

UNIVERSIDADE DO ESTADO DE SANTA CATARINA - UDESC
CENTRO DE CIÊNCIAS AGROVETERINÁRIAS - CAV
DEPARTAMENTO DE CLÍNICA E PATOLOGIA
MESTRADO EM CIÊNCIA ANIMAL

FERNANDA JÖNCK

INTOXICAÇÃO ESPONTÂNEA E EXPERIMENTAL POR
NITRATO/NITRITO EM BOVINOS ALIMENTADOS COM *Avena sativa*
(AVEIA) E/OU *Lolium spp.* (AZEVÉM).

LAGES, SC

2010

FERNANDA JÖNCK

**INTOXICAÇÃO ESPONTÂNEA E EXPERIMENTAL POR
NITRATO/NITRITO EM BOVINOS ALIMENTADOS COM *Avena sativa*
(AVEIA) E/OU *Lolium spp.* (AZEVÉM).**

Dissertação apresentada à coordenação do curso de Mestrado em Ciência Animal, como requisito para a obtenção do título de Mestre.

Orientador: Dr. Aldo Gava

Co-orientadora: Dr.^a Sandra Davi Traverso

LAGES, SC

2010

FERNANDA JÖNCK

**INTOXICAÇÃO ESPONTÂNEA E EXPERIMENTAL POR
NITRATO/NITRITO EM BOVINOS ALIMENTADOS COM *Avena sativa*
(AVEIA) E/OU *Lolium spp* (AZEVÉM).**

Dissertação aprovada pela coordenação do curso de Mestrado em Ciência Animal, como requisito para a obtenção do título de Mestre.

Banca examinadora:

Orientador:



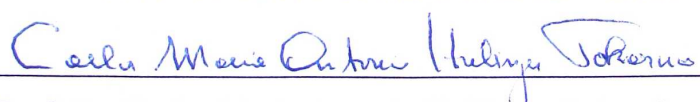
Prof. Dr. Aldo Gava
Universidade do Estado de Santa Catarina - UDESC

Co-orientadora:



Prof.ª Dr.ª Sandra Davi Traverso
Universidade do Estado de Santa Catarina - UDESC

Membro:



Prof. Dr. Carlos Maria Antonio Hübinger Tokarnia
Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro – UFRRJ –
Instituto de Zootecnia.

Membro:



Prof. Dr. David Driemeier
Universidade Federal do Rio Grande do Sul – UFRGS.

Lages, 26 de novembro de 2010.

Dedico

À minha mãe Cristina, ao meu pai Jaime, meu irmão Leandro, e à minha tia Vera, que sempre estiveram ao meu lado, me apoiando, incentivando, e pela maior herança de amor, caráter e bom exemplo.

AGRADECIMENTOS

É preciso agradecer! Uma vez que todo trabalho exige e necessita da dedicação, envolvimento e paciência de muita gente.

Primeiramente agradeço à Deus e as pessoas que convivi durante esse período de mestrado, por proporcionarem tudo aquilo que precisei para meu crescimento pessoal, tanto pelos bons momentos, quanto os não tão bons, pois é através deles que nos tornamos mais fortes e capazes de escolher o melhor caminho a seguir.

À minha família, principalmente minha mãe e meu pai pelo apoio nas horas difíceis, pela força, e incentivo. São meus exemplos de vida, trabalho e amor. Aos meus avós, Edith e Ahilton, que acreditaram em mim desde o início, e sempre me apoiaram. A minha tia Vera, pessoa muito especial, a qual tenho muito respeito e admiração, pelo carinho, incentivo e ajuda a qualquer hora. São pessoas que me proporcionaram a realização dessa etapa. Agradeço pela força, principalmente nas horas difíceis em que há a vontade de desistir.

Agradeço em especial ao meu maior exemplo de trabalho, perseverança, dissenimento, humildade e amor ao que faz. Pelo jeito especial com que vê nas pessoas uma semente que pode crescer. Pela insistência, por me mostrar um novo caminho, cheio de descobertas e identificações. Muito obrigada meu Orientador, Professor e Amigo Aldo Gava, por acreditar em mim, pela confiança depositada, pelo apoio e ajuda em todas as horas. Pelos ensinamentos de Patologia, Plantas Tóxicas e principalmente de VIDA!

