilizada amplamente em função das condições climáticas que impossibilitam a produção constante de volumosos durante o ano, em que o milho é de baixo custo e abundante, o que possibilita o confinamento de novilhos com tenra idade e baixo peso para poupar as matrizes da inanição pela escassez de forragem (GRANDINI, 2009).

Pouco é sabido sobre a dieta 100% concentrado para bovinos em terminação, por esta se tratar de tecnologia inovadora no sistema produtivo brasileiro e devido à escassa produção de pesquisa sobre este tipo de alimentação em nossas condições.

Em virtude dos fatos mencionados, objetiva-se neste capítulo abordar os principais aspectos associados à dieta 100% concentrado para terminação de bovinos de corte.

2 COMPOSIÇÃO DA DIETA

A dieta 100% concentrado é composta por 75 a 80% de grãos inteiros de milho e 25 a 20% por núcleo proteico, vitamínico e mineral.

Na maioria dos casos, a prática de dietas 100% concentrado tem sido realizada com a utilização de milho em grãos inteiros, o qual compõe de 75 a 95% da ração, juntamente com um núcleo proteico, vitamínico e mineral, formulado com teor de proteína bruta acima de 30%,

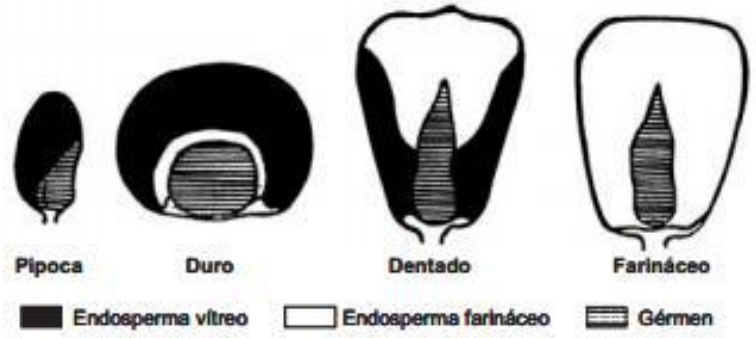
com níveis de minerais suficientes para suprir às exigências dos animais, devendo ser ajustada a porcentagem de inclusão na dieta conforme as recomendações da empresa fabricante (UENO, 2012).

Com base nas características do grão, existem cinco classes ou tipos de milho: dentado, duro, farináceo, pipoca (FIGURA 1) e doce. A maioria do milho comercial produzido nacionalmente é do tipo duro ou "flint", enquanto, nos países de clima temperado, a predominância é do tipo dentado (PAES, 2006).

A adequação de dietas contendo milho grão inteiro, prima pelo ajuste da fração mínima de fibra, cuja função, neste caso, é exercer um efeito mais físico ou mecânico do que nutritivo. O principal objetivo da fibra nessas dietas é promover a ruminação, a salivação e a consequente estabilidade ruminal para evitar eventuais distúrbios metabólicos, e reduzir a taxa de consumo, sem afetar o resultado produtivo (SARTOR, 2008).

Na maioria dos casos, uma vez que o milho comporá entre 75 a 95% da dieta, e o teor de amido deste ingrediente situa-se na faixa de 70%, temos que o maior componente de energia será de carboidrato não estrutural, compondo 52 a 66% da dieta. O uso de dietas a base de milho inteiro, sem fonte de volumosos de fibra longa ou mesmo volumoso algum, tem como vantagem obter o máximo benefício de conversão alimentar, sem emprego de processamentos mais modernos (GRANDINI, 2009).

Figura 1 – Tipos de milho e as relativas proporções do endosperma farináceo e vítreo.



Fonte: PAES (2006).

Em relação ao núcleo, segundo Beltrame e Ueno (2011), sua composição é variável de acordo com a formulação efetuada, porém deve conter cerca de: 37% de proteína bruta; 10% de matéria mineral; 7% de matéria fibrosa; 2% de extrato etéreo e 1% de NNP (ureia pecuária). Seus ingredientes variam em: farelo de soja; farelo de soja integral (grãos tostados); grão de milho; casca de soja; calcário calcítico; ureia pecuária; fosfato bicálcico; cloreto de sódio; premix mineral; farelo de trigo; aditivo promotor de crescimento e aditivo antioxidante.

3 ADAPTAÇÃO À DIETA

Bovinos recém chegados a confinamentos passam por inúmeras mudanças fisiológicas ou adaptações à medida que são ambientados ao confinamento. Essas adaptações incluem reposição da água corporal perdida, estabelecimento ou melhora da imunidade contra vários patógenos comuns, estabelecimento da estrutura social na baia e adaptação dos microrganismos no rúmen para utilizar novos alimentos (BROWN; MILLEN, 2009).

A incorporação de níveis mais elevados de alimentos concentrados nas rações promove alterações no comportamento ingestivo, portanto faz-se necessário a utilização de critérios mais severos na formulação e no manejo alimentar dos animais, em razão de que a maior participação de concentrados na dieta aumenta o risco de ocorrência de distúrbios metabólicos, tais como: acidose, laminite, abcessos hepáticos e timpanismo. Esses distúrbios metabólicos podem gerar perdas no desempenho animal e consequentemente na lucratividade da atividade pecuária em questão. Assim sendo, é extremamente importante adotar medidas que possibilitem a adaptação e desenvolvimento dos microrganismos ruminais. Assim, a adaptação de animais à dieta de alto concentrado envolve a adaptação dos microrganismos ruminais, com aumento no número de bactérias amilolíticas em relação às fibrolíticas (TAJIMA et al., 2001). Owens et al. (1998) relatam que dietas com elevada quantidade de amido aumentam a disponibilidade de glicose livre e estimulam o crescimento de diversas bactérias, aumentando assim a produção de ácidos graxos voláteis (AGVs) e, concomitantemente, diminuição do pH ruminal. Com isso, há diminuição no número de bactérias celulolíticas, que não sobrevivem em ambiente com pH inferior a 5,5 (SLYTER et al., 1970). Portanto, a adaptação dos animais à dieta deve ser feita de forma gradual, para que as mudanças no rúmen também ocorram de forma gradual, sendo o desejável para o desempenho máximo e saúde dos animais.

Segundo Brown e Millen (2009) as bactérias ruminais reproduzem-se em intervalos comumente menores que 60 minutos, respondendo rapidamente às alterações na alimentação, porém, conforme Dehority (2004), a população de protozoários ruminais leva de 12 a 15 horas para duplicar. À medida que o teor de concentrado da dieta passa a ser de 70% da matéria seca (MS) as populações de protozoários tem seu número reduzido, provavelmente, devido à sensibilidade ao pH ruminal mais baixo, reduzindo o tamanho da população.

De acordo com Brown e Millen (2009), mesmo o período de adaptação representando menos de 20% do tempo total de cocho para a maioria dos bovinos confinados, este é um dos mais críticos durante todo o período de alimentação. A mudança gradual visa possibilitar que

os microrganismos desejáveis do rúmen se estabeleçam, ao mesmo tempo em que reduz a possibilidade de crescimento demasiado de microrganismos ruminais menos desejáveis.

Se o animal é alimentado *ad libitum*, poderá comer em excesso, o que causará uma redução no pH ruminal. Quando o pH ruminal é baixo, o consumo é diminuído. A diminuição no consumo possivelmente funciona como um mecanismo interno que tenta limitar a fermentação excessiva, o que consequentemente restaura o pH para níveis "confortáveis". Uma vez que o pH retorna a níveis adequados, o animal se sente "melhor" e volta a consumir em alta quantidade, o que causa uma nova produção excessiva de ácidos no rúmen, fazendo com que todo o ciclo se repita (SCHWARTZKOPF-GENSWEIN et al., 2003).

Um ponto importante no uso do conceito da dieta com grão de milho inteiro é a adaptação dos animais, que geralmente estão ingerindo dietas baseadas em 100% de alimentos volumosos, principalmente no pasto. Nesse caso necessita-se efetuar uma adaptação adequada, que deverá seguir protocolos de acordo com a disponibilidade de alimentos volumosos e das características dos animais, pois o não cumprimento desse protocolo pode levar o animal a distúrbios metabólicos (BARBOSA et al., 2011).

Katsuki (2009) recomenda que na adaptação de bovinos à dieta 100% concentrado, a fim de minimizar distúrbios digestivos que afetam o desempenho animal, níveis decrescentes de volumosos devem ser fornecidos no período inicial para a adaptação dos microrganismos do rúmen. Embora a recomendação de algumas empresas fabricantes de núcleo proteico seja acrescentar a mistura concentrada a um volumoso fornecido à vontade na proporção de 0,8% do peso vivo por dois dias, em seguida 1,6% do peso vivo por dois dias e 1,8% de peso vivo por mais dois dias, no sétimo dia a recomendação é cortar o fornecimento do volumoso e disponibilizar somente a mistura de grãos com o núcleo. Alguns técnicos recomendam ainda, a fim de reduzir custos de alimentação, que a adaptação seja realizada com os animais ainda no pasto (UENO, 2012). Na Tabela 1 está representado o protocolo de adaptação conforme recomendações de empresas fabricantes do núcleo.

Tabela 1 – Protocolo de adaptação à dieta 100% concentrado.

Dias	**Fornecimento de volumoso**	**Fornecimento da dieta (80% milho + 20% núcleo)**
1º e 2º	*ad libitum*	0%
3º e 4º	*ad libitum*	0,8% do PV
5º e 6º	*ad libitum*	1,6% do PV
7º em diante	0%	*ad libitum*

Fonte: Adaptado de Beltrame e Ueno (2011).

4 CARACTERÍSTICAS DO ANIMAL

4.1 QUANTO AO SEXO

Muito pouco se conhece sobre o efeito de classe sexual, bem como de sua interação com dietas de maior ou menor densidade energética, sobre o desempenho e os parâmetros de consumo e digestibilidade dos nutrientes, particularmente na raça Nelore, que compõe grande parte do rebanho nacional (PAULINO et al., 2008).

De acordo com Pádua et al. (2004), desde que mantidos em condições que lhes permitam expressar seu potencial de crescimento, machos inteiros apresentam taxa de crescimento em torno de 10 a 20% superior aos machos castrados e às fêmeas.

A utilização de novilhas para a produção de carne se justifica, pois embora o preço pago pela carcaça seja 15% inferior, o preço de aquisição de animais desta categoria também é menor. Sob condições ideais de alimentação e manejo, as novilhas tornam-se fisiologicamente maduras cerca de três meses mais cedo que novilhos castrados (BARBOSA, 1995).

Feijó e Euclides Filho (1998) relataram que as características de qualidade de carcaça são semelhantes quando animais inteiros são abatidos com idade inferior a 24 meses, quando comparados aos bovinos castrados. Já, para Soares (2005), a castração torna-se desnecessária para bovinos Nelore machos abatidos a partir de 27 meses de idade. Contudo, no caso de remuneração por aspectos qualitativos da carcaça, recomenda-se a castração dos animais aos 15 meses de idade.

Cardoso (2012), em experimento utilizando 40 bovinos da raça Nelore, 20 machos não castrados média de 411 kg de peso corporal inicial e 30 meses de idade e 20 fêmeas com 274 kg de peso corporal inicial e idade de 24 meses e dieta constituída de 85% de milho grão inteiro e 15% de núcleo proteico-vitamínico-mineral, constatou que o ganho de peso [GP (kg) e GP (@)], ganho médio diário (GMD) e o ganho de carcaça (GC) não apresentaram diferença entre os sexos ($P>0,05$). A conversão alimentar (CA) e a eficiência alimentar (EA) apresentaram diferenças entre os sexos ($P<0,05$), sendo que as fêmeas apresentaram menor conversão alimentar e maior eficiência alimentar (TABELA 2).

Tabela 2 – Médias do desempenho de bovinos terminados em confinamento com dieta de alto grão e seus respectivos coeficientes de variação.

Variável	Sexo		CV (%)
	Macho	Fêmea	
GP (kg)	75,54 a	65,64 a	28,07
GP (@)	2,52 a	2,18 a	28,07
GMD (g)	1,08 a	0,94 a	28,07
GC (kg)	39,11 a	32,87 a	27,75
CA (kgMS/kgGP)	8,45 a	5,46 b	30,81
EA (kgGP/kgMS)	0,13 b	0,19 a	24,09

GP – ganho de peso, GMD – ganho médio diário, GC – ganho de carcaça, CA – conversão alimentar, EA – eficiência alimentar.
Médias, na mesma linha, seguidas por letras diferentes diferem entre si (P<0,05).
Fonte: Adaptado de Cardoso (2012).

Os valores médios de CA e EA indicam que nos machos a adaptação não foi eficiente apesar de não ter sido observado diferenças estatísticas nas variáveis de GP e GMD (CARDOSO, 2012).

Houve efeito do sexo para as características de carcaça: espessura de coxão (EC), comprimento de perna (CP), espessura de gordura de cobertura (EGC), área de olho de lombo (AOL), peso de carcaça quente (PCQ) e rendimento de carcaça (RC) (P<0,05), (TABELA 3).

As diferenças encontradas para CP e EC podem ser justificadas devido aos animais encontrarem-se na mesma fase fisiológica (terminação), sendo que os machos não castrados apresentam maior estrutura corporal, principalmente para as variáveis altura e largura corporal e condição normal do sexo. Na variável EGC, as fêmeas apresentaram médias superiores em decorrência da deposição de gordura mais precoce em relação aos machos não castrados. O efeito encontrado na variável AOL foi oriundo da diferença de carcaça, no tocante ao tamanho, fator provocado principalmente pela diferença cronológica dos animais (CARDOSO, 2012). A autora concluiu que o sexo como única variável no sistema de confinamento de dieta 100% concentrado não permite a apresentação de diferenças no desempenho.

Tabela 3 - Médias das características de carcaça de bovinos confinados terminados com dieta de alto grão e seus respectivos coeficientes de variação.

Variável	Sexo		CV (%)
	Macho	Fêmea	
EC (cm)	26,33 a	22,88 b	6,45
CP (cm)	82,88 a	74,88 b	2,80
EGC (mm)	1,83 a	2,88 b	22,18
AOL (cm²)	75,67 a	56,33 b	11,47
PCQ (kg)	254,40 a	171,41 b	7,06
RC (%)	51,76 a	50,19 b	2,80

EC – espessura de coxão, CP – comprimento de perna, EGC – espessura de gordura de cobertura, AOL – área de olho de lombo, AOL_{PCQ} – área de olho de lombo para 100 kg de peso de carcaça quente, PCQ – peso de carcaça quente, RC – rendimento de carcaça.
Médias, na mesma linha, seguidas por letras diferentes diferem entre si (P<0,05).
Fonte: Adaptado de Cardoso (2012).

Paulino et al. (2008) avaliaram o desempenho produtivo de bovinos Nelore de diferentes classes sexuais, onde foram utilizados 35 animais da raça Nelore (12 machos inteiros, 11 machos castrados e 12 fêmeas). Concluíram que a classe sexual representa um fator determinante no crescimento de animais da raça Nelore, visto que a mesma exerceu influência sobre o ganho de peso, o consumo de MS em relação ao peso corporal (% PC), a eficiência alimentar e a eficiência de deposição de tecidos na carcaça dos animais. Verificaram, também, que os machos inteiros foram mais pesados do que as fêmeas ao final do experimento e os castrados em posição intermediária. Os machos inteiros apresentaram ganho médio diário 18,7% superior à média dos machos castrados e das fêmeas, com 17,4% mais peso de corpo vazio (PCV) e 21,6% mais carcaça que a média dos machos castrados e das fêmeas (TABELA 4). Esses resultados vêm corroborar com os de Pádua et al. (2004) que relataram que animais inteiros crescem a uma taxa de 10 a 25% maior que a de animais castrados.

Uma possível explicação para o maior consumo relativo de MS observado para as fêmeas pode ser seu menor peso corporal, visto que animais mais leves tendem a apresentar capacidade de consumo superior a animais mais pesados (PAULINO et al., 2008).

Com relação à eficiência alimentar, é sabido que machos inteiros apresentam melhor capacidade de converter alimentos em ganho de peso e em tecidos componentes da carcaça (SEIDEMAN et al., 1982).

Tabela 4 – Peso corporal final (PC final), peso de corpo vazio final (PCVZ final), consumo de matéria seca (CMS), ganho médio diário (GMD), ganho de peso de corpo vazio final (GPCVZ final), eficiência alimentar (EA), ganho de carcaça e eficiência de deposição de carcaça de bovinos Nelore de diferentes classes sexuais.

Variável	Classe sexual		
	Machos Inteiros	**Machos castrados**	**Fêmeas**
PC final (kg)	435,00 a	396,00 ab	372,00 b
PCVZ final (kg)	405,50 a	371,40 ab	347,50 b
CMS (g/kg de PV)	19,30 b	20,00 ab	21,10 a
GMD (kg/dia)	0,83 a	0,69 b	0,66 b
GPCVZ (kg/dia)	0,92 a	0,76 ab	0,69 b
EA (kg ganho / kg MS ingerida)	0,11 a	0,09 ab	0,09 b
Ganho de carcaça (kg/dia)	0,58 a	0,47 ab	0,44 b
Eficiência de deposição de carcaça[1]	13,20 b	15,91ab	16,64 a

Médias, na mesma linha, seguidas por letras diferentes diferem entre si (P<0,05).
[1]kg de matéria seca consumida/ kg de ganho de carcaça.
Fonte: Adaptado de Paulino et al. (2008).

4.2 QUANTO À IDADE

A terminação de bovinos em confinamento visa à produção de carne em menor espaço de tempo, possibilita o abate de animais jovens e bem acabados, proporcionando, em geral, carcaças e carne de melhor qualidade (FEIJÓ; THIAGO; ARRUDA, 1996).

A idade do animal é um fator muito importante e deve ser considerado na escolha dos animais a serem confinados, pois animais mais novos apresentam melhor velocidade de crescimento e melhor conversão alimentar do que animais mais velhos e mais pesados. Estes últimos necessitam de maior quantidade de alimento por quilo de ganho de peso, pois sintetizam maior quantidade de gordura (para formar 1 quilo de gordura são necessários 2,5 vezes mais energia do que para formar a mesma quantidade de músculo), levando ao aumento das exigências de mantença e da composição do ganho de peso (ALLEONI, 2001). Para terminação de animais jovens é necessário usar dietas com elevada densidade energética e proteica, normalmente obtidas utilizando-se maior quantidade de concentrado (RESTLE; FLORES; VAZ, 1997). Animais terminados com rações mais ricas em grãos possuem maior porcentagem de gordura intramuscular do que animais terminados com rações à base de forragens (ALVES; GOES; MANCIO, 2005).

A utilização de alimentos de boa qualidade por novilhos jovens, que são biologicamente mais eficientes, permite a redução da idade de abate. Esta alternativa possibilita, nas propriedades que trabalham em sistema de ciclo completo, a liberação de áreas para serem ocupadas por outras categorias, com inúmeros benefícios (RESTLE; VAZ, 1999). De acordo

com Owens et al. (1997), animais alimentados com rações contendo grãos de milho inteiro sem volumoso ou com mínimo de volumoso, podem apresentar melhor desempenho quando comparados com animais alimentados com dietas contendo milho quebrado, laminado a seco ou moído grosso.

A produção de novilhos para o abate em idades de 12 a 14 meses, também chamados superprecoces, causa melhoria da qualidade da carne, já que o aumento de idade do animal é o fator que altera mais significativamente a maciez (RESTLE; VAZ; FEIJO, 2000).

Os componentes físico-químicos do corpo variam durante o crescimento do animal. Fatores como idade, peso, espécie, raça, condição sexual e nível de ingestão de energia influenciam estas variações. Em animais de maturidade fisiológica precoce quando comparados aos animais de maturidade tardia com o mesmo peso vivo, observam-se maiores conteúdos corporais de gordura e menores de proteína (AGRICULTURAL AND FOOD RESEARCH COUNCIL - AFRC, 1993). Segundo o ARC (1980), este fato se deve ao menor potencial dos animais precoces em depositar proteína, aliado à maior propensão em depositar gordura.

Véras, Valadares Filho e Silva (2000) verificaram a redução de proteína e aumento na proporção de gordura nas carcaças de bovinos da raça Nelore à medida que sua idade avançava.

De modo geral, a carne de animais jovens apresenta textura mais fina do que de animais de idade mais avançada (MÜLLER, 1987), o que está associado à maciez da carne. A menor maciez da carne é justificada pela alta correlação positiva entre a idade de abate dos animais e o número de ligações cruzadas termoestáveis do colágeno dos músculos (ALVES; GOES; MANCIO, 2005).

Animais tardios são considerados ideais em sistemas de nível nutricional elevado, porque podem ser abatidos com pesos maiores, alcançando o máximo desenvolvimento muscular, sem, contudo, depositar gordura em excesso. Já animais precoces apresentam maiores acúmulos de gordura e menores de proteína, mas o abate mais cedo destes animais pode oferecer um produto de melhor qualidade no mercado (BERG; BUTTERFIELD, 1976).

4.3 QUANTO AOS GRUPOS GENÉTICOS

Considerando a variabilidade do potencial genético para desempenho dentro de uma mesma raça, é importante a escolha rigorosa dos animais em sistemas de terminação em confinamento (RESTLE et al., 2007).

Em mesma idade, bovinos resultantes do cruzamento das raças Aberdeen Angus e Nelore apresentam maiores pesos, maiores GMD, maior acabamento e maior exigência de

energia em comparação aos da raça Nelore e dos mestiços Canchim × Nelore e Simental × Nelore. Animais de grupos genéticos diferentes apresentaram taxas de deposição dos constituintes químicos corporais e exigências líquidas para ganhos diferentes quando avaliados em mesma idade e mesmo manejo e sistema alimentar (GOULART et al., 2008).

Quanto ao tipo de animal utilizado, ao contrário dos Estados Unidos, no Brasil predominam os animais zebuínos e há carência de dados de desempenho desses animais com rações com teores elevados em concentrado, especialmente com rações ricas em amido. Também é escassa a literatura quanto aos métodos de processamento de milho e adequação de proteína degradável no rúmen (PDR) em rações de terminação formuladas com grãos de milho duro ou com coprodutos industriais como a polpa cítrica (CARARETO, 2011).

É conhecido que animais zebuínos têm menor capacidade de digerir amido que os taurinos. Com isso, torna-se interessante a utilização de cruzamentos industriais a fim de obter animais que terão melhores resultados quando confinados (CAETANO et al., 2010).

5 QUALIDADE DE CARCAÇA

O fornecimento de dietas com elevado teor de concentrado para bovinos jovens que apresentam boa resposta a esse tipo de alimentação tem sido adotado com o objetivo de intensificar o sistema de produção, pois permite o abate de animais jovens com acabamento de gordura adequado, sem prejuízos à qualidade da carne (LEME et al., 2003).

De acordo com Alves, Goes e Mancio (2005), rações mais ricas em grãos possibilitam animais terminados com maior porcentagem de gordura intramuscular do que animais terminados com rações à base de forragens. Por outro lado, Beltrame e Ueno (2011) não observaram variações nas características qualitativas da carne e carcaça de novilhos inteiros cruza Charolês, com idade média de 10 meses e peso vivo médio inicial de 350 kg, terminados com dieta 100% concentrado comparativamente à dieta constituída de silagem de milho mais concentrado, sendo que as duas dietas apresentaram resultados satisfatórios, valores médios de 54% de rendimento de carcaça e 3,7 mm de espessura de gordura.

Jones, Rompala e Jeremiah (1985) constataram que animais alimentados com rações sem volumoso, apresentaram maiores teores de gordura na carcaça que aqueles cujas rações eram à base de volumoso. A gordura subcutânea tem sido enfatizada como um importante indicador de qualidade final, uma vez que afeta a qualidade da carne. Carcaças com espessura de gordura subcutânea (EGS) abaixo de 3,0 mm são penalizadas quanto à classificação e remuneração pelo frigorífico (LUCHIARI FILHO, 1998).

Silva e Castro (2009), avaliando 72 machos Nelores, mensuraram nos animais vivos, a área de olho de lombo, a espessura de gordura subcutânea e o grau de marmorização da carne. Os exames mostraram que todas as dietas garantiram bom acabamento, com no mínimo três milímetros de gordura de cobertura, conforme exigência dos frigoríficos. Os melhores resultados foram obtidos com dietas à base de sorgo, bagaço de cana e ingredientes concentrados, apresentando, em média, 72,7 cm² de área de lombo e 4,9 mm de gordura de cobertura. As rações com milho inteiro também apresentaram bons resultados nessa avaliação, como demonstra o Tabela 5, o que, segundo os autores, é ponto favorável às dietas sem volumoso.

Tabela 5 – Avaliação da qualidade da carne (ultrassonografia).

Tratamentos	**A.O.L.[1] (cm^2)**	**E.G.S.[2] (mm)**	**M.A.R.[3] (escore)**
Milho inteiro (T_1, T_2, T_3, T_4)	69,7	4,3	2,3
Alto concentrado (T_5, T_6)	68,3	3,4	2,4
Alto concentrado + bin (T_7, T_8)	72,7	4,9	2,6
Média geral	69,7	4,3	2,3

[1]A.O.L. = área de olho-de-lombo.
[2]E.G.S. = espessura de gordura subcutânea.
[3]M.A.R. = marmoreio.
Fonte: Silva e Castro (2009).

A comercialização de bovinos no Brasil baseia-se no rendimento de carcaça, e alguns fatores nutricionais possuem grande influência neste parâmetro, como a ausência ou pequena participação de fibras longas, que certamente alteram o peso do conteúdo gastrintestinal (LAWRENCE; FOWLER, 1997). Os alimentos oferecidos durante a terminação têm efeito significativo nas diferenças observadas no rendimento de carcaça em bovinos, devido às diferenças que ocorrem no desenvolvimento do trato digestório (DI MARCO, 1994). Além disto, rações com elevado teor de concentrados geralmente produzem maior ganho de peso e consequentemente, maior quantidade de gordura na carcaça, pois a composição do ganho em planos nutricionais elevados favorece a deposição de gordura (GRANDINI, 2006).

A menor maciez da carne é justificada pela alta correlação positiva entre a idade de abate dos animais e o número de ligações cruzadas termoestáveis do colágeno dos músculos (ALVES; GOES; MANCIO, 2005), o que corrobora Müller (1987), que descreve que a carne de animais jovens apresenta textura mais fina do que de animais de idade mais avançada.

Ueno (2012) avaliou a carcaça e componentes não integrantes da carcaça de 20 novilhos inteiros da raça Canchim com 12 meses de idade, confinados com dieta 100% concentrado (T_1)

ou dieta com 55% concentrado e silagem de milho (T_2). Conforme a Tabela 6, não foram encontradas diferenças significativas entre os tratamentos para o peso vivo de fazenda (492,15 kg), peso de carcaça quente (263,76 kg), rendimento de carcaça (53,57%), comprimento de carcaça (175,40 cm), espessura de coxão (24,06 cm), comprimento de braço (39,25 cm), espessura de gordura (3,63 mm) e distribuição da gordura (4,15 mm). Houve variações significativas apenas para o perímetro de braço.

A espessura de gordura subcutânea medida no nível da décima segunda costela, numericamente foi menor em animais tratados com 100% de concentrado, apresentando 3,13 mm de gordura, comparativamente aos animais que foram alimentados com silagem de milho como fonte de volumoso, que depositaram 4,13 mm de gordura de cobertura na carcaça. A ração com 100% de concentrado proporcionou carcaças com acabamento e distribuição de gordura adequada às exigências da indústria (UENO, 2012), visto que o padrão de gordura desejado nas carcaças pela indústria frigorífica fica entre 3 a 6 mm de espessura, com mínimo de 2 mm e máximo de 7 mm. O excesso de gordura é inútil e praticamente sem valor comercial sendo aparado a um mínimo pelos varejistas no ato da comercialização (MACEDO et al., 2001).

Freitas et al. (2008), relataram que uma das características que expressam a musculosidade da carcaça é o perímetro de braço. Nos animais em confinamento apresenta correlações positivas com o peso de carcaça e porcentagem de dianteiro, no entanto, correlacionam-se negativamente com a espessura de gordura (UENO, 2012). O tratamento com 100% de concentrado promoveu aumento no perímetro de braço e redução numérica na cobertura de gordura da carcaça e, sendo sugestivo de propiciar carcaças com maior grau de musculosidade (UENO, 2012).

Nos últimos anos tem-se dado maior ênfase aos chamados componentes não integrantes da carcaça, principalmente aos tecidos externos (couro) e membros (cabeça, pernas e patas), explicado pela maior valorização destes produtos pela indústria beneficiadora do couro e de fabricação de rações, e também por estarem associados ao rendimento da carcaça (KUSS; BARCELLOS; LOPES, 2008).

Na comparação dos componentes do corpo não integrantes da carcaça (TABELA 8), não houve diferença significativa entre os tratamentos para os pesos de cabeça (11,50 kg), língua (1,0 kg), cabeça mais língua (12,50 kg), rabo (1,47 kg), coração (1,90 kg), fígado (5,63kg), rins (0,95 kg), pulmões (5,12 kg), diafragma (2,66 kg), rúmen cheio (37,55 kg), rúmen vazio (10,25 kg), abomaso cheio (4,74 kg), intestinos (20,60 kg), patas (10,51 kg), pescoço (4,63 kg) e testículos (1,26 kg).

Tabela 6 – Medidas quantitativas da carcaça de novilhos terminados em confinamento tratados com diferentes sistemas de alimentação

Variável	Tratamentos		Média
	100% concentrado[1]	Silagem de milho + concentrado[2]	
Peso vivo de fazenda (kg)	496,60 a	487,71 a	492,15
Peso de carcaça quente (kg)	265,48 a	262,04 a	63,76
Rendimento de carcaça (%)	53,44 a	53,71 a	53,57
Comprimento de carcaça (cm)	176,40 a	174,40 a	175,40
Espessura de coxão (cm)	24,20 a	23,92 a	24,06
Comprimento de braço (cm)	39,60 a	38,90 a	39,25
Perímetro de braço (cm)	39,60 a	37,10 b	38,35
Espessura de gordura (mm)	3,13 a	4,13 a	3,63
Distribuição da gordura (mm)	3,90 a	4,40 a	4,15

Tratamentos - [1]80% de grãos de milho + 20% núcleo proteico, (*ad libitum*); [2]5,5 kg animal^{-1} dia^{-1} de concentrado + silagem de milho (*ad libitum*).
Médias na linha, seguidas de letras maiúsculas diferentes, diferem entre si pelo teste F a 5%.
Fonte: Ueno (2012).

No entanto, novilhos tratados com 100% de concentrado apresentaram maiores pesos de baço e couro, com valores de 3,03 kg e 49,49 kg, respectivamente, enquanto que os tratados com silagem de milho e concentrado apresentaram pesos de 1,65 kg e 44,10 kg para os respectivos componentes do corpo não integrantes da carcaça. Numericamente, foram observados maiores pesos de coração (P=0,07) e fígado (P=0,09) em animais tratados com 100% de concentrado (TABELA 7) (UENO, 2012).

Segundo Ferrel, Garret e Hinman (1976), o tamanho de baço, fígado e rins pode aumentar com o consumo de maior concentração de nutrientes, principalmente energia e proteína, porque são órgãos que participam ativamente no metabolismo destes nutrientes.

Tabela 7 – Peso dos componentes do corpo da carcaça de novilhos terminados em confinamento tratados com diferentes sistemas de alimentação.

(Continua...)

Variável	Tratamentos		Média
	100% concentrado[1]	Silagem de milho + concentrado[2]	
Peso da cabeça	12,25 a	10,76 a	11,50
Peso da língua	1,08 a	0,92 a	1,00
Peso de cabeça + língua	13,33 a	11,67 a	12,50
Peso do rabo	1,55 a	1,39 a	1,47
Peso do coração	2,17 a	1,63 a	1,90
Peso do fígado	6,06 a	5,21 a	5,63
Peso dos rins	0,95 a	0,94 a	0,95
Peso dos pulmões	5,32 a	4,92 a	5,12
Peso do baço	3,03 a	1,65 b	2,34

Tabela 7 – Peso dos componentes do corpo da carcaça de novilhos terminados em confinamento tratados com diferentes sistemas de alimentação.

(Conclusão...)

Variável	Tratamentos		Média
	100% concentrado[1]	Silagem de milho + concentrado[2]	
Peso do diafragma	2,80 a	2,53 a	2,66
Peso do rúmen cheio	35,90 a	39,20 a	37,55
Peso do rúmen vazio	10,64 a	9,85 a	10,25
Peso do abomaso cheio	4,98 a	4,51 a	4,74
Peso dos intestinos	19,94 a	21,25 a	20,60
Peso do couro	49,40 a	44,10 b	46,75
Peso das quatro patas	11,00 a	10,02 a	10,51
Peso do pescoço	4,61 a	4,64 a	4,63
Peso dos testículos	1,28 a	1,25 a	1,26

Tratamentos - [1]80% de grãos de milho + 20% núcleo proteico, (*ad libitum*); [2]5,5 kg animal^{-1} dia^{-1} de concentrado + silagem de milho (*ad libitum*).

Médias na linha, seguidas de letras maiúsculas diferentes, diferem entre si pelo teste F a 5%.

Fonte: Ueno (2012).

De acordo com Restle et al. (2005) o peso do couro é influenciado pelo peso de abate e pelo grupo genético dos animais, podendo ocorrer acréscimo com o aumento no peso de abate dos animais.

Para o frigorífico, o peso absoluto do couro, como da língua, diafragma, retículo, rúmen, rabo, fígado, coração e rins são importantes, uma vez que representa maior receita por unidade comercializada (UENO, 2012).

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A dieta 100% concentrado deve ser utilizada de forma estratégica para que possa gerar ótimos resultados econômicos. Vários aspectos devem ser analisados e avaliados antes da escolha pelo confinamento com esta tecnologia. Com isso, deve-se levar em consideração a relação entre o preço do milho e da carne e o tipo de animal a ser confinado (idade, sexo e grupo genético).

São fatores positivos do confinamento com dieta 100% concentrado, o menor capital mobilizado, a maior economia em relação ao confinamento convencional quanto às instalações, a possibilidade de ser realizada sem dificuldades em propriedades com níveis tecnológicos baixos e nas quais não há estrutura para produzir volumosos ou processar grãos.

A dieta proporciona maiores rendimentos de carcaça, marmoreio e área de olho de lombo, satisfazendo aos consumidores. Possibilita alta eficiência alimentar, redução no número

de tratos, facilidade no transporte, estocagem e mistura de grãos e praticidade no arraçoamento, diminui perdas no cocho, diminui a utilização de máquinas e equipamentos agrícolas e diminui riscos de acidentes.

A redução no consumo e, concomitantemente, no volume de alimento necessário para alimentação de animais com dieta 100% concentrado é um fator que pode contribuir grandemente para a melhoria do sistema operacional e custos de alimentação. Contudo, podem ocorrer distúrbios metabólicos. Medidas são necessárias para que os mesmos sejam evitados, como a adaptação dos animais à dieta e a utilização de aditivos na ração.

Nos confinamentos brasileiros, esta tecnologia ainda deve ser aplicada com cautela, devido às diferenças de padrão genético dos animais (azebuados) e tipo de milho (duro/flint) utilizado, quando comparados aos países que utilizam a técnica há décadas (animais taurinos e milho do tipo dentado), e principalmente devido à escassa produção local de pesquisas, o que impossibilita uma análise mais aprofundada da eficiência desta tecnologia em nosso país.

7 REFERÊNCIAS

AGRICULTURAL AND FOOD RESEARCH COUNCIL - AFRC. **Energy and protein requeriments of ruminants.** Wallingford: Commonwealth Agricultural Bureaux International, 1993.

AGRICULTURAL RESEARCH COUNCIL - ARC. **The Nutrient requirements of ruminant livestock:** technical review. CAB Intl, 1980.

ALLEONI, G. F. Acabamento de bovinos de corte em confinamento.In: SIMPÓSIO GOIANO SOBRE MANEJO E NUTRIÇÃO DE BOVINOS, 3., 2001, Goiânia. **Anais...** Goiânia: SGSMNB, 2001, p. 155-186.

ALVES, D. D.; GOES, T. R.; MANCIO, A. B. Maciez da carne bovina. **Ciência Animal**, v. 6, n. 3, p. 135-149, 2005.

ANUALPEC. **Anuário estatístico da pecuária de corte**. São Paulo: FNP Consultoria e Comércio Ltda., 2013.

BARBOSA, P. F. Cruzamentos para obtenção do novilho precoce. In: ENCONTRO NACIONAL SOBRE NOVILHO PRECOCE, 1995, Campinas. **Anais...** Campinas: Encontro Nacional Sobre Novilho Precoce, 1995. p. 75-92.

BARBOSA, F. A. et al. Dietas de alto concentrado para terminação de bovinos de corte. In: ENCONTRO DOS MÉDICOS VETERINÁRIOS E ZOOTECNISTAS DOS VALES DO MUCURI, JEQUITINHONHA E RIO DOCE, 32., 2011, Teófilo Otoni. **Anais**...Teófilo Otoni-MG: SRMVVM, 2011.

BELTRAME, J. M; UENO, R. K. **Dieta 100% concentrado com grão de milho inteiro para terminação de bovinos de corte em confinamento.** 2011. 40 f. Projeto de pesquisa (Pós-Graduação *Lato Sensu* em Produção de Bovinos de Corte) - Universidade Tuiutido Paraná, Guarapuava-PR. 2011.

BERG, R. T.; BUTTERFIELD, R. M. **New concepts of cattle growth.** New York: Sydney University. 1976.

BROWN, M. S.; MILLEN, D. D. Protocolos para Adaptar Bovinos Confinados a Dietas de Alto Concentrado. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE NUTRIÇÃO DE RUMINANTES, 2., 2009, Botucatu. **Anais**... Botucatu: FCA-UNESP-FMVZ, 2009. p. 23-31.

CAETANO, M. et al. Time of collection affects starch losses in Nellore and crossbred cattle in commercial feedlots. **Journal of Animal Science**, v. 88, n. 2, p. 697, 2010.

CARARETO, R. **Fontes de nitrogênio, níveis de forragem e métodos de processamento de milho em rações para tourinhos da raça Nelore terminados em confinamento.** 2011. 106 f. Dissertação (Doutorado em Ciência Animal e Pastagem) - Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

CARDOSO, E. O. **Dieta de alto grão para bovinos confinados: viabilidade econômica e qualidade da carne**. 2012. 66 f. Dissertação (Mestrado em Produção de Ruminantes) - Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Bahia, 2012.

DEHORITY, B. A. In vitro determination of generation times for Entodiniumexiguum, OphryoscolexpurkynjeiandEudiplodiniummaggi. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, v. 51, p. 333-338, 2004.

DI MARCO, O. N. **Crecimiento y respuesta animal**. Balcarce: Associación Argentina de Producción Animal, 1994.

FEIJÓ, G. L. D.; EUCLIDES FILHO, K. Efeito de diferentes sistemas de produção sobre as características das carcaças de bovinos de dois grupos genéticos. In**:** REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 35., 1998, Botucatu. **Anais…** Botucatu: Sociedade Brasileira de Zootecnia, 1998. v. 4, p. 659-661.

FEIJÓ, G. L. D.; THIAGO, L. R. L.; ARRUDA, E. F. Efeito dos níveis de concentrado na engorda de bovinos confinados. Desempenho de novilhos nelore. IN: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 33., 1996, Fortaleza. **Anais...** Fortaleza: Sociedade Brasileira de Zootecnia, 1996. p. 70-73.

FERREL, C. L.; GARRET, W. N.; HINMAN, N. Estimation of body composition in pregnant and non pregnant heifers. **Journal of Animal Science**, v. 42, n. 5, p. 1158-1166, 1976.

FREITAS, A. K. et al. Características da carcaça de bovinos nelore inteiros VS castrados em duas idades, terminados em confinamento. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 37, n. 6, p. 1055-1062, 2008.

GOULART, R. S. et al. Composição corporal e exigências líquidas de proteína e energia de bovinos de quatro grupos genéticos terminados em confinamento. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 37, n. 5, p .926-935, 2008.

GRANDINI, D. Confinamento de bovinos de corte: uso de dietas com alto grão. In: CICLO DE PALESTRAS EM PRODUÇÃO E MANEJO DE BOVINOS, 11., 2006, Canoas. **Anais...** Canoas: Ed. da ULBRA, 2006. p. 49-56.

_____. Dietas Contendo Grãos de Milho Inteiro sem Fonte de Volumoso para Bovinos Confinados, 2009, Botucatu. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE NUTRIÇÃO DE RUMINANTES, 2., 2009. **Anais...** Botucatu: FCA-UNESP-FMVZ, 2009. p. 90-102.

JONES, S. D. M.; ROMPALA, R. E.; JEREMIAH, L. E. Growth and composition of the empty body in steers of different maturity types fed concentrate or forage diets. **Journal of Animal Science**, v. 60 n. 2, p. 427-433, 1985.

KATSUKI, P. A. **Avaliação nutricional, desempenho e qualidade da carne de bovinos alimentados com rações sem forragem, com diferentes níveis de substituição do milho inteiro por casca de soja.** 2009. 55 f. Tese (Doutorado em Ciência Animal) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2009.

KUSS, F.; BARCELLOS, J. O. J.; LÓPEZ, J. Componentes não-integrantes da carcaça de novilhos não-castrados ou castrados terminados em confinamento e abatidos aos 16 ou 26 meses de idade. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 37, n. 10, p. 1829-1836, 2008.

LAWRENCE, T. L. J.; FOWLER, V. R. **Growth of farm animals.** London: Cambridge University, 1997.

LEME, P. R. et al. Utilização do bagaço de cana-de-açúcar em dietas com elevada proporção de concentrados para novilhos Nelore em confinamento. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 32, n. 6, p. 1786-1791, 2003.

LUCHIARI FILHO, A. Perspectiva da bovinocultura de corte no Brasil. In: SIMPÓSIO SOBRE PRODUÇÃO INTENSIVA DE GADO DE CORTE, 1998, Campinas. **Anais...** Campinas: Colégio Brasileiro de Nutrição Animal, 1998. p. 1-10.

MACEDO, M. P. et al. Características de carcaça e composição corporal de touros jovens da raça nelore terminados em diferentes sistemas. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 30, n. 5, p. 1610-1620, 2001.

MÜLLER, N. **Normas para avaliação de carcaças e concurso de carcaças de novilhos**. 2. ed. Santa Maria: Universidade Federal de Santa Maria, 1987.

OWENS, F. N. et al. The effect of grain source and grain processing on performance of feedlot cattle: a review. **Journal of Animal Science**, v. 75, p. 868-879, 1997.

_____. Acidosis in cattle: A review. **Journal of Animal Science,** v. 76, p. 275-286, 1998.

PÁDUA, J. T. et al. Genótipo e condição sexual no desempenho e nas características de carcaça de bovinos de corte super jovens. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 33, n. 6, p. 2330-2342, 2004.

PAES, M. C. D. **Aspectos Físicos, Químicos e Tecnológicos do Grão de Milho.** Sete Lagoas: EMBRAPA-CNPMS, 2006. 6 p. (Circular Técnica: 75).

PAULINO, P. V. R. et al. Desempenho produtivo de bovinos Nelore de diferentes classes sexuais alimentados com dietas contendo dois níveis de oferta de concentrado. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 37, n. 6, p. 1079-1087, 2008.

RESTLE, J.; FLORES, J. L. C.; VAZ, F. N. Desempenho em confinamento, do desmame ao abate aos quatorze meses, de bovinos inteiros ou castrados, produzidos por vacas de dois anos. **Ciência Rural**, v. 27, n. 4, p. 6 51-655, 1997.

RESTLE, J. et al. Características das partes não-integrantes da carcaça de novilhos 5/8nelore 3/8charolês abatidos em três estádios de desenvolvimento. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 34, n. 4, p. 1339-1348, 2005.

_____. Apreciação econômica da terminação em confinamento de novilhos Red Angus super jovens, abatidos com diferentes pesos. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 36, n. 4, p. 978-986, 2007.

RESTLE, J.; VAZ, F. N. Confinamento de bovinos definidos e cruzados. In: LOBATO, J. F. P.; BARCELLOS, J. O. J.; KESSLER, A. M. (Eds.) **Produção de bovinos de corte**. Porto Alegre: EDIPUCRS, 1999. p. 141-198.

RESTLE, J.; VAZ, F. N.; FEIJÓ, G. L. D. Características de carcaça de bovinos não-castrados ou castrados de diferentes composições raciais Charolês x Nelore. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 29, n. 5, p. 1371-1379, 2000.

SANTOS, C. B. C. **A importância da alimentação do rebanho**. 2014. Disponível em: <http://www.clubeamigosdocampo.com.br/artigo/a-importancia-da-alimentacao-do-rebanho-1287>. Acesso em: 18 nov. 2015.

SARTOR, N. **Grão de milho inteiro na alimentação de bovinos.** Londrina, 2008. Disponível em: <www.camposecarrer.com.br>. Acesso em: 14 out. 2012.

SCHWARTZKOPF-GENSWEIN, et al. Effect of bunk management on feeding behavior, ruminal acidosis and performance of feedlot cattle: A review. **Journal of Animal** Science, v. 81, p. 149-158, 2003.

SEIDEMAN, S. C. et al. Utilization of the intact male for red meat production: a review. **Journal of Animal Science**, v. 55, n. 4, p. 826-840, 1982.

SILVA, H. L. **Dietas de alta proporção de concentrado para bovinos de corte confinados.** 2009. 157 f. Tese. (Doutorado em Ciência Animal) – Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2009.