A minha co-orientadora professora Sandra Davi Traverso, pelos ensinamentos e orientação.

Ao Laboratório de Patologia, o qual foi fundamental nos ensinamentos profissionais e pessoais, onde pude ter exemplos de profissionalismo e ética, amizade, bom caráter e companheirismo. Obrigada aos professores, mestrandos, bolsistas, funcionários e estagiários pelos bons momentos e ajuda quando necessária. Obrigada Adelmo, Dona Iane, Alencar, Bruno, Roberto, Fernanda, Valdecir, Marcelo, Kialane, Claudia, Claudine, Guilherme, Kívia, Daniel, Michelle, Thalita, Lucila, Cecília, Tiffany, Marcos, Renata, Carina, Samantha, Leíse, Professor Ademir Mondadori. Em especial, algumas pessoas que conheci no laboratório, que marcaram pela amizade e carinho, a Vanessa, Joelma e o Diego.

Ao Fernando por me apresentar a Patologia.

À minha “mãe” do Laboratório, a Sandra secretária, pelo carinho e cuidado especial que só uma mãe pode ter. Muito obrigada Sandrinha!

À minha amiga e irmã de coração, Luciane, por me ensinar, me escutar, me entender, me consolar, me amar do jeito que sou, pela confiança e amizade que só nós duas podemos medir o tamanho que tem. Muito obrigada por tudo Lu!!

À minha companhia de “quadrado”, amiga abençoada Daniela, pelos inúmeros abraços nos dias de carência, pelas delícias e pelos agrados, mas principalmente pelo carinho e exemplo de boa conduta.

Às amigas e amigos da república Black Tie e associados: Emanuela, Luana, Elisandra, Rosiane, Patricia, Rodrigo, Roger, Richard, Hêlo, Dreyce, Manuela, Cilene, Dona Donzília, tia Mida, Luciana, Tamiris e Helen, pelas horas de descontração companheirismo, risadas e apoio e carinho. Principalmente à Manu, pelas muitas horas de caminhada, e por ouvir minhas histórias e lamentações.

Aos amigos Dona Vilma e Seu Arno Sens, pelas inúmeras caronas, conversas e apoio.

Aos veterinários de campo, principalmente ao Edgar Gueller, Kátia Sbruzi, Eduardo Perez que nos chamaram e auxiliaram nos levantamentos da doença, tendo papel fundamental nessa dissertação.

Àos colegas Jovani Zalamena e Fabrício T. Barbosa pelo auxílio nas análises de nitrato.

À CAPES pela concessão da bolsa de demanda social.

E a todos aqueles que de forma direta ou indireta tiveram participação.

À TODOS MUITO OBRIGADA!

"A melhor de todas as coisas é aprender. O dinheiro pode ser perdido ou roubado, a saúde e força podem falhar, mas o que você dedicou à sua mente é seu para sempre."

Louis L'Amour

“A mente que se abre a uma nova idéia jamais voltará ao seu tamanho original.”

Albert Einstein

RESUMO

Descrevem-se os dados epidemiológicos, sinais clínicos e lesões da intoxicação espontânea e experimental por nitrato e nitrito em bovinos que pastoreiam em pastagens de aveia (*Avena sativa*) e azevém (*Lolium spp*), o teste da Difenilamina e os teores de nitrato nas amostras de pastagens onde ocorreram os surtos. A enfermidade ocorre em diferentes regiões do estado de Santa Catarina, quando as pastagens tem crescimento exuberante, após receberem quantidades excessivas de adubo químico e/ou orgânico, principalmente quando ocorrem condições climáticas de seca e posteriormente chuva. Os animais em contato com essas pastagens desenvolveram rapidamente mucosas de coloração marrom, taquipnéia, andar cambaleante, micção frequente, timpanismo, decúbito lateral e morte em poucos minutos, ou recuperação algumas horas após. Na necropsia de quatro animais que adoeceram espontaneamente, as principais lesões encontradas foram a coloração marrom das mucosas, a cor escura do sangue (cor de chocolate) e a coloração vermelho intensa da musculatura esquelética e do miocárdio esquerdo. A reprodução experimental da doença foi realizada em sete bovinos, com pastagens de quatro propriedades onde ocorreu a doença. Aveia e azevém verdes e sob a forma de feno foram administradas aos bovinos, destes quatro morreram, dois adoeceram e recuperam-se, um naturalmente e outro com a aplicação de azul de metileno a 1%, na dose de 2 mg/kg/peso vivo, e um bovino não apresentou alterações. Os sinais clínicos observados e lesões dos animais que adoeceram e morreram foram idênticos aos casos naturais. Alterações microscópicas não foram observadas nos casos naturais e experimentais. O teste da difenilamina resultou positivo em todas as propriedades em que ocorreram os surtos. A análise bromatológica realizada em amostras coletadas de várias propriedades em que ocorreram surtos da enfermidade variaram de 0,30% a 3,36% de nitrato na matéria seca. A enfermidade caracterizou-se principalmente por respiração ofegante, sangue de coloração escura, mucosas de coloração marrom e morte rápida de bovinos e está relacionada á ingestão de pastagens de aveia e azevém superadubadas, que acumularam alto teor de nitrato, após um período de chuvas precedido de seca.

Palavras-chave: Nitrato/nitrito; metemoglobinemia; Aveia (*Avena sativa*); Azevém (*Lolium spp*); Azul de Metileno; Teste da Difenilamina

ABSTRACT

Epidemiological data, clinical and pathological findings of the spontaneous and experimental poisoning by nitrate and nitrite in cattle fed by oats (*Avena sativa*) and ryegrass (*Lolium* spp), diphenylamine test, and the nitrate content in the samples of the pasture where the outbreaks occurred are described. The disease occurs in different regions of the state of Santa Catarina, in which pastures have exuberant growth, after receiving excessive amounts of chemical and/or organic fertilizer, mainly when raining occurs after a period of dry wheather. The animals grazing these pastures quickly developed brown mucosa, tachypnea, staggering gait, frequent urination, bloating, lateral recumbency and death in few minutes or hours. At necropsy of four animals that died spontaneously, the main lesions found were brown mucosa, dark color of the blood (chocolate), intense red color of the skeletal muscles and of the left part of the myocardium. The experimental reproduction of the disease was performed in seven cattles, with pastures of four farms where the disease occurred. The animals were fed with fresh and hay oats and ryegrass. Four animals died, two became ill and recovered, and one was treated with 2 mg / kg per body weight methylene blue 1%, and one cattle did not show changes. Clinical signs and lesions of the sickened and died animals were similar to natural cases. Microscopic changes were not observed in spontaneous and experimental poisoning. The diphenylamine test was positive in all the farms where the outbreaks occurred. The chemical analysis performed on samples of pasture from several farms in which outbreaks of the disease occured ranged from 0.30% to 3.36% of nitrate in the dry matter. The disease is associated with the ingestion of oats and ryegrass pastures heavily fertilizer, which accumulates high levels of nitrate after a period of rain and is characterized by rapid breathing, dark-colored blood, brown mucous and rapid death.

Key-words: Nitrate/nitrite. Methahemoglobinaemia. Oat (*Avena sativa*). Ryegrass (*Lolium* spp). Methylene blue. Dyphenilamine test.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Reações de redução do nitrato em amônia que ocorre na face externa das bactérias ruminais.....	20
Figura 2 -	a. Aveia (<i>Avena sativa</i>). b. Azevém (<i>Lolium spp.</i>).....	25
Figura 3 -	Teste da Difenilamina. a. Pressão de amostra de pastagem para obtenção de três gotas do fluido vegetal. b. Adição de uma gota da solução da difenilamina sobre o extrato vegetal. c. Reação azul forte em menos de 10 segundos considerada positiva.....	27
Figura 4 -	Intoxicação espontânea por Nitrato/nitrito. Bovino, Necropsia nº 28601, município de Rio do Sul - SC. a. Sangue escuro. b. Musculatura esquelética da coxa vermelho intenso. c e d. pulmões e SNC com tonalidade marrom.....	30
Figura 5 -	Aveia (<i>Avena sativa</i>) em solo adubado com esterco de suíno. Propriedade nº 7. Seara, SC.....	31
Figura 6 -	Teste da Difenilamina. Reações positivas. a. . Amostras de pastagens coletadas no município de Faxinal dos Guedes-SC. b. e c. Amostras de pastagens coletadas no município de Seara-SC.....	33
Figura 7 -	Intoxicação Experimental por Nitrato/Nitrito. a. Mucosa ocular marrom (bov. nº 136). b. Sangue escuro (bov. nº 136). c. Pulmões de tonalidade levemente marrom. d. Musculatura esquelética.....	35