SILVA, H. L.; CASTRO, F G. F. **Alto grão, dieta que vai bem em confinamento pequeno**. Revista DBO, p. 22-24, 2009. Disponível em: <http://agrocria.com.br/NetManager/documentos/altograo.pdf>. Acesso em: 15 out. 2015.

SLYTER, L. L. et al. Influence of the type and level of grain and diethylstilbestrol on the rumen microbial populations of the steers fed all-concentrate diets. **Journal of Animal Science,** v. 31, p. 996-1002, 1970.

SOARES, L. **Composição, rendimento de carcaça e desempenho de bovinos inteiros e castrados em diferentes idades, recriados a pasto e terminados em confinamento.** 2005. 74 f. Dissertação (Mestrado), Universidade Federal de Lavras. 2005.

TAJIMA, K. et al. Diet-dependent shifts in the bacterial population of the rumen revealed wthi real-time PCR. **Appliedand Environmental Microbiology,** v. 67, n. 6, p.2766- 2744. 2001.

UENO, R. K. **Avaliação bioeconômica da cultura do milho (*Zea mays* L.) utilizada sob diferentes formas na alimentação de novilhos em confinamento.** 2012. 152 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia – Produção Vegetal) - Universidade Estadual do Centro Oeste, Guarapuava-PR, 2012.

VÉRAS, A. S. C.; VALADARES FILHO, S. C.; SILVA, J. F. C. da. Predição da composição corporal e dos requisitos energéticos e protéicos de bovinos Nelore, não castrados, alimentados com rações com diferentes níveis de concentrados. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 29, n. 6, p. 2379-2389, 2000.

Capítulo

26

Diferimento de pastagem para bovinocultura de corte

Sâmila Esteves Delprete[1]
Letícia Mária Costa Fregulhia[2]
Luciano Bertolani Filho[3]
Antônio Carlos Cóser[4]
Deolindo Stradiotti Júnior[5]
Gisele Rodrigues Moreira[6]

1 INTRODUÇÃO

Segundo o Departamento de Agricultura dos Estados Unidos da América (USDA, 2013), desde 2009 o Brasil é o segundo maior produtor de carne do mundo. O rebanho bovino brasileiro em 2015 era de 212.343.932 cabeças, de acordo com o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), um aumento de 579.640 cabeças em relação ao ano de 2013, onde o rebanho bovino brasileiro possuía 211.764.292 cabeças (IBGE, 2015).

[1] Universidade Federal do Espírito Santo, e-mail: samiladelprete@hotmail.com;
[2] Universidade Federal do Espírito Santo, e-mail: lefregulhia@hotmail.com;
[3] Universidade Federal do Espírito Santo, e-mail: lucianobertolanifilho@hotmail.com;
[4] Bolsista DCR do CNPq/FAPES, e-mail: acoser1@yahoo.com.br;
[5] Universidade Federal do Espírito Santo, e-mail: jrstradiotti@terra.com.br;
[6] Universidade Federal do Espírito Santo, e-mail: gisele.moreira@ufes.br.

A Organização das Nações Unidas para a Alimentação e Agricultura (STEINFELD et al., 2006) estimou que a produção de carne deve aumentar cerca de 63% até o ano de 2050, sendo que 82% deste acréscimo deverá ser proveniente de países em desenvolvimento.

Em relação às pastagens, o Brasil teve redução de 3% na área, contudo, na Região Norte, a área de pastagens passou de 4.428.116 ha para 32.630.532 ha entre os anos de 1970 e 2006 (IBGE, 2006).

Pedreira e Primavesi (2011) relataram que de fato as pastagens estão crescendo sobre áreas de matas. Contudo, a Mata Amazônica é responsável por proporcionar eventos ambientais essenciais às atividades agropecuárias, mantendo o ciclo da água mais longo e com melhor distribuição de chuvas e de menor intensidade, recarga mais eficiente dos lençóis freáticos e dos aquíferos, estabilização da temperatura e manutenção da umidade relativa do ar.

A disponibilidade de água é de fundamental importância para o bom índice proteico necessário para o ótimo pastejo, assim como para o crescimento da forrageira. A deficiência hídrica do solo leva ao baixo desenvolvimento das pastagens secando-a e induzindo a perdas nutricionais, consequentemente reduzindo o peso dos animais bem como a lucratividade no setor agropecuário (SOUZA, 2014).

A pecuária brasileira é praticada quase que exclusivamente de forma extensiva, com uso de plantas forrageiras sob pastejo, em geral submetidas a superpastoreio, com lotação acima da capacidade de suporte (PEDREIRA; PRIMAVESI, 2011). Já não bastasse a má utilização das forrageiras tropicais, de acordo com a Steinfeld et al. (2006), as mudanças climáticas poderão reduzir a produção de forragem na magnitude de 16 a 25% até 2030, em vista do aquecimento e da redução da água disponível no solo.

Há diversas estratégias que podem ser empregadas para o fornecimento de forragem durante o período seco do ano, tais como a formação de capineiras utilizando-se capim ou cana-de-açúcar, ensilagem, fenação e diferimento do uso da pastagem, sendo esta última o recurso de mais fácil adoção e, em geral, de menor custo (SANTOS et al., 2009a). O diferimento do pasto é uma técnica onde se veda uma área da pastagem produzida no término de seu crescimento, a fim de possibilitar que ela seja utilizada durante as estações mais secas, tornando-se uma excelente técnica com o intuito de minimizar os efeitos da sazonalidade sobre o sistema de produção, contribuindo para uma distribuição e oferta mais homogênea da produção ao longo do ano.

Objetiva-se apresentar o diferimento de pastagem como estratégia de manejo nutricional para época seca para bovinos de corte, visto essa época do ano ser a época crítica na produção forrageira e com o intuito de demonstrar uma técnica barata e eficiente, quando feita

corretamente, de conservação de pastagem para utilização época seca que tende a ser mais impactante a cada ano devido à crise hídrica.

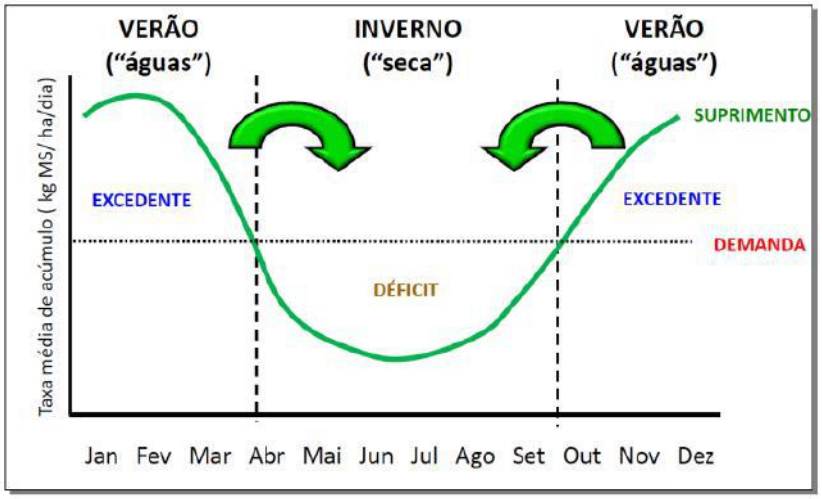
2 DIFERIMENTO DE PASTAGENS

Conforme ABIEC (2014) o rebanho bovino brasileiro é de aproximadamente 208,3 milhões de cabeças. Sendo que desse montante, 42,07 milhões de cabeças foram abatidas e dos animais abatidos, 4,66 milhões (11%) são provenientes de terminação em confinamento, ou seja, 89% dos animais abatidos são criados e terminados predominantemente em pasto, e uma parcela usa suplementação múltipla para fazer o acabamento em pasto. O uso de pastagens como principal fonte de alimento para ruminantes é a alternativa mais econômica de alimentação dos rebanhos bovinos (MORAES et al., 2006).

O principal fator limitante para a produção de bovinos a pasto, segundo Euclides e Queiroz (2000), é a escassez de forragem no período seco. Portanto, é indispensável a adoção de estratégias de manejo que visem aumentar a disponibilidade de forragem durante o período crítico, objetivando a manutenção da taxa de lotação; sendo que estratégias devem ser adotadas no período das águas.

A redução da produção de pastagens devido a diminuição na disponibilidade de fatores ambientais, como luz, radiação solar, água tem ocorrência em certo período do ano, a denominação deste é dada como estacionalidade de produção de forragem. Portanto, podemos observar um período das águas que compreende uma pastagem produtiva, bem manejada e nutrida e um período seco em que há discrepância no crescimento forrageiro (FIGURA 1).

Figura 1 - Estacionalidade de produção de forragem e demanda de forragem pelo rebanho ao longo do ano.



Fonte: Guarda, Queiroz e Monteiro (2015).

O pastejo diferido destaca-se como uma forma promissora a fim de abrandar os efeitos causados pela estacionalidade na produção forrageira. Essa técnica consiste em selecionar uma determinada área de pastagem e impedir o acesso dos animais no final da estação chuvosa, para que esse pasto seja utilizado em tempo de escassez, ou seja, período seco (EUCLIDES et al., 2007). Alguns cuidados com o desenvolvimento da técnica devem ser tomados a fim de estabelecer um ótimo aporte nutricional, pois à medida que se aumenta o período de vedação, ocorre um incremento no acúmulo de forragem, porém de valor nutritivo inferior (COSTA; OLIVEIRA; TOWNSEND, 1998; EUCLIDES et al., 1990; LEITE; COSTA; GOMES, 1998). As plantas mais indicadas são aquelas que apresentam baixo acúmulo de colmos e boa retenção de folhas verdes, o que proporciona menor redução no valor nutritivo ao longo do tempo (COSTA; OLIVEIRA; TOWNSEND, 1998; EUCLIDES et al., 1990; LEITE; COSTA; GOMES, 1998).

3 CARACTERÍSTICAS DO PASTO DIFERIDO

Fonseca e Santos (2011) relatam que pastos diferidos possuem grande quantidade de forragem, contudo de baixa qualidade, popularmente denominada como “macega”. Porém, as ações de manejo empregadas antes do período de diferimento interferem na produtividade de forragem em pastagens diferidas. As variações climáticas entre anos para uma mesma região também provocam diferenças significativas em produção de forragem.

Durante período de diferimento, grande parte dos perfilhos vegetativos (sem inflorescência) desenvolve-se em perfilhos reprodutivos (com inflorescência) e estes, passam à categoria de perfilhos mortos. Neste período, também há redução da quantidade de folha verde, bem como aumento das massas de folhas secas, talos secos e talos verdes no pasto (SANTOS et al., 2010). Outra característica comum em pastos diferidos é o tombamento das plantas, comumente chamados de “acamados”. O longo período de diferimento está associado a esta condição e, consequentemente, estas pastagens possuem grande quantidade de forragem de baixa qualidade (FONSECA; SANTOS, 2011).

4 AÇÕES DE MANEJO EM PASTAGENS DIFERIDAS

Conforme relatado por Fonseca e Santos (2011), inúmeras possibilidades de interferência existem, por meio de manejo, para melhorar a produção animal em pastagens diferidas, dentre as quais se destacam: escolha da espécie ou cultivar de planta forrageira; altura

do pasto no início do período de diferimento; adubação nitrogenada; duração do período de diferimento; subdivisão da área a ser diferida (vedação única ou escalonada) e suplementação do pasto.

4.1 ESCOLHA DA FORRAGEIRA

Em geral, as plantas forrageiras tropicais têm elevado potencial de produção manifestado, principalmente, durante o período das águas. Nessa época do ano é comum observar a concentração de 75% a 90% da produção anual de forragem (MARTHA JÚNIOR et al., 2003).

Não são todas as espécies forrageiras que são indicadas para o diferimento. Sendo que as mais indicadas são aquelas que apresentam uma boa retenção de folhas verdes, resultando em menores perdas no valor nutritivo durante o crescimento. Entre elas destacam-se as dos gêneros *Brachiaria* (decumbens e capim-marandu), *Cynodon* (capim-estrela, coastcross e tiftons) e *Digitaria* (capim-pangola). Porém, as gramíneas cespitosas, tais como as dos gêneros *Panicum* (capins tanzânia, mombaça e tobiatã), *Pennisetum* (capim-elefante) e *Andropogon* (capim-andropógon) não são indicadas para diferimento, pois quando vedadas por períodos longos apresentam acúmulo de caules grossos e uma baixa relação folha/caule (EUCLIDES; QUEIROZ, 2000).

Ainda segundo Euclides e Queiroz (2000), a diversificação de pastagens é recomendada, e na maioria das propriedades, há áreas indicadas para diferentes espécies forrageiras. Com isso recomenda-se que as forrageiras mais aptas para diferimento sejam utilizadas menos intensivamente durante as águas, para serem vedadas a partir de meados de janeiro. Enquanto aquelas menos apropriadas para vedação tenham seu uso concentrado na época das águas, de preferência, em manejo rotacionado para permitir melhor aproveitamento da forragem produzida. Segundo Silva et al. (2009) as espécies mais usadas para diferimento têm sido a *Brachiaria decumbens* (braquiarinha) e *Brachiaria brizantha* (braquiarão).

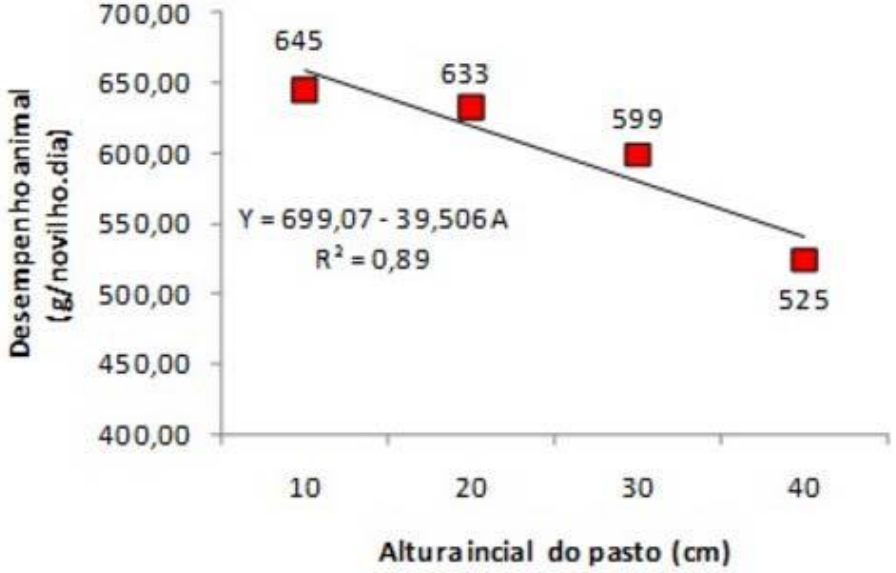
4.2 ALTURA DO PASTO NO INÍCIO DO PERÍODO DE DIFERIMENTO

Fonseca e Santos (2011) indicam que imediatamente antes do início do diferimento da pastagem, seja realizada pastejo intensivo com animais menos produtos a fim de reduzir a altura do pasto, remover as partes velhas e de baixa qualidade da forrageira e melhorar a rebrotação subsequente. O pasto mais baixo possibilita a penetração de luz até a superfície do solo e

estimula o aparecimento de novos perfilhos vegetativos (brotos), que possuem melhor qualidade.

Como exemplo, Gomes (dados não publicados) citado pelos autores acima referidos, avaliou o efeito de quatro alturas iniciais para diferimento de pasto de *Brachiaria decumbens* cv. Basilisk em Viçosa – MG. Gomes verificou que o rebaixamento do pasto para 10 cm resultou em aumento do desempenho dos bovinos em recria mantidos, durante o inverno nesses pastos diferidos (FIGURA 2). Cerca de 300 gramas de concentrado foi consumido pelos bovinos por dia nesse experimento. O autor recomenda, portanto, o rebaixamento dos pastos de *Brachiaria decumbens* para alturas entre 10 e 20 cm antes do início do período de diferimento.

Figura 2 - Desempenho de bovinos, durante o inverno, em pastos diferidos de *B. decumbens* cv. Basilisk em função da altura inicial dos pastos (A) no início do período de diferimento.



Fonte: Adaptado de Gomes (dados não publicados) por Fonseca e Santos (2011).

4.3 ADUBAÇÃO NITROGENADA

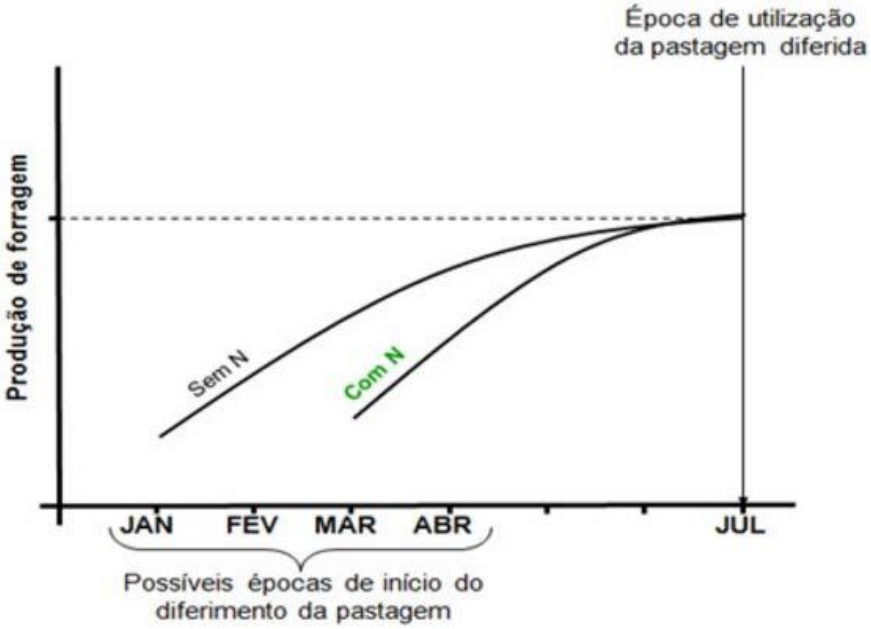
A adubação nitrogenada permite maior flexibilização quanto à determinação do início do diferimento da pastagem, porque altera a taxa de crescimento da gramínea e, consequentemente, a quantidade da forragem produzida (FONSECA; SANTOS, 2011).

Portanto, ao comparar pasto não adubado e pasto adubado com nitrogênio (N), averígua-se que o segundo pode ser vedado mais tardiamente (março), garantindo mais forragem no período que antecede o diferimento, pois possui maior taxa de crescimento, enquanto o primeiro apresentará crescimento mais lendo, necessitando de maior tempo de vedação (janeiro) para acúmulo de biomassa.

Santos et al. (2009b), constataram esse benefício ao avaliarem a produção de forragem em pastos de *B. decumbens* cv. Basilisk na região de Viçosa, MG. Esses autores verificaram, que o pasto diferido por maior período (116 dias) e sem adubação nitrogenada produziu semelhante massa de forragem (4.979 kg/ha) quando comparado àquele diferido por menor período (73 dias) e adubado com 80 kg/ha de N, que produziu 4.901 kg/ha de massa seca. Demonstrando que dessa forma, mesmo adotando-se distintos períodos de diferimento, pode-se obter produção de forragem semelhante (FIGURA 3).

Teixeira et al. (2011a) avaliaram a produção, o valor nutritivo da forragem e algumas características estruturais do pasto de *Brachiaria decumbens* diferido durante o período de 95 dias sob quatro estratégias de adubação nitrogenada. Foram estudadas as estratégias de aplicação de nitrogênio no início e no final do período chuvoso, respectivamente (0-0, 100-0, 50-50, 0-100 kg de N/ha). A adubação nitrogenada na forma de ureia foi aplicada no final de novembro de 2008, para o tratamento 100-0 e a primeira dose do tratamento 50-50, caracterizando o início do período chuvoso e em meados de março de 2009 foram adubados os tratamentos 0-100 e a segunda dose do tratamento 50-50. Os autores concluíram que a estratégia de aplicação de nitrogênio no final do verão promove maior produção de matéria seca de forragem total e de lâmina foliar nos estratos superiores do dossel, além de melhorar a qualidade da forragem. Entretanto, essa estratégia favorece a maior densidade de colmos nos estratos superiores e o elevado índice de tombamento dos pastos. Mesmo assim, a aplicação de nitrogênio no final do verão destaca-se como melhor estratégia para produção de forragem com melhor qualidade para ser utilizada no período seco. Para reduzir o tombamento de plantas, os pastos podem ser diferidos por menos tempo com essas mesmas doses de nitrogênio. O monitoramento da qualidade da forragem nos estratos verticais pode sugerir manejo diferenciado à medida que o pasto diferido é utilizado, uma vez que a utilização do pasto diferido normalmente é realizada no período seco sob lotação contínua.

Figura 3 - Esquema demonstrando a possibilidade de obtenção de semelhante produção por meio das variações nas épocas de diferimento e doses de nitrogênio.



Fonte: Santos et al. (2009b).

Teixeira et al. (2011b) avaliaram a produção e a qualidade de pastos de *Brachiaria decumbens* diferidos por períodos de 95 e 140 dias, visando determinar a estratégia mais adequada de adubação nitrogenada com aplicação no início e/ou no final do verão. Os autores optaram por não utilizar fertilizantes fosfatados, pois a prática do diferimento é normalmente utilizada em sistemas de baixo nível tecnológico. Portanto os mesmos avaliaram apenas os efeitos da adubação nitrogenada no primeiro ano de aplicação. Quatro estratégias de adubação nitrogenada, à base de ureia, foram aplicadas no início e/ou no final do verão (0-0, 100-0, 50-50, 0-100 kg ha-1 de N), respectivamente. A aplicação de nitrogênio no início do verão proporcionou maior produção forrageira total durante o ano, destacando-se a elevada produção no verão para os pastos diferidos por 95 dias.

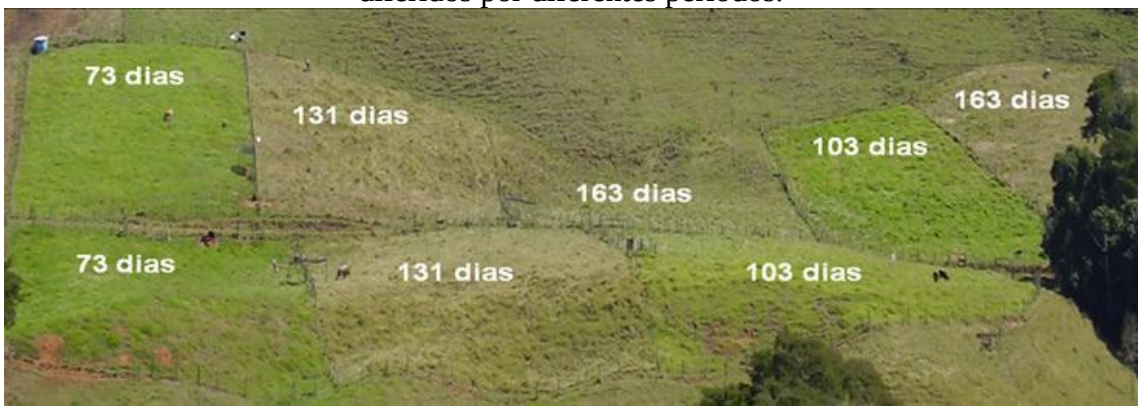
4.4 DURAÇÃO DO PERÍODO DE DIFERIMENTO

Fonseca e Santos (2011) descrevem que um dos aspectos de manejo de maior efeito sobre as características do pasto diferido é a duração do período de diferimento (FIGURA 4) e, consequentemente, sobre a produção do animal. Sendo que o baixo valor nutritivo da forragem, que compromete o desempenho animal, é uma das principais desvantagens da utilização de períodos de diferimento longos. Contudo, a baixa produção de forragem é o problema de períodos de diferimentos curtos, pois a quantidade de forragem produzida pode ser insuficiente

para alimentação dos animais, porém, com menor tempo de diferimento, as forrageiras apresentam melhores características qualitativas.

Ressalta-se que as recomendações de épocas de diferimento e de utilização da pastagem diferida não devem ser generalizadas, uma vez que cada região e propriedade possuem clima, solo e planta forrageira específicos (FONSECA; SANTOS, 2011).

Figura 4 - Pastos de *Brachiaria decumbens*, no início de julho, em Viçosa - MG, diferidos por diferentes períodos.



Fonte: Fonseca e Santos (2011).

4.5 SUBDIVISÃO DA ÁREA A SER DIFERIDA

4.5.1 Vedação única

Euclides e Queiroz (2000) relatam que na vedação única, toda área é vedada na mesma época. A pastagem é vedada em um período de crescimento intenso (época das águas) para ser utilizada no período crítico (época seca). Há grande acúmulo de material, porém, de baixa qualidade, pois o valor nutritivo do material diferido é inversamente relacionado com o período de vedação da pastagem, ou seja, quando mais tempo vedada, menor o valor nutritivo.

4.5.2 Vedação escalonada

Essa prática, apesar de requerer manejo mais complexo, possibilita a utilização de forragem de melhor qualidade, uma vez que os períodos de vedação são menores ou realizados em épocas de menor crescimento da planta (EUCLIDES; QUEIROZ, 2000).

Ainda segundo Euclides e Queiroz (2000) a vedação escalonada permite melhor controle da qualidade da pastagem diferida, ou seja, a utilização de forragens diferidas com

menor período de crescimento. Os autores recomendam para conciliar maior produção com melhor qualidade, a vedação escalonada das pastagens da seguinte forma: 40% da área de pastagem destinada a vedação no início de fevereiro, para utilização em meados de maio a fins de julho e 60% no início de março, para utilização de agosto a meados de outubro. De forma que a área vedada em fevereiro seja menor do que a vedada em março, pois essa pastagem apresentará maior produção de forragem por ter sido vedada em período mais favorável ao crescimento.

4.6 SUPLEMENTAÇÃO DO PASTO

No período de escassez a forragem apresenta baixa qualidade e a suplementação proteica e/ou energética auxilia na correção desta deficiência (DOMINGUES et al., 2014). Uma vez que a forragem foi consumida pelo animal, a qualidade da fibra passa a ser o fator mais limitante à produção, demonstrado pela melhora no desempenho animal com pequenas mudanças na digestibilidade da forragem (REIS et al., 2012).

De maneira geral, no período seco, em resposta ao manejo da pastagem, notadamente com a adoção do sistema de pastejo diferido, têm-se forragem com baixo nível de proteína, mas com conteúdo adequado de fibra em detergente neutro (FDN) potencialmente digestível (ARAÚJO, 2015).

Segundo Lazzarini et al. (2009) o grande desafio dos nutricionistas é otimizar a utilização da fibra em detergente neutro (FDN) pelos microrganismos ruminais. O principal objetivo na seca seria aumentar, por meio da suplementação com compostos nitrogenados, a utilização da fibra em detergente neutro potencialmente digestível (FDNpd), pois as forragens não apresentam o mínimo necessário de 7%, com base na matéria seca, de compostos nitrogenados para que os microrganismos ruminais apresentem plena capacidade de degradação dos substratos fibrosos, que corrobora com Reis et al. (2009) que relaram que mesmo havendo disponibilidade de FDNpd na seca, a proteína é o nutriente mais limitante e deve ser corrigida por meio da suplementação com o intuito de aumentar a eficiência de degradação da fração fibrosa e, assim, a taxa de passagem e o consumo de matéria seca da forragem.

Geralmente, a suplementação conota a provisão de alimentos densos em energia e/ou nutrientes para animais consumindo dietas baseadas em forragem (FRANÇA, 2015). Torna-se viável o uso da suplementação na produção de bovinos, pois promove uma dieta equilibrada por meio da disponibilidade de nutrientes, permitindo maior eficiência produtiva, por meio do

melhoramento do ganho de peso dos animais e tendo grande impacto sobre a eficiência da produção e redução da idade ao abate.

Diferentemente dos sistemas de semiconfinamento, quando se procede a suplementação a pasto não há o intuito de substituir o consumo de pasto pelo suplemento ofertado, mas sim incrementar o consumo de pasto por meio do aumento da digestibilidade da ingesta (MARCHIORETTO, 2015).

O suplemento mineral proteico energético possui em sua composição alimento (s) proteico (s), sal branco (NaCl) e sal mineral e alimento (s) energético (s). O suplemento mineral proteico possui em sua composição alimento (s) proteico (s), sal branco (NaCl) e sal mineral. É frequente o uso do milho moído como alimento energético e do farelo de seja como alimento proteico nas formulações de suplemento.

Zervoudakis et al. (2008) descreveram que a utilização de suplementos com autocontrole de consumo permite a regução de ingestão de suplementos pelo próprio animal, facilitando, o manejo e racionalizando a de mão de obra na distribuição desses suplementos nas pastagens, a qual pode ser realizada com periodicidade semanal ou quinzenal.

Oliveira et al. (2010) estudaram os efeitos da suplementação com proteinados sobre a degradabilidade da matéria seca (MS), proteína bruta (PB), fibra em detergente neutro e fibra em detergente ácido (FDN e FDA) em bovinos de corte em pastagem de *Brachiaria brizantha* cv. Marandu. Foram utilizados quatro bovinos Nelore com 395 ± 9 kg. Os suplementos continham 50, 40 e 30% de proteína bruta (PB) e foram fornecidos na proporção de 400 g/animal/dia em comparação à suplementação controle, com apenas sal mineral. Os autores concluíram que o uso de suplementos proteicos contendo 30 e 40% de proteína bruta e fornecidos no nível de 0,1% do peso vivo para bovinos consumindo forragem de baixo valor nutricional melhora os processos de digestão, por aumentar a degradabilidade efetiva da matéria seca, da proteína bruta e da fibra detergente neutro e por acelerar a taxa de passagem, reduzindo o tempo médio de retenção no rúmen.

Domingues et al. (2014) avaliaram o efeito de duas estratégias de suplementação no período seco sobre o desempenho e características da carcaça de novilhos terminados em capim marandu. Foram utilizados 36 bovinos Nelore, machos e castrados, com peso inicial de 417 ± 10,7 kg e idade média de 20 meses, sendo o peso pré-estabelecido para abate foi de 480 kg. Os tratamentos foram constituídos de sal mineral proteinado (SMP) com 40% de proteína bruta (PB) fornecido *ad libitum* (consumo médio de 0,320 kg) e da suplementação com concentrado (SC) com 18,27% de PB com 0,5% do peso corporal (PC) (consumo médio de 2,5 kg). A pastagem utilizada foi *Urochloa brizantha* (Syn. *Brachiaria brizantha)* cv. Marandu, diferida

por 137 dias antes do início do experimento e com produtividade de massa seca semelhante entre os piquetes. O SMP foi retirado dos animais após o abate dos animais do outro tratamento e estes foram mantidos na pastagem e fornecido somente sal mineral (minerais + NaCl), em função das precipitações no início da estação chuvosa e rebrota do pasto. Os autores concluíram que a suplementação com concentrado durante o período seco proporcionou maior ganho de peso médio diário e espessura de gordura subcutânea ajustada para 100 kg de carcaça, antecipando a idade de abate (em 82 dias) (TABELA 1). Porém a utilização de sal mineral proteinado com massa de forragem adequada pode ser uma alternativa de suplementação devido menor exigência de estrutura, controle de consumo, menor mão-de-obra e maior facilidade no fornecimento.

Sobre a avaliação econômica do experimento, Domingues et al. (2009) relataram que a suplementação com sal mineral proteinado de “alto consumo” apresenta boa lucratividade (valor agregado após a cobertura dos custos totais), caracterizando rentabilidade na terminação, além de demonstrar ser uma alternativa em anos de menor variação da arroba na entressafra e maior custo do concentrado. Obtiveram, portanto, menor custo e maior lucratividade para a suplementação com o sal proteinado em relação ao concentrado neste mesmo experimento (TABELA 2).

Tabela 1 - Características de carcaça de bovinos da raça Nelore suplementados no período seco com sal mineral proteinado e concentrado.

Características	**Sal mineral proteinado**	**Suplementação com concentrado**
Peso de carcaça (kg)	265 a	259 a
Peso de abate (kg)	493 a	483 a
Dias para abate	205 a	123 b
Rendimento de carcaça	53,75 a	53,62 a
EGS (mm)	3,4 a	4,4 a
AOL (cm²)	66,2 a	69 a
Ph	5,4 a	5,38 a
Marmorização	3,2 a	3,2 a

EGS = espessura de gordura subcutânea, AOL = área de olho de lombo.
Médias seguidas de letras minúsculas distintas, na linha, diferem entre si pelo teste F (P<0,01).
Fonte: Adaptado de Domingues et al. (2014)

Tabela 2 - Ganho de peso, receita e custo por animal submetido à suplementação com sal mineral proteinado ou concentrada em *Brachiaria brizantha* diferida.

Variáveis	Sal mineral proteinado	Suplementação concentrada
Ganho de peso total acumulado (kg)	**74,95**	**66,55**
Ganho médio diário até o abate (kg/dia)	0,366	0,541
Consumo de suplemento (kg)	0,320	2,517
Receita bruta (R$)[1]	**216,20**	**207,20**
Custo do pasto (R$)	86,10	51,66
Custo do sal mineral	6,56	-
Custo da suplementação (R$)	44,28	172,20
Custos totais (R$)	**136,94**	**223,86**
Receita líquida (R$)[2]	**79,26**	**-16,66**
Índice de lucratividade (%)[3]	**36,66**	**-8,04**

[1] Ganho de peso total acumulado * rendimento de carcaça *preço da arroba na venda
[2] Receita bruta – custos totais
[3] Receita líquida / receita bruta * 100
Fonte: Adaptado de Domingues et al. (2009)

Araújo (2015) avaliou o efeito de três níveis de suplementação (1,0; 1,5 e 2,0% PC) sobre consumo, digestibilidade e desempenho de tourinhos Nelore mantidos em pastos de *Brachiaria brizantha* cv. Marandu no período de transição seca-águas. Foram utilizados 39 bovinos Nelore, machos inteiros, com peso inicial de 372 ± 21 kg, com idade entre 20 e 24 meses. O autor concluiu que ocorre redução do consumo de forragem quando há aumento no nível de suplemento, o ganho médio diário aumenta e também o rendimento de carcaça. A maior produtividade foi encontrada com nível de suplementação de 1,5% do peso corporal (PC), contudo a suplementação ao nível de 2,0% do PC apresenta um potencial aumento na taxa de lotação em função da redução do consumo de forragem.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O diferimento de pastagens mostra-se uma alternativa eficiente e de baixo custo a fim de armazenar volumoso para época seca, podendo ser empregado em pequenas ou grandes propriedades. O pecuarista deve-se atentar ao adotar esta técnica considerando o período de rebrota, acúmulo de massa, desfolhação que determina um baixo aproveitamento de forrageira diferida.

6 REFERÊNCIAS

ABIEC. Brazilian Beef. 2014. **Balanço da pecuária**. Disponível em: <http://www.abiec.com.br/texto.asp?id=8>. Acesso em: 27 maio 2016.

ARAÚJO, T. L. R. **Eficiência nutricional da dieta de novilhos de corte mantidos em pastagem associada a suplementação.** 2015. 69 f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista, 2015.

COSTA, N. L.; OLIVEIRA, J. R. da C.; TOWNSEND, C. R. Efeito do diferimento sobre a produção e composição química do capim elefante cv. Mott. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v .33, p. 497- 500, 1998.

DOMINGUES, M. S. et al. A. Avaliação econômica da terminação de bovinos de corte em pastagem diferida de Brachiaria brizantha submetidos à suplementação com sal mineral proteinado ou concentrada. In: SIMPÓSIO DE CIÊNCIAS DA UNESP DE DRACENA, 5., 2009, Dracena. **Anais...** Dracena: Universidade Estadual Paulista, 2009.

_____. Desempenho e características da carcaça de novilhos submetidos à suplementação na seca. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal,** Salvador, v. 15, n. 4, p. 1052-1060, 2014.

EUCLIDES, V. P. B.; QUEIROZ, H. P. 2000. **Manejo de pastagens para produção de feno-em-pé.** Disponível em: <http://old.cnpgc.embrapa.br/publicacoes/divulga/GCD39.html>. Acesso em: 27 maio 2016.

EUCLIDES, V. P. B. et al. Avaliação de forrageiras tropicais manejadas para a produção de feno em pé. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 25, p. 393-407, 1990.

_____. Diferimento de pastos de braquiária cultivares Basilisk e Marandu, na região do Cerrado. **Pesquisa Agropecuária Brasileira, Brasília**, v. 42, n. 2, p. 273-280, 2007.

FRANÇA, R. A. **Avanços da suplementação nutricional de bovinos de corte no Brasil**. 2015. Disponível em: <http://www.locus.ufv.br/handle/123456789/7443>. Acesso: 27 maio 2016.

FONSECA, D. M.; SANTOS, M. E. R. Diferimento de pastagem. **Revista Agro Minas**, n. 15, p. 20-22, 2011.

GUARDA, V. D. A.; QUEIROZ, F. M.; MONTEIRO, H. C. **Diferimento de pastagens: ajustando a alimentação do rebanho para a época seca do ano**. Fronteira Agrícola (Informativo técnico), n. 8, 2015. Disponível em: <https://www.embrapa.br/documents/1355321/2434612/8%C2%AA%20edi%C3%A7%C3%A3o/afbc5c96-e673-48a6-9693-b9e09eaa9f19>. Acesso em: 29 set. 2016.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA – IBGE. **Censo Agropecuário.** 2006. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/economia/agropecuaria/consoagro/2006>. Acesso em: 25 maio 2016.

_____. **Anuário Estatístico do Brasil 2015.** 2015. Disponível em: <http://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/periodicos/20/aeb_ 2015.pdf>. Acesso em: 31 maio 2016.

LAZZARINI, I. et al. Intake and digestibility in cattle fed low-quality tropical forage and supplemented with nitrogenous compounds. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 38, n. 10, p. 2021-2030, 2009.

LEITE, G. G.; COSTA, N. L.; GOMES, A. C. **Épocas de diferimento e utilização de gramíneas cultivadas na região do Cerrado**. Planaltina: Embrapa-CPAC, 1998. (Embrapa-CPAC. Boletim de pesquisa, 40).

MARCHIORETTO, M. **Uso de suplementos minerais proteicos e proteico energéticos na bovinocultura de corte a pasto**. 2015. 29 f. Monografia – Universidade Federal do Rio Grande do Sul. 2015. Disponível em: <http://www.lume.ufrgs.br/bitstream/handle/10183/133643/000986180.pdf?sequence=1>. Acesso em: 30 maio 2016.

MARTHA JÚNIOR, G. B. et al. **Uso de Pastagem Diferida no Cerrado**. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 2003. 6 p. (Comunicado Técnico, 102).

MORAES, E. H. B. K. et al. Associação de diferentes fontes energéticas e proteicas em suplementos múltiplos na recria de novilhos mestiços sob pastejo no período da seca. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 35, p. 914-920, 2006.

OLIVEIRA, L. O. F et al. Digestibilidade in situ e cinética ruminal de bovinos de corte a pasto sob suplementação com proteinados. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 39, n. 6, p. 1328-1335, 2010.

PEDREIRA, M. S; PRIMAVESI, O. Aspectos ambientais na bovinocultura. In: BERCHIELLI, T. T.; PIRES, A. V.; OLIVEIRA, S. G. (Org.). **Nutrição de ruminantes**. Joboticabal: Funepp, 2011. p. 521-535.

REIS, R. A. et al. Suplementação da dieta de bovinos de corte como estratégia do manejo das pastagens. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 38, p. 147-159, 2009.

_____. Suplementação como estratégia de produção de carne de qualidade em pastagens tropicais**. Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v. 13, n. 3, p. 642-655, 2012.

SANTOS, M. E. R. et al. Produção de bovinos em pastagens de capim-braquiária diferidas. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 38, n. 4, p. 635-642, 2009a.

_____. Capim-braquiária diferido e adubado com nitrogênio: produção e características da forragem. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 38, n. 4, p. 650-656, 2009b.

_____. Estrutura do capim-braquiária durante o diferimento da pastagem. **Acta Scientiarum: Animal Sciences**, v. 32, n. 2, p. 193-145, 2010.

SILVA, F. F. et al. Suplementação a pasto: disponibilidade e qualidade x níveis de suplementação x desempenho. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 38, p. 371-389, 2009.

SOUZA, M. G**. A tecnologia na agricultura: Ações de estímulo à irrigação em pastagem promovidas pela Copérdia nos Municípios de Concórdia-SC e Jaborá-SC**. 2014. 92 f. Monografia (Graduação em Ciências Econômicas) - Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis, 2014.

STEINFELD, H. et al. **Livestock's long shadow:** environmental issues and options. Food & Agriculture Org., 2006.

TEIXEIRA, F. A. et al. Diferimento de pastos de Brachiaria decumbens adubados com nitrogênio no início e no final do período das águas. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 40, n. 7, p.1480-1488, 2011a.

_____. Produção anual e qualidade de pastagem de *Brachiaria decumbens* diferida e estratégias de adubação nitrogenada. 2011b. Disponível em: <http://periodicos.uem.br/ojs/ind ex.php/ActaSciAnimSci/article/view/10194/p10194>. Acesso em: 30 maio 2016.

UNITED STATES DEPARTAMENT OF AGRICULTURE - USDA. **Production, Supply and Distribution Online**. 2006. Disponível em: <http://www.fas.usda.gov/psdonline/>. Acesso em: 25 maio 2016.

ZERVOUDAKIS, J. T. et al. Suplementos múltiplos de autocontrole de consumo na recria de novilhos no período das águas. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 32, n. 6, p. 1968-1973, 2008.

Capítulo

27

Relação entre transtornos metabólicos e reprodutivos no pós-parto de vacas leiteiras

Jacymara Dutra Santos[1]
Mariana Paganini Lourencini[2]
Larissa Marchiori Sena[3]
Joelly Mariano Barbosa[4]
Stelio Simões de Morais[5]
Graziela Barioni[6]

1 INTRODUÇÃO

Segundo dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) em 2014 o rebanho bovino nacional foi considerado o segundo maior rebanho efetivo e o primeiro maior rebanho comercial do mundo, com aproximadamente 213,3 milhões de cabeças de gado. Desse rebanho total, de acordo com a Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA), cerca de 23 milhões de animais estão na categoria de animais ordenhados/em lactação, com uma produtividade de 1525 litros de leite por vaca por ano, alcançando uma produção anual

[1] Universidade Federal do Espírito Santo, e-mail: jacydutra28@gmail.com;
[2] Universidade Federal do Espírito Santo, e-mail: mariplourencini@gmail.com;
[3] Universidade Federal do Espírito Santo, e-mail: lmsmvet@gmail.com;
[4] Universidade Federal do Espírito Santo, e-mail: joellymariano@hotmail.com;
[5] Médico Veterinário Autônomo, e-mail: stelio_mv06@hotmail.com;
[6] Universidade Federal do Espírito Santo, e-mail: grazibari@gmail.com.

total de 35,17 bilhões de litros, o que representa um crescimento de 2,7% em relação ao ano anterior, fazendo com que o país ocupe o quarto lugar no ranking mundial de produção (EMBRAPA, 2015).

A atividade leiteira apresenta grande importância para o cenário econômico nacional, sendo que o leite está entre os seis mais importantes produtos da agropecuária nacional e sua cadeia produtiva é responsável pela geração de emprego e renda no país (CAMPOS; PIACENTI, 2007).

Apesar da produção leiteira do país estar crescendo ano a ano, o Brasil foi o país onde mais produtores abandonaram a atividade leiteira no período entre os anos de 2000 a 2010, com aproximadamente 3,2% dos produtores se redirecionando para outras atividades agropecuárias (EMBRAPA, 2011).

No estado do Espírito Santo, o rebanho apresenta cerca de 1,18 milhões de cabeças, onde 360 mil animais se enquadram na categoria de animais em lactação. Portanto, a atividade apresenta uma expressiva importância social, pois é geradora de emprego e renda. Segundo dados do Instituto Capixaba de Pesquisa, Assistência Técnica e Extensão Rural (INCAPER) o estado produz cerca de 475 milhões de litros de leite por ano estando entre os 12 estados que mais produzem leite no país (INCAPER, 2012).

Com o avançar dos anos e a constante busca por melhorias nos resultados produtivos, iniciou-se uma busca por animais com maior produção, desenvolvendo-se a seleção através do melhoramento genético e juntamente a isto, aumentou-se também a probabilidade dos animais serem acometidos por enfermidades relacionadas à alta produção (GARCIA, 2010), como é o caso das enfermidades metabólicas e reprodutivas.

A maioria dessas enfermidades, como a cetose e a hipocalcemia, se dá devido à ocorrência do balanço energético negativo (BEN) que é um desequilíbrio entre a demanda energética do animal e sua capacidade de ingestão, que faz com que o animal não consiga atender suas demandas energéticas de mantença, produção e reprodução (WITTWER, 2000).

O desempenho reprodutivo possui relação direta com a produção leiteira dos animais. Dessa forma, a saúde dos animais no período pós-parto apresenta efeito direto nos parâmetros reprodutivos e produtivos dos animais. Portanto, se os animais forem acometidos por distúrbios relacionados ao parto e doenças que afetam o trato reprodutivo durante este período, os resultados reprodutivos e produtivos serão afetados de maneira negativa, podendo acarretar em quadros de infertilidade (CORASSIN, 2004).

2 PRINCIPAIS TRANSTORNOS METABÓLICOS EM BOVINOS

2.1 BALANÇO ENERGÉTICO NEGATIVO

O balanço energético negativo é caracterizado por um desequilíbrio entre a produção leiteira do animal e a ingestão de matéria seca que ocorre durante o periparto. É um desequilíbrio entre o gasto energético do animal para a produção leiteira e a quantidade de energia que esse mesmo animal é capaz de ingerir; a quantidade gasta é maior que a quantidade ingerida. Esse desequilíbrio ocorre de forma invariável em todos os animais no pós-parto (CASTRO; RIBEIRO; SIMÕES, 2008).

Para que os animais sejam de capazes de manter a produção leiteira é necessária que façam ingestão imediata após o parto de uma grande quantidade de nutrientes. Porém, essa grande ingestão ocorre apenas algumas semanas após o parto. Esse atraso em atingir o pico de ingestão juntamente com o aumento da produção leiteira resultará no BEN que perdura por um período de aproximadamente 60 dias (CASTRO; RIBEIRO; SIMÕES, 2008; SANTOS; CAVALIERI; DAMASCENO, 2002).

2.2 CETOSE

A cetose é uma doença metabólica que ocorre no período em que se inicia a lactação; ela se manifesta pois no mecanismo da gliconeogênese ocorre um déficit no metabolismo energético devido à elevada demanda de nutrientes que o pico de lactação exige. Essa doença pode levar a quadros de hipoglicemia e acetonemia levando a quedas na produção do leite, redução do apetite e aparecimento de sinais nervosos (ORTOLANI, 2014).

O acometimento é maior em vacas de alta produção, sendo que o risco de ocorrência da doença é diretamente proporcional à produção, ou seja, quanto maior a produção maior é o risco de o animal desenvolver a doença. A incidência relatada da cetose nos rebanhos brasileiros varia de 13 a 24% e acomete com mais frequência as vacas em 3ª ou 4ª lactação, que é o estágio de maior produção do animal e; sua ocorrência é maior nas duas primeiras semanas após o parto. Assim como a hipocalcemia, a cetose também predispõe ao risco de surgimento de outras doenças como deslocamento de abomaso à esquerda, metrite e mastite (COELHO, 2004; CORASSIN, 2004; RAPOSO, 2010; ORTOLANI, 2014).

A doença vai ocorrer devido a uma desordem metabólica que afeta o metabolismo dos ácidos graxos acarretando em uma escassez de carboidratos que são precursores da glicose justamente no momento de sua maior utilização hepática. Com a ocorrência do déficit

energético os AGNE serão oxidados, formando energia e acetilcoenzima A que no metabolismo normal se combina com oxaloacetato e forma o citrato que entra no ciclo de Krebs e gera ATP e forma glicose. Porém, quando a formação da acetilcoenzima A for maior que o oxaloacetato que está disponível para combinação este é convertido em corpos cetônicos (acetoacetato, β-hidroxibutirato e acetona). Como na cetose esse mecanismo ocorre exageradamente, esses corpos cetônicos associados aos altos níveis de AGNES irão ocasionar uma depressão no apetite e um aumento na resistência à insulina levando à hipoglicemia. Os corpos cetônicos, são responsáveis pelo odor cetônico que é sentido na respiração, no leite e na urina dos animais que desenvolvem o quadro. A cetose ocorre principalmente no periparto devido à ocorrência do BEN (COELHO, 2004; GONZÁLEZ; CAMPOS, 2003; MINUZZI et al., 2013; ORTOLANI, 2014).

Clinicamente, a cetose apresenta uma forma típica e uma forma nervosa. Na forma típica os sintomas apresentados são depressão, queda na produção de leite, hipofagia e sintomas nervosos e o animal pode apresentar apetite seletivo e posteriormente desenvolver apetite depravado, que leva a uma evidente perda de peso, além de apresentar sonolência, ataxia, olhar fixo, cambaleios, constipação, fezes cobertas com muco e cegueira parcial. A forma nervosa surge de maneira súbita e o animal apresenta agressividade, hiperestesia, cambaleios, delírios, sialorreia intensa e apoio da cabeça em obstáculos. Nos casos de cetose, a respiração do animal é apenas superficial e com um odor característico de acetona. Além dessas formas clínicas a cetose também pode ocorrer de forma subclínica, onde os principais sinais observados são a perda de peso e a queda brusca na produção leiteira. Para prevenção dos quadros de cetose deve-se instituir um manejo nutricional adequado já na 8ª semana pré-parto (ORTOLANI, 2014; RADOSTITS et al., 2002).

2.3 HIPOCALCEMIA

A hipocalcemia é uma doença que acomete as vacas no periparto e é também conhecida como febre do leite. É uma doença de origem metabólica com causas multifatoriais, que vão desde causas genéticas até problemas relacionados à nutrição e manejo. A hipocalcemia acomete normalmente vacas de alta produção. Um fator que pode predispor a doença é o manejo nutricional inadequado no pré-parto. Essa doença pode estar relacionada a diversos outros problemas no periparto, aumentando os riscos de sua ocorrência, como partos distócicos, retenção placentária, prolapso uterino, deslocamento de abomaso, metrite e cetose, que acarretam em maior número de animais descartados, levando a perdas produtivas e econômicas.

Além de acarretar em uma queda significativa da eficiência reprodutiva dos animais. A doença está relacionada com uma rápida queda nos níveis de cálcio circulante e os sinais clínicos mais comumente apresentados são paresia, incoordenação, fraqueza e decúbito (CORASSIN, 2004; ESNAOLA, 2011; JACQUES, 2011).

A hipocalcemia aumenta o risco de ocorrência de cetose em 23,5 vezes, distocia em 7,3 vezes quando acontece antes do parto, mastite em 5,4 vezes, metrite em 4,7 vezes, deslocamento de abomaso em 3 vezes e diminui a eficiência reprodutiva em 4,2 vezes (CORASSIN, 2004).

A hipocalcemia caracteriza-se por um desequilíbrio repentino nas concentrações sanguíneas de cálcio, sendo mais comum sua ocorrência nas primeiras 72 horas após o parto, mas podendo ocorrer também nas últimas 48 horas que antecedem o mesmo. A doença ocorre devido à perda de cálcio nos últimos 60 dias da gestação; essa perda começa pequena e o cálcio perdido é destinado à mineralização óssea do feto; e vai aumentando para a produção do colostro e ainda mais para a produção leiteira (OLIVEIRA, 2011).

A hipocalcemia ocorre devido ao déficit entre a demanda de cálcio que o organismo do animal necessita e a sua quantidade disponível atingida pela absorção intestinal e pela reabsorção óssea durante o periparto, ou seja, a demanda de cálcio é mais elevada do que as quantidades obtidas por esses dois mecanismos. Para a redução desse déficit os dois mecanismos devem estar bastante eficientes, mas no periparto existe uma dificuldade de obtenção do cálcio (ORTOLANI, 2014).

A doença apresenta clinicamente três estágios que são definidos a partir da quantidade de cálcio sérico livre. O primeiro estágio é caracterizado pela manutenção da consciência, mas com a ocorrência de alguns sinais de ordem nervosa como excitação, tetania e tremores de cabeça, além de outros sinais como ranger de dentes e protusão de língua e posição de cavalete; podendo ou não apresentar decúbito. O segundo estágio apresenta como características os movimentos ruminais ausentes, um leve quadro de hipotermia e leva o animal a decúbito caracterizando a síndrome do animal caído. E, no terceiro e último estágio o animal fica inconsciente, com um quadro de flacidez da musculatura, taquicardia e hipotermia evidentes e instalação do quadro de coma; se o animal não receber tratamento adequado ocorre o óbito (ORTOLANI, 2014).

O impacto dos casos da doença na produção leiteira não pode ser estimado com precisão devido à baixa incidência (geralmente inferior a 7%) e à eficiência do tratamento, facilmente realizável, que é feito com a infusão lenta de soluções que contenham cálcio pela via intravenosa (CORASSIN, 2004; ORTOLANI, 1995).

3 PERFIL METABÓLICO

As afecções metabólicas, também conhecidas como doenças de produção, são de difícil percepção, sendo seu principal sinal a queda de produção dos animais acometidos. Sendo assim, começou a se utilizar, a partir dos anos 70, os perfis metabólicos para facilitar o diagnóstico e pesquisa dessas doenças. O perfil metabólico é um exame que permite a avaliação do status metabólico e nutricional dos animais através da coleta de amostras sanguíneas, verificando-se a adaptação dos animais ao período de balanço energético negativo. As análises bioquímicas sanguíneas refletem de forma fidedigna o equilíbrio energético, proteico e mineral entre ingestão, excreção e metabolização dos nutrientes ingeridos pelos animais (GONZALEZ et al., 2000; WITTWER, 2000).

Nos rebanhos leiteiros de produção elevada, é de extrema importância manter-se um equilíbrio nutricional, principalmente nas fases em que esses animais passam por períodos de maior exigência, como é o caso do período de transição, marcado pelo início da lactação (WITTWER, 2000).

O perfil metabólico pode ser utilizado não só para avaliação individual como também para a avaliação de rebanhos como um todo. Apesar de ser um exame de difícil interpretação, se interpretado corretamente fornece informações importantes sobre estado clínico, nutricional e metabólico dos animais (GONZÁLEZ; SILVA, 2006).

3.1 PERFIL METABÓLICO ENERGÉTICO

No perfil metabólico energético são avaliadas as concentrações de glicose, ácidos graxos não-esterificados (NEFA), beta-hidroxibutirato (βHB) e colesterol (GONZÁLEZ; SILVA, 2006).

3.1.1 Glicose

De acordo com Lehninger, Nelson e Cox (1995), a glicose é o principal regulador do metabolismo energético em mamíferos. É um metabólito vital para funções cerebrais e para a lactação. A concentração de glicose pode apresentar-se aumentada em quadros de estresse crônico e a redução da glicemia está relacionada à idade e a quadros de cetose e deficiências energéticas severas. Quando a hipoglicemia ocorre na lactação os animais não expressam todo o potencial e apresentam redução na produção. No terço final da gestação os ruminantes tendem

a apresentar quadros hipoglicêmicos, devido à utilização de grandes quantidades de glicose para o crescimento fetal. De acordo com a progressão da gestação os valores vão sendo reduzidos. Há relatos de correlação negativa entre glicemia e produção, ou seja, quanto maior a produção, menores serão os valores da glicemia (GOFFI, 2006; GONZÁLEZ; SILVA, 2006).

Segundo González, 2000, a concentração sanguínea de glicose é um indicador pouco expressivo para avaliação do status energético, pois apresenta insensibilidade a mudanças nutricionais e alta sensibilidade ao estresse.

3.1.2 Ácidos Graxos Não-Esterificados (NEFA)

A concentração de ácidos graxos não-esterificados (NEFA's) está intimamente relacionada com a intensidade do balanço energético negativo, sendo, portanto, uma importante ferramenta para a avaliação da intensidade do mesmo. A concentração sanguínea de AGNE é resultante da quebra de gordura corporal como resposta ao balanço energético negativo e sua alta concentração sanguínea por um balanço energético intenso resulta em um acúmulo de gordura corporal, o que pode levar à ocorrência de algumas desordens metabólicas (SANTOS; CAVALIERI; DAMASCENO, 2002).

Quando o animal apresenta quadro de restrição alimentar, dentro de 48 horas os níveis de NEFA elevam abruptamente e por isso, são melhores indicadores do status nutricional do que glicose e βHB. No período que compreende as primeiras semanas da lactação, seus níveis também apresentam-se elevados e existe correlação positiva entre NEFA's e corpos cetônicos, quanto mais elevadas forem as concentrações de NEFA's, também serão as de corpos cetônicos. Já sua diminuição não é comum, só ocorrendo em casos de desnutrição severa (GONZÁLEZ; SILVA, 2006).

3.1.3 Beta-hidroxibutirato (βHB)

O beta-hidroxibutirato (βHB) é um corpo cetônico assim como a acetona e acetoacetato. Esses corpos cetônicos são formados através do metabolismo de lipídios e butirato e, em condições normais eles são formados em pequenas quantidades no organismo e por isso não são acumulados, pois os ruminantes tem capacidade de utilizá-los como fonte de energia. Porém, quando são formados em quantidade superior àquela que conseguem utilizar eles se acumulam, causando transtornos metabólicos, como é o caso da cetose (ORTOLANI, 2002; WITTWER, 2000).

A formação dos corpos cetônicos depende dos hormônios reguladores da glicose sanguínea e, como a concentração desses hormônios é baixa no pré-parto e aumenta à medida que a lactação progride a concentração de corpos cetônicos é mais elevada no pós-parto (AROEIRA, 1998).

3.1.4 Colesterol

O colesterol é uma biomolécula que atua como precursor de ácidos biliares. Seu aumento está relacionado às doenças como o hipotireoidismo e a diabetes melittus, e casos de obstruções biliares e em dietas ricas em gorduras ou carboidratos. Além de seu nível ser mais elevado em vacas que em novilhas. Sua diminuição está relacionada à deficiência energética e, no momento do parto seus valores apresentam-se mais baixos, assim como no início da lactação (GONZÁLEZ; SILVA, 2006).

3.2 PERFIL METABÓLICO ENZIMÁTICO

No perfil metabólico enzimático avalia-se principalmente as concentrações das enzimas aspartato aminotransferase (AST), gama-glutamil transferase (GGT) e fosfatase alcalina (FA) (GONZÁLEZ; SILVA, 2006).

3.2.1 Aspartato aminotransferase (AST)

A aspartato aminotransferase é uma enzima que indica danos a tecidos moles, como por exemplo, o tecido hepático. Sendo, em ruminantes, indicativa do funcionamento hepático, sendo que, no pré-parto de vacas leiteiras sua avaliação é utilizada com o objetivo de prevenir a ocorrência de transtornos metabólicos no pós-parto. Os animais que apresentam concentração elevada de AST no pré-parto tem maior predisposição a desenvolverem problemas reprodutivos como retenção placentária e infertilidade (GONZÁLEZ; SILVA, 2006).

3.2.2 Gama-glutamil transferase (GGT)

A gama-glutamil transferase é uma enzima que indica problemas hepáticos, tais como colestases e proliferação de ductos biliares (GONZÁLEZ; SILVA, 2006).

3.2.3 Fosfatase alcalina

A fosfatase alcalina foi a primeira enzima a ser usada na clínica. Seu aumento está relacionado a quadros de colestase e, em animais jovens, sua concentração é 2 a 3 vezes maior que em adultos. (GONZÁLEZ; SILVA, 2006).

Em vacas gestantes, é comum o seu aumento, pois essa enzima está presente na placenta. Porém, após o parto, se suas concentrações continuarem aumentadas é indicativo de ocorrência de retenção placentária (GONZÁLEZ; CORRÊA; SILVA, 2014).

3.3 PERFIL METABÓLICO PROTEICO

No perfil metabólico proteico são avaliadas as concentrações de proteínas totais, albumina, globulinas, fibrinogênio e ureia (GONZÁLEZ; SILVA, 2006).

3.3.1 Proteínas totais

Albumina e globulinas são as principais proteínas e estão envolvidas em diversas funções do organismo, como por exemplo, transporte de nutrientes, hormônios e metabólitos e manutenção da pressão osmótica e viscosidade do sangue. O aumento dessas proteínas pode estar relacionado à desidratação ou, em animais mais velhos, que apresentam essa concentração mais elevada pelo fato de denotarem uma maior eficiência no metabolismo proteico que animais mais jovens. Quando a concentração das proteínas totais apresenta-se diminuída pode apontar falhas renais e hepáticas, transtornos intestinais e até mesmo por falha alimentar. Na semana que antecede o parto essa concentração também pode apresentar-se reduzida, mas logo retorna aos seus valores normais após o parto (GONZÁLEZ; SILVA, 2006).

3.3.2 Albumina

A albumina é uma proteína sintetizada pelo fígado e apresenta importantes funções como a regulação do pH e manutenção da osmolaridade sanguínea e também transporte de ácidos graxos livres, aminoácidos e bilirrubina. Sua concentração pode ser afetada por alterações hepáticas e equilíbrio hidroeletrolítico. Para que as alterações na sua concentração sejam detectadas é necessário um período de pelo menos um mês, pois essa proteína apresenta uma taxa de síntese e degradação baixa. Seu aumento é ocasionado pela desidratação ou, no verão, quando as pastagens são melhores os animais apresentam altas concentrações de albumina sanguínea. Sua diminuição pode ser provocada em detrimento de parasitoses, problemas hepáticos crônicos ou alimentação pobre em proteínas, dentre outros fatores. Após o parto pode-se notar queda nos valores que vão retomando os valores normais progressivamente durante o período pós-parto. E, também, a concentração sanguínea dessa proteína vem sendo relacionada à produção leiteira dos animais; de forma que vacas que produzem mais tem valores maiores e vacas que não expressam todo o seu potencial produtivo apresentam-se hipoalbuminêmicas (GONZÁLEZ; SILVA, 2006).

3.3.4 Globulinas

As globulinas são divididas em três grupos (α, β e ϒ) e apresentam função de transporte de metais, lipídios e bilirrubina, além de função imunológica. Apresentam mais importância como indicadores inflamatórios que metabólicos. Sua concentração é dada pela diferença entre o valor de proteínas totais e albumina (proteínas totais – albumina = globulinas). Seu aumento pode estar associado a vacinação precoce ou doenças infecciosas além de estarem relacionados à idade e gestação, animais mais senis e prenhas apresentam valores mais elevados. Sua diminuição está relacionada com o final da gestação, com passagem de ϒ globulinas para o colostro, além de se mostrar baixa também nas semanas que antecedem o parto, retomando valores normais no pós-parto. Quando essa diminuição é notada em bezerros é indicativo de baixa ingestão colostral (GONZÁLEZ; SILVA, 2006).

3.3.5 Ureia

A ureia é um metabólito hepático da amônia e é um indicador imediato de ingestão proteica. Seu aumento está relacionado com a idade, com a alta ingestão proteica ou em quadros de déficit energético, dentre outros. Sua diminuição ocorre por nutrição deficiente em compostos nitrogenados (GONZÁLEZ; SILVA, 2006).

3.4 PERFIL METABÓLICO MINERAL

No perfil metabólico mineral são avaliadas as concentrações de, principalmente, cálcio e fósforo; e também de magnésio, potássio, ferro, cobre, zinco, cobalto e indicadores de selênio e iodo (GONZÁLEZ; SILVA, 2006).

3.4.1 Cálcio

O cálcio é um macromineral que é amplamente encontrado na circulação sanguínea de todos os seres vertebrados e tem diversas funções no organismo como a mineralização óssea, contração muscular, controle metabólico, dentre outras. Pode ser encontrado em duas formas no organismo, a forma livre ionizada e a forma orgânica (GONZÁLEZ et al., 2000).

A dosagem sérica de cálcio não é uma boa maneira de se avaliar o status nutricional, pois o organismo animal, através do seu sistema endócrino, mantém as concentrações sanguíneas de cálcio, regulando a quantidade disponível de cálcio e suas perdas (GONZÁLEZ et al., 2000).

Sua dosagem nos rebanhos leiteiros apresenta relevante importância, pois algumas doenças puerperais estão diretamente relacionadas ao metabolismo de cálcio, como é o caso da hipocalcemia, também conhecida como febre do leite, que altera as concentrações séricas de cálcio devido à grande mobilização do mesmo para produção de colostro e leite, fazendo com que o organismo não consiga restabelecer as concentrações adequadas deste macromineral (GONZÁLEZ, 1997).

3.4.2 Fósforo

O fósforo, assim como o cálcio é classificado como um macromineral e exerce diversas funções no organismo, como a mineralização óssea e como componente das moléculas genéticas e de compostos energéticos (GONZÁLEZ, et al., 2000).

Em animais em lactação, as concentrações séricas de cálcio podem ser afetadas, gerando quadros de hipofosfatemia, devido à utilização do mesmo na síntese do leite. Essa concentração também pode ser alterada em casos de mudança de alimentação dos animais e em animais mais velhos, onde a disponibilidade do fósforo alimentar é reduzida com o avançar dos anos. Ao se

avaliar as concentrações de cálcio deve-se levar em consideração que as variações vão de acordo com sua ingestão (GONZÁLEZ; SCHEFFER, 2003; PAYNE; PAYNE, 1987).

4 RELAÇÃO ENTRE DISTÚRBIOS METABÓLICOS E REPRODUTIVOS

De acordo com Gil (2003), sabe-se que vários hormônios metabólicos como a somatotropina, a leptina, o hormônio de crescimento e os fatores de crescimento semelhantes à insulina (IGF-I) tem importante papel na regulação das funções reprodutivas e, portanto, transtornos metabólicos que influenciam na taxa desses hormônios são responsáveis por problemas relacionados à reprodução.

As concentrações de IGF-I ficam reduzidas em decorrência do BEN e como esse hormônio é responsável por aumentar a sensibilidade folicular à ação das gonadotrofinas ocorre um atraso no retorno à ciclicidade pós-parto (BEAM; BUTTLER, 1997). A insulina tem relevante importância para o crescimento folicular e, durante o período de BEN suas concentrações também ficam reduzidas, o que pode levar a baixa produção de estradiol e impedir que os folículos desenvolvam os receptores para LH (hormônio luteinizante), impedindo assim a ovulação; além de apresentar ação direta sobre os ovários impedindo a liberação de LH (SINCLAIR et al., 2002). Já a leptina apresenta ação direta sobre o controle da ingestão alimentar, balanço energético negativo e fertilidade, portanto, quando suas concentrações apresentam-se baixas exerce um efeito negativo sobre esses parâmetros (WILLIANS, 2001).

O balanço energético negativo, por levar a uma elevada mobilização de reservas corporais é responsável por um prolongamento do anestro pós-parto dos animais, sendo que em vacas primíparas esse efeito é mais acentuado, pois o BEN é mais intenso nessa categoria. Além disso, o BEN contribui para uma perda significativa de condição corporal, pois a quantidade de nutrientes ingerida não é capaz de suprir a demanda energética e proteica e, portanto, ela passa a mobilizar as reservas corporais. (CASTRO; RIBEIRO; SIMÕES, 2008; FERREIRA, 2010; RABASSA et al., 2007).

Devido à evidente perda de peso e condição corporal do animal ocasionados pelo BEN os resultados de fertilidade desses animais são prejudicados, pois desencadeia o acometimento dos animais por transtornos metabólicos que se manifestam clinicamente no pós-parto levando a significativas perdas produtivas e econômicas que serão acarretadas ao produtor além de uma significativa redução no desempenho reprodutivo da fêmea (CASTRO; RIBEIRO; SIMÕES, 2009; SILVA et al., [s.d.]).

Os principais impactos do balanço energético negativo na reprodução das vacas leiteiras são a demora no retorno à ciclicidade, determinada pelo atraso da primeira ovulação após o parto e a redução da eficiência reprodutiva da fêmea causando atraso na concepção e consequentemente a um significativo aumento no intervalo entre partos (CASTRO; RIBEIRO; SIMÕES, 2009).

Os quadros de cetose levam à redução da fertilidade pelo efeito negativo sobre o GnRH (hormônio liberador de gonadotrofina hipotalâmica) (MINUZZI et al., 2013).

O impacto da hipocalcemia na reprodução se deve ao fato da doença poder reduzir a vida reprodutiva da vaca em três ou quatro anos (PAYNE, 1968 apud CORASSIN, 2004).

Vacas que apresentam altas concentrações de NEFA, βHB e triglicerídeos durante o período de transição apresentam menores taxas de ovulação do primeiro folículo dominante após o parto, tornando-se folículo anovulatórios; mostrando que existe uma relação negativa entre as concentrações desses metabólitos com a capacidade ovulatória do folículo dominante (BUTTLER, 2004).

De acordo com Santos et al., (2004), os transtornos metabólicos também exercem influência negativa sobre a manutenção da vida do embrião. O momento em que ocorre a primeira ovulação pós-parto é fator determinante do número de serviços de determinada fêmea antes do período de inseminação artificial em tempo fixo, de modo que, a manifestação do cio, as taxas de concepção e a manutenção do embrião chegam a ser 20% maiores em animais que estavam ciclando antes dos 60 dias pós-parto.

A progesterona é um hormônio determinante para a manutenção da gestação após a cobertura ou inseminação artificial dos animais, sendo que sua concentração na circulação sanguínea deve estar em níveis desejáveis para que a manutenção e desenvolvimento do embrião ocorram de maneira satisfatória. Porém, em animais que apresentam BEN progressivo, as concentrações de progesterona circulantes sã menores, levando à prejuízos no desenvolvimento embrionário (BUTTLER, 2004).

A redução de fertilidade dos animais acometidos por transtornos metabólicos está relacionada às influências que esses transtornos irão causar no desenvolvimento e qualidade folicular e oocitária, formação e função hormonal do corpo lúteo e no ambiente uterino, sendo responsáveis por baixas taxas de ovulação e concepção e quadros de reabsorção embrionária (BORGES; MARTINS, 2014).

5 CONCLUSÃO

A avaliação do perfil metabólico dos animais durante o pós-parto apresenta relevante importância, pois permite determinar a intensidade do balanço energético negativo e realizar o diagnóstico de transtornos metabólicos que apresentam influência direta nos parâmetros reprodutivos e produtivos desses animais, gerando perdas econômicas para os produtores. Através dessa avaliação pode-se adotar estratégias que minimizem esses efeitos e melhorem os resultados produtivos e a eficiência reprodutiva dos rebanhos.

6 REFERÊNCIAS

AROEIRA, L. J. M. **Cetose e infiltração gordurosa no fígado em vacas leiteiras**. Juiz de Fora: EMBRAPA-CNPGL, 1998.

BEAM, S. W.; BUTTLER, W. R. Energy balance and ovarian follicle development prior to first ovulation postpartun in dairy cows receiving three levels of dietary dat. **Biology of Reproduction**, v. 56, p. 133-142, 1997.

BORGES, A. M.; MARTINS, T. M. Relação entre distúrbios metabólicos e reprodutivos. In: SIMLEITE, 4., 2014, Viçosa. **Anais...** Viçosa: SIMLEITE, 2014. p. 237-256.

BUTTLER, W. R. Efeito do balanço energético negativo na fertilidade de vacas leiteiras. In: CURSO DE NOVOS ENFOQUES NA PRODUÇÃO E REPRODUÇÃO DE BOVINOS, 7., 2004, Uberlândia. **Anais...** Uberlândia: VII CNEPRB, 2004.

CAMPOS, K. C.; PIACENTI, C. A. Agronegócio do leite: cenário atual e perspectivas. In: CONGRESSO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ECONOMIA, ADMINISTRAÇÃO E SOCIOLOGIA RURAL, 45., 2007, Londrina. **Anais...** Londrina: SBEASR, 2007.

CASTRO, D.; RIBEIRO, C.; SIMÕES, J. Medicina da produção: estratégias alimentares no pós-parto das vacas leiteiras. **Revista Electrónica de Veterinaria**, v. 1695, p. 7504, 2008. Disponível em: <http://www.veterinaria.org/ revistas/redvet/n101008/101005.pdf?q=vacasl>. Acesso em: 09 jun. 2016.

COELHO, K. O. **Impacto dos eventos ocorridos antes e após o parto sobre o desempenho produtivo e reprodutivo na lactação atual e na posterior de vacas Holandesas.** 2004. 70 f. Dissertação (Mestrado) - Escola Superior de Agricultura “Luis de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2004.

CORASSIN, C. H. **Determinação e avaliação de fatores que afetam a produtividade de vacas leiteiras:** Aspectos sanitários e reprodutivos. 2004. 113 f. Tese (Doutorado) - Escola Superior de Agricultura “Luis de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2004.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA - EMBRAPA. **Leite no Brasil e no mundo:** aspectos socioeconômicos e ambientais – 2011. Disponível em: < http://www.cnpgl.embrapa.br/sistemaproducao/book/export/html/397>. Acesso em: 16 set. 2016.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA - EMBRAPA, GADO DE LEITE. **Panorama do Leite.** v. 7, n. 75, 2015.

ESNAOLA, G. S. **Controle da hipocalcemia puerperal em bovinos leiteiros.** 2011. 44 f. Trabalho de conclusão de curso (Graduação em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2011.

FERREIRA, A. M. **Reprodução da fêmea bovina:** Fisiologia aplicada e problemas mais comuns (causas e tratamentos). 1. ed. Valença, Editar, 2010. 420 p.

GARCIA, A. M. B. **Avaliação metabólica de vacas leiteiras submetidas a diferentes estratégias de prevenção do balanço energético negativo no pós-parto.** 2010. 83 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2010.

GIL, C. V. **Effect of nutrition on follicle development and ovulation rate in the ewe.** 2003. 56 f. Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Uppsala, Uppsala, 2003.

GOFFI, J. P. Distúrbios do metabolismo dos carboidratos e da gordura. In: REECE, O. W. **Dukes:** Fisiologia dos animais domésticos**.** 10. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006. p. 510-515.

GONZÁLEZ, F. H. D. O perfil metabólico no estudo de doenças da produção em vacas leiteiras. **Arquivo da Faculdade de Veterinária,** UFRGS, Porto Alegre, v. 25, n. 2, 1997.

GONZÁLEZ, F. H. D. Uso do perfil metabólico no diagnóstico de doenças metabólico-nutricionais. In: GONZÁLEZ, F. H, D., BARCELLOS, J. O., OSPINA, H., RIBEIRO, L. A. O. **Perfil metabólico em ruminantes:** seu uso em nutrição e doenças nutricionais**.** Porto Alegre: UFRGS, 2000. p. 89-106.

GONZÁLEZ, F. H. D.; CAMPOS, R. Indicadores metabólico- nutricionais do leite. In: SIMPÓSIO DE PATOLOGIA CLÍNICA VETERINÁRIA DA REGIÃO SUL DO BRASIL, 1., 2003, Porto Alegre. **Anais...** Porto Alegre: UFRGS, 2003. p. 31-47.

GONZÁLEZ, F. H. D. et al. Variações sanguíneas de ureia, creatinina, albumina e fósforo em bovinos de corte no Rio Grande do Sul. **A Hora Veterinária**, v. 20, p. 59-62, 2000.

GONZÁLEZ, F. H. D.; CORRÊA, M. N.; SILVA, S. C. D. **Transtornos metabólicos nos animais domésticos.** 2ed. Porto Alegre: UFRGS, 2014. 337 p.

GONZÁLEZ, F. H. D.; SCHEFFER, J. F. S. Perfil sanguíneo: ferramenta de análise clínica, metabólica e nutricional. In: I SIMPÓSIO DE PATOLOGIA CLÍNICA VETERINÁRIA DA REGIÃO SUL DO BRASIL, 2003, Porto Alegre. **Anais...** Porto Alegre: UFRGS, 2003. p. 73-89.

GONZÁLEZ, F. H. D.; SILVA, S. C. **Introdução à bioquímica clínica veterinária.** Porto Alegre: Editora da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. 2006. 174 p.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA - IBGE. **Indicadores IBGE – Estatística da produção pecuária** – Outubro de 2014. Disponível em <www.ibge.gov.br >. Acesso em: 16 set. 2016.

INSTITUTO CAPIXABA DE PESQUISA, ASSISTÊNCIA TÉCNICA E EXTENSÃO RURAL: INCAPER. **Relatório Anual de Atividades**, 2012. Disponível em: <www.incaper.gov.br> Acesso em: 14 mai. 2016.

JACQUES, F. E. S. **Hipocalcemia puerperal em vacas de leite.** 2011. 22 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Medicina Veterinária) - Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2011.

LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de Bioquímica**. 2 ed. São Paulo: Sarvier, 1995.

MINUZZI, T. et al. **Prevenção de cetose em bovinos de leite através do uso de homeopatia.** Unijuí: Salão do Conhecimento, 2013. Disponível em: <https://www.revistas.unijui.edu.br/index.php/salaoconhecimento/article/view/2018>. Acesso em: 16 set. 2016.

OLIVEIRA, T. M. **Influência da administração de cálcio no pós-parto na prevalência de doenças do puerpério em vacas de leite na Ilha Terceira.** 2011. 85 f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina Veterinária, Unidade Técnica de Lisboa, Lisboa, 2011.

ORTOLANI, E. L. Aspectos clínicos, epidemiológicos e terapêuticos da hipocalcemia de vacas leiteiras. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia.** v. 47, p. 799-808, 1995.

_____. Avaliação metabólico-nutricional de vacas leiteiras por meio de fluidos corporais. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA, 29., 2002. **Anais...** Gramado: Universidade Federal do Rio Grande do Sul. 2002. p. 18-26.

_____. Transtornos metabólicos da vaca leiteira no período de transição. In: I SIMPÓSIO NACIONAL DA VACA LEITEIRA, 1., 2014, Porto Alegre. **Anais...** Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul. 2014. p. 107-126.

PAYNE, J. M.; PAYNE, S. **The metabolic profile test**. Oxford: Oxford University Press, 1987.

RABASSA, V. R. et. al. Anestro pós-parto em bovinos: mecanismos fisiológicos e alternativas hormonais visando reduzir este período – uma revisão. **Revista da FZVA**, v. 14, n. 1, p. 139-161, 2007.

RADOSTITS, O. M. et al. **Clínica Veterinária:** Um Tratado de Doenças do Bovinos, Ovinos, Suínos, Caprinos e Equinos. 9 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002, 1737 p.

RAPOSO, V. J. M. **O balanço energético negativo e a cetose em bovinos leiteiros:** avaliação da glucose e do β-hidroxibutirato sanguíneos. 2010. 54 f. Dissertação (Mestrado) - Universidade de Trás-os-montes e Alto Douro, Vila Real, 2010.

SANTOS, G. T.; CAVALIERI, F. L. B.; DAMASCENO, J. C. Manejo da vaca leiteira no período de transição e início da lactação. In: SANTOS, G. T.; BRANCO, A. F.; CECATO, U. (Ed.). **Sustentabilidade da Pecuária Leiteira na Região Sul do Brasil**. Maringá: Gráfica Editora Sthampa, 2002.

SANTOS, J. E. P. et al. The effect of embryonuc death rates in cattle on the efficacy of estrus synchronization programs. **Animal Reproduction Science**, v. 82-83, p. 513-535, 2004.

SILVA, M. O. D. et al. **Prevenção de transtornos metabólicos por lipomobilização em vacas leiteiras de alta produção.** Laboratório de Análises Clínicas Veterinárias, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, [s.d.].

SINCLAIR, K. D. et al. Ovulation of he first dominant follicle arising after day 21 postpartum in suckling beef cows. **Journal of Animal Science**, v.75, p. 115-126, 2002.

WILLIANS, G. L. Implicações da amamentação e manejo da cria na eficiência reprodutiva futura de vacas de corte. In: CURSO NOVOS ENFOQUES NA PRODUÇÃO E REPRODUÇÃO DE BOVINOS, 5., 2001, Uberlândia. **Anais...** Uberlândia, 2001. p. 65-73.

WITTWER, F. Diagnóstico dos desequilíbrios metabólicos de energia em rebanhos bovinos. In: GONZÁEZ, F. H, D., BARCELLOS, J. O., OSPINA, H., RIBEIRO, L. A. O. **Perfil metabólico em ruminantes:** seu uso em nutrição e doenças nutricionais. Porto Alegre: Gráfica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2000. p. 9-22.

Capítulo

28

Fatores que afetam a qualidade da carne

Natália Cabral Oliveira[1]
Fábio Costa Henry[2]
Elizabeth Fonsêca Processi[3]
Jonhny de Azevedo Maia Júnior[4]
Dione Henrique Breda Binoti[5]
José Geraldo Vargas Júnior[6]
Talita Pinheiro Bonaparte[7]

1 INTRODUÇÃO

Há anos a carne constitui o componente central da dieta humana, sendo alimento direto ou ingrediente a vários outros produtos. O consumo de carne, especialmente a vermelha, tem sido relacionado a doenças e outras preocupações com a segurança alimentar, influenciando diretamente na redução do consumo em determinadas regiões. Como resultado, questões sobre

[1] Universidade Estadual do Norte Fluminense, Campos dos Goytacazes -RJ, e-mail: nataliacabral@zootecnista.com.br;
[2] Universidade Estadual do Norte Fluminense, Campos dos Goytacazes -RJ, e-mail: fabiocosta@henry@uenf.br;
[3] Doutora em Ciência Animal, Campos dos Goytacazes-RJ, e-mail: processi@zootecnista.com.br;
[4] Universidade Estadual do Norte Fluminense, Campos dos Goytacazes -RJ, e-mail: jonhnymaia@yahoo.com.br;
[5] Universidade Federal do Espírito Santo, e-mail: dionebinoti@hotmail.com;
[6] Universidade Federal do Espírito Santo, e-mail: josegeraldovargas@yahoo.com.br
[7] Universidade Federal do Espírito Santo, e-mail: talitabonaparte@gmail.com

definição de qualidade da carne e do seu processamento têm sido discutidas (RAMOS; GOMIDE, 2012).

Um produto de qualidade é aquele que atende perfeitamente, de forma confiável, acessível, segura, e, no tempo certo, às necessidades do consumidor (CAMPOS, 1992).

De acordo com Felício (1993), os atributos de qualidade da carne foram classificados em:

a) qualidade visual: aspectos que atraem ou repelem o consumidor que vai às compras;

b) qualidade gustativa: atributos que fazem com que o consumidor volte ou não a adquirir o produto;

c) qualidade nutricional: nutrientes que fazem com que o consumidor crie uma imagem favorável ou desfavorável da carne como alimento compatível com suas exigências para uma vida saudável;

d) segurança: aspectos higiênico-sanitários e a presença ou não de contaminantes químicos, como resíduos de pesticidas.

Depois, os fatores que influenciam na qualidade visual e gustativa foram subdivididos em duas categorias: os *ante-mortem*, ou intrínsecos, e os *post-mortem*, ou extrínsecos.

No entanto, é o consumidor que define as principais qualidades de um alimento que deseja adquirir, especialmente num mercado altamente competitivo em que produtos similares permitem melhor opção de escolha. Sendo assim, ao criar a marca com os atributos procurados pelo consumidor, a indústria impõe seu próprio padrão de qualidade (RAMOS; GOMIDE, 2012). Sendo assim, a qualidade da carne pode ser definida como uma combinação de características que respondem pelo produto como um todo.

Diversos são os fatores que influenciam na textura da carne e em seu atributo qualitativo, a maciez. Dentre eles estão inclusos os fatores ligados à genética (raça), sexo, idade e demais características biológicas do tecido muscular como colágeno, fibras, enzimas e lipídios (RENAND et al., 2001). Outros fatores relacionados ao manejo pré e pós abate como nutrição, estresse do animal, estimulação elétrica, temperatura de resfriamento, tempo de maturação das carcaças, reações e modificações post-mortem ocorridas na conversão músculo-carne, bem como condições de estocagem e armazenamento também exercem significativa influência em seu processo de amaciamento.

Desta forma, pode-se notar o estabelecimento da maciez como parâmetro essencial de qualidade e como o desafio para a produção animal, tecnologia de alimentos e para a indústria de carne, onde o interesse em se gerar produtos de boa qualidade que garantam a saúde e

atendam as expectativas e a satisfação dos consumidores, é crescente. Assim, evidenciam-se nesta revisão, os principais fatores que podem interferir na qualidade, abordando suas funções e demais mecanismos bioquímicos de ação que levam ao estabelecimento ou não da maciez na carne.

2 FATORES DETERMINANTES DE VARIAÇÕES NA QUALIDADE DA CARNE

As características das carnes estão diretamente ligadas ao valor agregado, considerando alto preço para carnes com qualidade superior. Um alto padrão de qualidade apresenta características como: se de cor vermelho a vermelho–cereja, com 3 a 4% de gordura intramuscular. A gordura de cobertura deve estar muito bem aparada e firme sendo de coloração amarelo–pálida. Também seria necessário assegurar a maciez da carne com base nos tratamentos *post mortem* como o resfriamento lento, a estimulação elétrica e a maturação, ou uma combinação deles (FELÍCIO, 1998).

Diversos são os fatores envolvidos nos efeitos relacionados a variação da maciez da carne, dentre eles estão os ante mortem e os fatores *post-mortem* (BELEW et al., 2003).

As características consideradas mais importantes que determinam a qualidade da carne comercializada e que chega à mesa do consumidor são maciez, suculência e sabor, e as características de aparência são cor, quantidade de gordura e textura (BREWER; ZHU; MCKEITH, 2001). Com relação aos fatores que contribuem para a qualidade sensorial da carne, estes incluem raça (LAN et al., 1993), teor de gordura intramuscular (BREWER; ZHU; MCKEITH, 2001), níveis de calpastatina e calpaína (CASAS et al., 2006), presença do gene halotano (LEACH et al., 1998), dieta, tratamento *ante-mortem* (OHENE-ADJAI et al., 2003) e o pH final (ZHU; BREWER, 1998).

2.1 RAÇA

O primeiro fator que afeta a qualidade da carne é a precocidade da raça/linhagem. A precocidade pode ser definida como a velocidade que o animal atinge a puberdade, ocasião em que cessa o crescimento ósseo, diminui a taxa de crescimento muscular e é intensificado o enchimento dos adipócitos, ocorrendo deposição de gordura na carcaça. Em geral, animais mais precoces possuem menor tamanho e começam a depositar gordura a um menor peso.

As características da carne podem ser afetadas, tanto pela raça estar adaptada às condições ambientais ou porque duas ou mais raças foram cruzadas buscando prevalecer as qualidades desejáveis.

O colágeno constitui de 20 - 25% da proteína em mamíferos, e os tecidos conjuntivos são compostos principalmente por colágeno. Ele ocorre em tecido muscular, mas não é distribuído uniformemente neste, e geralmente seu conteúdo de colágeno está relacionado ao nível de atividade física do músculo. O aumento das ligações entre moléculas de colágeno diminui a extensibilidade e a solubilidade do músculo (FORREST et al., 1975).

A gordura subcutânea funciona como um isolante térmico, diminuindo a velocidade de resfriamento da carcaça, evitando a desidratação, o escurecimento e a diminuição da maciez da carne. Carcaças que são resfriadas muito rapidamente, antes de entrar em *rigor mortis*, a carne aumenta a sua dureza porque os sarcômeros do tecido muscular atingem um tamanho muito pequeno.

Ellis et al. (1996) relataram que os suínos da raça Duroc produzem carne com alto marmoreio e de boa qualidade. Brewer et al. (2004) relataram que a carne de Duroc x Landrace - e Large White - apresentaram maior teor de gordura que a carne de Duroc e Duroc x Hampshire. A carne de suínos Landrace x Duroc apresentou-se mais macia do que a de Landrace, Duroc e vários cruzamentos com suínos Yorkshire. Blanchard et al. (1999) relataram que a carne de suínos mestiços, compostas pelo menos por ½ sangue Duroc, apresentaram valores de maciez melhores que o cruzamento de Large White x Landrace.

Wood, Nute e Richardson (2004) relataram que a raça afetou a composição de ácidos graxos dos lipídios intramusculares. A carne de suínos Berkshire e Tamworth (carcaças com maior teor de gordura) apresentaram maior quantidade de mais C14:0 (Ácido mirístico) e C16:0 (Ácido palmítico), enquanto que a as raças Duroc e Large White (carcaças mais magras) continham mais ácidos graxos poli-insaturados. A carne de Duroc apresentaram concentrações elevadas de C20:5 (Ácido 5, 8, 11, 14, 17-eicosapentaenóico (EPA)) e C22:6 (Ácido 4, 7.10, 13, 16, 19-docosa-hexaenóico (DHA)).

2.2 GENÉTICA

Pesquisas revelam que as variações na maciez da carne se dão, em grande parte, pela participação dos fatores genéticos que correspondem por cerca de 30% dessa variação dentro de uma mesma raça, sugerindo a seleção como ferramenta para o melhoramento desta

característica (KOOHMARAIE, 2003). Tais fatores podem ser demonstrados por meio da comparação de diferentes raças ou diferentes genótipos da mesma raça através de bioquímica, estudos genômicos ou por determinação de marcadores genéticos que afetam a biologia do músculo (HOCQUETTE et al., 2005).

A maciez é uma característica controlada por vários genes. Atualmente é possível realizar uma análise do DNA e mapear genes ou conjunto de genes que exercem tal influência na carne, identificando QTLs (locos de características quantitativas - QTL), pela utilização de marcadores genéticos (SIQUEIRA et al., 2007). Ferreira e Grattapaglia (1998) definem marcador molecular como sendo qualquer fenótipo oriundo de gene expresso ou segmento de DNA específico. Estes marcadores permitem observar as características de DNA e diferenças fenotípicas entre dois ou mais indivíduos através das variações no genoma destes, que são herdados geneticamente.

Vários pesquisadores têm avaliado possíveis genes como os responsáveis pela qualidade de carcaça e de carne em bovinos de corte, como por exemplo, os genes: CAST, que codifica a enzima calpastatina (BARENDSE, 2002) e CAPN1, que codifica as enzimas calpaínas (PAGE et al., 2002).

A atividade de calpastatina nos músculos de animais explica grande parte das diferenças de maciez observadas entre diferentes espécies animais (EMBRAPA, 2000; FELÍCIO, 1994).

2.3 SEXO

O sexo influencia o crescimento dos tecidos da carcaça, afetando sua composição e distribuição. Atribuem-se também a qualidade organoléptica da carne, como cor do músculo e cor da gordura, maciez, suculência e o sabor, os quais contribuem na aparência do produto e aceitação do consumidor (PEREIRA; GUEDES, 2005). Segundo Luchiari Filho (2000) quando tratados e manejados apropriadamente, animais jovens (inteiros) podem ser utilizados para a produção eficiente de carcaças com bons rendimentos de porção comestível, carne magra e de boa qualidade.

2.4 IDADE

A idade em que o animal é abatido irá influenciar a composição da carcaça, ou seja, a relação osso/carne/gordura.