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Delineamento experimental em relação aos bovinos utilizados, pastagens, sua origem, quantidade e período de ingestão.....	24
Tabela 2 -	Identificação das propriedades visitadas e municípios, tipo de pastagem utilizada, total de bovinos, número de bovinos doentes e numero de bovinos mortos por propriedade, adubação utilizada, teores de nitrato em ppm e em percentagem nas amostras de pastagens obtidos pela destilação a vapor, e resultados do teste da difenilamina nas pastagens, por propriedade.....	32
Tabela 3 -	Amostras de bovinos com sinais clínicos e histórico compatível com intoxicação por nitrato/nitrito, enviadas ao Laboratório de Patologia Animal – CAV/UDESC, no período de julho de 2006 a setembro de 2010.....	34
Tabela 4 -	Números dos bovinos, peso, tipo de pastagem e número da propriedade, quantidade de planta ingerida e tempo de ingestão, principais sinais clínicos e evolução, da intoxicação experimental por nitrato/nitrito.....	36

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	13
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	14
2.1 HISTÓRICO.....	14
2.2 ASPECTOS BOTÂNICOS.....	15
2.2.2 Aveia (<i>Avena sativa</i>).....	15
2.2.3 Azevém (<i>Lolium spp</i>).....	16
2.3 EPIDEMIOLOGIA.....	16
2.4 PATOGENIA, SINAIS CLÍNICOS E LESÕES.....	18
2.5 TRATAMENTO.....	23
2.6 DIAGNÓSTICO.....	23
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	24
3.1 DOENÇA ESPONTÂNEA, HISTÓRICOS E DADOS EPIDEMIOLÓGICOS.....	24
3.1.1 Doença Espontânea.....	24
3.2 REPRODUÇÃO EXPERIMENTAL.....	24
3.3 TESTE DA DIFENILAMINA.....	26
3.4 ANÁLISE BROMATOLÓGICA DAS PASTAGENS E ÁGUA.....	27
4 RESULTADOS.....	29
4.1 DOENÇA ESPONTÂNEA.....	29
4.2 REPRODUÇÃO EXPERIMENTAL.....	34
5 DISCUSSÃO.....	37
6 CONCLUSÕES.....	42
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	43

1 INTRODUÇÃO

O desenvolvimento de tecnologias aplicáveis à agropecuária tem contribuído para o aparecimento de enfermidades anteriormente não observadas. Em Santa Catarina, particularmente no Oeste, no Planalto Serrano e no Alto Vale do Itajaí a utilização de pastagens cultivadas tem aumentado significativamente nos últimos anos. Informações de produtores e médicos veterinários sobre mortes de bovinos mantidos em pastagens formadas exclusivamente por aveia (*Avena sativa*) e/ou azevém (*Lolium spp*) são freqüentes. Essas mortes ocorrem em pastagens com crescimento rápido, em áreas com muita adubação química e/ou orgânica excessivas.

A mortalidade de bovinos que pastoreiam sobre gramíneas cultivadas em solos super adubados é conhecida em outros países (NEWSOM et al., 1937; BRADLEY, BEATH & EPPSON 1939; O'HARA & FRASER, 1975; RIET-ALVARIZA, 1993; ROSENBERGER 1975; NICHOLLS, 1980; CARRIGAN & GARDNER, 1982; JONES, HUNT & KING, 2000; RADOSTITS et al., 2000; McKENZIE et al., 2004) e estas mortes geralmente estão relacionadas a plantas com alto teor de nitrato/nitrito.

No Brasil há relato de intoxicação por nitrato/nitrito no sertão da Paraíba com a ingestão de capim-mandante (*Echinochloa polystachya*) e capim-elefante (*Pennisetum purpureum*) (MEDEIROS et al., 2003), no Ceará com *P. purpureum* (informação verbal)¹ e em Santa Catarina, em pastagens de aveia e azevém (LUCIOLI et al., 2007; JONCK et al., 2009).