Com o aumento da idade dos animais, aumentam o número de ligações cruzadas intra e entre as moléculas de tropocolágeno do colágeno. Essas ligações, chamadas de piridinolina, conferem maior estabilidade à molécula, mas em contra partida aumenta a insolubilidade do colágeno. Como consequência, com o avançar da idade do animal a carne se torna mais dura (LAWRIE, 2005).

Devido ao dimorfismo sexual, o desenvolvimento dos tecidos é diferente entre os gêneros (macho, macho castrado e fêmeas). Em todas as espécies, o macho apresenta uma taxa anabólica de deposição de tecido muscular superior à das fêmeas e a deposição de tecido adiposo é mais tardia. Ao abate, em idades semelhantes às fêmeas irão apresentar maior quantidade de tecido adiposo em relação aos machos.

Quanto à castração, nos bovinos os machos apresentam uma taxa intermediária de deposição de tecido adiposo e nos suínos, os machos castrados apresentam taxas superiores a das fêmeas. Em suínos, o uso de carne de machos inteiros altera o sabor e o aroma da carne, resultando em carne conhecida como “odor sexual”. Essa carne é rejeitada pelo consumidor pelo odor (sabor de urina e fezes que exala no momento de seu cozimento). As substâncias responsáveis pelo odor sexual são a androsterona, que é um feromônio produzido nos testículos, e o escatol, que é o produto da degradação do triptofano no intestino delgado, fazendo com que o abate de suínos seja proibido por lei (LUCHIARI FILHO, 2000).

A idade do animal influência na qualidade da carne, pois vários trabalhos desenvolvidos têm demonstrado essa influência, em animais jovens, por exemplo, podemos citar o menor desenvolvimento das fibras musculares tornando-as menos rígidas, tendo como produto uma carne mais macia, suculenta e saborosa.

Os consumidores, principalmente os do mercado internacional, buscam carnes com qualidade comprovada, não se importando em pagar um preço maior por esta garantia (CERVIERI, 2005).

Outro ponto influenciado pela idade é com relação à aparência, porque com o avançar da idade ocorre o escurecimento do músculo devido à elevação da concentração de hemoglobina, e com a idade decresce a tenrura da carne devido às transformações do tecido conjuntivo (PARDI et al., 2001).

2.5 COR

A cor da carne é considerada como o principal aspecto no momento da comercialização. A cor e a aparência da carne fresca são fatores importantes na decisão de compra do consumidor, porque são indicadores de qualidade de carne e que se encontram frescas (BREWER et al., 2002). A mioglobulina é a principal substância na determinação da cor da carne. O teor de hemoglobina só influenciará a cor da carne se o processo de sangria for mal executado levando a putrefação da carne. Dois são os pigmentos responsáveis pela coloração da carne: mioglobulina dos músculos e a hemoglobina do sangue. Ambos comportam-se de maneira parecida sob a ação do oxigênio e do calor. Em presença do oxigênio a hemoglobina forma a oxiemoglobina, de cor vermelho-brilhante (LAWRIE, 2002).

A cor da carne está relacionada com a concentração de pigmentos heme (mioglobina, hemoglobina), o estado químico, e a dispersão da luz sobre a carne (LAWRIE, 2002). Sob pH elevado, o ferro heme encontra-se predominantemente no estado ferroso (Fe^{2+}); em pH baixo há a aceleração da conversão de ferro ferroso para o estado férrico (Fe^{3+}), sendo que o oxigênio somente pode se ligar ao ferro heme se este estiver no estado ferroso (Fe^{2+}). No entanto, muitas outras moléculas ligantes (NO, CO, N_3) podem ligar-se tanto com o estado ferroso (Fe^{2+}) quanto férrico (Fe^{3+}). A água pode ligar-se a mioglobina (Mb) apenas se o ferro estiver na forma ferrosa. Em condições de baixa tensão de oxigênio, a Mb se exibe com coloração roxa, na forma reduzida (Fe^{2+}). Quando exposto ao oxigênio durante um curto período de tempo, o ferro liga-se reversivelmente ao oxigênio, produzindo oximioglobina (MbO_2), que é de cor rosa ou vermelho brilhante. Todavia, quando exposto ao oxigênio durante um período prolongado, o ferro pode perder um elétron (ficando oxidado a Fe^{3+}) e produzir metamioglobina (MetMb), que é de coloração cinza-castanho (TOLDRÁ, 2010).

Aspectos como idade, sexo, músculo e atividade física afetam a cor da carne. A cor natural e ideal da carne é um vermelho brilhante. Na carne cozida, o principal pigmento é um pigmento marrom, apresentando a parte proteica (globina) desnaturada e o ferro na forma de Fe3+. A cor da carne cozida é determinada por outros fatores, como a caramelização de carboidratos e reação de Maillard (FEIJÓ, 1999). As peças recentes de carne fresca mantém sua cor atrativa aproximadamente por 72 horas, dependendo dos invólucros utilizados e do emprego de baixas temperaturas. Devido a cor ser função da taxa de declínio de pH, a genética pode influenciar tanto na cor absoluta (rosa escuro, rosa pálido) quanto na uniformidade da cor.

Carnes Pálida, Flácida e Exsudativa (PSE) são causadas por estresse no momento do abate levam a um acúmulo de lactato (redução de pH) que, juntamente com a temperatura alta do músculo, provocam um estado em que a carne libera água, torna-se flácida e com coloração amena (FEIJÓ, 1999).

Os problemas relacionados à cor observadas na PSE suíno também estão ligados ao declínio de pH *post-mortem* e a temperatura da carcaça (TOLDRÁ, 2010). O PSE é indesejável para serem embalados devido à alta perda por gotejamento/exsudado, o que representa perda de valor com a diminuição do volume do produto, enquanto que a cor clara torna a carne suína PSE menos atraente para os consumidores (BREWER; LAN; MCKEITH, 1998).

Carnes Escura, Firme e Seca (DFD) são resultantes de estresse prolongado antes do abate que podem esgotar as reservas de glicogênio, impedindo que o pH decline; dessa forma, o músculo passa a reter mais água (seco), ficando estruturado (firme) e de coloração escura tanto pela menor refração de luz, quanto pela maior ação enzimática, com gasto periférico do oxigênio.

2.6 POTENCIAL HIDROGENIÔNICO (PH)

O pH é um dos principais aspectos que influenciam na qualidade e segurança da carne, a determinação deste fornece indicação do grau de deterioração, pois está relacionado com o acúmulo de ácido lático oriundo das mudança *post-mortem.* O acúmulo de ácido lático na carne tem influência direta ou indireta, nos atributos cor, aparência, sabor e aroma (RAMOS; GOMIDE, 2012).

No processo de *rigor mortis*, o pH influencia na contração ocasionando mudanças na sua estrutura e qualidade. A maioria das reações envolvidas na formação do sabor são dependentes do pH; pois afeta a quantidade e qualidade dos compostos aromáticos, que contribuem para o sabor da carne (RAMOS; GOMIDE, 2012).

Quando os animais são acometidos de estresse pré-abate, a reserva de glicogênio dos músculos desses animais pode ser parcial ou totalmente exaurida. Como consequência, o estabelecimento do *rigor mortis* se dá na primeira hora, mesmo antes da carcaça ser levada à câmara fria, porque a reserva energética não é suficiente para sustentar o metabolismo anaeróbio e produzir ácido lático capaz de fazer baixar o pH a 5,5 na 24ª hora *post mortem* (LAWRIE, 2005).

A carne resultante desse processo terá pH>5,8 (TARRANT; KENNY; HARRINGTON, 1989), que proporciona às proteínas musculares uma alta capacidade de retenção de água, mas será escura, com vida de prateleira mais curta, que se dá porque na ausência de ácido lático e glicose livre as bactérias utilizam os aminoácidos da carne com produção de odores desagradáveis. Para Shorthose (1989), essa carne com pH alto também pode apresentar uma descoloração esverdeada, causada por bactérias que produzem H_2S.

Momentos antes do abate, quando o animal é submetido a um fator estressante, ocorre a liberação de catecolaminas (adrenalina e noradrenalina) e de cortisol. Tais hormônios aumentam a atividade da creatina fosfoquinase, acelerando o metabolismo e provocando ativação excessiva do músculo. Nesse momento, com o metabolismo acelerado ocorre rápida produção de ácido láctico e o pH cai bruscamente (LAWRIE, 1998). A combinação do pH baixo com a temperatura elevada da carcaça, que ainda não dissipou o calor, resulta na maior desnaturação das proteínas musculares, principalmente da miosina (MANTESE, 2002).

O pH muscular logo após o abate encontrasse próximo de 7,0 e passadas 24 horas, o pH deve estar entre 5,5 a 5,8. Quando essa queda de pH é anormal, ocorrem problemas como carnes DFD (dark, firm, dry) e PSE (pale, soft, exudative), comprometendo a qualidade da mesma (LAWRIE, 2002).

A diferença entre “PSE” e “DFD” é que o primeiro está associado ao estresse em um curto espaço de tempo, imediatamente antes do abate, enquanto que o “DFD” está intimamente ligado ao estresse de longo período antes do abate (LAWRIE, 1998).

Este fenômeno causa o escurecimento da carne que, de acordo com Swatland (1995), devido ao pH elevado as proteínas miofibrilares apresentarem máxima capacidade de retenção de água, absorve mais luz do que o normal; firmes porque as fibras estão intumescidas pelo preenchimento com fluidos sarcoplasmáticos e, finalmente seca porque a água endógena da carne está firmemente ligada às proteínas, não a deixando fluir para a superfície (OLIVO; SANTOS; FRANCO, 2006).

2.7 FATORES NUTRICIONAIS E ALIMENTAÇÃO

A alimentação animal pode contribuir diretamente para a qualidade da carne (composição da ração) ou indiretamente (principalmente através do aumento do teor de gordura). A nutrição e o nível de ingestão de nutrientes digestíveis podem afetar a composição da carcaça. O maior efeito observado será na proporção de gordura. Uma alimentação com

menor quantidade de concentrados durante a fase de engorda resultará numa proporção mais baixa de gordura, enquanto numa alimentação mais elevada de concentrados a proporção de gordura será maior.

Rações com subprodutos de peixe, soja bruta e óleo de canola podem resultar em sabores indesejáveis na carne (MELTON, 1990). Os suínos provavelmente são os animais que mais têm interferência quanto ao teor de gordura corporal, devido à fonte de gordura na alimentação. Os suínos têm pouca capacidade de biohidrogenar gorduras insaturadas, depositando-as nos tecidos.

O teor de proteínas com alto valor biológico é uma característica positiva da carne e é determinado pelo seu conteúdo em aminoácidos essenciais e pela digestão dos mesmos. Ressalte-se que o tecido que contém menor valor biológico é o conjuntivo. As proteínas são classificadas em solúveis em água ou em soluções salinas. Na carne encontram-se numerosas proteínas sarcoplasmáticas (cerca de 50 componentes), muitos dos quais são enzimas glicolíticas. As solúveis em soluções salinas concentradas ou proteínas miofibrilares (actina, miosina, actomisina) são importantes na contração muscular e nas modificações *post-mortem*. Proteínas insolúveis em soluções salinas concentradas são provenientes do tecido conjuntivo (colágeno, elastina e reticulina), enzimas da respiração e fosforilação oxidativa. O colágeno é o principal componente deste tecido, que é encontrado na pele, tendões e, também, fazendo parte do músculo esquelético (PARDI et al., 2006).

A gordura da carne, além do aspecto energético, é importante pelos ácidos graxos essenciais, colesterol e vitaminas lipossolúveis, sendo também indispensável para os aspectos organolépticos de sabor e uso culinário. A digestibilidade da gordura varia em função dos ácidos graxos constituintes. O valor energético da gordura da carne é da ordem de 8,5 cal/g (PARDI et al., 2006).

Rosenvold et al. (2001) relataram que o uso de dietas de terminação com baixo teor de carboidrato digestível podem reduzir estoques de glicogênio muscular em suínos para abate, sem comprometer a taxa de crescimento. Esta dieta reduziu a atividade das calpaínas e aumentou a atividade das calpastatina, indicando menor degradação proteica muscular nos músculos em comparação com os músculos dos animais controle.

As carnes apresentam todas as vitaminas lipossolúveis (A, D, E, K), as dos complexos B e um pouco de vitamina C. A que tem maior teor presente nas carnes são as do complexo B, que atuam nas funções neurológicas e são indispensáveis ao crescimento e maturação do corpo.

2.8 ODOR E SABOR

O aroma da carne é uma sensação complexa que envolve a combinação de odor, sabor e pH. Por serem aspectos integrantes, o odor e o sabor podem ser agrupados em um complexo denominado de saboroma, sendo que ao eliminar-se o odor, o sabor de um alimento fica alterado. A melhor maneira de avaliação é por meio de painéis de degustação, embora possam ser criticados pela subjetividade (FEIJÓ, 1999).

Para Feijó (1999) a temperatura e a duração do processo de cozimento são passíveis de influenciar a intensidade do saboroma da carne. Quanto maior o tempo de cozimento maior a degradação proteica e perda de substâncias voláteis.

O sabor - e odor - são influenciados pela presença de compostos na carne, tais como álcoois, aldeídos, compostos aromáticos, ésteres, éteres, furanos, hidrocarbonetos, cetonas, lactonas, pirazinas, piridinas e sulfuretos (SHAHIDI, 1994).

Os lipídios presentes no tecido muscular (gordura subcutânea, gordura intramuscular, gordura intermuscular, lipídios intramiocelular e fosfolipídios estruturais) são compostos por ácidos graxos que podem ser saturados ou insaturados. Eles podem ser obtidos diretamente pela alimentação, produzidos como resultado de biohidrogenação de lipídios na alimentação, ou via síntese endógena (ELMORE et al., 1999). Enzimas endógenas antioxidantes, especialmente a catalase, podem retardar o aparecimento de rancidez oxidativa (PRADHAN; RHEE; HERNÁNDEZ, 2000). O tecido muscular também possui compostos que contribuem para sabores indesejáveis na carne que estão diretamente relacionados com a genética, o sexo, o conteúdo de heme do tecido muscular e a dieta. Quanto maior o conteúdo de ferro presente na carne maior à rejeição da mesma pelos consumidores (YANCEY et al., 2005).

2.9 SUCULÊNCIA

A suculência depende da sensação de umidade nos primeiros movimentos mastigatórios, ou seja, da liberação de líquidos pela carne. Uma sensação de suculência é mantida pelo teor de gordura na carne que estimula a salivação e lubrifica o bolo mastigatório. A carne de animais jovens costuma ser suculenta no início, mas, pela falta de gordura, torna-se seca ao final do processo de mastigação. Os processos de resfriamento, congelamento em si não afetam a suculência da carne, mas a sua duração (FEIJÓ, 1999).

Feijó (1999) afirma que o processo de cozimento é fator determinante da capacidade de retenção de água da carne (suculência). Carne que atinge uma dada temperatura interna, mas rapidamente apresenta-se mais suculenta, sendo que esse fato é mais bem observado até 70 °C, pois a partir dessa temperatura as alterações proteicas são tão intensas que o tempo de cozimento torna-se indiferente. Quando a carne é assada forma-se uma superfície (capa) de proteína coagulada que impede a perda de suco; quanto mais rápido o processo de aquecimento mais rápido será a formação dessa capa.

2.10 MACIEZ

Em geral, os consumidores avaliam a maciez como o principal fator que determina a qualidade da carne (BREWER; NOVAKOFSKI, 2008). Reações bioquímicas e a estrutura das fibras musculares são responsáveis pela maciez da carne. De acordo com Sinex (1968), a estabilidade mecânica das fibrilas de colágeno aumenta significativamente com a idade cronológica do animal.

Podem acontecer dois extremos: a carne ser tão fragmentável que partículas aderem-se à língua e bochechas dando a sensação de secura; ou a carne apresentar fibras demasiadamente unidas, quase sempre em virtude de excesso de tecido conjuntivo. Resíduo ou restos de mastigação (restos de carne que permanecem após o processo mastigatório, geralmente tecido conjuntivo originário de perimísio ou epimísio) (FEIJÓ, 1999).

A maciez da carne é afetada pelo índice miofibrilar, tecido conjuntivo, e componentes em sua composição. As miofibrilas podem ser afetadas pelo encurtamento pelo frio e degradação proteolítica; o tecido conjuntivo pode ser afetado pela idade do animal e pelo grau de atividade muscular (PEARSON; YOUNG, 1989).

Segundo Feijó (1999) muitos fatores interferem na maciez da carne, e são divididos em *ante-mortem* ou *post-mortem*. Entre eles estão: genética, fisiologia, alimentação e manejo do animal. Com a idade do animal há a formação de ligações cruzadas entre as moléculas de colágeno que as tornam indissolúveis e endurece a carne.

A maciez é sem dúvida a característica mais importante da palatabilidade da carne e a idade do animal é responsável em grande parte pela variação da maciez da carne, devido à maior solubilidade do colágeno. No entanto, o resfriamento rápido de carcaças de animais jovens pode resultar em carnes duras, devido ao rigor de resfriamento (“cold shortening”) e encurtamento dos sarcômeros. (SMITH et al., 1976).

A deposição de maior ou menor teor de colágeno sob a forma de perimísio (grão da carne) promove diferenças raciais quanto à maciez da carne. Animais inteiros apresentam carne menos macia. O marmoreio (gordura intramuscular) ajuda na maciez por lubrificar a mastigação e diluir o teor de tecido conjuntivo da carne (FEIJÓ, 1999).

Feijó (1999), ainda relatou fatores externos ao animal como uso ou não de processos visando ao amaciamento da carne e distúrbios de refrigeração: encurtamento pelo frio se dá quando um músculo é resfriado em seguida após o abate; rigor pelo descongelamento é quando um músculo congela antes de atingir o rigor mortis; eletro estimulação é uma corrente elétrica que provoca contrações; maturação é quando ocorre desnaturação proteica.

Pela cocção, a maciez é condicionada pela temperatura e pela velocidade de cozimento. Nas carnes bem cozidas ocorre uma maior rigidez por um fenômeno denominado "endurecimento proteico", que é devido à coagulação das proteínas, principalmente as miofibrilares; já que com o calor, o colágeno transforma-se em gelatina, beneficiando a maciez da carne (FEIJÓ, 1999).

A maciez está relacionada com todas as características sensoriais, tais como: antes da mastigação (tamanho de partícula, oleosidade), durante a mastigação (maciez, suculência), e depois de mastigação (resíduo fibroso) (BOURNE, 1992).

A maciez do produto final depende do tecido muscular no qual a carne foi originada. Por exemplo, o músculo *Psoas major* apresentou-se mais macio do que os músculos *Gluteus medius*, *Infraspinatus* e *Rectus femoris* (STETZER et al., 2007). Dentre os músculos *Complexus*, *Serratus ventralis*, *Vastus lateralis*, *Vastus medialis* e *Longissimus dorsi*, o *Longissimus dorsi* apresenta maior maciez e o *Vastus lateralis* foi o menos macio (STETZER et al., 2006).

Em geral, a carne mais macia é originada de músculos que foram menos utilizados quando o animal estava vivo, enquanto a carne que se apresenta mais dura, ou menos macia, é originada de músculos que foram os mais utilizados.

Conforme FELÍCIO (1997) a carcaça tornar-se menos rígida com a fase de resolução do rigor sendo, portanto, representada pela efetiva desnaturação proteica e consequente desestruturação miofibrilar, processo no qual ocorre a maturação da carcaça, técnica a qual a carne fresca é mantida sob refrigeração em temperaturas acima do ponto de congelamento (-1 ºC) por um período após o abate que pode chegar de 7 a 28 dias, onde a carne se tornará mais tenra e aromática.

A tenderização da carne que ocorre após o *rigor mortis*, durante a estocagem refrigerada, denominada maturação, é conhecida desde o início do século. Porém, as explicações para as modificações na estrutura das miofibrilas que tornam mais macia a carne maturada são recentes. A maturação é um processo complexo, afetado por muitas variáveis, tais como a idade e espécie - ou raça - do animal, velocidade de glicólise, quantidade e solubilidade do colágeno, comprimento do sarcômero das miofibrilas, força iônica e degradação das proteínas miofibrilares (KOOHMARAIE, 1994).

Durante este período, a carne é conservada embalada a vácuo a fim de se evitar o crescimento microbiano e sua rápida deterioração. É neste processo que se observa a ação prolongada das principais enzimas endógenas responsáveis pela hidrólise das proteínas miofibrilares que levam ao amaciamento da carne (LUCHIARI FILHO, 2000).

A maciez da carne está diretamente relacionada com o comprimento de sarcômero, o tipo de tecido muscular, as proteínas de tecido conjuntivo e a degradação proteolítica. A maciez depende, em parte, da degradação proteolítica de proteínas estruturais e miofibrilares (KOOHMARAIE et al., 2002).

Koohmaraie (1994) resumiu as modificações químicas e estruturais do processo de maturação da carne, no que diz respeito ao componente miofibrilar, indicando que ocorrem em sequência, o enfraquecimento e/ou degradação do disco Z. Seguido pela degradação da proteína desmina, provavelmente com ruptura de pontes entre as miofibrilas. Após a ruptura ocorre a degradação da proteína titina, que liga filamentos de miosina, no sentido longitudinal das miofibrilas, promovendo a degradação da proteína nebulina (ligações transversais na banda I dos sarcômeros). Com a degradação da nebulina ocorre o desaparecimento de troponina T e aparecimento simultâneo de polipeptídeos. As proteínas contrácteis miosina e actina não são então afetadas.

Existem três sistemas enzimáticos responsáveis pela proteólise dos componentes estruturais das miofibrilas: o sistema das catepsinas, o complexo multicatalítico de proteases (MCP) e o sistema enzimático das “calpaínas”.

As catepsinas são as proteases ácidas presentes nos lisossomas, tendo como substratos a actina, a miosina e a linha Z (KOOHMARAIE, 1994). Uma importante característica dessas catepsinas é que elas atuam até em pH mais baixo (pH<6,0) que as calpaínas, e degradam não só proteínas miofibrilares (como as calpaínas o fazem) como também exercem ação sobre as proteínas do tecido conjuntivo (colágeno), o que pode indicar um sinergismo com o sistema enzimático das calpaínas.

O complexo multicatalítico de proteases (MCP) atua preferencialmente em peptídeos, em pH neutro ou alcalino, e em temperaturas de 45 ºC, apresentando por esta razão pouca importância.

O sistema enzimático denominado “calpaínas” é considerado o principal mecanismo relacionado com a proteólise que conduz à tenderização da carne. Dransfield (1992) demonstrou que 65% da variação na maciez da carne pode ser explicada pela variação na atividade da calpaína-I.

De forma semelhante, GOLL et al. (1992), com base em algumas evidências, ressaltaram que as calpaínas são responsáveis por 90% ou mais da tenderização *post-mortem* da carne. O sistema enzimático das calpaínas é formado por duas calpaínas (proteinase ativada por concentração micromolar de cálcio ou μ-calpaína ou calpaína tipo I e proteinase ativada por concentração milimolar de cálcio ou m-calpaína ou calpaína tipo II) ativadas pelo cálcio livre (não retido no retículo sarcoplasmático ou nas mitocôndrias) e inibidas por outra enzima denominada calpastatina (KOOHMARAIE, 1992).

Buscando então evitar o “cold shortening”, Felício (1997) sugere manter as carcaças a uma temperatura de 10 ºC até o desenvolvimento do *rigor mortis*. O endurecimento da carne causada pelo encurtamento do sarcômero pode então, em sua maioria, ser solucionado pelo amaciamento decorrente do processo de maturação, envolvendo proteólise *post mortem* durante o armazenamento da mesma sob temperatura de refrigeração, interferindo desta forma, nos mecanismos bioquímicos responsáveis pela conversão do músculo em carne, atuando assim sobre a maciez final.

3 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Foram apresentados os mais importantes fatores que influenciam na qualidade da carne. Os fatores *ante* e *post mortem* discutidos exercem, direta ou indiretamente, alguma influência no processo de estabelecimento e resolução do *rigor mortis*. De fato, o conhecimento acerca dos vários fatores interferentes na maciez se relaciona diretamente com estratégias que buscam elucidar, acompanhar e solucionar os principais processos causadores de variação desta característica.

4 REFERÊNCIAS

BARENDSE, W. J. **DNA: markers for meat tenderness.** 2002. Disponível em: <http://www.google.com.br/patents?hl=ptBR&lr=&vid=USPAT7625698&id=AaTKAAAAEBAJ&oi=fnd&dq=DNA:+markers+for+meat+tenderness+Barendse&printsec=abstract#v=onepage&q&f=false>. Acesso em: 01 jun. 2016.

BELEW, J. B. et al. Warner-Bratzler shear evaluations of 40 bovine muscles. **Meat Science**, v. 64, p. 507-512, 2003.

BLANCHARD, P. J. et al. The influence of the proportion of Duroc genes on growth, carcass and pork eating quality characteristics. **Animal Science**, v. 68, n. 3, p. 495-501, 1999.

BOLEMAN, S. J. et al. Effects of post – mortem time of calcium chloride injection on beff tenderness and drip, cooking, and total loss. **Meat science**, v. 39, n. 1, p. 35-41, 1995.

BOURNE, M. Calibration of rheological techniques used for foods. **Journal of Food Engineering**, v. 16, p. 151-163, 1992.

BREWER, S.; NOVAKOFSKI, J. Consumer quality evaluation of aging of beef. **Journal of Food Science**, v. 73, n. 1, p. 278-282, 2008.

BREWER, S.; LAN, H.; MCKEITH, F. Consumer evaluation of pork appearance with differing physiological and packaging conditions. **Journal of Muscle Foods**, v. 9, n. 2, p. 173-183, 1998.

BREWER, M. S. et al. The effect of pig genetics on palatability, color and physical characteristics of fresh pork loin chops. **Meat Science**, v. 61, p. 249-256, 2002.

_____. Enhancement effects on quality characteristics of pork derived from pigs of various commercial genetic backgrounds. **Journal of Food Science**, v. 69, n. 1, p. 5-10, 2004.

BREWER, S.; ZHU, L.; MCKEITH, F. Marbling effects on quality characteristics of pork loin chops: Consumer purchase intent, visual and sensory characteristics. **Meat Science**, v. 59, n. 2, p.153-163, 2001.

CAMPOS, V. F. **Controle da Qualidade Total** (no estilo japonês). 3. ed. Belo Horizonte: Fundação Cristiano Ottoni, 1992.

CASAS, E. et al. Effects of calpastatin and o - calpain markers in beef cattle on tenderness traits. **Journal of Animal Science**, v. 84, n. 3, p. 520-525, 2006.

CERVIERI, R. **Vantagens da Produção Intensiva de Carne-produção de novilhos precoce e superprecoce**. 2005. Disponível em: <http://www.beefpoint.com.br/sobre-o-site/novas-do-site/vantagens-da-producao-intensiva-de-carne-producao-de-novilhos-precoce-e-superprecoce-23188/>. Acesso em: 10 jun. 2016.

DRANSFIELD, E. Modeling post-mortem tenderization. III - Role of calpain I in conditioning. **Meat Science**, v. 31, p. 85-94, 1992.

ELLIS, M. et al. The influence of terminal sire genotype, sex, slaughter weight, feeding regime and slaughter - house on growth performance and carcass and meat quality in pigs and on the organoleptic properties of fresh pork. **Journal of Animal Science**, v. 62, n.3, p. 521-530, 1996.

ELMORE, S. et al. Effect of the polyunsaturated fatty acid composition of beef muscle on the profile of aroma volatiles. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 47, n. 4, p. 1619-1625, 1999.

EMBRAPA. **Maturação da carne**. Bagé-RS: Curso - Qualidade da carne e dos produtos cárneos, 2000.

FEIJÓ, G. L. D. **Noções de ciência da carne**. 1999. Embrapa/CNPGC. Disponível em: <http://www.cnpgc.embrapa.br/publicacoes/doc/doc77/03nocoescarne.html>. Acesso em: 29 jul. 2016.

FELÍCIO, P. E de. Fatores ante e post-mortem que influenciam na qualidade da carne vermelha. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, v. 30, p. 43-52, 1993.

_____. Dois aspectos de competitividade da carne de *Bos indicus*. Um positivo e outro negativo. In: CONGRESSO DAS RAÇAS BRASILEIRAS ZEBUÍNAS. 1. **Anais...** Uberaba. p. 1-9, 1994.

_____. Fatores ante e post mortem que Influenciam na qualidade da carne bovina. In: **Produção de Novilho de Corte**. 1. ed. Piracicaba: FEALQ, p. 79-97, 1997.

_____. Desdobramento da qualidade da carne bovina. **Revista Higiene Alimentar**, v.12, n. 54, p. 16-22, 1998.

FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 3. ed., Brasília: Embrapa-Cenargen, 1998.

FORREST, J. et al. Part II. Muscle and associated tissues. In: **Principles of Meat Science**. San Franscisco, Calif.: W.H. Freeman and Company, p.25-144, 1975.

GOLL, D. E. Role of proteinases and protein turnover in muscle growth and meat quality. **Reciprocal Meat Conference Proceedings**, v. 44, p. 25-33, 1992.

HOCQUETTE, J. F. et al. **Genetic effects on beef meat quality**. p. 13-19, 2005. Disponível em: <http://www.bsas.org.uk/downloads/BQ_May05.pdf.>. Acesso em: 2 maio 2016.

KOOHMARAIE M. Role of the neutral proteinases in postmortem muscle protein degradation and meat tenderness. In: **Proc. Rec. Meat Conference**, Colorado State University, v. 45, p. 63-71, 1992.

_____. Muscle proteinases and meat aging. **Meat Science**, v. 36, p. 93-104, 1994.

KOOHMARAIE, M. et al. Meat tenderness and muscle growth: Is there any relationship? **Meat Science**, v. 62, p. 345-352, 2002.

KOOHMARAIE, M. et al. Understanding and Managing Variation in Meat Tenderness. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA. 40. **Anais**... Santa Maria: UFSM, 2003.

LAN, Y. H. et al. Carcass and muscle characteristics of Yorkshire, Meishan, Yorkshire x Meishan, Meishan x Yorkshire, Fengjing x Yorkshire, and Minzhy x Yorkshire pigs. **Journal of Animal Science**, v. 71, p. 3344-3347, 1993.

LAWRIE, R. A. **Lawrie`s Meat Science**. 6. ed. Lancaster-Basel: Technomic, 336p, 1998.

_____. The eating quality of meat. In: **Meat Science**, 5. ed. New York: Pergamon Press, 2002.

_____. **Ciência da carne**. Porto Alegre: Artmed Editora. 384p, 2005.

LEACH, L. et al. The growth performance, carcass characteristics, and meat quality of Halothane carrier and negative pigs. **Journal of Animal Science**, v. 74, p. 934-943, 1998.

LUCHIARI FILHO, A. **Pecuária da Carne Bovina**. 1. ed. São Paulo: Ed. R. Vieira. 134p, 2000.

MANTESE, F. G. **Transformação do músculo em carne**. 2002. Programa de pós-graduação em Ciências Veterinárias da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Disponível em: <http://www.ufrgs.br/bioquimica/posgrad/BTA/carne>. Acesso em: 04 maio 2016.

MELTON, S. L. Effects of feeds on flavor of red meat: A review. **Journal of Animal Science**, v. 68, p. 4421-4435, 1990.

OHENE-ADJAI, S. et al. Effects of chilling rate and location within muscle on the quality of ham and loin muscles. **Journal of Muscle Foods**, v. 14, n. 2, p. 107-118, 2003.

OLIVO, R.; SANTOS, M. N.; FRANCO, F. O. Carne de frango e nutrição. In: OLIVO, R. **O mundo do frango:** cadeia produtiva da carne de frango. Criciúma: do Autor, Cap.55, p.655-663, 2006.

PAGE, B. T. et al. Evaluation of single-nucleotide polymorphisms in CAPN1 for association with meat tenderness in cattle. **Journal of Animal Science**, Savoy, v. 80, n. 12, p. 3077-3085, 2002.

PARDI, M. C. et al. **Ciência, higiene e tecnologia da carne**. UFG e Universidade Federal Fluminense (EDUFF). Goiânia, 2006. Disponível em <http://www.proec.ufg.br>. Acesso em: 10 out. 2016.

_____. **Ciência Higiene e Tecnologia da Carne**. 2. ed. Goiânia: Editora UFG, 623p, 2001.

PEARSON, A.; YOUNG, R. **Muscle and Meat Biochemistry**. San Diego, California: Academic Press, 1989.

PEREIRA, A. S. C.; GUEDES, C. **Tipificação de Carcaça e seus Benefícios**. 2005. Disponível em: <http://www.serrana.com.br/n_boletins.asp?Tipo=n&id=74.>. Acesso em: 15 jul. 2016,

PRADHAN, A.; RHEE, K. S.; HERNÁNDEZ, P. Stability of catalase and its potential role in lipid oxidation in meat. **Meat Science**, v. 54, p. 385-390, 2000.

RAMOS, E. M.; GOMIDE, L. A. M. **Avaliação da qualidade de carnes: fundamentos e metodologias**. 2. ed., v. 1, Viçosa: Editora UFV, 2012.

RENAND, G. et al. Relationship between muscle characteristics and meat quality traits of young Charolais bulls. **Meat Science**, Jouy-en-Josas, v. 59, p. 49-60, 2001.

ROSENVOLD, K. et al. Muscle glycogen stores and meat quality as affected by strategic finishing feeding of slaughter pigs. **Journal of Animal Science**, v. 79, n. 2, p. 382-391, 2001.

SHAHIDI, F. Flavor of meat and meat products - An overview. In: _____. **Flavor of Meat and Meat Products**. London: Blackie Academic and Professional, 1994.

SHORTHOSE, W. R. Dark-cutting in beef and sheep carcasses under the differente environment of Australia. In: **Proceedings of an Australian Workshop**. Australian Meat and Live-stock Research and Development Corp. Sydney South, p.68-73, 1989.

SINEX, F. M. In: RAMACHANDRAN, G. N. **Treatise on collagen**. v. 2b, Ed. G. N. New York: Academic Press. 1968.

SIQUEIRA, F. et al. **Genética molecular aplicada à qualidade da carne bovina**. Embrapa Gado de Corte. Documentos, 2007.

SMITH, G. C. et al. Fatness, rate of chilling and tenderness of lamb. **Journal Food Science**, v. 41, n. 4, p. 748-756, 1976.

STETZER, A. J. et al. Quality changes in beef complexus, serratus ventralis, vastus lateralis, vastus medialis, and longissimus dorsi muscles enhanced prior to aging. **Journal of Food Science**, v. 73, n. 1, p.6-10, 2006.

STETZER, A. J. et al. Quality changes in beef gluteus medius, infraspinatus, psoas major, rectus femoris, and teres major enhanced prior to aging. **Journal of Food Science**, v. 72, n. 4, p. 242-246, 2007.

SWATLAND, H. J. **On line evaluation of meat**. Lancaster: Technomic. 1995.

TARRANT, P. V.; KENNY, F. J.; HARRINGTON, D. The effect of stocking density during 4 hour transport to slaughter on behaviour, blood constituents and carcass bruising in Friesian steers. **Meat Science**, Oxon, v. 24, n. 3, p. 209-222, 1989.

TOLDRÁ, F. **Handbook of meat processing**. John Wiley & Sons, 577p, 2010.

WOOD, J. D.; NUTE, G. R.; RICHARDSON, R. I. Effects of breed, diet and muscle on fat deposition and eating quality in pigs. **Meat Science**, v. 67, n. 4, p. 651-667, 2004.

YANCEY, E. et al. Flavor characterization of top blade, top sirloin, and tenderloin steaks as affected by pH, maturity, and marbling. **Journal of Animal Science**, v. 83, n. 11, p. 2618-2623, 2005.

ZHU, L.; BREWER, S. Discoloration of fresh normal, PSE, and DFD pork during retail display. **Journal of Food Science**, v. 63, p. 763-767, 1998.

Capítulo

29

Redução do custo da proteína e seus benefícios para piscicultura

Stefani Graceda Silva Moraes[1]
Lucas Pedro Gonçalves Junior[2]
Pedro Pierro Mendonça[3]

1 INTRODUÇÃO

De acordo com a Food and Agriculture Organization of the United Nations – FAO (2016), a aquicultura é o cultivo de organismos aquáticos, como peixes, crustáceos, moluscos e plantas aquáticas. Envolve o cultivo em água doce ou água salgada sob condições controladas**.**

A atividade da piscicultura é um dos ramos da aquicultura, destinada à criação de peixes, principalmente de água doce, onde a expansão segue uma tendência mundial, compensando os problemas enfrentados pela pesca extrativa, garantindo uma produção com qualidade, que atenda aos promissores mercados nacional e internacional.

A piscicultura no Brasil vem sofrendo constantes transformações que protagonizam a transição, de uma fase artesanal, com baixos índices e controles econômicos e zootécnicos, para uma atividade desenvolvida em escala comercial, tendo se consolidado como importante atividade no agronegócio brasileiro mostrando um crescimento de 20% no ano de 2014

[1] Universidade Federal do Espírito Santo, e-mail: stefani.moraes@outlook.com;
[2] Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte-MG, e-mail: juniorvezula@hotmail.com;
[3] Instituto Federal do Espírito Santo, e-mail: ppierrom@gmail.com.

(INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA - IBGE, 2014), substituindo em parte o peixe proveniente da pesca extrativa. Principalmente em função da disponibilidade de recursos hídricos, das condições climáticas favoráveis e da disponibilidade de espécies de peixes passíveis de cultivo (LOPES et al., 2010).

O Brasil apresenta como um potencial país para desenvolvimento da piscicultura, como poucos países do mundo. Formado por 8.400km de costa marítima e 5.500.000 hectares em reservatórios de águas doces, dos quais apenas uma pequena fração tem sido aproveitada para o cultivo de peixes em tanques-rede, o país comporta aproximadamente 12% da água doce disponível no planeta (FIGUEIREDO, 2016).

A disponibilidade de recursos hídricos, o clima extremamente favorável, a mão-de-obra abundante e a crescente demanda por pescado no mercado interno têm contribuído para alavancar a atividade. No Brasil, o consumo *per capita* de pescado aumentou de 4kg/ano para 9kg/ano, segundo dados da FAO (2016), nos últimos oito anos, graças a tendência mundial em consumir carnes que tragam benefícios a saúde, sendo a carne de peixe rica em proteínas, vitaminas hidrossolúveis do complexo B e lipídeos, além de ser fonte de minerais.

De acordo com o Serviço brasileiro de apoio às micro e pequenas empresas - SEBRAE (2015) o Brasil tem potencial para atingir até 2030, uma produção anual de 20 milhões de toneladas de peixe, assumindo assim um papel importante no fornecimento do pescado mundial. Focado na produção, o país contabiliza 1,3 milhões de toneladas por ano, dados que revelam, não só o potencial existente, como também a necessidade de mais investimentos e atenção ao setor.

Até poucas décadas atrás, o cultivo extensivo era a forma mais utilizada na produção de peixes, nesse sistema não era oferecido nem uma fonte alimentar utilizando somente a produção natural. Em contrapartida utilizava-se uma baixa densidade de indivíduos, resultando em uma baixa eficiência de produção. Atualmente com o aumento da demanda de carne de peixes pelo mercado consumidor e o aumento dos avanços tecnológicos tem acarretado progressiva transformação dos cultivos extensivos em cultivos semi-intensivos ou intensivos, uma evolução essencial para garantir a viabilização econômica dos cultivos. Os chamados sistemas semi-intensivos caracterizam pela máxima utilização de alimentos naturais (fito e zooplâncton, bentos e macrófitas), produzidos no próprio viveiro através de adubações químicas ou/e orgânicas, e suplementados com rações. Intensificar um cultivo implica em aumentar a quantidade de biomassa de animais produzidos por área, à custa do fornecimento constante de rações balanceadas e adequadas a cada fase de desenvolvimento dos animais (TSUKAMOTO; TAKAHASHI, 1992).

As mudanças ocorridas no sistema de criação dos animais trouxeram também um novo desafio, a produção de rações que sejam capazes de atender as necessidades nutricionais dos animais. Um dos grandes desafios da piscicultura, então, tem sido identificar ingredientes que possam reduzir os custos com a alimentação, que pode chegar a atingir cerca de 70% do custo total, sendo as fontes proteicas as mais onerosas, sem, no entanto, comprometer a qualidade da água e o desempenho dos peixes (LOPES et al., 2010; PEZZATO et al., 2000).

Devido ao potencial da atividade em se torna um dos ramos mais promissores do agronegócio aliado à necessidade de produzir rações balanceadas e de menor custo essa revisão de literatura tem como objetivo abordar a necessidade de proteína na nutrição de peixes e as principais formas de se obter esse ingrediente de alto valor nutricional, com menor custo.

1.1 PROTEÍNA NA NUTRIÇÃO DE PEIXES

Proteínas são macromoléculas composta por aminoácidos, unidos por ligações peptídicas. Apresenta diversas funções nas células como componentes estruturais, funções enzimáticas, funções hormonais, recepção de estímulos hormonais e armazenamento de informações genéticas (SANTOS; MACEDO; CHAGAS, 2011).

A exigência de proteína para diversas espécies de peixes é maior se comparado aos outros animais. Rações para peixes devem conter entre 24 e 50% de proteína bruta, em função da fase de desenvolvimento, do ambiente, das espécies, balanço de energia da dieta, composição e digestibilidade dos aminoácidos dos ingredientes utilizados (MOREIRA et al., 2001; SANTOS et al., 2013).

O conceito de proteína ideal é definido como o balanceamento exato de aminoácidos essenciais e não essenciais necessários para atender às exigências de todos os aminoácidos para manutenção e produção dos peixes, baseado na proposta de que cada aminoácido essencial seja expresso em relação a um aminoácido de referência, a lisina (FURUYA et al., 2005).

A farinha de peixe é utilizada no mundo inteiro como o alimento básico para o fornecimento de proteína para animais aquáticos. Constitui cerca de 20 a 60% do volume total da ração, sendo considerada a fonte nutricional ideal para suprir as necessidades proteicas e lipídicas dos peixes carnívoros, (TSUKAMOTO; TAKAHASHI, 1992).

Produzido a partir peixes inteiros ou pedaços, secos e triturados, dos quais foi extraída ou não a parcela de óleo. Apresenta acima de 58% de PB na matéria seca, é rica em cálcio e fósforo e sendo fonte balanceada de aminoácidos essenciais (lisina, metionina, treonina e triptofano) (GOES et al., 2013).

Gonçalves e Carneiro (2003) ao analisarem o coeficiente de digestibilidade da farinha de peixes para alevinos de Pintados observaram valores satisfatórios para os coeficientes de digestibilidade da energia e proteína em relação aos alimentos de origem vegetal estudados.

Apesar de apresentar características nutricionais ideais, a farinha de peixes não é encontrada facilmente no mercado além de poder sofre grandes variações na sua composição nutricional. Devido a sua progressiva escassez no mercado mundial, inúmeros estudos vêm sendo realizados buscando por alternativas viáveis, a sua substituição completa ou parcial, como será apresentado no decorrer dessa revisão, tanto em preço e qualidade, mas principalmente com disponibilidade constante e produção em larga escala (TSUKAMOTO; TAKAHASHI, 1992).

1.2 SUPLEMENTAÇÃO COM AMINOÁCIDOS SINTÉTICOS

Os aminoácidos presentes nas proteínas dos seres vivos podem ser classificados de várias formas, entretanto, do ponto de vista da nutrição de animais, eles são classificados principalmente como aminoácidos essenciais e aminoácidos não essenciais. Os chamados essenciais não são sintetizados pelo organismo do animal, ou são sintetizados em quantidades insuficientes para suprir as exigências. Já na classe dos não essenciais, estão presentes aqueles que podem ser sintetizados pelo tecido animal a partir de metabólitos do metabolismo intermediário e de grupamentos amino provenientes do excesso de aminoácidos (SANTOS; MACEDO; CHAGAS, 2011).

Segundo Moreira et al. (2001), peixes apresentam uma exigência de 10 aminoácidos essenciais, são eles: arginina, histidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, fenilanina, treonina, triptofano e valina. Entre os aminoácidos mais limitantes em dietas formuladas com base em proteína de origem vegetal, destaca-se a lisina, os aminoácidos sulfurados, a treonina e o triptofano, que devem estar presentes de forma balanceada evitando os excessos ou deficiências, pois podem prejudicar o desempenho e a qualidade da carcaça.

Usualmente a metodologia empregada para determinação das exigências em aminoácidos para peixes baseia-se em experimentos individuais de dose-resposta para cada aminoácido, nos quais concentrações crescentes do aminoácido são adicionadas à dieta até que o ganho de peso não responda mais a inclusão dos mesmos. A partir da década de 60, com o conceito de proteína ideal proposto inicialmente para suínos, o perfil de aminoácidos do corpo revelaria a proporção dos aminoácidos em relação a um aminoácido referência, geralmente o mais limitante (ABIMORAD; CASTELLANI, 2011).

A formulação de dietas com menor nível proteico por meio da suplementação de aminoácido sintéticos possibilita a formulação de dietas com valores mais próximos para atender a exigência dos peixes, como observado em Tilápia do Nilo por Bomfim et al. (2006), Botaro et al. (2006) e Furuya et al. (2005); em camarão-branco-do-pacífico (*Litopenaeus vannamei*) por Furtado et al. (2010).

Segundo, Botaro et al. (2006) e Furuya et al. (2013) reduzir o teor de proteína em dietas para peixes, utilizando o conceito de proteína ideal, é importante para a formulação de dietas de baixo custo e baixo impacto ambiental, especialmente quando os peixes são criados intensivamente. Dietas com menor teor de proteico é uma estratégia para aumentar a sustentabilidade pela menor entrada de nitrogênio e menor excreção no meio aquático, sem por tanto causar prejuízos econômicos.

Logo, aminoácidos sintéticos devem ser utilizados na obtenção de dietas balanceadas com proporções adequadas de aminoácidos, maximizando a utilização de proteína da dieta (BOTARO et al., 2006).

Segundo Bomfim et al. (2006), para alevinos de tilápia do Nilo, com 0,80g revertidos, o nível de proteína bruta pode ser reduzido de 32% para 28% sem causar prejuízo ao desempenho dos animais, desde que as rações sejam suplementadas com aminoácidos essenciais limitantes. As rações testadas foram formuladas para serem isoenergéticas e isolisínicas digestíveis, mantendo-se constantes as relações mínimas dos aminoácidos com a lisina.

Para tilápia do Nilo com peso entre 100 a 500g, Righetti et al. (2010), conclui que é possível a redução de 26,7 para 24,5 a proteína digestível, por meio da suplementação com aminoácido sintético.

Segundo Furuya et al. (2001), para alevinos de tilápia do Nilo revertidos sexualmente, com peso médio 1,31g, a exigência de metionina + cistina total e digestível, baseado no conceito de proteína ideal é de 1,11 e 1,0%, respectivamente, correspondendo uma relação metionina + cistina digestível/lisina digestível de aproximadamente 61%. Já na fase de terminação peso médio de 117,9g, a exigência de Lisina, para peixes da mesma espécie, é de 1,42% de lisina (5,7% da proteína ou 4,8mg de lisina/kcal de energia digestível) na ração (FURUYA et al., 2005).

Em Tambaquis na fase juvenil a necessidade de treonina, metionina + cistina e lisina digestíveis é de 0,98%, 0,94% e 2,05%, respectivamente (GONÇALVES JUNIOR, 2015).

Poucas são as informações sobre as exigências de aminoácidos para peixes, principalmente na fase larval, assim com a aplicação do conceito de proteína ideal, sendo

importantes esses valores para permitir a elaboração de rações práticas de elevado valor nutricional e, consequentemente, aumentar o retorno econômico (FURUYA et al., 2001).

1.3 SUBSTITUTOS PROTÉICOS: SUBPRODUTOS

O termo subproduto é empregado para designar produtos resultantes do processamento industrial, após a retirada do produto de maior interesse. Tem se a ideia que esse alimento não apresenta mais condição para uso. Entretanto, ao ser analisado para fins de nutrição animal, muitas vezes apresentam como fontes nutricionais com qualidades excepcionais. Além da disponibilidade existente no Brasil, graças à grande variedade de processamentos aqui realizada, podendo ser restritos a uma determinada região do país (MENEGHETTI; DOMINGUES, 2008).

A utilização de alimentos alternativos, subprodutos ou resíduos do processamento de alimentos para o consumo humano é uma prática utilizada como forma de reduzir o impacto ambiental, amortizar o custo de produção de rações para as espécies animais de produção (LEMOS; GUIMARÃES; MIRANDA, 2011). A seguir serão apresentados os substitutos proteicos mais utilizados na piscicultura brasileira.

1.3.1 Farelo de soja

A soja é uma planta leguminosa, que a partir da moagem do seu grão é extraído o óleo, que é destinado para consumo humano, e obtido o farelo de soja que representa um dos ingredientes de maior importância utilizado em ração animal (RUNHO, 2001). Segundo Valadares Filho et al. (2015), o farelo de soja apresenta MS de 88,57%, PB 48,17%, e FB 6,09%.

Dentre as proteínas de origem vegetal a soja, *Glycine max* (L), é considerada como um alimento de grande potencial na formulação das rações comerciais, tanto para peixes de água doce quanto para marinhos. Apresentando um perfil aminoácidico rico em lisina e metionina que o coloca a frente dos demais vegetais; e possuindo ainda, quase a totalidade dos ácidos graxos necessários para os peixes de água doce. Caracterizando como uma proteína especial por atender os requisitos nutricionais básicos: digestibilidade elevada e balanço adequado de aminoácidos essenciais (TSUKAMOTO; TAKAHASH, 1992).

Ao analisar o farelo de soja para juvenis de Tilápia do Nilo, Pezzato et al. (2004), descreveram que digestibilidade aparente da MS, EE, PB, é de 71,04%, 89,88% e 82,67%,

respectivamente. Classificando como uma das fontes proteicas de origem vegetal de melhor coeficiente digestibilidade aparente. Gonçalves e Carneiro (2003) citaram que a digestibilidade aparente da proteína do farelo de soja para pintados, que possui habito alimentar piscívoro, é de 67,10%.

1.4 FARELO DE COCO NA ALIMENTAÇÃO DE PEIXES

O farelo de coco ou torta de coco é um subproduto da extração do óleo de coco, que pode ser usado como fonte energética e proteica na alimentação animal. Pode ser um substituto parcial do milho e do farelo de soja nas rações de animais não ruminantes. No entanto, a proteína do farelo de coco pode ser considerada de qualidade inferior à da soja, em virtude de sua deficiência em aminoácidos essenciais como metionina, fenilalanina, lisina e arginina. Em razão dessas deficiências e do alto teor de fibra (10 a 12%), este subproduto é adicionado em pequenas quantidades em rações para animais não ruminantes, embora não apresente atividade antinutricional que deprima o crescimento animal (SIEBRA et al., 2008).

Segundo Valadares Filho et al. (2015) o farelo apresenta cerca de 89,90% de matéria seca, 8,95% de extrato etéreo, 22,72% de proteína bruta e 14,26% de fibra bruta. A composição centesimal de rações com inclusão de farelo de coco demonstra um aumento gradual nos teores de fibra bruta e estrato etéreo (OMENA, 2008).

Diversos autores mostram a inclusão de farelo de coco na ração de tilápia do Nilo. Santos et al. (2009a) demonstram que o farelo de coco pode substituir o farelo de soja em dietas de alevinos de tilápia do Nilo em até 15% sem comprometer seu desempenho e com maior viabilidade econômica.

Omena (2008) ao analisar ganho de massa de alevinos, machos, revestidos de Tilápia do Nilo observou que não houve diferença significativa no ganho de massa em dietas com inclusão de 30% do farelo de coco e relação à dieta sem farelo.

Corroborando com esse estudo, Pezzato et al. (2000) ao avaliarem o valor nutritivo do farelo de coco em dietas de alevino de Tilápia do Nilo constatou-se que os tratamentos sem farelo de coco e substituição pelo farelo de coco na proporção de 10%, 20% e 30% diferiram entre si, sendo que a inclusão de até 30% de farelo de coco proporcionou melhores resultados de ganho de peso. Mesmo resultado foi demonstrado por Lemos, Guimarães e Miranda (2011), analisado o desempenho de juvenis de Tambaqui, alimentados com ração contendo 25%, 50% e 100% de farelo de coco em substituição ao farelo de soja.

Analisando o rendimento do filé de alevinos machos Tilápia do Nilo alimentados com rações que possuía 20% e 30% de inclusão do farelo de coco, Omena (2008) constatou uma menor deposição de massa muscular em relação ao peso corporal. Em alevinos de Tambaquis alimentados com ração com 25%, 50% e 100% de farelo de coco em substituição ao farelo de soja não foi observado diferença significativa para o rendimento de filé, o que indica a possibilidade de substituição deste ingrediente sem prejudicar as características de carcaça (LEMOS; GUIMARÃES; MIRANDA, 2011).

Ao analisar o teor de gordura da carcaça de Tilápia do Nilo, Omena (2008) observou que não ocorreu diferença significativa na quantidade de gordura na carcaça, sendo obtidos 1,15% a 1,81%, o que classifica o peixe como magro.

Segundo Santos et al. (2009a), a substituição acima de 30% do farelo de soja por farelo de coco na ração, de alevinos de Tilápia, apresentou um efeito linear crescente, sobre o a conversão aparente, piorando de forma significativa. Provavelmente, esse efeito tenha ocorrido devido à retirada de fontes proteicas e energéticas de melhor digestibilidade como o milho e farelo de soja, substituídos pelo farelo de coco. De modo contrário, Lemos, Guimarães e Miranda (2011), constataram a conversão alimentar de Tambaqui não foi influenciada pelos diferentes tratamentos (0%, 25%, 50 e 100% de substituição) durante o período experimental.

Avaliando também, a digestibilidade do farelo de coco na alimentação de alevinos de Tilápia do Nilo, foi obtido um valor de energia digestível (ED) de 3525 kcal ED/kg e, uma disponibilidade para o fósforo (Pdis) de 19,97%. O coeficiente de digestibilidade aparente obtido com o emprego de dieta purificada, para o farelo de coco, foi de 60,53% para a fração matéria seca, 86,78% para proteína bruta, 94,64% para extrato etéreo e 82,47% para matéria mineral (PEZZATO et al., 2000).

Na fase juvenil, Tilápias alimentadas com farelo de coco, segundo Pezzato et al. (2004), apresentaram o coeficiente de digestibilidade aparente médio para MS e PB de 60,19% e 86,78%, respectivamente, e energia digestível de 2990 kcal/kg. Concluído que o coeficiente de digestibilidade da MS e PB do farelo é melhor que o do farelo de soja, além dos maiores valores de energia digestível.

De acordo com Oliveira et al. (1997), o coeficiente de digestibilidade aparente obtido para o farelo de coco foi de 72,63% para a fração matéria seca, 83,35% para proteína bruta, 97,56% para extrato etéreo, 38,77% para fibra bruta e 87,42% para matéria mineral, apresentando melhor digestibilidade que a torta de dendê, ambos podem compor dietas para Pacu.

Outras características são importantes para uma melhor avaliação das condições fisiológicas, quando o animal esta sendo submetido a dietas com alimentos alternativos de origem vegetal, pois estes podem conter relações com fatores antinutricionais presentes nesses alimentos que venham a comprometer o normal funcionamento do organismo dos peixes, causando problemas no seu metabolismo (SANTOS et al., 2009a). O índice hepatossoático, gordura víscero-somática e peso das vísceras foram avaliados em tilápia do nilo alimentado com farelo de coco, sendo observado que não houve diferença significativa quando comparado valores médios, esse fato pode ser explicado, pois as rações têm valores nutricionais semelhantes.

Observou-se efeito significativo da substituição do farelo de soja pelo farelo de coco sobre o índice hepatossomático e índice de gordura visceral em alevinos de Tambaqui. À medida que se aumentou o nível de farelo de coco, 25%, 50% e 100%, na dieta houve decréscimo no índice hepatossomático e aumento na quantidade de gordura depositada nas vísceras dos animais. Fato esse que pode ser explicado, por se tratar de um peixe reofílico, o tambaqui necessita armazenar energia para períodos de escassez de alimento na natureza. Esta característica pode ter influenciado nos resultados do presente estudo (LEMOS; GUIMARÃES; MIRANDA, 2011).

O consumo diário de ração não apresentou diferenças ($p>0,05$) o que corrobora as observações de Santos et al. (2009b) que ao testarem níveis de farelo de coco em dietas para alevinos de tilápia (*Oreochromis niloticus*) verificaram que a inclusão de até 45% de farelo de coco na dieta não influenciou o consumo de ração.

1.5 FARELO DE CANOLA NA ALIMENTAÇÃO DE PEIXES

O farelo de canola (FC) é o subproduto obtido da extração do óleo da semente da canola. Apresenta em sua composição bromátologica 89,38% de MS, 40,12% PB, 11,38 FB e 2,47 EE (VALADARES FILHO et al., 2015). Entretanto, possui fatores limitantes como os metabólitos oriundos da hidrólise dos glicosinolatos, inibidores de tripsina, fitatos, compostos fenólicos e taninos (GOES et al., 2013).

O farelo contém mais fibra bruta e menos energia metabolizável (EM) do que o farelo de soja, e tais valores são distintos entre variedades e tipos de processamento (EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA, 1998).

Nos valores médios de desempenho de Tilápias do Nilo em fase de crescimento, observou-se efeito quadrático dos níveis de substituição da PB do FS pela do FC sobre a

porcentagem de ganho de peso e rendimento de carcaça, em que foram obtidos os melhores valores com os níveis estimados de 48,17% e 45,93% de substituição da PB do FS pela do FC, respectivamente Em juvenis de Pacu, Viegas et al. (2008), concluíram que adição de até 19% de farelo de canola em dietas, pode ser utilizada sem prejuízos para o crescimento do pacu.

Galdioli et al. (2001), relata que o FC pode substituir 50,00% da proteína do farelo de soja em dietas de alevinos de Pivuçu. Ressalta-se, ainda, que a sua utilização dependerá das oscilações nos valores de comercialização e disponibilidade destes no mercado.

Corroborando com essa ideia, Soares et al. (2001), observa-se uma redução linear na porcentagem de gordura visceral à medida em que a PB do FS foi substituída pela do FC em dietas de Tilápia do Nilo, em fase de crescimento. Este resultado pode ser devido aos menores valores de extrato etéreo nas rações com teores mais elevados de FC e/ou pelos maiores níveis de taninos nessas dietas. Concluindo que o farelo de canola pode ser incluído a 35,40% (substituindo 48,17% da proteína do farelo de soja) em dietas para a tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*), na fase de crescimento.

Em Pacu ocorreu um aumento de gordura corporal, proporcionado por dietas com o uso concomitante de farelo de canola (até 19%) e 12% de farinha de peixe, podendo ser uma estratégia importante para os juvenis de pacu atravessar o período de inverno, quando a ingestão de alimentos diminui consideravelmente (VIEGAS et al. 2008).

1.6 FARELO DE ALGODÃO NA ALIMENTAÇÃO DE PEIXES

O uso de derivados do algodão na ração animal, como o farelo de algodão, é bastante difundido pela sua composição nutricional e por conter proteína de boa qualidade. O farelo de algodão é o terceiro farelo proteico mais produzido no mundo, perdendo apenas para o farelo de soja e de canola. É o subproduto resultante da extração do óleo contido no grão que, ao ser esmagado, é denominada torta; é usada na forma obtida ou moída e peletizada, para uso animal (EMBRAPA, 2003).

Segundo, Botelho (2012) o farelo de algodão se apresenta como fonte proteica alternativa para compor rações para tilápia do Nilo, possuindo custo significativamente inferior aos dos alimentos proteicos mais utilizados em dietas. Mas, ressalta que a utilização da enzima fitase se faz necessária para que ocorra a otimização na utilização de alguns minerais presentes no farelo de algodão pela Tilápia do Nilo, reduzindo as possibilidades de eutrofização do meio aquático, principalmente em sistema intensivo de produção, bem como a necessidade de suplementação da dieta com determinados minerais, principalmente o P, reduzindo seu custo.

O farelo de algodão apresenta em sua composição bromatologica 35% PB e 1,5% EE. Sendo possivel a utilização de 8 e 16% de farelo de algodão na ração de Tilápia do Nilo proporcionando o melhor ganho de peso e comprimento, podendo ser incorporado em dietas de peixes desde de que haja limitação quanto a dose e o tempo de uso (SAKABES et al., 2003).

Em alevinos de piavuçu Galdioli et al. (2001), observou que o farelo de algodão pode substitui cerca de 50% do farelo de soja nas rações. O mesmo resultado foi encontrado por Kleemann (2011), ao estudar a substituição do farelo de soja pelo farelo de algodão isento em gossipol livre, para alevinos de Tilápia do Nilo.

O farelo de algodão (0% de gossipol livre) pode compor 32,0% da ração para tilápia do Nilo, substituir em 50,0% a proteína do farelo de soja quando suplementado com lisina, sem afetar o desempenho, hematologia e morfologia intestinal dos animais em crescimento Kleemann (2011).

Segundo Pezzato et al. (2004), farelo de algodão apresenta os seguintes valores para digestibilidade aparente, para juvenis de Tilápia do Nilo, 53,11% MS, 74,87% PB, 99,39 EE.

Não se verifica alteração no consumo das rações experimentais, em alevinos de Tilápia do Nilo, mesmo com o aumento da inclusão do farelo de algodão. Isso demonstra que este ingrediente é tão palatável quanto o farelo de soja para esta espécie de peixe Kleemann (2011).

2 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A utilização de substitutos proteicos em dietas de peixes vem demonstrando ser a forma mais eficiente de produzir rações balanceadas que atenda a necessidade desses animais.

Mas a inclusão desses alimentos nas dietas deve respeitar os limites máximos estabelecidos e a viabilidade econômica que pode variar de acordo com a sua disponibilidade. É importante a realização de mais pesquisas que busquem agregar alimentos que possuem características desejáveis para a produção de ração.

3 REFERÊNCIAS

ABIMORAD, E. G.; CASTELLANI, D. Exigências nutricionais de Aminoácidos para o lambari-do-rabo amarelo baseadas na composição da carcaça e do músculo. **Boletim do Instituto de Pesca**, v. 37, n. 1, p. 31-38, 2011.

BOMFIM, M. A. D. **Redução de proteína bruta, relações aminoácidos digestíveis com a lisina em rações para alevinos de Tillápia do Nilo**. 2006. 108 f. Tese (Doutorado) - Curso de Zootecnia, Departamento de Zootecnia, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2006.

BOTARO, D. et al. Redução da proteína da dieta com base no conceito de proteína ideal para tilápias-do-nilo (*Oreochromis niloticus*). **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 36, n. 3, p. 517-525, 2006.

BOTELHO, R. de M. **Valor nutritivo, pela tilápia do Nilo, do farelo de algodão suplementado com fitase**. 2012. 51 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Medicina Veterinária, Medicina Veterinária, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2012.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA - EMBRAPA. **Farelo de Canola: Uma alternativa proteica para alimentação de suínos e aves**. 1998. Disponível em: <http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/58420/1/doc55.pdf>. Acesso em: 1 maio 2016.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA- EMBRAPA. **Farelo Subprodutos do Algodão**. 2003. Disponível em: <:https://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Algodao/AlgodaoAgriculturaFamiliar/subprodutos.htm>. Acesso em: 1 maio 20016.

FIGUEIREDO, L. A. **Desconto na tarifa de energia elétrica:** direito do aquicultor. 2016. Disponível em: <http://www.canaldoprodutor.com.br/sites/default/files/artigo-14.pdf>. Acesso em: 28 set. 2016.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS - FAO. **Perspectivas Agrícolas no Brasil:** desafios da agricultura brasileira 2015-2024. 2015. Disponível em: <https://www.fao.org.br/download/PA20142015CB.pdf>. Acesso em: 27 set. 2016.

FURTADO, P. S. et al. Suplementação de taurina em dietas com duas concentrações proteicas para pós-larvas de camarão-branco-do-pacífico. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 39, n. 11, p. 2330-2335, 2010.

FURUYA, W. M. et al. Exigências de metionina + cistina total e digestível para alevinos revertidos de tilápia do Nilo, *Oreochromis niloticus*. **Acta Scientiarum**, v. 23, n. 4, p. 885-889, 2001.

_____. Aplicação do Conceito de Proteína Ideal para Redução dos Níveis de Proteína em Dietas para Tilápia do nilo. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 34, n. 5, p. 1433-1441, 2005.

_____. Nutrição de tilápias no brasil. **Revista Varia Scientia Agrárias**, v. 3, n. 1, p. 133-150, 2013.

GALDIOLI, E. M. et al. Substituição parcial e total da proteína do farelo de soja pela proteína dos farelos de canola e algodão em dietas para alevinos de piavuçu, *Leporinus macrocephalus* (Garavello & Britski, 1988). **Revista de Veterinária e Zootecnia**, v. 23, n. 1, p.841-847, 2001.

GOES, R. H. et al. **Alimentos E Alimentação Animal**. Dourados: UFGD, 2013.

GONÇALVES JUNIOR, L. P. **Necessidade de treonina, metionina+cistina e lisina digestível para juvenis de tambaqui (*Colossoma macropomum*)**. 2015. 68 f. Dissertação

(Mestrado) - Curso de Ciências Veterinárias, Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Espírito Santo, Alegre, 2015.

GONÇALVES, E. G.; CARNEIRO, D. J. Digestibilidade Aparente da Proteína e Energia de Alguns Ingredientes Utilizados em Dietas para o Pintado (*Pseudoplatystoma coruscans*). **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 34, n. 4, p. 779-786, 2002.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA – IBGE. **Produção da pecuária municipal**. Rio de Janeiro: IBGE, v. 42. 2014.

KLEEMANN, G. K. **Farelo de algodão como substituto ao farelo de soja, rações para tilápia do Nilo.** 60 f. 2011. Tese (Doutorado em Zootecnia) - Universidade Estadual Paulista, 2011.

LEMOS, M. V. A.; GUIMARÃES, I. G.; MIRANDA, E. C. Farelo de coco em dietas para o tambaqui (*Colossoma macropomum*). **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v. 1, n. 12, p. 188-198, 2011.

LOPES, J. M. et al. Farelo de babaçu em dietas de Tambaqui. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v. 11, n. 2, p. 519-526, 2010.

MENEGHETTI, C. C.; DOMINGUES, J. L. Características nutricionais e uso de subprodutos da agroindústria na alimentação de bovinos. **Revista Eletrônica Nutritime**, v. 5, n. 2, p. 512-536, 2008.

MOREIRA, H. L. M. et al. **Fundamentos da moderna aquicultura.** 3. ed. Canoas: Ulbra, 2001. 200 p

OLIVEIRA, A. C. B. de et al. Coeficiente de digestibilidade aparente da torta de dendê e do farelo de coco em pacu (*Piaractus mesopotamicus*). **Revista Unimar**, v. 19, n. 3, p. 897-903, 1997.

OMENA, C. M. B. de. **Reflexos da utilização de farelo de coco na alimentação de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*)**. 2008. 95 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Química e Biotecnologia, Instituto de Química e Biotecnologia, Universidade Federal do Alagoas, Maceió, 2008.

PEZZATO, L. E. et al. Valor nutritivo do farelo de coco para a tilápia-do-nilo (*Oreochromis niloticus*). **Acta Scientiarum**, v. 22, n. 3, p. 695-699, 2000.

PEZZATO, L. E. et al. Digestibilidade aparente da matéria seca e da proteína bruta e a energia digestível de alguns alimentos alternativos pela tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*). **Acta Scientiarum**, v. 26, n. 3, p. 329-337, 2004.

RIGHETTI, J. S. et al. Redução da proteína em dietas para tilápias-do-nilo por meio da suplementação de aminoácidos com base no conceito de proteína ideal. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 3, n. 40, p. 469-476, 2010.

RUNHO, R. C. (Brasil). **Farelo de soja:** Processamento e Qualidade. Osasco: Polinutri Alimentos, 2001.

SAKABES, R. et al. Farelo de algodão na alimentação de tilápia do nilo. **Revista Ceres**, v. 292, n. 50, p. 708-783, 2003.

SANTOS, E. L. et al. Digestibilidade aparente do farelo de coco e resíduo de goiaba pela tilápia do nilo (*Oreochromis niloticus*). **Revista Caatinga**, v. 22, n. 2, p.175-180, 2009a.

_____. Níveis de farelo de coco em rações para alevinos de tilápia do Nilo. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v. 10, n. 2, p. 390-397, 2009b.

_____. Considerações sobre o manejo nutricional e alimentar de peixes carnívoros. **Revista Eletrônica Nutritime**, v. 11, n. 195, p. 2341-2351, 2013.

SANTOS, F. A. P.; MACEDO, F. L.; CHAGAS, L. J. Aplicação do conceito de proteína ideal para bovinos leiteiros. In: SIMPÓSIO NACIONAL DE BOVINOCULTURA LEITEIRA E I SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE BOVINOCULTURA LEITEIRA, 3., 2011, Viçosa. **Anais...** Viçosa, 2011. p. 75 - 122.

SERVIÇO BRASILEIRO DE APOIO ÀS MICRO E PEQUENAS EMPRESAS – Sebrae. **Aquicultura no Brasil**. 2015. Disponível em: <http://www.bibliotecas.sebrae.com.br/chronus/ARQUIVOS_CHRONUS/bds/bds.nsf/4b14e85d5844cc99cb32040a4980779f/$File/5403.pdf>.>. Acesso em: 15 jun. 16.

SIEBRA, J. E. da C. et al. Desempenho bioeconômico de suínos em crescimento e terminação alimentados com rações contendo farelo de coco. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 37, n. 11, p. 1996-2002, 2008.

SOARES, C. M. et al. Substituição da Proteína do Farelo de Soja pela Proteína do Farelo de Canola em Dietas para a Tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) na Fase de Crescimento. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 30, n. 4, p. 1172-1177, 2001.

TSUKAMOTO, R.; TAKAHASHI, N. Falta de Proteína para Ração: Estrangulamento da Aqüicultura no Brasil. **Panorama da Aqüicultura**, v. 14, p. 8-9, 1992.

VALADARES FILHO, S. C. et al. **CQBAL 3.0 Tabelas Brasileiras de Composição de Alimentos para Bovinos.** 2015. Disponível em: <www.ufv.br/cqbal>. Acesso em: 8 maio 2016.

VIEGAS, E. M. M. et al. Farelo de canola em dietas para o pacu *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg 1987): efeitos sobre o crescimento e a composição corporal. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária**, v. 60, n. 6, p. 1502-1510, 2008.

Capítulo

30

Fitoquímicos e moléculas bioativas em nutrição de organismos aquáticos

Lucas Pedro Gonçalves Junior[1]
Stefani Graceda Silva Moraes[2]
Pedro Pierro Mendonça[3]

1 INTRODUÇÃO

Para explorar o máximo potencial das espécies produzidas, é necessário o conhecimento das necessidades nutricionais. Os lipídios, minerais, carboidratos, proteínas e vitaminas são necessários em proporções adequadas para suprir as necessidades fisiológicas dos animais (FERNANDES JUNIOR et al., 2010). O cultivo de qualquer organismo aquático em sistema intensivo requer uma dieta nutricionalmente completa, pois nessa situação a disponibilidade de alimento natural é limitada, sendo as necessidades nutricionais atendidas exclusivamente pelas dietas balanceadas.

Entretanto, além dos nutrientes comumente utilizados, temos ainda diversos componentes alimentares que não são essenciais para o metabolismo, porém, com grande potência de aplicação na formulação de rações para a produção animal. Entre as diversas

[1] Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte-MG, e-mail: uniorvezula@hotmail.com;
[2] Universidade Federal do Espírito Santo, e-mail: stefani.moraes@outlook.com;
[3] Instituto Federal do Espírito Santo, e-mail: ppierrom@gmail.com.

funções desses componentes, podemos citar a atividade anti-inflamatória, antialérgica, antitrombótica, antimicrobiana, antineoplásica, imunoestimulante e antioxidante.

O aumento do interesse em alimentos que possam trazer efeito benéfico à saúde é uma tendência observada claramente na nutrição humana. Nesse aspecto, podemos citar os elementos classificados como fitoquímicos. O termo "fitoquímico" refere-se a um grupo amplo de compostos produzidos e acumulados nas plantas. Muitos desses compostos possuem atividades biológicas potentes em mamíferos, e alguns podem apresentar efeitos tóxicos quando ingeridos em altas doses. O interesse nesses compostos advém de vários estudos informando que uma dieta rica em frutas, vegetais, cereais integrais e leguminosas, possa trazer benefícios à saúde e diminuir o risco de doenças crônicas degenerativas (CARDOSO; BARRÉRE; TROVÃO, 2009). Os fotoquímicos podem ser classificados como carotenoides, fenólicos, alcaloides, compostos contendo nitrogênio e compostos organosulfurados.

Temos ainda uma infinidade de moléculas biologicamente ativas provenientes de microrganismos como bactérias e fungos. Estima-se que existam cerca de 50.000 metabólitos secundários de microrganismos, sendo que, 12.000 são antibióticos conhecidos (CAMPOS, 2009). A descoberta destas estruturas juntamente com a elucidação dos mecanismos biológicos, bioquímicos e a ação terapêutica, tem sido uma abordagem importante na descoberta de novos aditivos para as rações para organismos aquáticos.

2 OBJETIVO

Fazer um levantamento dos principais fitoquímicos e moléculas bioativas utilizadas na aquicultura, assim como as implicações da utilização desses compostos.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 MOLÉCULAS BIOATIVAS

Segundo Barreiro et al. (1997) as teorias desenvolvidas para explicar a atividade farmacológica das substancias, numa primeira aproximação, baseia-se no paradigma da "chave-fechadura". Neste modelo, as "fechaduras" ou receptores celulares são biomacromoléculas de extrema sensibilidade, responsáveis pelo reconhecimento molecular de espécies endógenas e exógenas capazes de apresentar atividade biológica. Estes receptores interagem

reversivelmente, em geral, com as moléculas bioativas (mediadores celulares endógenos e fármacos), consideradas neste modelo como as “chaves”. Assim, os complexos formados entre as moléculas bioativas e os receptores são os responsáveis por provocarem as respostas biológicas.

A ação de uma substancia no organismo, é determinada, principalmente pela sua estrutura química. Entretanto, o conhecimento da estrutura molecular de uma substância não é tarefa simples, pois não são muitos os métodos capazes de caracterizar completamente uma dada estrutura, permitindo sua descrição precisa em termos de distâncias e ângulos de ligação, além de ângulos de torção (ou ângulos diedro) que definem sua conformação (BARREIRO et al. 1997).

Entretanto, técnicas convencionais de extração como percolação, maceração e extração por Soxhlet fundamentam-se na escolha correta do solvente extrator, na agitação, no uso de calor, aumentando assim, a solubilidade dos componentes e a taxa de transferência de massa. Tais técnicas necessitam de períodos longos de extração e, em alguns casos, o uso de aquecimento, como na extração por Soxhlet, pode ocasionar degradação de substâncias naturais termicamente instáveis presentes no material vegetal (BARBOSA, 2008).

Em uma recente revisão Sant’Anna (2009) descreveu os métodos de modelagem molecular como alternativa para estudar compostos bioativos. O processo de desenvolvimento dessas moléculas, devido à sua complexidade durante o isolamento, identificação e determinação da atividade biológica, envolve um grande conjunto de métodos computacionais. Esses métodos podem ser usados como ferramentas no planejamento racional de compostos ativos, assim chamados porque é orientado por uma hipótese racional sobre o mecanismo de ação destes compostos.

De maneira geral o estudo de novas moléculas bioativas envolvem as etapas de extração, fracionamento, isolamento e identificação de substâncias. Posteriormente, é determinado à atividade biológica da substancias de interesse, sendo essa última fase, a mais longa e complexa. O novo composto deve apresentar os seguintes requisitos: Não deve ser toxico ao hospedeiro que irá utiliza-lo; deve atingir o local onde irá atuar; deve ter efeito *in vivo* conforme os resultados encontrados *in vitro*; não deve promover a resistência bacteriana.

Em um estudo com amoreira-preta (*Rubus* spp.) para verificar a presença de compostos oriundos do metabolismo secundário, especialmente flavonóides e antocianinas, os quais apresentam grande capacidade de reagir com radicais livres que causam estresse oxidativo. Além dos compostos fenólicos, a amora-preta também apresenta outros fitoquímicos como

carotenoides e às vitaminas C e E. Conforme esses autores, o perfil fitoquímico das plantas pode variar em função de seu estado de desenvolvimento de folhas, raízes e frutos (JACQUES; ZAMBIAZI, 2011).

Segundo o apresentado na revisão realizada por Gomes et al. (2012) sobre o papel dos compostos bioativos da linhaça (*Linum usitatissimum* L.) no combate ao câncer em humanos, foram descritos uma serie de substâncias bioativas tais como omega-3, lignanas, fibras alimentares e vitamina E. Esses fitoquímicos presentes na linhaça desempenham importantes funções relacionadas à ação antioxidante, efeito anti-inflamatório e ação antiestrogênica quando ingeridos regularmente.

França et al. (2010) realizaram um estudo com objetivo de determinar o perfil fitoquímico do extrato alcoólico da *Nopalea cochenillifera*, popularmente conhecida como palma forrageira. Qualitativamente ela é bastante rica em água, mucilagem e resíduo mineral; apresenta alto coeficiente de digestibilidade da matéria seca; e tem alta produtividade. Com essa metodologia foi possível identificar as substâncias fitoquímicas presentes no teste qualitativo sobre a presença dos metabólitos secundários, tais como: açúcares redutores, saponinas espumídicas, fenóis, taninos, antraquinonas e purinas. Conforme os resultados fitoquímicos encontrados, a espécie vegetal mostrou ser uma promissora para a utilização nas áreas de estudo com alimentos energéticos, farmacológicos e nutrição.

3.2 PRINCIPAIS MOLÉCULAS BIOATIVAS UTILIZADAS NA AQUICULTURA FONTES DE MOLÉCULAS BIOATIVAS

Uma pratica que vem ganhando espaço na nutrição é a utilização de fitoterápicos. A fitoterapia é outra alternativa de grande potencial para prevenção ou controle de patógenos na aquicultura. Esta se caracteriza pelo uso de diferentes partes de plantas na prevenção e controle de doenças (TAVECHIO; GUIDELLI; PORTZ, 2009). Essa fonte vegetal normalmente possui um conjunto de substancias benéficas para o bom funcionamento do organismo.

Vários vegetais apresentam potencial de utilização para organismos aquáticos, podendo tanto ser fornecidos via dieta como adicionados em banhos terapêuticos. Nesse sentido pode ser citado o uso de extrato aquoso de folhas de amendoeira, na concentração de 200 ppm, Chitmanat, Tongdonmuan e Nunsong (2005) conseguiram reduzir a infecção por fungos nos ovos de tilápias e, com 800 ppm, eliminaram completamente *Trichodina* spp. de juvenis de tilápias após 2 dias de tratamento.

Nwabueze (2012) investigou o efeito de diferentes concentrações de alho (0.5%, 1.0% e 3%) suplemento na dieta de peixe no crescimento e parâmetros hematológicos de alevinos de *Clarias gariepinus*. Este estudo mostrou que a suplementação com 0,5% da dieta melhorou os resultados para comprimento e volume total de parâmetros hematológicos de *C. gariepinus*.

Em outro estudo foi verificado que o alho pode exercer atividade antioxidante em tilápias (*Oreochromis niloticus*) (METWALLY, 2009). A adição de alho para os peixes estimulo a atividade da glutationa peoxidase, superóxido dismutase e catalase, sendo essas enzimas importantes indicadoras da atividade antioxidante. Consequentemente, o ganho de peso, taxa de sobrevivência e o desempenho do crescimento aumentaram em todos os grupos alimentados com alho em comparação as dietas controle.

Shalaby, Khattab e Rahman (2006) utilizaram o alho (10, 20, 30, e 40g.kg dieta) e o antibiótico chloramphenicol (15, 30 e 45 $mg.kg^{-1}$ dieta) como imunoestimulante e promotor de crescimento para tilápias. As maiores respostas para crescimento foram verificadas para os tratamentos com 30 g de alho/ 30 mg de chloramphenicol por kg da dieta. A inclusão desses suplementos reduziu coliformes totais na água de cultivo, músculo e no intestino dos animais. Em relação aos parâmetros hematológicos tais como a quantidade de eritrócitos, hemoglobina e hematócitos foram positivamente afetadas pelos tratamentos testados.

Em outro estudo semelhante, porém para truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) realizado por Farahi et al. (2010), o ganho de peso e o desempenho aumentaram em todos os grupos alimentados com alho. Entretanto, além de estimular o sistema imunológico e o crescimento, a adição de alho afetou a composição bromatológica da carcaça. O teor de proteína e cinzas no corpo do peixe foi significativamente mais elevado no grupo alimentado com a dieta que continha 30 g kg-1 da dieta do alho do que todos os outros grupos. Conteúdo total de lipídeos no corpo do peixe diminuiu em tratamentos e foi menor nos peixes alimentados com 30 g kg-1 dieta de alho.

Temos ainda plantas medicinais que já são conhecidas pelos seus efeitos benéficos, sendo utilizadas amplamente pela culinária, elaboração de cosméticos e na medicina. A babosa (*Aloe vera*) enquadrasse nesse perfil por possuir muitas substâncias com propriedades farmacêuticas, tais como: anti-inflamatória, antioxidante, rejuvenescedora, anticancerígena, imunoestimulante, além de atividade fungicida (ZANUZZO; BILLER-TAKAHASHI; URBINATI, 2012).

Heidarieh et al. (2013) investigaram os efeitos da suplementação na dieta com *Aloe vera* (0.01%, 0.1% e 1%) para truta arco-íris. Os resultados mostraram que a administração de *Aloe*

vera em 0,1% e 1% resultou em resultados satisfatórios para a taxa de crescimento específico e conversão alimentar. A suplementação com *Aloe vera* resultou em melhorias no intestino proximal, cecos pilóricos e epiderme. Os níveis de inclusão de 0,1% e 1% proporcionaram ainda aumento da sobrevivência após o desafio sanitário com a bactéria *S. agalactiae*.

Farahi et al. (2012) testaram o efeito da alimentação com erva-cidreira (*Melissa officinalis*) e babosa (*Aloe vera*) para truta arco-íris. Nesse estudo foi evidenciado que essas duas plantas possuem efeito protetor contra a peroxidação lipídica na carne do peixe, entretanto, não foi encontrado diferença para o desempenho produtivo. Segundo esses autores o crescimento resultante da suplementação de plantas ou extratos de plantas como aditivos alimentares, depende de suas concentrações, composição da dieta basal e as condições de criação.

Zodape (2010) verificou que a utilização de *Aloe vera* teve efeito sobre a toxidade induzida pelo cromo em *Labeo rohita*. Efeito pronunciado de cromo e suco de *Aloe vera* foi observado em atividades tais como, o glutamato- oxaloacetato transaminase, glutamato-teansaminase piruvato, fosfatase ácida e alcalina, o total de proteínas, lipídios totais, atividade de protease e aminoácidos livres e atividade do glicogênio.

Zanuzzo, Biller-Takahashi e Urbinati (2012) avaliaram o efeito do extrato de *Aloe vera* na água de transporte de matrinxã (*Brycon amazonicus*) em resposta ao estresse. Os peixes foram transportados durante 4 horas em água contendo *Aloe vera* em níveis de 0, 0,02, 0,2 e 2 $mg.L^{-1}$. Esses autores verificaram que a utilização de *Aloe vera* melhorou a atividade respiratória de leucócitos e exerceu um possível efeito modulador do sistema imune dos peixes.

Temos ainda um grande número de substâncias provenientes de microrganismos conhecidas como probióticos e prebióticos. Esses são alimentos que possuem microrganismos que fortalecem a microbiota intestinal e ajudam o bom funcionamento do trato gastrointestinal, podendo assim prevenir doenças, e alimentos com substâncias que resistem à ação enzimática durante a digestão e conseguem assim atingir a microbiota intestinal e serem metabolizadas por bactérias benéficas, fortalecendo-as e melhorando seu desenvolvimento no trato gastrointestinal (BUENTELLO; NEILL; GATLIN, 2006).

Carvalho et al. (2011) compararam, o efeito da suplementação da ração com probiótico (*Bacillus subtilis*) ou prebiótico (mananoligossacarídeo). Os peixes submetidos aos tratamentos com a adição de probiótico ou de prebiótico apresentaram maior altura das vilosidades, e aqueles que receberam o tratamento com o probiótico apresentaram ainda maior espessura do

epitélio das vilosidades, quando comparados com os animais alimentados com a ração sem os aditivos.

3.3 VITAMINAS C, E

A maioria dos compostos utilizados é empregada para estimular o sistema imunológico, o que indiretamente resulta em menores mortalidades e maior crescimento. Segundo Tavechio, Guidelli e Portz (2009) a imunonutrição é uma das técnicas que visa aumentar a resistência imunológica de animais cultivados através da alimentação. Estes produtos são conhecidos como imunoestimulantes, e têm propriedades capazes de estimular o sistema imune por conferirem um aumento na atividade das células fagocitárias, na produção de lisossomos e anticorpos, diminuírem o estresse do manejo reduzindo assim, as perdas causadas pelas doenças (TAVECHIO; GUIDELLI; PORTZ, 2009).

Nesse sentido, podemos citar fatores nutricionais como as vitaminas. As vitaminas são compostos orgânicos que devem ser suplementados na dieta, pois os peixes não são capazes de sintetizar em quantidade suficiente. Entretanto, além das funções essenciais para o funcionamento do organismo, algumas vitaminas, como o ácido ascórbico (vitamina C) e o tocoferol (vitamina E), estão especialmente ligadas à formação e desenvolvimento do sistema imunológico em peixes.

Li e Lovell (1985) submeteram alevinos de bagre do canal a dietas contendo de 0 a 3000 mg de vitamina C/kg ração até que os sinais externos de escorbuto foram observados nos peixes alimentados com dieta deficiente. Posteriormente, avaliaram a resistência à infecção bacteriana. As taxas de mortalidade dos peixes infectados experimentalmente com *Edwardsiella ictaluri*, a bactéria que causa septicemia entérica, diminuiu com o aumento de doses de ácido ascórbico na dieta, variando de 100% para os peixes alimentados com a dieta com deficiência de ácido ascórbico a 15% para os peixes alimentados com 300 mg ácido ascórbico /kg ração e 0 para peixes alimentados com 3.000 mg de ácido ascórbico/kg ração.

Falcon et al. (2007), avaliaram o desempenho produtivo e os parâmetros fisiológicos de tilápias alimentadas, durante 112 dias, com dietas preparatórias para o inverno, formuladas com diferentes níveis de lipídeo e vitamina C. Foi observado que a concentração de vitamina C no fígado é proporcional à concentração na dieta, porém, em virtude da capacidade de reserva desse órgão, a quantidade de 600 mg de vitamina C/kg da dieta mostrou-se economicamente

adequada e a ausência de vitamina C prejudicou a produção de eritrócitos e a síntese de colágeno.

Conforme o apresentado na revisão de Woodward (1994) as necessidades de vitamina de vitamina C para salmonídeos está entre 50 e 400 de vitamina C/kg da dieta. Para promover o crescimento dos animais, em condições ideais o requerimento de vitamina é menor. Entretanto, para obter ganho de peso máximo e evitar a patologia nas condições adversas do cultivo, o requerimento de vitamina C tendeu a aumentar.

Estudos epidemiológicos têm sugerido um papel protetor da vitamina E em resposta ao estresse oxidativo (FERREIRA; MATSUBARA, 1997). O aumento dos níveis dietéticos de tocoferol na alimentação de peixes reduziu a incidência de peroxidação lipídica, em uma variedade de tecidos e isso pode posteriormente proteger o peixe do estresse oxidativo e aumentar a qualidade pós-colheita do filé (NG et. al., 2004; WANG; YUEN; NG, 2006).

Conforme Martins et al. (2008) a suplementação em conjunto da vitamina E associada à vitamina C demonstrou bons resultados de resposta inflamatória aguda em alevinos de tilápia do Nilo. Segundo os resultados apresentados, a suplementação vitamínica possibilitou a maior migração de células de defesa (leucócitos e trombócitos) para o sítio inflamatório.

3.4 β-GLUCANO

β-glucanas são polissacarídeos composto por polímeros de glicose. Ocorrem naturalmente em uma grande variedade de vegetais, tais como aveia, cevada e algas. São ainda constituintes da parede celular de fungos e bactérias patogênicas. As propriedades curativas e imunoestimulante de cogumelos são conhecidas há milhares de anos nos países orientais. Estes cogumelos contêm polissacarídeos biologicamente ativos, que em sua maioria pertencem ao grupo de β-glucanas. Essas substâncias aumentam a defesa imunológica do hospedeiro através da ativação do sistema não especifico, aumentando a quantidade de macrófagos e potencializando o funcionamento das células (AKRAMIENĖ et al., 2007).

Palic et al. (2006) verificaram que a utilização de β-glucano para peixes submetido a condições de estresse cônico, aumentou a atividade dos neutrófilos, potencializou a resistência a doenças, aumentou as taxas de sobrevivência após o transporte e quando os peixes foram submetidos a condições de baixa qualidade da água.

Em um estudo realizado por El-Boshy et al. (2008) com tilápias alimentadas com β-1, 3 glucano foi verificado melhoras no funcionamento da imunidade e proteção não específica, sendo verificado aumentou significativamente do grau de resistência quando os animais foram expostos ao desafio sanitário com a bactéria *S. iniae*.

Kumari e Sahoo (2006) investigaram os efeitos da administração prolongada e curta de β-glucano de levedura em parâmetros imunitários não específicos, a taxa de crescimento e a resistência a doenças de bagre asiática, (*Clarias batrachus*). Os peixes foram alimentados com dieta basal suplementada com 0,1% β-glucano. Foi verificado que administração de 0,1% β-glucano na ração, melhorou de forma significativa (P<0,05) em relação à dieta controle os níveis de lisozima, a produção de superóxido, a hemaglutinação e o nível de proteção contra *Aeromonas hydrophila*.

A melhora na resistência ao estresse com a utilização do β-glucano resulta em efeitos positivos na eficiência produtiva. Misra et al. (2006), testando níveis de β-glucano de 0,1%, 0,25% e 0,5% para juvenis de *Labeo rohita*, não observaram diferença significativa entre os níveis do imunoestimulante. Porém, o tratamento com o nível superior apresentou melhor conversão alimentar em relação aos outros tratamentos num período de 56 dias.

Schorer et al. (2009) com o objetivo de avaliar a utilização do β-glucano (0%, 0,1%, 0,2% e 0,3%) em rações peletizadas e extrusadas no desempenho produtivo de juvenis de pacu (*Piaractus mesopotamicus*), não encontraram efeito do processamento da dieta e dos níveis de inclusão nos parâmetros avaliados. Entretanto, apesar de não ter sido encontrado diferença estatística, quando observado os valores numéricos, os peixes alimentados com o nível de 0,3% de β-glucano apresentaram maior ganho de peso, taxa de crescimento específico e peso final. Esses autores ressaltaram que períodos maiores de suplementação podem resultar em diferenças significativas no desempenho.