O objetivo do presente trabalho foi avaliar os aspectos epidemiológicos, clínicos e lesionais de bovinos que adoeceram e morreram rapidamente em pastagens de aveia (*Avena sativa*) e azevém (*Lolium spp.*), reproduzir experimentalmente a enfermidade e avaliar as concentrações de nitrato nas pastagens.

¹ Informação fornecida por Carlos H. Tokarnia em viagem a Santa Catarina em 2009.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 HISTÓRICO

Em 1923, começaram as reclamações de surtos de intoxicação por feno de aveia (“oat Hay”), no Colorado EUA. Os animais morriam após a ingestão de feno, e se relacionava a umidade do feno como fator importante nas intoxicações, porém não foi possível provar o que era ofensivo no feno. Atribuía-se as mortes a ingestão de ácido cianídrico (HCN), pois os animais apresentavam sinais semelhantes aos ocorridos na intoxicação por HCN. Entretanto o teste com ácido pícrico era positivo no conteúdo ruminal e negativo no feno (NEWSOM et al., 1937; THORP Jr., 1937). Em outubro de 1934, foi relatada a perda no leste de Wyoming, USA, onde 39 cabeças de gado morreram em poucas horas após alimentarem-se com feno de aveia,. Seguiram-se relatos de outros produtores da região e em outros estados com perdas em condições similares. Os animais apresentavam asfixia, depressão, e morte rápida. (BRADLEY, BEATH& EPPSON, 1939). Em laboratório, um feno proveniente de Dayton, Wyoming foi administrado a um novilho e causou a morte após 9 horas da ingestão. O extrato aquoso desse feno, também causou depressão e os sinais semelhantes aos anteriormente descritos. Em ambas as situações foi observado sangue de coloração escura (cor de chocolate), devido as altas concentrações de metemoglobina no sangue e baixas de oxigênio, o que explicava a asfixia e a depressão desses animais. Abortos ocorriam em animais que se recuperavam, provavelmente devido ao período que a mãe sofria asfixia e o feto acabava morrendo (BRADLEY, BEATH & EPPSON, 1939).

Em 1939, ainda não se conhecia qual era o princípio tóxico contido no feno e na palha de aveia. Porém, a enfermidade ocorria em áreas restritas, e atribuía-se a algo que ocorria no crescimento da aveia, algo contido no solo, ou fatores climáticos. Suspeitava-se desses fatores, uma vez que a enfermidade ocorria em “áreas problemas”, tanto em pastagens verdes, em locais secos ou irrigados (BRADLEY, BEATH & EPPSON, 1939). Concluiu-se que os animais morriam devido à metemoglobinemia, após ingerir feno ou palha de aveia, e atribuiu-se ao princípio tóxico contido no extrato aquoso, adquirido a partir do feno. Esse extrato depois de ser evaporado formou cristais identificados como Nitrato de potássio, e as concentrações encontradas variaram 3,2-7,2 %. Encontraram no extrato aquoso do feno quantidades muito baixas ou insignificantes de nitrito, porém na urina e bile dos animais havia

nitrito, necessário para formação de metemoglobina. Essa transformação de nitrato em nitrito teria que ocorrer no trato gastrointestinal (BRADLEY, EPPSON & BEATH, 1939).

No Brasil, de acordo com histórico fornecido por Tokarnia (2009)¹, durante uma seca muito grande, que ocorreu em 1993 em Quixeramobim, Ceará, na área do açude Banabuí, foi plantado capim elefante (*Pennisetum purpureum*). Este era fornecido picado no cocho ao gado de um grande criador da região. Morreram aproximadamente 200 bovinos, na maioria vacas, em questão de 20 minutos. Os animais mugiam e tornaram-se dispnéicos e o sangue dos animais tinha cor de chocolate. Foi feito o diagnóstico de intoxicação por nitrato/nitrito e com a aplicação de azul de metileno salvaram-se alguns animais. Este problema é conhecido na região, sempre quando se fornece ao gado só *P. purpureum* (não misturado com outro capim) plantado em terras férteis na beira de açudes. No estado da Paraíba, três surtos de intoxicação por nitrato/nitrito foram observados em bovinos alimentados com *Echinochloa polystachya* (capim-mandante) e *Pennisetum purpureum* (capim elefante) (MEDEIROS et al., 2003). Em Santa Catarina, são relatados dois surtos de intoxicação por nitrato/nitrito em bovinos que pastoreavam em *Avena sativa* (aveia) e *Lolium* spp (azevém) (LUCIOLI et al., 2007; JONCK et al., 2009).