Resultados contraditórios foram obtidos em estudo realizado por Ai et al. (2007), no qual o aumento no ganho de peso do yellow croaker (*Pseudosciaena crocea*) foi atribuído ao uso de dosagens baixas de β-glucano (0,09%/ kg de ração) durante oito semanas. Contudo, o crescimento não foi favorecido quando esses autores utilizaram dosagem maior que 0,18% de β-glucano, sugerindo que o uso de baixas dosagens fornece uma suplementação adequada para otimizar o ganho de peso dessa espécie

Baixas doses de β-glucano são conhecidas por aumentar a resposta imune. Entretanto, elevadas concentrações podem esgotar as células fagocitoticas. Vainikka et al. (2005) relataram que o uso de β-glucanas para melhorar a função imunológica em tenca (*Tinca tinca*), espécie pertencente ao grupo dos ciprinídeo, provavelmente, é obtido com doses inferiores a 0,1% da dieta.

A administração desse composto para fins profiláticos em organismos aquáticos pode ser administrada por diferentes vias. A aplicação de β-glucano é feito através de injeções

(intraperitoneal, pré-anal e intravenosa), por incorporação desses compostos em dietas formuladas, ou por adição direta na água de cultivo. Piaget et al. (2007) verificaram que a aplicações de 5 $mg.L^{-1}$ de β-glucano na água de criação aumentar a sobrevivência e crescimento das larvas de linguado (*Paralichthys adspersus*), ao passo que. Esses resultados foram mais evidentes para as larvas que tinham absorvido o saco vitelino recentemente.

3.5 MANANOLIGOSSACARÍDEO

O mananoligossacarídeo (MOS) é encontrado como em fragmentos de parede celular de *Saccharomyces cerevisiae*, com uma estrutura complexa, eficaz na aglutinação de bactérias patogênicas, o que impede a colonização e proliferação dessas no intestino (SANTURIO, 2005). Possui na sua composição química cerca de 40% de β-glucanos, 40% de α-mananos, 28% de proteínas, 7% de lipídeos, 3% de substâncias inorgânicas e 2% de hexosaminas e quitina. O glucano é o componente estrutural mais abundante e está localizado na parte interna da parede, enquanto o manano localiza-se na parte externa (HOUGH, 1990).

Alguns autores ressaltaram as a vantagens da utilização do MOS como suplemento alimentar para tilápia em termos de crescimento e resistência às doenças. Samrongpan et al. (2008) verificaram para juvenis de tilápia que a alimentados durante 21 dias com 4 e 6 $g.kg^{-1}$ de MOS foi capaz de melhorar as respostas para peso e comprimento dos animais.

Schwarz et al. (2011) avaliaram níveis crescentes de MOS (0; 0,15; 0,30; 0,45; 0,60 e 0,75%) na dieta de larvas de tilápias do nilo na fase de reversão sexual durante 30 dias. A utilização de MOS no nível de 0,34% em dietas para larvas de tilápia do nilo melhorou a conversão alimentar e promoveu o aumento do comprimento do intestino, da altura das vilosidades e da densidade de vilos intestinal. Conforme esse autor a melhora nos parâmetros avaliados pode ser atribuído ao fato dos MOS atuarem sobre o sistema imunológico, na prevenção da colonização de bactérias patogênicas no trato gastrointestinal e por melhorar a utilização de alguns nutrientes.

Em outro estudo com a tilápia do Nilo Schwarz et al. (2011) para os animais alimentados por 53 dias com os níveis de 0, 1, 2 e 3% foi encontrado os seguintes resultados. A conversão alimentar, taxa de eficiência proteica, teores de proteína e extrato etéreo na carcaça e altura das vilosidades intestinais foram obtidos em peixes que consumiram a dieta com MOS, sendo o nível de 1% o recomendado para juvenis de tilápias do Nilo.

Os efeitos positivos da suplementação de MOS foi atribuído por Schwarz et al. (2011) a adsorção de agentes patógenos que podem colonizar o trato gastrintestinal ligando-se aos açúcares manose na superfície do intestino. Ao fornecer uma rede de manose no complexo manano, os patógenos ligam-se à rede e são expelidos do sistema, o que consequentemente, aumenta a disponibilidade de nutrientes para ser absorvido pelos peixes.

3.6 LEVAMISOL

O levamisol é um composto químico sintético pertencente ao grupo dos imidazotiazóis amplamente utilizado como anti-helmíntico em casos de infecções causadas por nematoides em humanos e outros animais (TREVES-BROWN, 2000), sendo uma alternativa aos medicamentos, produtos químicos e antibióticos atualmente usado para o controle de doenças em organismos aquáticos.

Perera e Pathiratne (2008) estudaram de forma completa a utilização do levamisol como imunoestimulante. Neste estudo, o levamisol foi testado em banhos de duas horas com as concentrações de 1,25 e 2,5 $mg.L^{-1}$ para avaliar a concentração e os efeitos de curso de tempo sobre o sistema imunitário da catla (*Catla*). Os resultados mostraram que ambas as concentrações de levamisol poderia aumentar especialmente alguns componentes do sistema imunitário não específico. Níveis de leucócitos, abundância de neutrófilos, monócitos e linfócitos, a atividade fagocitária total, índice de fagocitose, a atividade da mieloperoxidase e nível de proteína total no sangue aumentaram significativamente em peixes tratados levamisol, em comparação com os peixes de controle após 14 - 56 dias a exposição ao levamisol.

Conforme os resultados apresentados por Perera e Pathiratne (2008) a proliferação de leucócitos aumenta vários dias após a exposição ao levamisol. Não foram encontradas diferenças significativa entre os tratamentos com 1,25 e 2,5 $mg.L^{-1}$ de levamisol com relação aos parâmetros citados acima, exceto o tempo de curso padrão de estimulação das populações de linfócitos. Teste padrão de tempo de curso de estimulação imunológica revelaram que as respostas imunes reforçadas podem persistir por pelo menos 56 dias, enquanto que para a maioria dos parâmetros testados, a resposta máxima foi observada aos 42 dias após a administração.

Shahidi et al. (2011) avaliaram os efeitos do levamisol como um agente immunostimulator em banho diário nas doses de 3, 5 e 10 $mg.L^{-1}$ durante 15 minutos para alevinos de carpa capim (*Ctenopharyngodon idella*). Esses autores verificaram que os

parâmetros sanguíneos mostraram diferenças significativas em neutrófilos nas doses de 5 e 10 $mg.L^{-1}$ após 18 dias, embora este atingiu o pico de resposta a dose de 3 $mg.L^{-1}$ até o final de 31 dias. De igual modo o número de monócitos, na dose de 3 $mg.L^{-1}$ foi maior do que os outros grupos experimentais. Foi sugerido que a utilização desse composto para estimular a resposta imunitária da carpa capim pode ser administrada em concentrações menores por um período maior, ou doses mais elevadas em curto espaço de tempo.

Outra possibilidade de utilização promissora do levamisol é como medida profilática na preparação dos animais que iram ser submetidos ao estresse do transporte. Em contra partida, Oliveira (2008) quando avaliaram o efeito da suplementação alimentar com levamisol com 100 mg de levamisol kg^{-1} durante seis, 12 e 18 dias antes do transporte. Observaram que independente do tratamento testado, os peixes apresentaram hiperglicemia, aumento no número de eritrócitos, aumento da hemoglobina total e celular, sendo que, a suplementação com levamisol não foi capaz de minimizar os efeitos fisiológicos negativos causados pelo transporte no matrinxã (*Brycon amazonicus*), podendo ainda apresentar efeito imunossupressor sobre leucócitos e trombócitos.

3.7 EUGENOL E BENZOCAINA

Os manejos realizados na aquicultura como biometria, análise patológica, e transporte podem causar ferimentos e perdas de escamas, além de expor os peixes a uma variedade de fatores estressantes. Nesse sentido, substancias com propriedades anestésicas demonstra eficácia no controle de eventuais mortalidades devido ao manejo, além de proporcionar menor risco ao manipulador (ROTILI et al. 2012).

O óleo de cravo é um composto fenólico resultado da destilação das folhas, flores (incluindo talos) das árvores de cravo da Índia (*Syzgium aromaticum*), sendo a substância ativa o eugenol, com concentração que varia de 70 a 95% da composição total do óleo essencial do cravo (MAZZAFERA, 2003). Rotili et al. (2012) avaliaram a utilização do eugenol como anestésico para juvenis de pacu. Para o tempo de indução anestésica, observou-se efeito quadrático, ou seja, quando se aumentou a dose, houve queda no tempo de indução, com tendência de estabilização em doses crescentes. As doses que proporcionaram o menor tempo de indução encontram-se entre 175 mg L-1 e 240 mg L-1. Para alevinos de matrinxã Vidal et al. (2007), verificaram que as concentrações de 50; 62,5; 75 e 100 mg/L mostraram-se satisfatórias para a indução anestésica profunda, no que diz respeito aos tempos de indução e

recuperação. Entretanto, não foi verificado influência das dosagens testadas no tempo de recuperação após a sedação.

Diemer et al. (2012) estudaram a utilização do eugenol para o jundiá (*Rhamdia voulezi*) e realizaram as seguintes observações. Após o primeiro contato dos peixes com o anestésico, foram verificados movimentos lentos e desequilíbrio natatório até o momento em que não apresentaram nenhum movimento e perda total de reação aos estímulos.

Outro composto que vem sendo utilizado é a benzocaína. Esse é classificado como anestésico local, embora atue de forma sistêmica em peixes, agindo no sistema nervoso central (OKAMURA, et al. 2010). Entretanto a utilização de forma errada pode resultar em efeitos indesejados, pois tem sido observado que margem de segurança pequena entre a dose eficaz e a dose letal. Yukihiro et al. (2008) observaram que os peixes submetidos a concentração de 125 mg/L atingiram a anestesia profunda rapidamente, porém apresentaram mortalidade sete dias após a indução.

Antunes et al. (2008) avaliaram diferentes doses de benzocaína na anestesia de carpas (*Cyprinus carpio*). Esses autores relacionaram a dose ótima com o peso dos animais e verificaram que aumento no peso em 1g, corresponde a um aumento de 0,158 mg/L na dose de benzocaína para carpas.

Além da dose do anestésico variar em função do peso, também varia em para as diferentes espécies. Rocha et al. (2012) estudaram a benzocaína na anestesia de tilápias (*Oreochromis niloticus*) onde a dose ótima de benzocaina ficou na faixa entre 146 a 167 mg/L de água.

4 REFERÊNCIAS

AI, Q. et al. Effects of dietary B-1,3 glucan on innate immune response of large yellow croaker Pseudosciana crocea. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 22, n. 4, p. 394-402, 2007.

AKRAMIENĖ, D. et al. Effects of b-glucans on the immune system. **Medicina (Kaunas, Lithuania)**, v. 43, n. 8, p. 597-606, 2006.

ANTUNES, M. I. P. P. et al. Cloridrato de benzocaína na anestesia de carpas (*Cyprinus carpio*), **Ciências Agrárias**, v. 29, n. 1, p. 151-156, 2008.

BARBOSA, D. A. **Avaliação fitoquímica e farmacológica de** *Genipa americana L*. 2008. 138 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2008.

BARREIRO, E. J. et al. Modelagem molecular: uma ferramenta para o planejamento racional de fármacos em química medicinal, **Química Nova**, v. 20, n. 1, 1997.

BUENTELLO, J. A.; NEILL, W. H.; GATLIN, D. M. Effects of dietary probiotics on the growth, feed efficiency and non-specific immunity of juvenile red drum Sciaenops ocellatus fed soybean-based diets. **Aquaculture Research**, v. 41, p. 411-418, 2010.

CAMPOS, F. F. **Isolamento e identificação de substâncias bioativas produzidas por fungos endofíticos associados a Piptadenia adiantoides (Fabaceae)**. 2009. 172 f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) - Programa de Pós-graduação em Microbiologia, Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, 2009.

CARDOSO, R. M.; BARRÉRE, A. P. N.; TROVÃO, F. C. S. Os fitoquímicos e seus benefícios na saúde. **Einstein**, v. 7, n. 2 Pt 2, p. 106-9, 2009.

CARVALHO, J. V. de et al. Desempenho zootécnico e morfometria intestinal de alevinos de tilápia-do -Nilo alimentados com "*Bacillus subtilis*" ou mananoligossacarídeo. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v. 12, n. 1, 2011.

CHITMANAT, C.; TONGDONMUAN, K.; NUNSONG, W. The use of crude extracts from traditional medicinal plants to eliminate Trichodina spp. in tilapia (Oreochromis niloticus) fingerlings. **Journal Science and Technology**, v. 27, n. 1, p. 359-364, 2005.

DIEMER, O. et al. Eugenol como anestésico para jundiá (Rhamdia voulezi) em diferentes pesos. **Semina: Ciências Agrárias**, p. 1495-1500, 2012.

EL-BOSHY, M. E. et al. Immunomodulatory effect of dietary *Saccharomyces cerevisiae*, β-glucan and laminaran in mercuric chloride treated Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) and experimentally infected with *Aeromonas hydrophila*. **Fish & shellfish immunology**, v. 28, n. 5, p. 802-808, 2010.

FALCON, D. R. et al. Lipídeo e vitamina C em dietas preparatórias de inverno para tilápias-do-nilo. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 36, n. 5, p. 1462-1472, 2007.

FARAHI, A. et al. Effect of garlic (*Allium sativum*) on growth factors, some hematological parameters and body compositions in rain bow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **AACL Bioflux**, v. 3, n. 4, 2010.

_____. Effect of dietary supplementation of Melissa officinalis and Aloe vera on hematological traits, lipid oxidation of carcass and performance in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Journal of Animal Feed Research**, v. 2, n. 1, p. 1-5, 2012.

FERNANDES JUNIOR, A. C. et al. Resposta hemática de tilápias-do-nilo alimentadas com dietas suplementadas com colina e submetidas a estímulo por baixa temperatura. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 39, p. 1619-1625, 2010.

FERREIRA, A. L. A.; MATSUBARA, L. S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 43, n. 1, p. 61-68, 1997.

FRANÇA, C. F.; CPRREIA, M. J. M.; ARAUJO, J. A. Perfil fitoquímico do extrato vegetal da espécie *Nopalea cochenillifera.* In: **CONNEPI**, 5., 2010.

GOMES, F. I. et al. Papel dos compostos bioativos da linhaça (*Linum usitatissimum* L.) no cancer. **Nutrição Brasil**, v. 11, n. 1, p. 48-55, 2012.

HEIDARIEH, M. et al. Effects of Dietary Aloe Vera on Growth Performance, Skin and Gastrointestine Morphology in Rainbow Trout (Oncorhynchus mykiss). **Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences,** v. 13, p. 367-373, 2013.

HOUGH, J. S. **Biotecnología de la cerveza y de malta**. Zaragoza: Ed. Acribia, 1990. 274 p.

JACQUES, A. C.; ZAMBIAZI, R. C. Fitoquímicos em amora-preta (*Rubus* spp.). **Semina: ciências agrárias**, v. 32, n. 1, p. 245-260, 2011.

KUMARI, J.; SAHOO, P. K. Dietary b-1,3 glucan potentiates innate immunity and disease resistance of Asian catfish, Clarias batrachus (L.). **Journal of Fish Diseases**, v. 29, p. 95-101, 2006.

LI, Y. P.; LOVELL, R. T. Elevated levels of dietary ascorbic acid increase immune responses in channel catfish. **Journal of Nutrition**, v. 115, p. 123-131, 1985.

MARTINS, M. L. et al. Ração suplementada com vitaminas C e E influencia a resposta inflamatória aguda em tilápia do Nilo. **Ciencia rural**, v. 38, n. 1, p. 213-218, 2008.

MAZZAFERA, P. Efeito alelopático do extrato alcoólico do cravo-da-índia e eugenol. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 26, n. 2, p. 231-238, 2003.

METWALLY M. A. A. Effects of Garlic (*Allium sativum*) on Some Antioxidant Activities in Tilapia Nilotica (*Oreochromis niloticus*). **World Journal of Fish and Marine Sciences**, v. 1, n. 1, p. 56-64, 2009.

MISRA, K. M. et al. Effect of long term administration of dietary -glucan on immunity, growth and survival of Labeo rohita fingerlings. **Aquaculture**, v. 255, n. 1, p. 84-94, 2006.

NG, W. K. et al. Replacement of dietary fish oil with palm fatty acid distillate elevates tocopherol and tocotrienol concentrations and increases muscle oxidative stability in the muscle of African catfish, Clarias gairepinus. **Aquaculture**, v. 233, p. 423-437. 2004.

NWABUEZE, A. A. The effect of garlic (*Allium sativum*) on growth and haematological parameters of *Clarias gariepinus* (Burchell, 1822). **Sustainable Agriculture Research**, v. 1, n. 2, p. 222, 2012.

OLIVEIRA, S. R. **Efeito da suplementação de levamisol no estresse por transporte de matrinxã,** *Brycon amazonicus*. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Biologia Tropical e Recursos Hídricos, Universidade Federal do Amazonas, 2008.

OKAMURA, Daniel et al. Effect of benzocaine concentration and fish size on anesthesia and recovery in Nile tilapia. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 39, n. 5, p. 971-976, 2010.

PALIĆ, D. et al. Immunomodulatory effects of β-glucan on neutrophil function in fathead minnows (Pimephales promelas Rafinesque, 1820). **Developmental & Comparative Immunology**, v. 30, n. 9, p. 817-830, 2006.

PERERA, H. A. C. C.; PATHIRATNE, A. Enhancement of immune responses in Indian carp, Catla catla, following adistration of levamisole by immersion. In: BONDAD-REANTASO, M.G. et al. (eds.). **Diseases in Asian Aquaculture VI**. Manila, Philippines: Fish Health Section, Asian Fisheries Society. 2008. p. 129-142

PIAGET, N. et al. Effect of the application of β-glucans and mannan-oligosaccharides (βG MOS) in an intensive larval rearing system of Paralichthys adspersus (*Paralichthydae*). **Investigaciones Marinas**, v. 35, n. 2, p. 35-43, 2007.

ROCHA, M. A. et al. Determination of the optimal dose of benzocaine hydrochloride in anesthesia of tilápia (*Oreochromis niloticus*). **Ciências Agrárias**, Londrina, v. 33, n. 6, p. 2403-2410, 2012.

ROTILI, D. A. et al. Eugenol as anesthetic for *Piaractus mesopotamicus*. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v. 42, n. 3, p. 288-294, 2012.

SAMRONGPAN, C. et al. **Effects of mannan-oligosaccharide on growth, survival and disease resistance of nile tilapia (o*reochromis niloticus* Linnaeus)**. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM TILAPIA IN AQUACULTURE, p. 345-353, 2008.

SANT'ANNA, C. M. R. Métodos de modelagem molecular para estudo e planejamento de compostos bioativos: Uma introdução. **Revista Virtual Quimica**, v. 1, n. 1, p. 49-57. 2009.

SANTURIO, J. **A hora e a vez dos prebióticos**. 2005. Disponível em: <http://www.aviculturaindustrial.com.br/ortalGessulli/WebSite/Noticias/a-hora- e-a-vez-dos-prebioticos,14419.aspx>. Acesso em: 31 maio 2013.

SCHORER, M. et al. Desempenho produtivo de juvenis de pacu (*Piaractus mesopotamicus*) submetidos a dietas suplementadas com b-glucano. **Revista Acadêmica: Ciências Agrárias e Ambientais**, v. 7, n. 4, p. 433-443, 2009.

SCHWARZ, K. K. et al. Mananoligossacarídeo em dietas para larvas de tilápia. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 40, n. 12, p. 2634-2640, 2011.

SHAHIDI, S. et al. The evaluation of Tetanus-diphtheria (Td) vaccine impacts on immune response to hepatitis B (HB) vaccine in non-responder dialysis patients. **Journal of Research in Medical Sciences**, v. 16, n. 5, 2011.

SHALABY, A. M.; KHATTAB, Y. A.; ABDEL RAHMAN, A. M. Effects of Garlic (*Allium sativum*) and chloramphenicol on growth performance, physiological parameters and survival of Nile tilapia *(Oreochromis niloticus*). **Journal of Venomous Animals Toxins including Tropical Diseases,** v. 12, n. 2, p. 172-201. 2006.

TAVECHIO, W. G.; GUIDELLI, G.; PORTZ, L. Alternativas para a prevenção e o controle de patógenos em piscicultura. **Boletim do Instituto de Pesca**, v. 35, n. 2, p. 335-341, 2009.

TREVES-BROWN, K. M. **Applied Fish Pharmacology**. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht: The Netherlands, 2000. 309 p.

VAINIKKA, E. I. et al. Effects of testosterone and b-glucan on immune functions in tench, **Journal of Fish Biology**, v. 66, p. 348–361, 2005.

VIDAL, L. V. O. et al. Eugenol como anestésico para juvenis de matrinxã ("*Brycon cephalus*"). **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v. 8, n. 4, 2007.

WANG, Y.; YUEN, K. H; NG, W. K. Deposition of tocotrienols and tocopherols in the tissues of red hybrid tilapia, Ore- ochromis sp., fed a tocotrienol-rich fraction extracted from crude palm oil and its effect on lipid peroxidation. **Aquaculture**, v. 253, p. 583-591, 2006.

WOODWARD, B. Dietary vitamin requirements of cultured young fish, with emphasis on quantitative estimates for salmonids. **Aquaculture**, v. 124, p. 133-168, 1994.

YUKIHIRO, R. G. et al. Diferentes concentrações de benzocaína na indução anestésica do lambari-do-rabo- amarelo (Astyanax altiparanae). **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v. 9, n. 2, p. 350-357, 2008.

ZANUZZO, F. S.; BILLER-TAKAHASHI, J. D.; URBINATI, E. C. Effect of Aloe vera extract on the improvement of the respiratory activity of leukocytes of matrinxã during the transport stress. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 41, n. 10, p. 2299-2302, 2012.

ZODAPE, G. V. Effect of *Aloe Vera* Juice on Toxicity Induced by Metal (Chromium) in *Labeo Rohita* (Hamilton). **Journal of Applied Sciences Research**, v. 6, n. 11, p. 1788-1793, 2010.

Capítulo

31

Fatores que afetam a síntese de proteína microbiana no rúmen

Elizabeth Fonsêca Processi[1]
Carlos Augusto Alencar Fontes[2]
Natália Oliveira Cabral[3]
Laila Cecília Ramos Bendia[4]
Dione Henrique Breda Binoti[5]
Talita Pinheiro Bonaparte[6]
José Geraldo Vargas Júnior[7]

1 INTRODUÇÃO

A capacidade dos ruminantes utilizarem variedade de alimentos como fonte de nutrientes é devido à relação simbiótica do hospedeiro com microrganismos ruminais que possibilitam o uso da parede celular de vegetais e nitrogênio não proteico como fonte de

[1] Doutora em Ciência Animal, Campos dos Goytacazes-RJ, e-mail: processi@zootecnista.com.br;
[2] Universidade Estadual do Norte Fluminense, Campos dos Goytacazes -RJ, e-mail: cafontes@uenf.br;
[3] Universidade Estadual do Norte Fluminense, Campos dos Goytacazes -RJ, e-mail: nataliacabral@zootecnista.com.br;
[4] Universidade Estadual do Norte Fluminense, Campos dos Goytacazes -RJ, e-mail: lailabendia@yahoo.com.br;
[5] Universidade Federal do Espírito Santo, e-mail: dionebinoti@hotmail.com;
[6] Universidade Federal do Espírito Santo, e-mail: talitabonaparte@gmail.com;
[7] Universidade Federal do Espírito Santo, e-mail: josegeraldovargas@yahoo.com.br.

nutrientes, compostos complexos e não utilizáveis para a maioria dos outros animais. A degradação dos alimentos pelos microrganismos no rúmen tem como produtos finais ácidos graxos de cadeia curta, proteína microbiana, vitaminas do complexo B, vitamina K, metano, dióxido de carbono e amônia (OWENS; GOETSCH, 1988).

O fornecimento de nitrogênio na alimentação se dá por fontes de proteínas verdadeiras e de compostos nitrogenados não proteicos. As proteínas são grandes moléculas que diferem no tamanho, forma, solubilidade e composição de aminoácidos, estando presentes na parede, no conteúdo celular de todos os vegetais e no tecido animal. Os compostos nitrogenados não proteicos são moléculas menores, que incluem peptídeos, aminas, amidas, aminoácidos livres, ácidos nucleicos, nitratos e amônia (SCHWAB et al., 2003).

O metabolismo de nitrogênio é dividido em dois eventos distintos: a degradação da proteína no rúmen e a síntese de proteína microbiana (BACH; CALSAMIGLIA; STERN, 2005). O National Reserch Council - NRC (1996) divide os requerimentos proteicos em proteína degradável no rúmen (PDR) e proteína não degradável no rúmen (PNDR). A PDR é necessária aos microrganismos ruminais para síntese de proteína microbiana, já a PNDR escapa da fermentação ruminal e vai direto para o abomaso. Em adição, os microrganismos que escapam do rúmen, fornecem proteína ao animal na forma de proteína bruta microbiana. Com isso, a proteína dietética tem papel fundamental na nutrição dos ruminantes, não apenas de fornecer aminoácidos para o animal, mas também fornecimento de nitrogênio para síntese de proteína microbiana (OLIVEIRA JUNIOR, 2002).

Para eficiência da síntese de proteína microbiana no rúmen é necessário o fornecimento de fontes de nitrogênio para os microrganismos, e também um sinergismo nitrogênio-energia. Os carboidratos constituem de 50 a 80% da matéria seca das forragens e grãos, e embora sejam mais pobres em energia do que proteínas (5,65 kcal/g) e os lipídeos (9,40 kcal/g), os carboidratos (4,15 kcal/g), devido à proporção que participam nas dietas são os que mais contribuem com energia para os animais e microrganismos ruminais. A energia química proveniente do catabolismo dos carboidratos no rúmen pela ação dos microrganismos gera energia na forma de ATP que é utilizada pelos mesmos como fonte de energia principalmente na síntese das ligações peptídicas (BACH; CALSAMIGLIA; STERN, 2005).

A nutrição dos ruminantes tem por objetivos principais maximizar o crescimento microbiano e a quantidade de PDR que vai para célula microbiana, pois assim melhora-se o fornecimento de aminoácidos para o intestino e reduz perda de nitrogênio. Isso porque do total de proteína que chega ao intestino delgado, de 50 a 80% é proveniente da síntese de proteína

microbiana do rúmen (MOULD; ORSKOV, 1983). Para tanto, é necessário um melhor entendimento do processo de conversão dos nutrientes dietéticos e energia química dos alimentos em proteína microbiana e dos fatores que a afetam.

2 FATORES QUE AFETAM A SÍNTESE DE PROTEÍNA MICROBIANA

Vários estudos têm sido conduzidos para determinar a síntese de proteína microbiana no rúmen sob uma variedade de condições, no entanto existe uma variabilidade muito grande entre os resultados dos estudos. Stern e Hoover (1979) fizeram uma revisão com resultados obtidos de pesquisas que determinaram a síntese microbiana no rúmen, e encontraram valores variando de 6,3 a 30,7 g de proteína bruta sintetizada/100 g de matéria orgânica digerida. A variação entre os estudos é atribuída ao grande número de fatores que podem induzir a essas diferenças. Os principais fatores que afetam a síntese de proteína microbiana são:

2.1 DEGRADAÇÃO RUMINAL DA PROTEÍNA

A degradação ruminal da proteína é uma das principais razões para a ineficiente utilização da mesma pelos ruminantes. Por outro lado, os compostos nitrogenados que são liberados no rúmen durante a degradação proteica são indispensáveis para o crescimento microbiano ruminal (VERBIC, 2002). A degradação ruminal da proteína dos alimentos é um fator importante que afeta o aporte de aminoácidos para o intestino delgado. A velocidade e a quantidade de proteína degradada no rúmen pode condicionar a quantidade de proteína microbiana sintetizada nele e determinar a quantidade total de proteína não degradada no rúmen que chega ao duodeno (STERN et al., 1994).

A população microbiana ruminal tem uma ampla variedade de proteases, mas a sua atividade proteolítica é apenas moderada comparada com outros microrganismos proteolíticos e as próprias secreções gástrica e pancreática do hospedeiro. No entanto, o período de tempo que a digesta é mantida no rúmen permite essa atividade proteolítica quebrar uma proporção substancial da maioria das proteínas da dieta (ORSKOV; MCDONALD, 1979).

O primeiro passo para a degradação da proteína no rúmen envolve o ataque das bactérias às partículas do alimento e fixação nas mesmas, seguido pela atividade das proteases microbianas. Cerca de 70 a 80% dos microrganismos ruminais atacam partículas indigestíveis do alimento e 30 a 50% tem atividade proteolítica. No entanto, grande parte dos microrganismos

ruminais agem em consórcio, sinergicamente atacam as partículas alimentares, degradando e fermentando os nutrientes, incluindo a proteína (BACH; CALSAMIGLIA; STERN, 2005).

Proteína da dieta é geralmente degradada rapidamente pelas proteases microbianas secretadas pelas bactérias ruminais, protozoários e fungos presentes no rúmen, dando origem a peptídeos e aminoácidos (WALLACE, 1996), os quais são, em seguida, transportados para dentro da célula microbiana.

Os peptídeos podem ainda serem degradados pelas peptidases dentro da célula em aminoácidos, que podem ser incorporados à proteína microbiana ou desaminados em ácidos graxos voláteis, CO_2 e amônia (TAMMINGA, 1979). Além disso, grande quantidade de aminoácidos dietéticos são incorporados diretamente na proteína microbiana. O destino dos peptídeos e aminoácidos absorvidos, uma vez que estão no interior da célula microbiana, depende da disponibilidade de energia.

Se a energia é disponível, os aminoácidos serão transaminados ou usados diretamente para síntese de proteína microbiana. Entretanto, se a energia for limitante os aminoácidos serão desaminados e seus esqueletos carbônicos serão fermentados a ácidos graxos voláteis (BACH; CALSAMIGLIA; STERN, 2005). Algumas bactérias não têm mecanismo de transporte de aminoácidos do citoplasma para o ambiente extracelular, portanto o aminoácido em excesso deve ser eliminado do citoplasma como amônia (TAMMINGA, 1979).

A grande maioria da atividade peptidase é aminopeptidase, uma propriedade que confere alto grau de resistência à degradação ruminal no N-terminal. A hidrólise de peptídeos no rúmen consiste de dois passos (WALLACE, 1996). O primeiro é uma atividade aminopeptidase que cliva dipeptideos ao invés de aminoácidos simples da cadeia de peptídeo. Enzimas que executam esse processo são classificadas como dipeptidil peptidase. Os dipeptídeos são depois clivados a aminoácidos pelas dipeptidades separadas.

A degradação dos aminoácidos é o passo final da conversão da proteína dietética em amônia. A taxa de degradação de aminoácidos é geralmente maior do que a utilização dos aminoácidos pelos microrganismos ruminais. Aminoácidos essenciais para o animal, arginina e treonina são degradados rapidamente (0,5 a 0,9 mmol h^{-1}), lisina, fenilalanina, leucina e isoleucina são degradados de 0,2 a 0,3 mmol h^{-1} formando um grupo intermediário, ao passo que a valina e metionina são rapidamente degradados (0,10 a 0,14 mmol h^{-1}) (ATASOGLU; WALLACE, 2003).

Apenas uma fração da proteína consumida e, em grau limitado, alguns peptídeos resultantes da proteólise, escapam da fermentação do rúmen. Uma vez liberados, os aminoácidos não sobrevivem na forma livre por muito tempo. Eles são incorporados na proteína microbiana ou desaminados a amônia; sendo assim, as concentrações de aminoácidos livres são baixas (ATASOGLU; WALLACE, 2003).

Recentemente, surgiu a sugestão de que a proteólise não é executada apenas pelos microrganismos ruminais, mas também pelas proteases endógenas das plantas, nas quais podem desempenhar função significante na degradação da proteína da forragem no rúmen (ZHU et al., 1999).

A microbiota ruminal degrada diferentes peptídeos a diferentes taxas. A estrutura do N-terminal e da cadeia de peptídeos tem grande influência na hidrólise de peptídeos (WALLACE; FRUMHOLTZ; WALKER, 1993). As principais características da sequência de aminoácidos que induzem alguns peptídeos serem mais resistentes à degradação que outros parecem ser resíduos de Gli-Gli, Pro-X ou X-Pro no *N*-ternimal (WALLACE, 1996).

A taxa e extensão da degradação da proteína dependem da atividade proteolítica e tipo de proteína, susceptibilidade e acessibilidade às ligações peptídicas (BACH; CALSAMIGLIA; STERN, 2005). Várias características químicas e físicas das proteínas, como solubilidade, o grau secundário e terciário e a presença de ligações dissulfito são importantes determinantes da susceptibilidade da proteína à digestão pelos microrganismos ruminais. Algumas proteínas são fermentadas mais rapidamente do que outras no rúmen, sendo a taxa e extensão da degradação da proteína gera peptídeos e aminoácidos, os quais serão incorporados na proteína microbiana ou transformados em amônia pelos microrganismos ruminais (WALLACE, 1996).

A solubilidade da proteína é o fator chave para determinar sua susceptibilidade às proteases microbianas e sua degradação. Por exemplo, prolaminas e glutaminas são insolúveis e de degradabilidade lenta, mas as globulinas são solúveis e de alta degradabilidade no rúmen (ROMAGNOLO; POLAN; BARBEAU, 1994). Segundo Bach, Calsamiglia e Stern (2005) algumas albuminas são solúveis, mas contêm ligações dissulfito, tornando-as lentamente degradadas no rúmen, mostrando assim, que outros fatores além da solubilidade afetam a degradabilidade ruminal das proteínas. Entretanto, a estrutura da proteína também é importante devido às ligações dentro e entre as cadeias de proteínas (estruturas terciária e quaternária) que têm função na determinação da degradação proteica, além disso, algumas ligações peptídicas específicas são mais resistentes à degradação do que outras, por exemplo, dipeptídeos formados

por prolina e lisina são hidrolisados no rúmen mais lentamente do que dipeptídeos formados por lisina e alanina (YANG; RUSSELL, 1992).

Os protozoários têm papel importante na degradação da proteína, e a sua função mais importante é a capacidade de engolfar moléculas grandes, proteínas, carboidratos e bactérias ruminais (VAN SOEST, 1994). Em adição, os protozoários também têm função de regulação do *turnover* de nitrogênio bacteriano e ainda são capazes de fornecer proteína solúvel para o crescimento microbiano. Como não são aptos a utilizar o nitrogênio da amônia (ONODERA; NAKAGAWA; KANDATSU, 1977), eles engolfam a proteína insolúvel que retorna ao rúmen na forma de proteína solúvel (DIJKSTRA, 1994).

2.2 FONTE DE NITROGÊNIO

A síntese de proteína microbiana requer um fornecimento adequado de nitrogênio para alcançar a máxima eficiência. Se o nível de nitrogênio não é adequado, o desacoplamento da fermentação pode ocorrer e isso resulta em fermentação sem produção de ATP eficiente. Em contraste, se o nível de nitrogênio é excessivo, a energia pode ser o fator limitante para a utilização eficiente do nitrogênio. Entretanto, para máxima eficiência de crescimento microbiano ocorrer, nitrogênio e energia disponíveis no rúmen devem ser balanceados (STERN; HOOVER, 1979).

As exigências dos microrganismos ruminais para compostos nitrogenados são atendidas pela PDR e pelo nitrogênio metabólico endógeno proveniente da oxidação de aminoácidos nos tecidos e órgãos, que é reciclado para o rúmen através do sangue ou da saliva. Alguns sistemas nutricionais (AGRICULTURAL AND FOOD RESERCH COUNCIL - AFRC, 1992 e NRC, 2001) propõem que a captura da proteína degradada no rúmen não é completa, sendo necessário um excesso de PDR.

A PDR acima da quantidade requerida pelos microrganismos é degradada a amônia, absorvida no intestino delgado e metabolizada no fígado como ureia e perdida na urina (BACH; CALSAMIGLIA; STERN, 2005), o que gera prejuízo porque além de eliminar nitrogênio gasta também energia para tal processo. Desse modo, a perda de nitrogênio pode ser reduzida com o aumento da degradação da proteína no rúmen e do nitrogênio utilizado pelos microrganismos.

Os requisitos nutricionais de animais de alta produção frequentemente excedem à capacidade de síntese proteica e fermentação ruminal. Assim, a PNDR da dieta é aumentada e o balanço de aminoácidos desta parcela torna-se muito importante. Com isso, a seleção de

proteínas de várias fontes é frequentemente necessária para assegurar a absorção com um adequado balanceamento de aminoácidos (PALMQUIST; WEISBJERG; HVELPLUND, 1993).

Embora a concentração do nitrogênio na dieta possa parecer adequada para máximo crescimento microbiano, a resistência da proteína à degradação ruminal pode resultar em deficiência de nitrogênio (STERN; HOOVER, 1979). Em dietas com amido de cereal há grande possibilidade de nitrogênio inadequado, particularmente com o milho no qual a proteína é altamente resistente à degradação ruminal. Forragens também podem resultar em deficiências de nitrogênio disponível para microrganismos do rúmen dependendo de alguns fatores como a espécie, estágio de maturidade e secagem (HUME, 1975).

Outra consideração importante obtida é que, quando a disponibilidade de nitrogênio aumenta em relação a MOVDR, a eficiência de síntese microbiana diminui, ou seja, se a disponibilidade de nitrogênio ruminal é relativamente alta em relação a MODR, a quantidade de nitrogênio microbiano sintetizado por unidade de MODR diminui, indicando que a utilização de energia para a síntese de proteína microbiana torna-se menos eficiente porque o excesso de nitrogênio não é usado pelos microrganismos ruminais.

Um fator importante influenciando a síntese e o fluxo de proteína microbiana para o duodeno é sem dúvida, a fonte de nitrogênio dietético. Santos et al. (1998), revisando dados publicados na literatura, onde fontes de PNDR substituíram o farelo de soja, concluíram que o aumento da PNDR dietética não melhorou consistentemente o desempenho de vacas em lactação, sugerindo que a inclusão de fontes de PNDR pode ter resultado em redução da síntese microbiana ruminal. Ipharraguerre e Clark (2005), avaliando o efeito de diferentes fontes de proteína dietética sobre o fluxo de proteína microbiana para o duodeno de vacas observaram uma redução de 7% no fluxo de proteína microbiana, quando o farelo de soja foi substituído por fontes de PNDR, corroborando as conclusões de Hoover e Stokes (1991) de que a deficiência de energia, aminoácidos, peptídeos ou amônia no rúmen pode deprimir o crescimento microbiano ruminal, quando fontes de PDR são substituídas por PNDR.

Os alimentos ricos em nitrogênio não proteico, normalmente são facilmente solúveis nas condições do ambiente ruminal e, portanto, são rapidamente hidrolisados por enzimas microbianas específicas gerando amônia que, por sua vez, pode ou não ser utilizada pelos microrganismos ruminais. A ureia, por exemplo, um alimento rico em nitrogênio não proteico, é rapidamente hidrolisada por ureases microbianas e forma amônia e CO_2. A amônia pode ser utilizada para a síntese de aminoácidos. Essa atividade permite os ruminantes utilizarem a ureia

proveniente da alimentação, da secreção salivar endógena ou que passa por difusão pela parede ruminal.

A síntese de proteína microbiana pode ocorrer no rúmen em dietas na qual a ureia é a única fonte de nitrogênio, entretanto, a eficiência do crescimento microbiano pode ser limitada pela deficiência de aminoácidos pré-formados (STERN; HOOVER, 1979). Salter, Daneshvar e Smith (1979) examinaram a origem do nitrogênio incorporado na bactéria no rúmen de novilhos alimentados com proteína e ureia, e observaram que quando um fornecimento dietético adequado de aminoácidos pré-formados foi disponível, a prolina, arginina, histidina, metionina e fenilalanina foram derivados do ambiente a uma maior extensão do que outros aminoácidos. Enquanto a síntese de prolina, arginina e histidina aumentaram em dieta contendo ureia, a de metionina e fenilalanina não aumentaram. Entretanto, metionina e fenilalanina podem ser limitantes para crescimento da bactéria em dietas com baixa proteína e alto nitrogênio não proteico.

Dietas à base de cereais estimulam maior atividade proteolítica do que dietas de forragem seca, provavelmente porque essas dietas são adequadas para a proliferação de espécies ruminais amilolíticas que é de conhecimento serem mais proteolíticas do que as celulolíticas (SIDDONS; PARADINE, 1981).

A estabilidade relativa do perfil de aminoácidos da proteína microbiana torna difícil a alteração do perfil de aminoácidos da digesta duodenal (STERN et al.,1994), sendo necessário para essa alteração, o fornecimento de fontes de PNDR em proporções substanciais da proteína dietética. Todos os alimentos geralmente contêm alguma PNDR e em contraste com a proteína microbiana, existem grandes diferenças na qualidade da PNDR. A maior variação no perfil de aminoácidos essenciais que deixam o rúmen deve-se à quantidade e proporção desses aminoácidos na PNDR (SCHWAB et al., 2003).

2.3 FONTE DE ENERGIA

O crescimento microbiano depende da transferência de energia da fermentação dos carboidratos para o processo biossintético de síntese de proteína microbiana. O processo catabólico (fermentação de carboidratos) é completamente vinculado ao processo anabólico (síntese microbiana) via adenosina trifosfato (ATP). Se a taxa de produção de ATP excede a taxa de utilização, ocorre desacoplamento energético, e a energia do ATP é dissipada como calor por meio de ciclos de íons pela membrana celular. Isto ocorre quando a energia está em

excesso (uso de altos níveis de concentrado) ou se minerais como enxofre e fósforo estão deficientes (NOCEK; RUSSELL, 1988).

As bactérias podem utilizar carboidratos e proteínas como fonte de energia, entretanto os carboidratos são a principal, e ainda podem ser fonte de esqueleto de carbono para síntese de proteína microbiana em combinação com a amônia (BACH; CALSAMIGLIA; STERN, 2005).

Geralmente, quando os carboidratos são limitantes, os aminoácidos dietéticos são usados como fonte de energia, ocorrendo acúmulo de amônia (RUSSELL et al., 1992). Portanto, a adição de carboidratos, além de promover síntese de proteína microbiana, exerce um efeito poupador de aminoácidos (NOCEK; RUSSELL, 1988).

A utilização eficiente de nitrogênio degradado requer que a energia da fermentação da matéria orgânica da dieta seja fornecida a uma taxa que corresponde às habilidades sintéticas dos microrganismos do rúmen. A taxa na qual a energia é disponibilizada pode ser o fator mais limitante à síntese de proteína microbiana, uma vez que os carboidratos fibrosos apresentam lenta taxa de digestão. Desta forma, o fornecimento de quantidades moderadas de carboidratos não fibrosos, geralmente aumenta o fluxo de nitrogênio microbiano para o abomaso, desde que não haja limitação da disponibilidade de nitrogênio no rúmen.

Carboidratos, prontamente disponíveis como amido e açúcares, foram mais efetivos do que outros carboidratos no aumento da utilização do nitrogênio dietético degradado (STERN et al., 1978). Assim como, quando o amido foi adicionado à dieta com alto teor de celulose ou substituindo parte da celulose, houve aumento da utilização do nitrogênio. A eficiência do amido promover a utilização do nitrogênio pode estar relacionada a produção de energia durante sua fermentação (STERN; HOOVE, 1979) disponibilizando grande quantidade de energia para as bactérias ruminais.

Chamberlain, Robertson e Choung (1993) demonstraram que os açúcares solúveis (sacarose, lactose e frutose) são superiores ao amido como fonte de energia para fixação de nitrogênio microbiano no rúmen. Essas observações sugerem a existência de uma relação ótima entre açúcares disponíveis e nitrogênio solúvel sendo que Hoover e Miller-Webster (1998) citaram um aumento de 25% no crescimento microbiano, quando a relação proteína/açúcar solúvel passou de 1:1 para 2 ou 3:1.

Uma vez que os açúcares representam, normalmente, menos de 10% do total de carboidratos não fibrosos, o amido torna-se a principal fonte de carboidrato para o crescimento microbiano (HOOVER; MILLER-WEBSTER, 1998). A taxa de fermentação de todos os

carboidratos determina seu destino no trato digestivo e a eficiência com a qual os microrganismos podem utilizá-los (VAN SOEST, ROBERTSON, LEWIS, 1991). A variabilidade na degradabilidade pode ser originada por vários fatores, como por exemplo, a proporção entre as moléculas constituintes do amido (amilose e amilopectina), a estrutura (presença ou não de pericarpo), processamentos como moagem, trituração, floculação, etc.

Chamberlain, Robertson e Choung (1993) relataram maior produção de proteína microbiana quando dietas à base silagem de capim foram complementadas por sacarose, frutose, lactose ou xilose em comparação com a adição de amido. Se o pressuposto do efeito benéfico dos açúcares é verdade, eles podem, pelo menos parcialmente explicar a variabilidade da eficiência de síntese de proteína microbiana entre forragens.

O sistema *CNCPS* sugere a divisão do ecossistema ruminal em dois grupos microbianos, ou seja, os microrganismos que utilizam carboidratos estruturais, e aqueles que utilizam carboidratos não estruturais. Esta segregação reflete diferenças quanto às fontes de energia e compostos nitrogenados utilizados, bem como a eficiência do crescimento microbiano.