2.2 ASPECTOS BOTÂNICOS

2.2.1 Aveia

Avena sp., pertence a Família Poaceae, é uma planta anual, ereta, intensamente perfilhada (FLOSS, 1995; KISSMANN, 1997). Adapta-se a climas temperados e subtropicais, requer maior quantidade de umidade que outros gramíneas, mas também suporta longos períodos de restrição hídrica recuperando-se rapidamente (FLOSS, 1995). A época de semeadura pode ser iniciada em março e prolonga-se até julho, dependendo da finalidade da cultura, se pastejo ou produção de sementes (MORAES, 1995). Permite pastejo mais cedo que o azevém, e o período de duração da pastagem é de aproximadamente quatro meses (MORAES, 1995). Possui 14,05 de proteína bruta na matéria seca (MS).

A aveia é uma espécie com múltiplas possibilidades de utilização, podendo ser empregada para a produção de grãos (alimentação humana e animal), forragem (pastejo, feno, silagem ou cortada e fornecida fresca no cocho), cobertura do solo e adubação verde (proteção e melhoria das condições físicas do solo), inibir as infestações de plantas invasoras (efeito

alelopático) e melhorar a sanidade do solo por ser praticamente imune ao mal-do-pé (moléstia fúngica da lavoura de trigo) (SÁ, 1995).

Existem três espécies principais de aveia cultivadas. *Avena sativa* (aveia branca), *Avena byzantina* (aveia amarela) e *Avena strigosa* (aveia preta). A aveia branca (*Avena sativa*) é a mais utilizada para alimentação humana e animal, permite, além de forragem, a produção de grãos na rebrota (SÁ, 1995).

2.2.2 Azevém

Lolium spp., Família Poaceae, é uma planta anual, ereta, herbácea, densamente perfilada, medindo de 30-90cm de altura, com reprodução por sementes. Sua origem é da Europa, considerada planta daninha em 38 países (LORENZI, 1982), comum nas regiões temperadas do sul do país, uma das poucas gramíneas anuais vegetantes no inverno. As espécies mais comuns são *Lolium multiflorum* e *Lolium perene*.

Forrageira de excelente qualidade, produz até 25 toneladas de massa verde por hectare (KISSMANN, 1997); é empregada também para fenação, com matéria seca em 12% de proteína bruta (LORENZI, 1982), com boa palatabilidade e bom valor nutritivo.

2.3 EPIDEMIOLOGIA

A fonte de intoxicação mais comum por nitrato e nitrito nos animais são as plantas (O'HARA & FRASER, 1975; ROSENBERGER, 1975; NICHOLLS, 1980; CARRIGAN & GARDNER, 1982; BOERMANS, 1990; BROWN, BURROWS & EDWARDS, 1990; PICKRELL, OEHME & HICKMAN, 1990; RADOSTITS et al., 2000; TOKARNIA, DÖBEREINER & PEIXOTO, 2000; MEDEIROS et al., 2003; OZMEN, 2003; McKENZIE et al., 2004), e a água que estes consomem (KINGSBURY, 1964; McPARLAND et al., 1980; BOERMANS, 1990; YONG, BRANDOW & HOWLETT, 1990; YERUHAM et al., 1997; CHEEKE, 1998; RADOSTITS et al., 2000; SMITH, 2000; VILLAR et al., 2003). Outras formas menos comuns, podem ocorrer, com soro do leite, rico em nitrato de potássio, adicionado a dieta de bovinos, ou pelo transporte desse soro em tanques utilizados anteriormente para transportar fertilizante líquido á base de nitrato de amônio (EGYED & SHLOSBERG, 1980; YERUHAM et al., 1997).

A intoxicação pode ocorrer pela ingestão de água contaminada por fertilizantes (YERUHAM et al., 1997; CHEEKE, 1998; RADOSTITS et al., 2000; SMITH, 2000;

VILLAR et al., 2003), esterco (RADOSTITS et al., 2000; MEDEIROS et al., 2003), óleo de máquina e salmouras (RADOSTITS et al., 2000) e a água de condensação de estábulos (McPARLAND et al., 1980; RADOSTITS et al., 2000). Yong, Brandow & Howlett (1990) relatam dois surtos de intoxicação, pela água, após detonação de poços usando explosivos que continham nitrato de amônio.