As bactérias que fermentam carboidratos estruturais necessitam de amônia como principal fonte de nitrogênio e ácidos graxos de cadeia ramificada. Estes microrganismos não utilizam peptídeos e aminoácidos, apenas quando em condições limitantes de nitrogênio, apresentando menor crescimento, decorrentes dos maiores custos de manutenção. As bactérias que fermentam carboidratos não estruturais apresentam crescimento mais rápido e utilizam em média 66% de peptídeos e aminoácidos e 34% de amônia para o seu crescimento (RUSSELL et al., 1992).

Stern et al. (1978) notaram que níveis de energia na dieta apenas não é um fator limitante para o crescimento microbiano. Eles encontraram um aumento no crescimento microbiano em resposta a aumento nos níveis de carboidratos não estruturais na dieta. Os maiores fatores que afetaram a utilização do nitrogênio dietético degradado foi o tipo de carboidratos disponíveis e a taxa de degradação. Parece que a extensão e taxa de degradação de fontes de nitrogênio e carboidrato são muito importantes na determinação da eficiência de crescimento microbiano.

2.4 pH

O pH ótimo para enzimas proteolíticas está entre 5,5 e 7,0 (KOPECNY; WALLACE, 1982), no entanto, a degradação da proteína é reduzida na extremidade inferior de pH ruminal (STERN et al., 1994). Baixos valores de pH podem ser deletérios aos microrganismos,

especialmente os protozoários e também estão relacionados com a redução na digestibilidade dos componentes fibrosos das plantas (VERBIC, 2002). Segundo Strobel e Russell (1986), em baixos valores de pH ruminal, a energia disponível para o crescimento microbiano é desviada para a manutenção do pH interno dos microrganismos, reduzindo, dessa forma, a eficiência de utilização da energia para síntese microbiana.

O rúmen é tamponado pela secreção salivar, mas se a quantidade de fibra insolúvel em detergente neutro (FDN) dietética for restrita e a taxa de fermentação de carboidratos for rápida, o pH pode declinar. Estudos indicam que, quando as dietas contem menos de 40% de forragem (20% FDN), um baixo crescimento microbiano é observado.

Uma mistura de bactérias ruminais que foi incubada *in vitro*, produziu 50% menos proteína microbiana em pH 5,7 em relação ao pH de 6,7 (STROBEL; RUSSELL, 1986). O CNCPS ajusta a produção de proteína microbiana utilizando o pH, sendo este predito a partir do conteúdo de FDN dietético. Quando o conteúdo de FDN da dieta é menor ou igual a 20% da matéria seca, a produção de proteína microbiana decresce 2,5% para cada 1% de decréscimo na FDN (RUSSELL et al., 1992).

Cardozo, Calsamiglia e Ferret (2000) desenvolveram um trabalho no qual compararam uma dieta com forragem apenas e outras com alta proporção de concentrado e observaram pH entre 4,9 e 7,0. Foi verificado ainda que a degradação da proteína diminuísse quando o pH diminuiu, independente da dieta. Embora a bactéria amilolítica tenda a ser mais proteolítica do que bactéria celulolítica (WALLACE; FRUMHOLTZ; WALKER, 1993), a degradação da proteína foi menor na dieta de alto concentrado, pois esse pode ter fornecido substrato para os microrganismos independente do pH.

Portanto, a degradação é afetada pelo pH e o tipo de ração, o que pode ditar o tipo predominante da população microbiana no rúmen. Nesse mesmo sentido Lana, Russell e Van Amburgh (1998) desenvolveram um trabalho onde a redução do pH ruminal de 6,5 para 5,7 diminuiu a concentração de amônia apenas quando as bactérias foram obtidas de bovinos alimentados com 100% de forragem, enquanto que com bactérias de bovinos alimentados com 90% de concentrado houve menor concentração de amônia independente do pH.

Espécies diferentes de bactérias ruminais variam nas suas sensibilidades a pH baixo. As bactérias celulolíticas são muito sensíveis ao pH ácido enquanto espécies amilolíticas são tolerantes. Strobel e Russell (1986) observaram que as taxas de crescimento e a produção de bactérias do rúmen foram deprimidas quando o pH foi reduzido e concluíram que vários fatores contribuem para reduzir a síntese de proteína em pH baixo. Depressão da utilização de

carboidratos foi certamente o principal fator, mas não explica completamente a redução da proteína. Em certos casos, baixo pH aumenta lactato, e esse aumento conduz a redução da proteína, porque as vias do lactato produzem os ATP´s.

Celulase é inibida quando o pH reduz a menos que 6,0 (STEWART,1977), reduzindo a digestão da fibra e aumentando o efeito rúmen fill. Strobel e Russell (1986) observaram que a síntese microbiana foi reduzida de 34 a 69% quando o pH inicial foi igual a 6,0, mas essas reduções foram maiores do que diminuições na utilização de carboidratos, aumentos de lactato, e reduções associadas a produção de ATP, menos ATP foi utilizado para a síntese de proteína microbiana, parece que baixo pH desviou a energia para funções não relacionadas ao crescimento.

Russell e Dombrowski (1979) estudando o efeito do pH em diferentes microrganismos ruminais observaram reduções concomitantes no pH e na produção dos microrganismos e atribuíram isso a mudanças nos produtos finais da fermentação. Eles postularam que a produção de proteína foi influenciada por um desacoplamento do crescimento a um pH baixo. Desacoplamento energético é essencialmente um desvio de energia do crescimento para outros processos e, finalmente, a energia é dissipada na forma de calor. A manutenção do potencial de membrana é tal como uma função não relacionada ao crescimento, e como o pH torna-se ácido, é necessário mais energia para expulsar prótons.

2.5 INTERAÇÕES DE NUTRIENTES

A combinação efeito de pH e substrato na degradação da proteína ruminal pode ser explicada pelo resultado da população microbiana predominante. A degradação da proteína ocorre pela ação das enzimas proteolíticas, mas há evidências que suportam a importância de outras atividades enzimáticas na degradação da proteína (BACH; CALSAMIGLIA; STERN, 2005).

A adição da amilase pode aumentar a degradação da proteína de grãos de cereais de 6 a 20% (ASSOUMANI et al., 1992) e a proteína da forragem somente é degradada depois que inicia-se a despolimerização da celulose (DEBROAS; BLANCHART, 1993). Algumas proteínas de plantas estão presas na matriz de fibra que necessita ser degrada para que as proteases tenham acesso às proteínas para degradação (BACH; CALSAMIGLIA; STERN, 2005), desse modo para máxima degradação são requeridas a presença de enzimas proteolíticas e não-proteolíticas e a combinação de vários microrganismos e atividades enzimáticas.

Este fato é claramente ilustrado em um estudo realizado por Endres e Stern (1993) que observaram uma redução na digestão da PB e FDN quando o pH diminuiu de 6,3 para 5,9. Contagem de bactérias proteolíticas não foram afetadas pelo pH, mas as bactérias celulolíticas foram reduzidas em cerca de 50%. É provável que, com uma ração de alto concentrado, mesmo se o pH for elevado, as bactérias que degradam amido predominam e a digestão da fibras é limitada pelo número reduzido de bactérias celulolíticas, reduzindo a degradação da proteína (MOULD; ORSKOV, 1983).

Portanto, o efeito do pH e/ou do substrato inicial fermentado pode afetar a população microbiana predominante e modificar a degradação da proteína causada pela interação entre nutrientes (BACH; CALSAMIGLIA; STERN, 2005), pois a redução do pH diminui a população de microrganismos celulolíticos e consequentemente a degradação da fibra, com isso reduz o acesso das bactérias proteolíticas à proteína e indiretamente reduz a degradação da proteína. Portanto, parece que a degradação da proteína no rúmen requer a presença de várias enzimas proteolíticas e não proteolíticas, e a combinação de vários microrganismos e atividades enzimáticas são necessárias para a degradação máxima da proteína (STERN et al., 1994).

2.6 TAXA DE DILUIÇÃO

Alterações nas taxas de diluição do líquido e dos sólidos ruminais também podem ter impacto na fermentação no rúmen e no crescimento microbiano (RUSSELL et al., 1992). A taxa de diluição ruminal é definida com uma proporção do volume total do rúmen que o deixa por hora (Harrison et al., 1975). Muitos fatores como a dieta, níveis de consumo, proporção de forragem na dieta, tamanho de partícula da ração e condições ambientais podem afetar a taxa de diluição ruminal (STERN; HOOVER, 1979).

O aumento da síntese de proteína microbiana e da eficiência de síntese de proteína microbiana que é obtida com altas taxas de diluição tem sido atribuído à seleção de espécies de microrganismos com melhores taxas de crescimento, uma maior proporção da população microbiana na fase exponencial de crescimento e uma diluição da exigência de mantença dos microrganismos (BACH; CALSAMIGLIA; STERN, 2005). Além disso, altas taxas de diluição estão associadas com menores tempos de retenção no rúmen, o que reduz a autólise bacteriana, engolfamento de bactérias por protozoários e também as mudanças na estrutura da população microbiana induzida por mudanças no substrato (STERN; HOOVER, 1979).

Em condições onde a taxa de passagem é elevada, espera-se uma redução nos custos de mantença dos microrganismos, devido a uma redução no tempo de permanência ruminal dos mesmos (VERBIC, 2002). Do ponto de vista teórico, espera-se que o máximo de produção microbiana possa ocorrer quando a taxa de diluição for igual à taxa de replicação microbiana (ORSKOV, 1992).

A taxa de saída do rúmen é uma função do consumo de matéria seca e, portanto pode assumir-se que a síntese de proteína microbiana no rúmen pode ser aumentada por um aumento na ingestão de matéria seca. Um dos mais importantes fatores que limitam a ingestão de volumosos de baixa qualidade é sua baixa capacidade de degradação ruminal. Volumosos de alta qualidade são, portanto, esperados não só para aumentar a produção de proteína microbiana ao fornecer quantidades elevadas do substrato fermentável, mas também por aumentar o nível de ingestão (VERBIC, 2002).

2.7 ENXOFRE

O enxofre é requerido pelos microrganismos ruminais para síntese de metionina e cisteína e o consumo de enxofre pode limitar a síntese proteica quando grandes quantidades de nitrogênio não proteico são utilizados. A relação nitrogênio:enxofre de 10:1 tem sido sugerida para máximo crescimento microbiano (STERN; HOOVER, 1979).

2.8 FREQUÊNCIA DE ALIMENTAÇÃO

Carneiros alimentados em intervelos de 2 horas resultou em melhor síntese de proteína do que alimentados uma vez ao dia (AL ATTAR; EVANS; AXFORD, 1976). Jensen e Wolstrup (1977) investigaram o efeito de novilhas alimentadas com a frequência de 2 e 12 vezes por dia e observaram que alimentação frequente comparada com duas vezes ao dia resultou em redução do metabolismo microbiano no rúmen e aumento no pool de ATP microbiano.

3 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Para maximizar a eficiência de produção animal, aumento na produção e na passagem de proteína microbiana ruminal para o intestino são desejados. De fato a composição de

aminoácidos da proteína microbiana verdadeira é semelhante àquela proteína dos principais produtos no animal, ou seja, leite e carne, não há proteína, não há fontes que atendam aos requisitos dos animais melhores do que a proteína microbiana. No entanto, essa é difícil de ser mensurada devido aos inúmeros fatores e combinações desses que afetam a síntese de proteína microbiana.

4 REFERÊNCIAS

AGRICULTURAL AND FOOD RESERCH COUNCIL - AFRC. Nutritive requirements of ruminant animals protein. **Nutrition Abstracts and Reviews (Series B)**, v. 62, p. 787- 835, 1992.

AL ATTAR, A.; EVANS, R. A.; AXFORD, R. F. E. The effect of frequency of feeding and of the dietary energy source upon microbial protein synthesis in the rumen of sheep. **Proceedings Nutrition Society**. v. 35, n. 108A (abstr.), 1976.

ASSOUMANI, M. B. et al. Refinement of an enzymatic method for estimating the theoretical degradability of proteins in feedstuffs for ruminants. **Animal Feed Science and Technology**, v. 39, p. 357-368, 1992.

ATASOGLU, C.; WALLACE, R. J. Metabolism and de novo synthesis of amino acids by rumen microbes. In: D'MELLO, J. P. F. **Amino acids in animal nutrtition**. 2. ed. CAB International, 2003.

BACH, A.; CALSAMIGLIA, S.; STERN, M. D. Nitrogen metabolism in the rumen. **Journal of Dairy Science**, v. 88, E. Suppl., 2005.

CARDOZO, P.; CALSAMIGLIA, S.; FERRET, A. Effect of pH on microbial fermentation and nutrient flow in a dual flow continuous culture system. **Journal of Dairy Science**, v. 83 (Suppl. 1), p. 265, 2000.

CHAMBERLAIN, D. G.; ROBERTSON, S.; CHOUNG, J. J. Sugars versus starch as supplements to grass silage. Effects on ruminal fermentation and the supply of microbial protein to the small-intestine, estimated from the urinary-excretion of purine derivatives. **Journal Science of Food and Agriculture**, v. 63, p. 189-194, 1993.

DEBROAS, D.; BLANCHART, G. Interactions between proteolytic and cellulolytic rumen bacteria during hydrolysis of plant cell wall protein. **Reproduction Nutrition Development**, v. 33, p. 283-288, 1993.

DIJKSTRA, J. Simulation of the dynamics of protozoa in the rumen. **British Journal of Nutrition**, v. 72, p. 679-699, 1994.

ENDRES, M. I.; STERN, M. D. Effects of pH and diets containing various levels of lignosulfonate-treated soybean meal on microbial fermentation in continuous culture. **Journal of Dairy Science**, v. 76 (Suppl. 1), p.177, 1993.

HARRISON, D. G. et al. Manipulation of rumen fermentation in sheep by increasing the rate of flow of water from the tureen. **Journal of Agricultural Science**, v. 85, n. 1, p. 93-101, 1975.

HOOVER, W. H.; MILLER-WEBSTER, T. K. Role of sugars and starch in ruminal fermentation. In: Tri-State Dairy Nutrition Conference. Fort Wayne. **Proceedings…** p. 1-16, 1988.

HOOVER, W. H.; STOKES. S. R. Balancing carbohydrates and protein for optimum rumen microbial yield. **Journal of Dairy Science**. v. 74, p. 3630-3644, 1991.

HUME, I. D. Use of 35S to estimate the proportion of dietary protein degraded in the rumen. In: **Panel Proceedings Series (IAEA)**. International Atomic Energy Agency, 1975.

IPHARRAGUERRE, I. R.; CLARK, J. H. Varying Protein and Starch in the Diet of Dairy Cows. II. Effects on Performance and Nitrogen Utilization for Milk Production. **Journal of Dairy Science**, v. 88, p. 2556–2570, 2005.

JENSEN, K.; WOLSTRUP, J. Effect of feeding frequency on fermentation pattern and microbial activity in the bovine tureen. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v. 18, n. 1, p. 108, 1977.

KOPECNY, J.; Wallace, R. J. Cellular location and some properties of proteolytic enzymes of rumen bacteria. **Applied Environmental Microbiology**, v. 43, p. 1026-1033, 1982.

LANA, R. P.; RUSSELL, J. B.; VAN AMBURGH, M. E. The role of pH in regulating ruminal methane and ammonia production. **Journal of Animal Science**, v. 76, p. 2190-2196, 1998.

MOULD, F. L.; ORSKOV, E. R. Manipulation of rumen fluid pH and its influence on cellulotysis in sacco, dry matter degradation and the rumen microflora of sheep offered either hay or concentrate. **Animal Feed Science and Technology**, n. 1, p. 1-14, 1983.

NOCEK, J. E.; RUSSELL, J. B. Protein and energy as an integrated system. Relationship of ruminal protein and carbohydrate availability to microbial synthesis and milk production. **Journal of Dairy Science**, v. 71, p. 2070-2107, 1988.

NUTRIENT Requirements of Beef Cattle – NRC. 7. ed. rev. Washington, D. C.: National Academy Press, 1996.

_____. 7. ed. rev. Washington, D. C.: National Academy Press, 2001.

OLIVEIRA JUNIOR, R. C. **Substituição do farelo de soja por ureia em dietas de bovinos de corte**. 2002. 196 f. Tese (Doutorado). Escola Superior de Agricultura: “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, São Paulo, 2002.

ONODERA, R.; NAKAGAWA, Y.; KANDATSU, M. Ureolytic activity of the washed suspension of rumen ciliated protozoa. **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 41, p. 2177-2182, 1977.

ORSKOV, E. R. **Protein nutrition of ruminants**. 2. ed. London: Academic Press. 1992.

ORSKOV, E. R.; MCDONALD, I. The estimation of protein degradability in the rumen from incubation measurements weighted according to rate of passage. **The Journal of Agricultural Science**, v. 92, n. 02, p. 499-503, 1979.

OWENS, F. N.; GOETSCH, A. L. Ruminal fermentation. In: CHURCH, D.C. (Ed.). **The Ruminant Animal Digestive Physiology and Nutrition**. 1988. p. 145-171.

PALMQUIST, D. L.; WEISBJERG, M. R.; HVELPLUND, T. Ruminal intestinal and total digestibilities of nutrients in cows fed diets hight in fat and undegradable protein. **Journal of Dairy Science**, v. 76, n. 5, p. 1353-1364, 1993.

ROMAGNOLO, L. C.; POLAN, C. E.; BARBEAU, W. E. Electrophoretic analysis of ruminal degradability of corn proteins. **Journal of Dairy Science**, v. 77, p. 1093-1099, 1994.

RUSSELL, J. B.; DOMBROWSKI, D. B. Effect of pH on the efficiency of energy utilization by rumen bacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 39, p. 604, 1979.

RUSSELL, J. B. et al. A net carbohydrate and protein system for evaluating cattle diets: I. Ruminal fermentation. **Journal of Animal Science**, v. 70, p. 2551-2561, 1992.

SALTER, D. N.; DANESHVAR, V.; SMITH, R. H. The origin of nitrogen incorporated into compounds in the rumen bacteria of steers given protein- and urea-containing diets. **British Journal of Nutrition**, v. 41, p. 197, 1979.

SANTOS, F. A. P. et al. Effects of rumen-undegradable protein on dairy cow performance: A 12-year literature Review. **Journal of Dairy Science**, v. 81, n. 12, p. 3182-3213, 1998.

SCHWAB, C. G. et al. Characterization of proteins in feeds. **Journal of Dairy Science**, v. 86 (E. Suppl.), p. 88-103, 2003.

SIDDONS, R. C.; PARADINE, J. Effect of diet on protein degrading activity in the sheep rumen. **Journal of the Science Food and Agriculture**, v. 32, p. 973-981, 1981.

STERN, M. D. et al. Effects of nonstructural carbohydrate, urea and soluble protein on microbial protein synthesis in continuous culture of rumen contents. **Journal of Animal Science**, v. 47, p. 944-956, 1978.

STERN, M. D.; HOOVER, W. H. Methods for determining and factors affecting rumen microbial protein synthesis: A review. **Journal of Animal Science**, v. 49, p. 1590-1603, 1979.

STERN, M. D. et al. Evaluation of chemical and physical properties of feeds that affect protein metabolism in the rumen. **Journal of Dairy Science**, v. 77, p. 2762-2786, 1994.

STEWART, C. S. Factors affecting the cellulolytic activity of rumen contents. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 33, p. 497, 1977.

STROBEL, H. J.; RUSSELL, J. B. Effect of pH and energy spilling on bacterial protein synthesis by carbohydrate-limited cultures of mixed rumen bacteria. **Journal of Dairy Science**, v. 69, p. 2941-2947, 1986.

TAMMINGA, S. Protein degradation in the forestomachs of ruminants. **Journal of Animal Science**, v. 49, p. 1615, 1979.

VAN SOEST, P. J. **Nutritional Ecology of the Ruminant**. Ithaca, NY: Cornell University Press, 1994.

VAN SOEST, P. J.; ROBERTSON, J. B.; LEWIS, B. A. Symposium: carbohydrate methodology, metabolism, and nutritional implications in dairy cattle. **Journal Dairy Science**, v. 74, n. 10, p. 3583-3597, 1991.

VERBIC, J. Factores affecting microbial protein synthesis in the rumen with emphasis on diets containing forages. **Viehwirtschaftliche Fachtagung**. Milchproduktion und Rindermast, 2002.

WALLACE, R. J.; FRUMHOLTZ, P. P.; WALKER, N. D. Breakdown of N-terminally modified peptides and an isopeptide by rumen microorganisms. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 59, p. 3147-3149, 1993.

WALLACE, R. J. Ruminal microbial metabolism of peptides and amino acids. **Journal of Nutrition**, v. 126, p. 1326S-1334S, 1996.

YANG, C. M.; RUSSELL, J. B. Resistance of proline-containing peptides to ruminal degradation in vitro. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 58, p. 3954-3958, 1992.

ZHU, W.Y. et al. Evidence of a role for plant proteases in the degradation of herbage proteins in the rumen of grazing cattle. **Journal of Dairy Science**, v. 82, p. 2651-2658, 1999.

Capítulo

32

Alimentação líquida para suínos

Talita Pinheiro Bonaparte[1]
José Geraldo Vargas Júnior[2]
Drielly Gomes Bizarria[3]
Hugo da Silva Nascimento[4]
Clara Souto dos Santos[5]
Júlio Valiati Marin[6]
Gabriel Pinto Brunoro[7]
Natália Oliveira Cabral[8]
Elizabêth Fonseca Processi[9]
Dione Henrique Breda Binoti[10]

1 INTRODUÇÃO

A conversão alimentar influencia a produção e o gasto com alimentação, sendo que a maneira como o alimento é fornecido aos animais apresenta grande importância (MANZKE et

[1] Universidade Federal do Espírito Santo, e-mail: talitabonaparte@gmail.com;
[2] Universidade Federal do Espírito Santo, e-mail: josegeraldovargas@yahoo.com.br;
[3] Universidade Federal do Espírito Santo, e-mail: drielly.bizarria@hotmail.com;
[4] Universidade Federal do Espírito Santo, e-mail: hugonas@gmail.com;
[5] Universidade Federal do Espírito Santo, e-mail: clara_sds@hotmail.com;
[6] Universidade Federal do Espírito Santo, e-mail: julio_valiati@hotmail.com;
[7] Universidade Federal do Espírito Santo, e-mail: gabrielbrunorozoo@hotmail.com;
[8] Universidade Estadual do Norte Fluminense, Campos dos Goytacazes -RJ, e-mail: nataliacabral@zootecnista.com.br;
[9] Doutora em Ciência Animal, Campos dos Goytacazes-RJ, e-mail: processi@zootecnista.com.br;
[10] Universidade Federal do Espírito Santo, e-mail: dionebinoti@hotmail.com.

al., 2011). A dieta líquida é uma alternativa para reduzir a conversão alimentar, e pode ser utilizado com sucesso em todas as fases de produção (LANGE; ZHU; NIVEN, 2006) através do fornecimento de ração com adição de água ou coprodutos da cadeia de alimentos, como o soro de leite, reduzindo o custo da nutrição e a mão de obra, além de melhorar os índices zootécnicos.

O custo elevado para implantação da tecnologia, a necessidade de ajustes no balanceamento da dieta, a falta de mão de obra, instabilidade na rede elétrica, a decantação e a mistura inadequada dos ingredientes são fatores que restringem o uso da tecnologia nas granjas do Brasil (STRINGHINI; RONER; NUNES, 2006).

Na maioria dos países da Europa, a alimentação líquida está nutrindo mais de 50% dos animais em terminação (YAGÜE, 2007), mais da metade das granjas trabalham com a mistura automatizada e computadorizada de ração ou coprodutos secos a água ou coprodutos líquidos, como soro de leite. Reduzindo a necessidade de métodos alternativos de destinação de coprodutos (KOELEMAN, 2010).

Apesar de levantamentos apontarem que apenas 2% dos animais terminados no Brasil serem alimentados com dieta líquida, é possível observar economia de 10 a 15% com o uso da dieta líquida a quilo de ganho, além de trazer benefícios aos próprios animais, tendendo a tornar esta tecnologia cada vez mais difundida como principal alternativa de investimento na produção de suínos (YAGÜE, 2007).

O uso da alimentação líquida depende de estudos para confirmar sua viabilidade. Através do conhecimento da adequada utilização dos nutrientes e tamanho da partícula dos ingredientes de uma ração umedecida com água será possível fornecer subsídios ao pesquisador sobre a digestibilidade dos nutrientes de uma dieta líquida (PEDERSEN; STEIN, 2010).

1.1 ALIMENTAÇÃO LÍQUIDA

A alimentação líquida se baseia na diluição de ingredientes sólidos em componentes líquidos. A diluição pode ser em água (PEDERSEN; STEIN, 2010; SILVA et al., 2011), em resíduos industriais líquidos fermentados (MISSOTTEN et al., 2010; PEDERSEN; STEIN, 2010), em resíduos não fermentados (CANIBE; JENSEN, 2003) e com componentes acidificantes (DUNG; MANH; OGLE, 2005).

Com a dieta líquida é possível aproveitar subprodutos da indústria alimentícia, ter efeitos positivos sobre a composição da microbiota gastrintestinal do animal, aumento do consumo de ração, melhor desempenho, redução do custo, maior digestibilidade, menor volume

de dejetos, menor desperdício de ração e maior conforto animal (BERTOL; BRITO, 1995; BROOKS; BEAL; NIVEN, 2003; JENSEN; MIKKELSEN, 1998; MISSOTTEN et al., 2010; PLUMED-FERRER; WRIGHT, 2009).

Segundo Beal et al. (2002) e Farzan et al. (2006) ocorre melhoria nos aspectos sanitários com redução dos riscos de contaminação microbiana para os animais. Ao se utilizar alimentos líquidos fermentados são verificadas alterações de pH aumentando o controle de microrganismos (PLUMED-FERRER; WRIGHT, 2009)

Outro benefício, atribuído ao uso de dieta líquida para suínos, é a melhoria da qualidade da carcaça, devido à redução da sensação de calor e pelo fato de a água estar associada ao mecanismo de termo regulação (SILVA et al., 2011; CANIBE; JENSEN, 2012) e o aumento da digestibilidade da dieta.

Grãos imersos em água, por um período de tempo, podem ter maior ativação das enzimas naturais. A fitase, que ocorre naturalmente no pericarpo de alguns grãos de cereais e sementes, é ativada quando as matérias-primas materiais estão umedecidas, assim, a imersão de trigo e cevada aumenta a hidrólise de fitato.

O favorecimento da digestão da ração proporcionada pela dieta líquida é explicado pelo efeito da atividade da água sobre as partículas dos ingredientes solubilizados, em especial o efeito da hidratação, ideal para o processo de digestão do suíno, principalmente quando há tempo suficiente para que o processo da hidratação ocorra de forma efetiva. Cada ingrediente utilizado nas dietas tem uma cinética de hidratação característica, dependendo ainda do diâmetro médio das partículas (NOGUEIRA et al., 2001).

1.2 HISTÓRICO

A chegada ao país da prática de fornecimento de dieta líquida aos suínos foi em meados da década de 1990 com a importação de máquinas de última geração, especialmente de empresas alemãs. A implantação do novo sistema representou economia de ração e de mão de obra para as integradoras, agilizando todo o processo de arraçoamento. A alimentação líquida ganhou força a partir dos anos 2000, no estado de Goiás, com a alimentação líquida especialmente para a fase de terminação. As atuais máquinas de alimentação líquida computadorizadas proporcionam tamanha exatidão, que a economia de ração consegue ser traduzida em maior margem de lucro no abate.

1.3 SUBPRODUTOS UTILIZADOS

Os subprodutos mais comumente utilizados são originários do processamento do leite (soro doce, soro ácido, leite gorduroso), resíduos de panificação, açúcar líquido, subprodutos da fabricação de cerveja, subprodutos da produção de etanol (BRAUN; LANGE, 2004), resíduos do processo de produção de alimentos infantis, sobras, cascas e água oriundas de plantas de processamento de batata, sendo o reaproveitamento dos coprodutos, uma das principais vantagens proporcionadas pelos sistemas de alimentação líquida (ORLANDO et al., 2009).

Na Europa, além do uso do soro de leite ou restos de batata frita restos em geral de empresas de laticínios e até de chocolate são disponibilizados aos produtores, que ainda hoje tratam seus suínos com bombons e chocolate em pó, descartados pela indústria. Na Holanda fornece o melhor exemplo de utilização de coproduto, onde se estima que anualmente sobre 6,5 milhões de toneladas de coprodutos são usados diretamente nas fazendas. De um total de 6,5 milhões de tonelada total, cerca de 35% (2,3 milhões de toneladas) é usado na alimentação de suínos. Disto, 70% consistem em matéria rica em carboidratos (SCHOLTEN et al., 1999). Estima-se que aproximadamente 30% dos suínos no norte e oeste da Europa são alimentados com dietas líquidas, e que a maioria destes, incorpore pelo menos um coproduto da indústria de alimentos na dieta.

Observa-se atualmente o uso dos mais diferentes tipos de coprodutos como o iogurte e achocolatado, até leite, levedura líquida ou suco de laranja. Em outros locais usa-se pão, biscoito e até torrada. Outro exemplo testado e aprovado na prática, tanto no Brasil quanto em outros países é a utilização da silagem com grão de milho úmido moído na alimentação líquida.

Um grande problema para os técnicos e para o produtor de suínos quando decide utilizar coprodutos é a variabilidade na sua composição química. Para uso eficiente as dietas precisam ser continuamente reformuladas para compensar as alterações que podem ocorrem na composição de um lote para o próximo.

1.4 PREPARAÇÃO DA DIETA LÍQUIDA

A mistura pode ser feita em um tanque, e, posteriormente, é conduzida através de roscas transportadoras, na quantidade previamente programada no computador, de acordo com o número de animais da fase (creche, recria, terminação) a ser alimentada. Durante esse processo,

diferentes tipos de alimentos, sejam coprodutos ou ração concentrada, são conduzidos através de roscas transportadoras por tubos até o tanque.

Com a quantidade desejada de ração pesada na balança, adiciona- se ao tanque a água ou o subproduto líquido. Geralmente a proporção utilizada é de 2 a 3 litros para cada quilo de ração. O envio da ração líquida é feita por auxílio de uma bomba, sendo enviada para os cochos por uma tubulação. A quantidade oferecida aos animais é pré-programada e então é liberada em cada cocho, através da abertura de válvulas pneumáticas comandadas por computador, que liberam a quantidade pré-programada de ração em cada cocho, com precisão de dezenas de gramas (LEH; PETTINGER; FORTES, 2013).

1.5 VANTAGENS DA ALIMENTAÇÃO LÍQUIDA PARA SUÍNOS

- Economia de trabalho e facilidade de recrutamento de mão-de-obra jovem;
- Redução do impacto ambiental e do volume de dejetos líquidos entre 21 e 30%;
- Redução da alimentação manuseada anualmente;
- Menor concentração de poeira. 10 a 30% menos;
- Redução do desperdício de alimentação com derramamento, 5% menos;
- Maior ingesta de substância seca. Em torno de 5% mais em suínos em terminação;
- Maior ingesta de alimento em fêmeas lactantes (+20%);
- Menor ocorrência de doenças, principalmente respiratórias. (-50%);
- Possibilidade de alimentos mais baratos;
- Maior facilidade, rapidez e baixo custo na medicação pela alimentação;
- Tanto fêmeas quanto suínos em crescimento se apresentam menos estressados;
- Melhor proposta de negócio. Retorno em 2,5 anos;
- Não afeta a cor da carne;
- Permite a adição de subprodutos mais baratos na dieta, como o soro do leite;
- Alterações diárias podem ser mais facilmente alcançadas;
- Melhora na utilização de nutrientes e no controle dos programas de arraçoamento;
- Melhoria no desempenho dos animais;
- Reduz mortalidade: creche, crescimento, terminação (CANIBE; JENSEN, 2003);
- Melhora a sanidade do sistema digestório (BROOKS; BEAL; NIVEN, 2001).
- Melhora a ingestão em altas temperaturas ambientes.

1.6 DESVANTAGENS

- Suínos na fase de crescimento acima do peso;
- Maior deposição de gordura (P2) com 14-18mmm em lugar dos 10-12 mm;
- Pode reduzir a renda da carcaça em 15%;
- Aspecto da precisão alimentar e de aplicação mais difícil nesse sistema;
- Se instalações forem sujas há surgimento e multiplicação de patógenos;
- Dificuldade de diluição ideal para cada ingrediente;
- Velocidade de decantação dos ingredientes;
- Decomposição dos subprodutos que não incorporarem a mistura em tempo hábil;
- Níveis de potássio altos quando a dieta contiver melaço (NOGUEIRA et al., 2001);
- Custo inicial de implantação.

1.7 APONTAMENTOS TÉCNICOS

A melhora significativa na conversão alimentar para o sistema de oferta da ração líquida, com acúmulo de diferença de 7,51% melhor em relação a ração seca, foi observada. Segundo Orlando et al. (2009), esta melhora se deve a investimentos em treinamento, manutenção e uso de curvas de consumo de ração, com controle na frequência e quantidade de ração por dia e fase de produção.

Com a alimentação líquida a economia é de até 190 gramas de ração por quilo de “ganho de peso”, nas fases de recria e terminação em comparação à alimentação seca, segundo cálculos de empresas de nutrição, integradoras e produtores. No final do processo, um animal terminado consome 15,20kg a menos de ração para um ganho de 80 kg nesta fase, representando economia de R$ 7,00 a R$ 8,00 por animal. Por exemplo, em uma granja com capacidade para 4.000 animais em engorda, o produtor venderá o lote com R$ 28.000 de economia apenas em ração - com ganho de R$ 98.000/ano somente com o melhor aproveitamento do alimento fornecido.

O proprietário da Granja Rhaetia, Wienfried Matthias Leh, atribui o sucesso da produção à alimentação líquida que foi implantada há 15 anos. Segundo Leh, na Europa, 50% da produção de suínos utiliza dieta líquida, enquanto no Brasil, este indicador fica entre 0,8% a 2% (YAGÜE, 2007). Wienfried Matthias Leh, Guarapuava-PR, utiliza alimentação líquida com silagem de grão úmido no processo de alimentação de seus suínos e corresponde a quase 60% da ração consumida pelos cerca de 65.000 terminados/ano, dos quais 45% são alimentados com dieta líquida. Cálculos apontam economia de 190 gramas de ração para cada quilo de peso

ganhado. A economia por animal chega a R$ 7,00 em comparação com a ração seca. Desta forma, os 30 mil animais terminados/ano em alimentação líquida economizam R$ 205 mil – ou um montante próximo a R$ 3 milhões, nos últimos 15 anos. Nos 15 anos de utilização da alimentação líquida, Wienfried economizou R$ 2.816.160,00 apenas em ração e mão-de-obra na Granja Rhaetia. O ganho estimado por ele no mesmo período foi de R$ 3.958.829,00 (REBELATTO, [2016]).

Ocorre a eliminação do pó da ração, a diminuição do desperdício e dos custos. Além disso, este processo facilita a utilização de coprodutos, como antibióticos solúveis, que podem ser introduzidos na mistura. A alimentação líquida também supre de 70% a 80% das necessidades diárias de água dos suínos com dieta balanceada, servida em horários rigorosos e distribuída de forma precisa (REBELATTO, [2016]).

Han, Thacker e Yang (2006) verificaram que dietas liquidas fornecidas por 10 dias para leitões com 30 dias de idade foram suficientes para incrementar a digestibilidade da matéria seca, da energia, da proteína bruta e da fração fibrosa das dietas.

1.8 HIGIENIZAÇÃO DO MAQUINÁRIO

Ao se utilizar coprodutos da indústria alimentícia e alimentos umedecidos na dieta de suínos houve preocupação com o surgimento e proliferação de microrganismos patogénicos. O surgimento de microrganismos como fungos, decorrente da permanência de restos de alimentos úmidos na tubulação e nos tanques de mistura é controlado na higienização do maquinário.

Empresas fabricantes de máquinas de alimentação líquida computadorizada já dispõem de equipamentos capazes de eliminar todos os resíduos de alimento, seja através da utilização de luz ultravioleta (nos tanques) ou através da higienização de toda a tubulação com água limpa, no pós-trato. A precisão da dosagem e sensores também prometem evitar a permanência de restos indesejados de ração nos cochos.

1.9 DIETA LÍQUIDA E O CONSUMO DE ÁGUA

Os coprodutos da indústria alimentícia utilizados, em sua maioria, possuem alto teor de minerais e é essencial que os suínos tenham acesso livre a água, para que possam manter seu equilíbrio homeostático (BROOKS; CARPENTER, 1990). Esta é uma exigência dos códigos de bem-estar animal do Reino Unido (HMSO, 1991) e deve ser obrigatório sempre que a dieta líquida é utilizada. Além de sua necessidade de manter a homeostase, o suíno parece ter uma

necessidade comportamental de consumir água separadamente daquela oferecida na dieta líquida.

O consumo de água, além do fornecido via dieta líquida, não é visto como uma desvantagem, pois o desempenho dos suínos na terminação é melhorado quando consomem mais água, resultando em maior ingestão total de água. Posteriormente, Barber, Brooks e Carpenter (1991) demonstraram que dietas líquidas tem maior digestibilidade e são mais bem aproveitadas pelos suínos.

1.10 REDUÇÃO DO IMPACTO AMBIENTAL

O uso de dietas líquidas, com ou sem coprodutos, podem aumentar o volume de efluentes e reduzir a carga de nutrientes por litro excretado. Portanto, é muito importante ao fazer comparações entre a carga de poluentes produzida por diferentes sistemas de alimentação, que sejam expressos em termos de nutrientes anuladas por quilo de peso vivo ganho pelo suíno, ou por nutrientes anulados por quilo de carne produzida.

Apesar do maior custo com combustível para o transporte dos coprodutos a serem utilizados na dieta líquida, o reaproveitamento é benéfico, uma vez que os co-produtos devem ser eliminados no ambiente de forma aceitável.

Ao melhorar o manejo nutricional através da adoção de alimentação líquida há redução do impacto ambiental com menor excreção de nitrogênio nos efluentes e do fósforo através da ativação da enzima endógena fitase nos grãos de cereais.

1.11 VOLUME DE ÁGUA UTILIZADO PARA DILUIÇÃO

A água utilizada para diluir a ração também funciona como veículo para o transporte de nutrientes do tanque de mistura até o comedouro. A ingestão de matéria seca deve ser mantida, mesmo que a taxa de diluição varie entre 2 a 4 litros de água por kg de alimento, garantindo assim, que os resultados produtivos não sejam afetados (INSTITUT TECHNIQUE DU PORC – ITP, 2000). Valores de água adicionados acima de 2,2 L/kg, ingerida pelo suíno, se transforma litro por litro em chorume (LE TREUT; KERVENEZ; RANNOU, 2003).

Deve-se adotar menores diluições, pois uma grande diluição na dieta líquida pode reduzir o efeito do crescimento pela restrição sobre o consumo de nutrientes (FEVRIER, 1985). O aumento do fornecimento de água via dieta serve como tática para reduzir o consumo de

ração e ganho de peso em suínos na fase de terminação (KORNEGAY; VANDER NOOT, 1968), mas também leva ao aumento do volume de dejetos.

Liptrap e Hogberg (1991) relataram que os suínos preferem dieta na proporção de 2 para 1, atingindo bons resultados. Dieta muito concentrada dificulta a passagem do fluxo e pode provocar congestionamentos na distribuição de tubos e válvulas do sistema (HOPPENBROCK et al., 1998), com excesso de água leva ao aumento do volume de dejetos (RUSSELL et al., 1996) e aumento da decantação, separando as partes líquida e sólida.

Segundo Penz Júnior e Ludke (1996), o efeito da água sobre as partículas gera condições mais adequadas ao processo de digestão, com efeito mais acentuado para o amido devido a maior exposição das ligações α1-4.

As enzimas endógenas dos grãos são ativadas pela hidratação, especialmente a fitase (CARLSON; POULSEN, 2003) que atua liberando o fósforo fítico, reduzindo a produção de fosfatos inorgânicos (BROOKS; BEAL; NIVEN, 2001). O mesmo se pode supor com a atividade de outras enzimas (glicosidases, proteases, entre outras) ou a aplicação de enzimas endógenas. Assim como acontece com o nitrogênio, se reduziria igualmente a excreção de fósforo e metais pesados nos dejetos e diminuiria a poluição ambiental (LIZARDO, 2003).

1.12 BENEFÍCIO DA DIETA LÍQUIDA PARA LEITÕES

Durante o desmame, os leitões sofrem distúrbios digestivos em função da troca de dieta, alterações fisiológicas, consumo inadequado e do estresse, o que pode causar diarreia e, em particular, possível propagação de germes patógenos no trato gastrintestinal. O fornecimento de alimento líquido em pequenas doses e maior frequência desempenha nos leitões o comportamento natural durante o aleitamento e promove a integridade do epitélio intestinal (DEPREZ et al., 1987).

Mantendo o comportamento natural da época do aleitamento, facilita a transição do leite materno para o alimento convencional, ajuda a manter o equilíbrio da microflora gastrintestinal (RUSSELL et al., 1996) e contribui para melhorar os resultados durante o crescimento (KIM et al., 2001).

1.13 ATIVIDADE MICROBIANA E SAÚDE INTESTINAL

A alimentação líquida tem um efeito positivo na saúde intestinal dos suínos e reduz a incidência de *Salmonella*. Em estudo realizado em 320 fazendas na Holanda, a incidência de

infecção causada por *Salmonella* subclínica foi dez vezes menor em suínos alimentados com soro de queijo acidificado (TIELEN et al., 1997), também verificado por Van Der Wolf et al. (1999) que ao usar alimentação líquida com coprodutos da indústria alimentícia verificou diminuição do risco de infecção.

Scholten et al. (1999) afirmaram que produtos fermentados por bactérias, com elevado valor de ácido láctico e, em consequência, com baixo pH, inibe a presença de *Salmonella* na alimentação. Por conseguinte, verificou-se que a inclusão de coprodutos fermentados em dietas líquidas para suínos faz uma contribuição significativa para a segurança alimentar, para isso é necessário conhecer a microbiologia do alimento líquido e desenvolver fermentação controlada de alimentos para animais.

O uso de alimentação líquida resulta em alterações nas propriedades físico-químicas e microbiológicas da dieta, tão importantes para o desempenho e saúde suína. Ao adicionar coprodutos fermentados com altos níveis de ácido láctico em dietas para suínos há benefícios sobre a saúde dos suínos com redução do pH e da população de *Escherischia coli* (GEARY, 1997; GEARY et al, 1996; GEARY et al., 1999; RUSSELL et al. 1996), pois a maior umidade favorece a multiplicação de Lactobacillus.

No uso de alimentos fermentados é preciso ser capaz de controlar a fermentação através do controle da temperatura e da redução do pH da alimentação (JENSEN; MIKKELSEN, 1998).

2 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Apesar da utilização restrita da dieta líquida para os suínos no Brasil, se trata de uma tecnologia que apresenta grandes vantagens para a produção suinícola em relação ao uso de alimentos sólidos, tendendo a se fazer cada vez mais presente nas granjas brasileiras.

Em termos gerais, a dieta líquida desponta como alternativa cada vez mais real e vantajosa para o médio e grande produtor, facilitando a utilização de diversos tipos de coprodutos (sólidos e líquidos), a economia e a redução de custos com ração. A alimentação líquida é realidade em mais da metade das granjas europeias e está se enraizando no Brasil.

Da mesma forma, a alta tecnologia tende a se fazer cada vez mais presente na produção suinícola brasileira, por meio de equipamentos completamente automatizados e computadorizados, favorecendo produtores exigentes resultando no equilíbrio entre despesas e retornos.

3 REFERÊNCIAS

BARBER, J.; BROOKS, P. H.; CARPENTER, J. L. The effects of water to food ratio on the digestibility, digestible energy and nitrogen retention of a grower ration. **Animal Production**, v. 52, p. 601, 1991.

BEAL, J. D. et al. The effect of temperature on the growth and persistence of *Salmonella* in fermented liquid pig feed. **International Journal of Food Microbiology**, v. 79, n. 1-2, p. 99-104, 2002.

BERTOL, T. M.; BRITO, B. G. Efeito do óxido de zinco x sulfato de cobre com ou sem restrição alimentar, sobre o desempenho e ocorrência de diarreia em leitões. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 24, n. 2, p. 279-288, 1995.

BRAUN, K.; LANGE, C. F. M. **Liquid swine feed ingredientes**: Nutritional quality and contaminants. Proc. ANAC Eastern Nutrition Conference, Canadá, 2004.

BROOKS, P. H.; BEAL, J. D.; NIVEN, S. Liquid feeding of pigs: potential for reducing environmental impact and for improving productivity and food safety. **Recent Advances in Animal Nutrition in Australia**, v. 13, p. 49-63, 2001.

BROOKS, P. H.; BEAL, J. D.; NIVEN, S. Liquid feeding of pigs. I. Potential for reducing environmental impact and for improving productivity. **Animal Science Papers and Reports**, v. 21, p. 1-7, 2003.

BROOKS, P. H.; CARPENTER, J. L. The water requirement of growing-finishing pigs; theoretical and practical considerations. In: HARESING, W.; COLE, D. J. A. **Recent Advances in Animal Nutrition**, London: Butterworths, 1990. p. 115-136.

CANIBE, N.; JENSEN, B. B. Fermented and nonfermented liquid feed to growing pigs: Effect on aspects of gastrointestinal ecology and growth performance. **Journal of Animal Science**, v. 81, n. 8, p. 2019-2031, 2003.

CANIBE, N.; JENSEN, B. B. Fermented liquid feed - Microbial and nutritional aspects and impact on enteric diseases in pigs. **Animal Feed Science and Technology**, v. 173, n, 1, p.17-40, 2012.

CARLSON, D.; POULSEN, H. D. Phytate degradation in soaked and fermented liquid feed-effect of diet, time of soaking, heat treatment, pitase activity, pH and temperature. **Animal Feed Science and Technology**, v. 103, n. 1, p. 141-154, 2003.

DEPREZ, P. et al. Liquid versus dry feeding in weaned piglets: the influence on small intestinal morphology. **Journnée Médecine Vétérinaire Services**, Quebec, v. 34, n. 6, p. 254-259, 1987.

DUNG, N. N. X; MANH, L. H.; OGLE, B. Effects of the Duration of Liquid Feeding on Performance and Nutrient Digestibility in Weaned Pigs. **Livestock Research for Rural Development (online)**, v. 17, n. 9, 2005.

FARZAN, A. et al. Prevalence of *Salmonella spp*. on Canadian pig farms using liquid or dry-feeding. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 73, n. 3, p. 241-254, 2006.

FEVRIER, C. **Colloque de Production Porcine**. Quebec: CPAQ-MAPA, 1985.

GEARY, T. M. **Improving the performance of weaner pigs through developments in liquid feeding**. UK: University of Plymouth, 1997.

GEARY, T. M. et al. Performance of weaner pigs fed ad libitum with liquid feed at different dry matter concentrations. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 72, n. 1, p. 17-24, 1996.

_____. Effect on weaner pig performance and diet microbiology of feeding a liquid diet acidified to pH 4 with either lactic acid or through fermentation with Pediococcus acidilactici. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 79, n. 4, p. 633-640, 1999.

HAN, Y. K., THACKER, P. A.; YANG, J. S. Effects of the duration of liquid feeding on performance and nutrient digestibility in weaned pigs. **Asian-Australasian Journal of Animal Science**, v. 19, n. 3, p. 396-401, 2006.

HMSO. **The welfare of pigs regulations**. Statutory Instrument, n. 1477, London, 1991.

HOPPENBROCK, K. H. et al. Sepiolite-SPLF effect on performance in liquid feeding systems**.** In: VAN ARENDONK, J.A.M. (ed.). **49ª EAAP Annual Meeting: Wageningen**, Netherlands, 1998. p. 266.

INSTITUT TECHNIQUE DU PORC - ITP. **Mémento de l'éleveur de porc.** Paris: ITP, 2000.

JENSEN, B. B.; MIKKELSEN, L. L. Feeding liquid diets to pigs. In: GARNSWORTHY, P. C.; WISEMAN, J. **Recent advances in animal nutrition**. Nottingham: Univ. Press Nottingham, 1998. p. 107-126.

KIM, J. H. et al. Liquid diets accelerate the growth of early-weaned pigs and the effects are maintained to market weight. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 79, n. 2, p. 427-434, 2001.

KOELEMAN, E. **Pigs benefit from fermented liquid diets**. 2010. Disponível em: <http://www.allaboutfeed.net/article-database/pigs-benefit-from-fermented-liquid-dietsid1461.html>. Acesso em: 15 abr. 2010.

KORNEGAY, E. T.; VANDER NOOT, G. W. Performance, digestibility of diet constituents and Nretention of swine fed diets with added water**. Journal of Animal Science**, v. 27, n. 5, p. 1307-1312, 1968.

LANGE, C. F. M. et al. Swine liquid feeding: nutritional considerations. In: 27TH WESTERN NUTRITION CONFERENCE, 27., 2006. Winnipeg: Manitoba, Western Nutrition Conference Committee, 2006. p. 19-20

LE TREUT, Y.; KERVENEZ, B.; RANNOU, M. La soupe em engraissement: des auges propres et des porcs qui poussent. **Porc magazine,** v. 363, p. 134-137, 2003.

LEH, W. M.; PETTINGER, K.; FORTES, E. I. **Alimentação Líquida Suína: 15 anos no Brasil**, 2013. Disponível em: <http://www.porkworld.com.br/noticia/alimentacao-liquida-suina-15-anos-no-brasil/>. Acesso em: 20 jul. 2016.

LIPTRAP, D. O.; HOGBERG, M. G. Physical Forms of Feed: feed processing and feeder design and operation. In: MILLER, E. R.; UEBREY, D. E.; LEWIS, A. J. (Eds). **Swine Nutrition**, Boston: Butterworth-Heinemann, 1991. p. 373-386.

LIZARDO, R. **Alimentación líquida del ganado porcino**. IRTA - Centro Mas Bové: Tarragona, 2003. Disponível em: <http://www.recercat.cat/bitstream/handle/2072/4547/Lizardo+-+Alimentaci%F3n+lEDquida+en+ganado+porcino.pdf;jsessionid=E8305E676CB9CC16367532E6614D9CAD.recercat1?sequence=3>. Acesso em: 05 out. 2016.

MANZKE, N. E. et al. **Novos desenvolvimentos na nutrição dos leitões nas fases de crescimento e terminação**. Porto Alegre: VI SINSUI - Simpósio Internacional de Suinocultura, 2011. Disponível em: <http://www.suinotec.com..br/arquivos_edicao/sinsui2011_05_Gustavo_Lima.pdf>. Acesso em: 20 jul. 2016.

MISSOTTEN, J. A. M. et al. Fermented liquid feed for pigs: a review. **Archives of Animal Nutrition,** v. 64, n. 6, p. 437-466, 2010.

NOGUEIRA, E.T. et al. Manejo nutricional e alimentação de suínos nas fases de recria e terminação. In: CONGRESSO DA ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE CRIADORES DE SUÍNOS - ABRAVES, 10., 2001, Porto Alegre. **Anais…** Porto Alegre: ABRAVES, 20 p, 2001. Disponível em: <http://ammcopharma.com.br/arquivos/Manejo.pdf>. Acesso em: 05 out. 2016.

ORLANDO, U. et al. Definição de programas de nutrição e alimentação para recria e terminação de suínos com foco em melhoria na conversão alimentar. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE VETERINÁRIOS ESPECIALISTAS EM SUÍNOS (ABRAVES), 14., 2009, Uberlândia. **Anais...** Uberlândia: Abraves, 2009.

PEDERSEN, C.; STEIN, H. H. Effects of liquid and fermented liquid feeding on energy, dry matter, protein and phosphorus digestibility by growing pigs. **Livestock Science**, v. 134, n. 1, p. 59-61, 2010.

PENZ JÚNIOR, A. M.; LUDKE, J. V. **Alimentação líquida para suínos em crescimento e terminação.** ITAL/CTA: Campinas, 1996. Disponível em: <http://www.bdpa.cnptia.embrapa.br/busca.jsp?baseDados=ACERVO&unidade=TODAS&fraseBusca="LUDKE,J.V."emAUT&posiçãoRegistro=7&formFiltroAction=N&view=16350>. Acesso em: 09 nov. 2011.

PLUMED-FERRER, C.; WRIGHT, A. V. Fermented pig liquid feed: nutritional, safety and regulatory aspects. **Journal of Applied Microbiology**, v. 106, n.2, p. 351-368, 2009.

REBELATTO, M. **Alimentação líquida diminui custos na produção de suínos**. Disponível em: <http://www.agrolink.com.br/noticias/brde-vai-investir-r--2-12-bilhoes-na-regiao-sul-no-ano_362039.html>. Acesso em: 30 set. 2016.

RUSSELL, P. J. et al. Performance, water use and effluent output of weaner pigs fed ad libitum with either dry pellets or liquid feed and the role of microbial activity in the liquid feed. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 72, n. 1, p. 8-16, 1996.

SCHOLTEN, R. H. J. et al. Fermented co–products and fermented compound diets for pigs: a review. **Animal Feed Science and Technology**, v. 82, n. 1, p. 1-19, 1999.

SILVA, J. L. et al. Rações com diferentes níveis de inclusão de água para suínos na fase de creche. **Ciência Animal Brasileira**, v. 12, n. 4, p. 610-616, 2011.

STRINGHINI, J. H.; RONER, M. N. B.; NUNES, R. C. **Alimentação líquida para suínos em crescimento e terminação**. Porto Feliz: Suinocultura Industrial, 2006.

TIELEN, M. J. M. et al. Risk factors and control measures for subclinical *Salmonella* infection in pig herds. In: NIELSEN, S. B.; IELSEN, J. P. **Proceedings of the Second International Symposium on Epidemiology and Control of *Salmonella* in Pork**. Copenhagen: Federation of Danish Pig Producers and Slaughterhouses, 1997. p. 32-35.

VAN DER WOLF, P. J. et al. *Salmonella* infections in finishing pigs in the Netherlands: bacteriological herd prevalence, serogroup and antibiotic resistance of isolates and risk factors for infection. **Veterinary Microbiology**, v. 67, n. 4, p. 263-275, 1999.

YAGÜE, A. P. **Alimentación líquida aplicada en ganado porcino**. Tierras de Castilla y León: Ganadería, 2007. Disponível em: <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=2290550>. Acesso em: 13 jul. 2010.

Capítulo

33

Potencial inseticida de extratos de plantas em *Sitophilus* spp.

Julianne Almeida Rodrigues[1]
Alda Trivellato Lanna Neta[2]
Joelly Mariano Barbosa[3]
Ulysses Rodrigues Vianna[4]
José Romário de Carvalho[5]

1 INTRODUÇÃO

O crescimento da população mundial refletiu no aumento na demanda de produção de alimentos (MENEZES, 2005) e a redução da população em áreas rurais e das fazendas (CARLINI; GROSSI-de-SÁ, 2002) agravou ainda mais esse problema. Para suprir à demanda cada vez maior de alimentos, ocorreu a chamada revolução verde, datada da década de 1960, levando a caracterização de uma agricultura baseada em monoculturas extensivas e de ampla utilização de fertilizantes químicos sintéticos e agrotóxicos (MENEZES, 2005).

[1] Universidade Federal do Espírito Santo, e-mail: julianne_ar@hotmail.com;
[2] Universidade Federal do Espírito Santo, e-mail: alda.neta@hotmail.com;
[3] Universidade Federal do Espírito Santo, e-mail: joellymariano@hotmail.com;
[4] Universidade Federal do Espírito Santo, e-mail: ulyssesvianna@hotmail.com;
[5] Universidade Federal do Espírito Santo, e-mail: jromario_carvalho@hotmail.com.

O uso dessas substâncias contribuiu de maneira significativa para o aumento na produção agrícola, e consequentemente foi responsável por uma série de problemas, uma vez que, o uso incorreto e de forma indiscriminada no decorrer de várias décadas levou ao acúmulo de resíduos tóxicos nos alimentos, intoxicação em produtores rurais, contaminação do solo e da água, aparecimento de pragas resistentes, a interrupção do sistema de controle biológico por meio de inimigos naturais, tendo por consequência os surtos de insetos pragas, entre muitos outros problemas (COSTA; SILVA; FIUZA, 2004; MENEZES, 2005).

Os patógenos, as pragas e as ervas daninhas constituem as ameaças mais visíveis para a sustentabilidade na produção de alimentos. Desde a Segunda Guerra Mundial, a iniciativa mais comum diante desses problemas tem sido a aplicação de agrotóxicos. O mercado mundial de agrotóxicos movimenta, anualmente, bilhões de dólares e, tradicionalmente os inseticidas mais utilizados constituem os piretróides e os fosforados, seguidos dos organoclorados. Além dos riscos que apresentam para a saúde humana, pode-se afirmar que os agrotóxicos sintéticos são responsáveis por um alto impacto ambiental (AZEVEDO, 2003).

Em função dos diversos impactos adversos em relação ao uso de agentes químicos, existe a necessidade de uma busca incessante por novos inseticidas e, nesse contexto surgem as espécies vegetais como fontes promissoras de metabólitos secundários que apresentam atividade inseticida (LEÃO, 2007).

Extratos de plantas vêm sendo utilizados pelo homem desde a Idade Antiga, numa prática que persiste até hoje. Em Honolulu, no Havaí, o botânico Salen Ahmed coordenou um projeto pelo qual catalogou mais de 2000 espécies de plantas que são reconhecidas por suas propriedades inseticidas (MARANGONI; MOURA; GARCIA, 2012).

De forma geral, existem dois objetivos nas pesquisas realizadas com plantas inseticidas, o primeiro está relacionado à descoberta de novas moléculas que permitam a obtenção de novos inseticidas sintéticos e o segundo é a obtenção de inseticidas botânicos naturais para uso direto no controle de pragas (VENDRAMIM; CASTIGLIONI, 2000).

Segundo Saito e Lucchini (1998), as substâncias presentes nas plantas, quando relacionadas ao controle de insetos, são classificadas como: análogos hormonais de insetos, repelentes e atraentes, substâncias deterrentes e toxinas.

Uma grande quantidade de substâncias obtidas a partir dos produtos do metabolismo secundário das plantas pode ser encontrada nas folhas, sementes e raízes, entre eles rotenóides, piretróides, alcalóides e terpenóides podem interferir no metabolismo de outros organismos, ocasionando impactos variáveis como repelência, deterrência alimentar e de oviposição,

esterilização bloqueio de metabolismo e interferência no desenvolvimento, sem necessariamente causar a morte (MACHADO et al., 2003).

O uso de extratos plantas, como inseticida alternativo, é uma forma de promover um controle sem desencadear os problemas provocados pelos inseticidas sintéticos químicos, que causam desequilíbrios ambientais nas culturas e demais populações vegetais e animais pertencentes ao ecossistema, podendo, ainda, poluir os recursos hídricos, desencadear o surgimento de insetos resistentes e deixar resíduos tóxicos para os animais e humanos (ALMEIDA; GOLDFARB; GOUVEIA, 1999).

Os inseticidas naturais, dentre os quais se podem destacar: o uso de produtos alternativos, como pós e extratos botânicos, e óleos essenciais de origem vegetal (ARRUDA; BATISTA, 1998), podem ser usados tanto no manejo integrado de pragas em cultivos comerciais, como também, na agricultura biológica. Esses óleos devem ser utilizados como um método de controle eficaz, para redução dos custos, preservação do ambiente e dos alimentos da contaminação química, se adequando à agricultura sustentável (KÉITA et al., 2001; ROEL, 2001).

Quando se trata de produtos armazenados, os inseticidas naturais apresentam uma importância ainda maior, visto que os resíduos químicos dos inseticidas sintéticos permanecem acumulados por mais tempo, em função de praticamente não haver atividade metabólica no vegetal e, em particular, pela não ocorrência da ação de fatores climáticos, como chuva, sol, vento e outros, o que poderia reduzir mais rapidamente o nível de resíduos nas sementes e grãos tratados (BARANEK, 2008).

A utilização de inseticidas botânicos no controle de pragas de grãos armazenados apresenta perspectivas positivas em vista da possibilidade de se controlar as condições ambientais dentro das instalações de armazenamento, potencializando a atividade do inseticida. Nestes locais, estes podem ser empregados na forma de pós, extratos (aquosos ou orgânicos) e óleos. O controle de pragas de produtos armazenados pode ser resultante da repelência ou toxicidade dos extratos botânicos, refletindo em menor crescimento da população do inseto, ocasionando redução nas perdas dos grãos armazenados (BARANEK, 2008).

O uso de plantas inseticidas é atualmente um dos métodos alternativos mais estudados em todo o mundo para controle de pragas de produtos armazenados, como os coleópteros do gênero Sitophilus. Das espécies de pragas que atacam os grãos e sementes armazenadas, a espécie *Sitophilus* spp., de notada importância econômica, é tida como das mais severas. Causando prejuízos decorrentes de danos qualitativos e quantitativos (BRAGA; GUEDES;

SILVA, 2015), ocasionando perda parcial ou total do produto, dependendo do grau de infestação.

2 PLANTAS COM POTENCIAL INSETICIDA

O uso de plantas e seus derivados como inseticida é uma prática que vem sendo adotada pelo homem desde a idade antiga (VIEGAS-JÚNIOR, 2003). Roark (1947) relatou cerca de 1.200 espécies de plantas que apresentavam esse potencial, hoje, mais de 2.000 espécies são conhecidas pelo seu potencial inseticida (SALAZAR, 1997).

No início da primeira metade do século XX, essas substâncias eram amplamente utilizadas no controle de insetos, principalmente nos países tropicais (COSTA; SILVA; FIUZA, 2004).

Os inseticidas botânicos foram muito populares e importantes entre as décadas de 30 e 40 e o Brasil foi grande produtor e exportador destes produtos, substâncias como piretro, rotenona e nicotina, que apresentam maior segurança no uso agrícola e menor impacto ambiental (MENEZES, 2005).

Estudo realizado por Lagunes e Rodrigues (1989) considera que os primeiros inseticidas botânicos foram a Nicotina, extraída do fumo (*Nicotiana tabacum* L.); a Piretrina, extraída do piretro (*Chrysanthemum cinerariaefolium* Vis.); a Retenona, extraída de *Derris* spp. e *Lonchocarpus* spp.; a Sabadina, extraídos de Sabadila (*Schoenocaulon officinale* A. Grang); e a Rianodina, extraída de *Ryania Speciosa* Vahl.

Os inseticidas naturais foram de maneira gradativa sendo substituídos pelos sintéticos, em função de problemas como variações na eficiência, devido a diferenças na concentração do ingrediente ativo entre plantas e baixo efeito residual, o que obrigatoriamente tornava necessária a realização de várias aplicações em períodos curtos (COSTA; SILVA; FIUZA, 2004).

Segundo Corrêa (2011) atualmente o interesse pelos produtos botânicos para o controle de pragas tem aumentado em função de apresentarem menores riscos à saúde humana e ao ambiente, e, por consequência do aumento da demanda por produtos alimentícios saudáveis e isentos de resíduos de agrotóxicos.

A atividade botânica de algumas substâncias inseticidas é conhecida, tais como, piretrinas, rotenona, nicotina, cevadina, veratridina, rianodina, quassinoides, azadiractina e biopesticidas voláteis. Os últimos são, normalmente, óleos essenciais presentes em plantas aromáticas (ISMAN, 2000).

Atualmente existe cerca de 400 espécies de plantas com atividade inseticida conhecida de forma popular ou científica, pertencentes a diversas famílias botânicas, e, nesse contexto, estão se tornando objeto de estudo visando melhor compreender esta relação, destaca-se, por exemplo, o Nim (*Azadirachta indica* A. Juss.) por apresentarem eficiência contra várias espécies de insetos-praga (AZEVEDO et al., 2010).

O uso de produtos alternativos advindos de extratos plantas vem sendo um forte aliado no controle de diferentes insetos, mantendo o equilíbrio ambiental, sem deixar resíduos químicos e não provocando resistência, plantas como *Azadirachta indica* e *Rosmarinus officinalis* potencial inseticida sobre larvas e adultos de *Alphitobius diaperinus* (PEGORINI et al., [2016]).

De acordo com Vicente (2014) os princípios ativos oriundos dos metabólicos secundários constituem uma promissora fonte de conhecimento para inseticidas naturais, cujos efeitos podem ser, mortalidade do inseto, repelência, atração de predadores do inseto-pragas, resistência induzida pela planta, formulação de fitotoxinas vegetais no combate ao inseto entre outros mecanismos. Assim melhor compreender o potencial de extratos vegetais pode melhor elucidar este mecanismos de interações entre inseto e plantas em favorecimento de um manejo mais sustentável sem uso de químicos.

Os metabólitos secundários produzidos pelas plantas apresentam a capacidade de afetar a biologia, o desenvolvimento fisiológico e morfológico e a reprodução dos insetos e por isso estão sendo usados em programas de manejo de pragas (ROEL, 2001).

O estudo desses metabólitos ganham destaque na área de gestão ambiental com sustentabilidade voltada ao controle de insetos, como Lepidópteros (TORRES et al., 2006), Coleópteros (DEQUECH et al., 2008) e Hemípteros (NERI et al., 2006) na agricultura e, também, no controle de pragas urbanas. São conhecidos, atualmente, aproximadamente cem mil compostos eco quimicamente ativos (LARCHER, 2000).

Em várias famílias são encontradas plantas com atividade alelopática, e as espécies botânicas mais promissoras, como fontes de substâncias inseticidas, pertencem às famílias Anacardiaceae, Anonaceae, Asteraceae, Cannellaceae, Lamiaceae, Leguminosae, Meliaceae, Mirtaceae e Ruraceae (JACOBSON, 1989).

Mesmo apresentando vantagens, como toxicidade baixa a moderada para mamíferos, baixa fitotoxidade e maior seletividade, ação e degradação rápidas, os inseticidas botânicos também apresentam algumas desvantagens como necessidade de utilização de composto sinergista, baixa persistência, carência de pesquisas, escassez do recurso natural, necessidade de padronização química e controle de qualidade, dificuldade de registro e custo. Além disso,

a falta de dados relacionados à fitotoxicidade, à persistência e aos efeitos sobre organismos benéficos e as dificuldades relacionadas ao isolamento de princípios ativos e a concentração em diferentes partes vegetais, também são algumas barreiras a serem rompidas e mais estudos nesta área são necessários (COSTA; SILVA; FIUZA, 2004; ISMAN, 2000; MENEZES, 2005).

Os inseticidas botânicos podem causar a morte dos insetos, visto que, estes podem apresentar ação tóxica, atuando sobre o sistema nervoso central. É importante notar que muitas substâncias que apresentam ação tóxica aos insetos, podem apresentar também efeitos similares no homem (MENEZES, 2005).

Os extratos vegetais com atividade inseticida constituem uma alternativa importante de controle de insetos-praga em pequenas áreas de cultivo, como as hortas, e pequenos armazéns de grãos situação na qual a produção de extratos torna-se viável (BRUNHEROTTO; VENDRAMIM, 2003; DEQUECH et al., 2008).

Extrato de diversos vegetais vem sendo empregado para o controle de pragas conforme Almeida, Goldfarb e Gouveia (1999), Bandeira et al. (2009) e Mazzonetto e Vendramim (2003).

Rathi et al. (2008) realizaram uma triagem fitoquímica em dez plantas que apresentam atividade inseticida, entre elas: *Adathoda vasica*, *Cynodon dactylon*, *Eclipta alba*, *Morinda pubescens*, *Ocimum tenuiflorum*, *Phyllanthus amarus*, *Sesbania grandifolora*, *Solanum surattense*, *Solanum trilobatum* e *Vinca rosea*. Várias misturas de solventes foram utilizadas como extrator. Foram encontrados taninos, importante classe de compostos que agem como uma barreira a insetos herbívoros, e flavonoides na maior parte das plantas estudadas.

Murugesan e Murugesh (2008) testaram, também, dez extratos diferentes de *Azadirachta indica* (extrato das folhas de Nim), extrato das folhas de *Calotropis gigantea*, extrato das folhas de *Lantana camara*, torta de Nim, óleo de Nim, Nimbecidine®, extrato de folhas de *Pongamia glabra*, extrato de folhas de *Prosopis juliflora* L., extrato de folhas de *Vitex negundo*, e extrato de alho, *Allium sativum*. O teste revelou redução da população de *Henosepilachna vigintioctopunctata* Fabricius (Coleoptera: Coccinellidae) entre 87,86 e 71,97% após o terceiro dia de pulverização, sendo que o melhor resultado foi conseguido com o óleo de Nim. Entretanto a eficácia dos extratos foi reduzida ao passar dos dias após a pulverização.

Irulandi et al. (2008) relatam diferenças entre a atividade inseticida apresentada por extratos botânicos contra a broca do café, *Hypothenemus hampei* (Ferrari) (Coleoptera: Scolytidae), em estudos laboratoriais e estudos no campo. O extrato de Nim, por exemplo, apresentou maior atividade inseticida quando testado em laboratório do que quando testado nas

plantações. Segundo os autores os resultados discrepantes podem ser explicados pela ação solar sobre os extratos levando a fotodegradação.

Henriques (2011) destaca que o extrato aquoso das folhas de mamona é eficaz no controle de inúmeras pragas, como formigas, cupins, ácaros, lagartas, moluscos, piolhos e pulgas, além de fungos e vírus causadores de doenças na agropecuária. Apresenta, ainda, propriedades microbianas e filaricida (vermífuga).

Mazzonetto e Vendramim (2003) observaram que pós de folhas de eucalipto (*E. citriodora*) e de frutos de cinamomo (*M. azedarach*) provocaram repelência nos adultos do caruncho do feijão *Acanthoscelides obtectus* (Say) (Coleoptera: Bruchidae). Já Bueno e Andrade (2010) observaram em seu estudo que o óleo de eucalipto apresentou repelência intermediária (72,7%) às fêmeas de *Aedes albopictus* (Skuse) (Diptera: Culicidae).

Em estudo com óleo de eucalipto diante do caruncho do milho *Sitophilus zeamais* Motschulsky (Coleoptera: curculionidae), houve atividade inseticida a 65% após 24 horas (SANDI; BLANCO, 2007). Já um trabalho realizado com essa mesma espécie de caruncho do milho, os autores verificaram que o óleo de eucalipto possui baixa repelência, porém em altas concentrações, causa a mortalidade deste inseto (PINTO JUNIOR et al., 2010).

3 EXTRATOS DE PLANTAS PARA O CONTROLE DE PRAGAS COM ÊNFASE EM *Sitophilus* spp.

Estima-se que no Brasil cerca de 20% da produção de grãos são perdidos todos os anos no processo de colheita e pós-colheita (BRAGA; ROSSI; PINTO, 2010). Na pós-colheita a maior parte das perdas está relacionada a problemas, sendo que apenas os insetos praga de produtos armazenados podem ser responsáveis por cerca de 10%, ou seja, um montante em torno de 15 milhões de toneladas considerando a safra de 2010/11, ou seja, 150 milhões de toneladas (BRASIL, [2016]).

Das espécies de pragas que acometem os grãos e sementes armazenadas, a espécie *Sitophilus* spp., de notada importância econômica, é tida como das mais severas. Os prejuízos causados decorrem de danos qualitativos e quantitativos (BRAGA; ROSSI; PINTO, 2010), podendo ocasionar perdas totais ou parciais, dependendo do grau de infestação.

Os adultos da espécie *Sitophilus* spp. são caracterizados por apresentar alto potencial biótico, infestação cruzada, polifagia e alta capacidade de adaptação; características que os tornam resistentes em relação ao controle alternativo (ALMEIDA; GOLDFARB; GOUVEIA, 1999).

O gorgulho do arroz, *Sitophilus oryzae* (Linnaeus) (Coleoptera: Curculionidae), é um bastante semelhante ao *S. zeamais* quanto à biologia, etologia e características morfológicas das formas jovens e adultas. As formas adultas de *S. oryzae* e *S. zeamais* podem ser diferenciadas por características externas, mas, é mais segura à identificação proposta por KUSCHEL, em 1961, diferenciando essas duas espécies por meio de características da genitália (PACHECO; PAULA, 1995).

O *S. oryzae* é um inseto cosmopolita, supostamente advindo da Índia e, disseminado pelo mundo através de grãos infestados em navios (METCALF; FLINT, 1962). Pode ser encontrado em todas as regiões quentes e tropicais do mundo. Constitui praga primária do arroz, milho, trigo e sorgo armazenados, mas pode infestar os grãos ainda no campo. Desenvolve-se também em produtos cereais processados, como mandioca desidratada e macarrão (GALLO et al., 2002).

De acordo com Puzzi (1986) os danos ocasionados pelo gorgulho *S. oryzae*, em arroz armazenado a granel, chega a 9,2% de perdas em peso. Gallo et al. (2002) através de seu trabalho relata que os danos provocados por *Sitophilus* spp. em arroz é de 10 a 15% no estado do Rio Grande do Sul.

Inúmeras maneiras naturais de controle dessa praga tem sido pesquisadas, podendo mencionar os resultados de Saljoqi et al. (2006) que a partir de testes com extratos alcoólicos das raízes de *Cymbopogon citratus*, folhas e frutos de *Melia azadarach*, folhas de *Mentha longifolia* e *Myrtus communis* e de ramos e sementes de *Peganum harmala*, para repelir e combater o gorgulho do arroz *S. oryzae*, observaram maior repelência quando os grãos foram tratados com extratos de folhas de *M. azadarach*, repelindo em torno de 74% dos insetos até 48 horas, ocorrendo após isso, uma redução na porcentagem de repelência. Em relação à sobrevivência, o extrato de frutos de *M. azadarach*, causou a maior mortalidade (82%) no sexto dia após o tratamento.

Yankanchi e Gadache (2010), por meio de um trabalho com extratos alcoólicos de *Clerodendrum inerme*, *Withania somnifera*, *Gliricidia sepia*, *Cassia tora* e *Eupatorium odoratum* para controlar de *S. oryzae*, verificaram que os extratos de *C. inerme* e *W. somnifera* foram os mais eficientes dentre os extratos testados, ocasionando mortalidades de 86,6 e 73,3% respectivamente, ambos na dose 5% e aos 21 dias do tratamento.

Franz, Knaak e Fiuza (2011), avaliando a toxicidade do óleo essencial de *Cymbopogon citratus* (folhas), *Zingiber officinale* (raizes) e *Mentha* sp. (folhas) a *S. oryzae* por contato e fumigação, constataram que o óleo essencial de *C. citratus* apresentou maior eficiência sobre esse inseto, causando 70 e 100% de mortalidade com 24 e 48 horas respectivamente. Pelo

método de fumigação, o óleo essencial de *Z. officinale*, causou maior mortalidade (70%) com menor tempo de exposição (24 horas).

O gorgulho *S. zeamais* destaca-se como uma das mais prejudiciais pragas que acometem grãos armazenados, pelo grande número de hospedeiros, elevado potencial biótico, capacidade de penetração na massa de grãos e infestação cruzada, o que ocasiona danos, principalmente, aos grãos de milho, arroz e trigo (GALLO et al., 2002).

O controle desses insetos tem sido realizado por meio de produtos químicos. Pesquisas atuais e o conhecimento dos efeitos indesejáveis do uso indiscriminado desses produtos, associado à preocupação dos consumidores quanto à qualidade de alimentos, têm incentivado estudos sobre novas técnicas de controle (TAVARES, 2002).

Nesse contexto, plantas com ação inseticida têm sido utilizadas como método alternativo de controle por meio de produtos com formulação em pó, óleos e extratos contra as principais pragas que acometem os grãos armazenados e no campo (ESTRELA et al., 2006).

Souza e Trovão (2009) fazendo uso de extratos secos de nim (*Azadiractha indica*), angico (*Anadenanthera macrocarpa*), craibeira (*Tabebuia caraiba*), faveleira (*Cnidosculus quercifolius*), para tratar grãos de milho, contra *S. zeamais*, observaram que apenas o *A. indica* apresentou a capacidade de combater esse inseto com 70% de mortalidade de adultos, e a espécie *C. quercifolius* foi considerada pelos autores como ovicida e/ou larvicida.

Coitinho et al. (2006) testando os óleos de andiroba (*Carapa guianensis* Aubl.), copaíba (*Copaifera* sp.), eucalipto (*Eucaliptus globulus* Labill. e *Eucaliptus citriodora* Hook.), nim (*Azadirachta indica* A. Juss), eugenol, pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.), alecrim (*Lippia gracillis* HBK.) e cedro (*Cedrela fissilis* Vell.), em adultos de *S. zeamais* concluiu que os óleos de *E. globulus*, eugenol, *L. gracillis* e *A. indica* na dose de 50µL/20g apresentaram maior toxicidade aguda, causando 100% de mortalidade em adultos de *S. zeamais* em grãos de milho. Os óleos de *C. brasiliense*, *C. fissilis*, *C. guianensis*, *E. citriodora* e *Copaifera* sp. provocaram mortalidade de 95; 92,5; 90; 87,5 e 20%, respectivamente. Com exceção de *Copaifera* sp., que reduziu a emergência de adultos em 51%, a redução causada pelos óleos foi de 100%. Comparando-se os efeitos na mortalidade e na emergência causados por *Copaifera* sp., evidencia-se a ocorrência de ação ovicida/larvicida deste óleo sobre *S. zeamais*.

Almeida et al. (2013) testando extratos a partir de folhas, ramos e frutos de Melão-de-São-Caetano (*Momordica charantia* L.) e de frutos de pimenta Dedo-de-Moça (*Capsicum baccatum* L.), em concentrações que variavam de 2 a 10 ml e com 48h de exposição obtiveram resultados de 100% de mortalidade nas concentrações de 6, 8 e 10 ml de *Capsicum baccatum*

(frutos) e em concentrações de 8 e 10 ml com a *Momordica charantia* (planta completa e frutos).

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os extratos de plantas constituem, sem dúvida, um importante potencial contra organismos indesejáveis que acometem os grãos usados na alimentação humana e de animais, desde o campo até o destino final do produto, tal importância se deve, principalmente, a sua baixa persistência nos mais variados ambientes, além de sua eficácia no controle de insetos, destacando os do gênero Sitophilos, responsável por perdas significativas nas produções. Apesar da perspectiva promissora, ainda é necessário intensificar os estudos afim de se obter uma melhor caracterização e forma de uso dos extratos das plantas.

5 REFERÊNCIAS

ALMEIDA, F. A. C.; GOLDFARB, A. C.; GOUVEIA, J. P. G. Avaliação de extratos vegetais e métodos de aplicação no controle de *Sitophilus* spp. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, v. 1, n. 1, p. 13-20, 1999.

ALMEIDA, F. A. C. et al. Extratos botânicos no controle de Sitophilus zeamais Motschulsky 1885 (Coleoptera: Curculionidae). **Revista Verde**, v. 8, n. 3, p. 163-168, 2013.

ARRUDA, F. P.; BATISTA, J. L. Efeito da luz, de óleos vegetais e de cultivares de caupi na infestação do caruncho *Callosobruchus maculatus* (Fabr., 1775) (Coleoptera: Bruchidae). **Revista Caatinga**, v. 11, n. 1-2, p. 53-57, 1998.

AZEVEDO, F. A. **As bases toxicológicas da ecotoxicologia**. São Carlos-SP: Rima Intertox, 2003.

AZEVEDO, A. I. B. et al. Bioatividade do óleo de nim sobre *Alphitobius diaperinus* (Coleoptera: Tenebrionidae) em sementes de amendoim. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**. v.14, n. 3, p. 309-313, 2010.

BANDEIRA, R. D. C. C. et al. Composição volátil dos defeitos intrínsecos do café por CG/EM-headspace. **Química Nova**, v. 32, p. 309-314, 2009.

BARANEK, E. J. **Estudo da suscetibilidade de *Sitophilus zeamais* (Coleoptera: Curculionidae) ao óleo de nim (*Azadirachta indica* A. Juss)**. 2008. 36 f. Monografia (Grau de Engenheiro Agrônomo) – Curso de Agronomia, Universidade Estadual de Ponta Grossa, Ponta Grossa, 2008.

BRAGA, G. C.; GUEDES; R. N. C., SILVA, F. A. P. Avaliação da eficiência de inseticidas, isolados e em misturas, no controle de *Sitophilus zeamais* Motschulsky (Coleoptera: curculionidae) em milho armazenado. **Revista Ceres**, v. 38, n. 220, p. 522-528. 2015.

BRAGA, B. M.; ROSSI, M. M.; PINTO, A. S. Perdas ocasionadas por *Sitophilus* spp., em genótipos comerciais de milho, em condições de laboratório. **Nucleus**, v. 7, n. 1, p. 233-242. 2010.

BRASIL. Companhia Nacional de Abastecimento. **Balanço de oferta e demanda**. Disponível em: <http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/1demanda_brasileira.pdf.>. Acesso em: 14 abr. 2016.

BRUNHEROTTO, R.; VENDRAMIM, J. D. Bioatividade de Extratos Aquosos de *Melia azedarach L*. Sobre o Desenvolvimento de *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae) em Tomateiro. **Neotropical Entomology**, v. 30, p. 455-459, 2003.

BUENO, V. S.; ANDRADE, C. F. S. Avaliação preliminar de óleos essenciais de plantas como repelentes para *Aedes albopictus* (Skuse, 1894) (Diptera: Culicidae). **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v. 12, n. 2, p. 215-219, 2010.

CARLINI, C. R.; GROSSI-DE-SÁ, M. F. Plant toxic proteins with insecticidal properties. A review on their potentialities as bioinsecticides. **Toxicon**, v. 40, n. 11, p. 1515-39, 2002.
COITINHO, R. L. B. C. et al. Atividade inseticida de óleos vegetais sobre *Sitophilus zeamais* Mots. (Coleoptera: Curculionidae) em milho armazenado. **Caatinga**, v. 19, n. 2, p. 176-182, 2006.

CORRÊA, R. da S. Toxicidade de extratos de timbós (*Derris* spp.) sobre *Tetranychus desertorum* (Acari: Tetranychidae) em folhas de pimentão. 2011. 72 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia, área de concentração em Conservação e uso de recursos genéticos vegetais da Amazônia). Universidade Federal do Amazonas, Manaus-AM. 2011.

COSTA, E. L. N.; SILVA, R. F. P.; FIUZA, L. M. Efeitos, aplicações e limitações de plantas inseticidas. **Acta Biologica Leopoldensia**, v. 26, n. 2, p. 173-185, 2004.

DEQUECH, S. T. B. et al. Efeito de extratos de plantas com atividade inseticida no controle de Microtheca ochroloma Stal (Col.: Chrysomelidae), em laboratório: **Biotemas**, v. 21, n. 1, p. 41-46, 2008.

ESTRELA, J. L. V. et al. Toxicidade de óleos essenciais de *Piper aduncum* e *Piper hispidinervum* em *Sitophilus zeamais*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 41, n. 2, p. 217-222, 2006.

FRANZ, A. R.; KNAAK, N.; FIUZA, L. M. Toxic effects of essential plant oils in adult *Sitophilus oryzae* (Linnaeus) (Coleoptera, Curculionidae). **Revista Brasileira de Entomologia**, v. 55, n. 1, p. 116-120, 2011.

GALLO, D. et al. **Manual de entomologia agrícola**. Fundação de Estudos Agrários Luiz de Queiroz, Piracicaba, Brasil, 2002.

HENRIQUES, A. Nutrição e controle de pragas e doenças com folhas de mamoneira. Agro Ecológico: Informativo Técnico do Sindicato dos Trabalhadores em Assistência Técnica e Extensão Rural do Estado de Minas Gerais, n. 1, p. 3, fev., 2011.

IRULANDI, S. et al. Effect of botanical insecticides on coffee berry borer, *Hypothenemus hampei* (Ferrari) (Coleoptera: Scolytidae). **Journal of Biopesticides**, v. 1, n. 1, p. 70-73, 2008.

ISMAN, M. B. Plant essential oils for pest and disease management. **Crop Protection**, v. 19, p. 603-608, 2000.

JACOBSON, M. Botanical pesticides: past, present and future. In: ARNASON, J. T.; PHILOGENE, B. J. R.; MORAND, P. (Ed.). **Insecticides of plant origin**. Washington: American Chemical Society, 1989. p. 110-119.

KÉITA, S. M. et al. Efficacy of essencial oil of *Ocimum basilicum* L. and *O. gratissimum* L. applied as an insecticidal fumigant and powder to control *Callosobruchus maculates* (Fab.) (Coleoptera: Bruchidae). **Journal of Stored Products Research**, v. 37, p. 339-349, 2001.

LAGUNES, T. A.; RODRÍGUEZ, H. C. **Busqueda de tecnologia apropriada para el combate de plagas del maiz almacenado en condiciones rústicas**. Chapingo: [s.n.], 1989.

LARCHER, W. **Ecofisiologia vegetal**. São Carlos: Rima, 2000.

LEÃO, J. D. J. **Bioatividade de extratos vegetais no controle de *Sitophilus oryzae* (LINNÉ, 1763) em arroz**. 2007. 91 f. Tese (Doutorado em agronomia) - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria. 2007.

MACHADO, T.B. et al. In vitro activity of Brasilian medicinal plants, naturally ocorring naphthoquinones and their analougues, against methicilin-resistant *Staphylococcus aureus*. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 21, n. 3, p. 279-284, 2003.

MARANGONI, C.; MOURA. N. F.; GARCIA, F. R. M. Utilização de óleos essenciais e extratos de plantas no controle de insetos. **Revista de Ciências Ambientais**, v. 6, n. 2, p. 95-112, 2012.

MAZZONETTO, F.; VENDRAMIM, J. D. Efeito de pós de origem vegetal sobre *Acanthoscelides obtectus* (Say) (Coleoptera: Bruchidae) em feijão armazenado. **Neotropical Entomology**, v. 32, n. 1, p. 145-149, 2003.

MENEZES, E. L. A. **Inseticidas botânicos:** seus princípios ativos, modo de ação e uso agrícola. Seropédica-RJ: Embrapa Agrobiologia, 2005.

METCALF, C. L.; FLINT, W. P. **Destructive and useful insects**: their habit and control. New York & London: Mc Graw Hill, 1962.

MURUGESAN, N.; MURUGESH. T. Efficacy of some plant products against spotted Leaf beetle (Hadda beetle), *Henosepilachna vigintiooctopunctata* (F.) in Brinjal. **Journal of Biopesticides**, v. 1, n. 1, p. 67-69, 2008.

NERI, D. K. P. et al. Efeito do Extrato Aquoso de Nim Sobre *Bemisia Tabaci* Biótipo B (Gennadius) (Hemiptera: Aleyrodidae), em Meloeiro. **Revista Verde**, v. 1, n. 2, p. 48-53, 2006.

PACHECO, I. A.; PAULA, D. C. **Insetos de grãos armazenados:** identificação e biologia. Campinas-SP: Fundação Cargill, 1995. 228p.

PEGORINI, C. S. et al. **Atividade inseticida de*Azadirachta indica* e *Rosmarinus officinalis* sobre *Alphitobius diaperinus* (PANZER) (COLEOPTERA: TENEBRIONIDAE).** Disponível em: <web.dv.utfpr.edu.br:448/ seer/index.php/SSPA/article/viewFile/451/204>. Acesso em: 02 abr. 2016.

PINTO JUNIOR, A.R. et al. Bioatividade de óleos essenciais de sassafrás e eucalipto em cascudinho. **Ciência Rural**, v. 40, n. 3, p. 637-643, 2010.

PUZZI, D. **Abastecimento e armazenagem de grãos**. Campinas: Instituto Campineiro de Ensino Agrícola, 1986.

RATHI, J. M. et al. Qualitative phytochemical screening of some locally available insecticidal plants. **Journal of Biopesticides**, v. 1, n. 1, p. 52-54, 2008.

ROARK, R. C. Some promising insecticidal plants. **Economic Botany**, v. 1, p. 437-445. 1947.

ROEL, A. R. Utilização de plantas com propriedades inseticidas: uma contribuição para o Desenvolvimento Rural Sustentável. **Revista Internacional de Desenvolvimento Local**, v. 1, n. 2, p. 43-50, 2001.

SALAZAR, E. C. **Inseticidas e acaricidas**. Pelotas: UFPelotas, 1997.

SALJOQI, A. U. R. et al. Effects of six plant extracts on rice weevil *Sitophilus oryzae* L. in the stored wheat grains. **Journal of Agricultural and Biological Science**. v. 1, n. 4, 2006.

SAITO, M. L.; LUCCHINI, F. **Substâncias Obtidas de Plantas e a Procura por Praguicidas Eficientes e Seguros ao Meio Ambiente**. Série Documentos Nº 12. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente. 1998.

SANDI, J. T. T.; BLANCO, R. F. Atividade inseticida do óleo essencial obtido de eucalipto, *Eucalyptus globulus* Labill (Myrtaceae), sobre o gorgulho do milho, *Sitophilus zeamais* (Coleoptera: Curculionidae). **Revista de Biologia e Saúde da UNISEP**, v. 1, n. 1-2, 2007.

SOUZA, M. C. C.; TROVÃO, D. M. B. M. Bioatividade do extrato seco de plantas da caatinga e do Nim (*Azadiractha indica*) sobre *Sitophilus zeamais* Mots em milho armazenado. **Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável**, v. 4, n. 1, p. 120-124, 2009.

TAVARES, M. A. G. C. **Bioatividade da erva-de-santa-maria, *Chenopodium ambrosoides* L. (Chenopodiaceae), em relação a *Sitophilus zeamais* Mots., 1855 (Col: Curculionidae)**. 2002. 59 f. Dissertação (Mestrado) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba. 2002.

TORRES, A. D. et al. Efeito de extratos aquosos de *Azadirachta indica*, *Melia azedarach* e *Aspidospermaspyrifolium* no desenvolvimento e oviposição de *Plutella xylostella*. **Bragantia**, v. 65, n. 3, p. 447-457, 2006.

VENDRAMIM, J. D.; CASTIGLIONI, E. Aleloquímicos, Resistência de plantas e plantas inseticidas. In: GUEDES, J. C.; COSTA, I. D.: CASTIGLIONI, E. (Eds.). **Bases e técnicas do manejo de insetos**. Santa Maria: UFSM/CCR/DFS, 2000. p. 113-128.

VICENTE, R. R. Avaliação da repelência de extratos vegetais sobre a barata *Periplaneta americana* (L.) visando contole alternativo de pragas e a redução de impactos ambientais. (**Monografia de especialização**). Universidade Tecnológica Federal do Paraná –UTFPR – Campus Medianeira. Medianeira. 2014.

VIEGAS-JUNIOR, C. Terpenos com atividade inseticida: uma alternativa para o controle químico de insetos. **Química Nova**, São Paulo, v. 26, n.3, p.390-400, 2003.

YANKANCHI, S. R.; GADACHE, A. H. Grain protectant efficacy of certain plant extracts against rice weevil, *Sitophilus oryzae* L. (Coleoptera: Curculionidae). **Journal of Biopesticides**, v. 3, n. 2, p. 511-513, 2010.

UFES 60 anos

PPGCV

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
CIÊNCIAS VETERINÁRIAS
CCAE-UFES