O princípio tóxico existente nas plantas é sempre o nitrato, geralmente na forma de nitrato de potássio (KNO_3) (RADOSTITS et al., 2000). Os nitratos são absorvidos do solo pelas raízes das plantas e incorporados normalmente nos tecidos como aminoácidos, proteínas e outros compostos nitrogenados. O local primário para conversão do nitrato nesses produtos são as folhas verdes em crescimento (OZMEN, 2003). O nitrato acumula nas partes altas e baixas da planta, não nos grãos (CHEEKE, 1998).

Nitratos e nitritos podem estar presentes em altas concentrações em alguns alimentos, particularmente em gramíneas forrageiras no início do estágio vegetativo, fertilizadas com grandes quantidades de nitrogênio (N) (WRIGHT & DAVISON, 1964; RADOSTITS et al., 2000; KOZLOSKI, 2009), ou espécies que contém normalmente um nível maior de nitrato (WRIGHT & DAVISON, 1964). O nitrato se acumula e persiste nas plantas em condições que limitam o metabolismo vegetal: secas, baixa umidade (NOVAIS & MELLO, 2007), solos ácidos, baixo molibdênio, enxofre e fósforo, baixa temperatura, boa aeração do solo, e o uso de herbicidas (WRIGHT & DAVISON, 1964; CONNOR, 1977), matéria orgânica principalmente de origem animal (ROSENBERGER, 1975; RADOSTITS et al., 2000), rápido crescimento das plantas quando ocorrem chuvas após períodos de seca e doenças (RIET-ALVARIZA, 1993; CHEEKE, 1998; RADOSTITS et al., 2000; RIET-CORREA et al., 2007), até mesmo o estágio de maturidade da planta (WRIGHT & DAVISON, 1964). A tendência de acúmulo tem relação com os períodos de chuva, baixa incidência solar, e temperaturas baixas, que provocam a baixa atividade fotossintética (WRIGHT & DAVISON, 1964). Nessas condições, os nitratos podem representar mais de 30% do N das plantas (KOZLOSKI, 2009).

Há plantas conhecidas por conter níveis altos de nitrato, como o *Shorgum* sp. (HALIBURTON & EDWARDS, 1978; CARRIGAN & GARDNER, 1982; BROWN, BURROWS & EDWARDS, 1990; CHEEKE, 1998), *Avena sativa* (aveia) (NEWSOM et al., 1937; BRADLEY, BEATH & EPPSON, 1939; DAVIDSON, DOUGHTY & BOLTON, 1941; DODD & COUP, 1957; ROSENBERGER, 1975; CHEEKE, 1998; RADOSTITS et al., 2000; LUCIOLI et al., 2007; McKENZIE et al., 2009), *Lolium* spp (azevém) (O'HARA & FRASER, 1975; LUCIOLI et al., 2007), *Brassica* spp (nabo), *Triticum vulgare* (trigo), *Zea mays* (milho) (RADOSTITS et al., 2000), feno de *Chenopodium album* ("lambsquarters",

falsa erva de santa-maria, acarinha branca) (OZMEN, 2003), *Dactyloctenium radulans* (“button grass”) (McKENZIE et al., 2004), *Echinochloa polystachya* (capim-mandante) (MEDEIROS et al., 2003) e *Pennisetum purpureum* (capim elefante) (MEDEIROS et al., 2003).

As espécies animais susceptíveis são os bovinos (THORP Jr, 1937; BRADLEY, BEATH & EPPSON, 1939; DAVIDSON, DOUGHTY & BOLTON, 1941; WANG, GARCIA-RIVERA & BURRIS, 1961; HARRIS & RHODES, 1969; O’HARA & FRASER, 1975; HIBBS, STENCEL & HILL, 1978; HIBBS, 1979; CARRIGAN & GARDNER, 1982; CHENG et al., 1985; BOERMANS, 1990; YONG, BRANDOW & HOWLETT, 1990; YERUHAM et al., 1997; RADOSTITS et al., 2000; JONES; MEDEIROS et al., 2003; OZMEN, 2003; VILLAR et al., 2003; McKENZIE et al., 2004) ovinos (DAVISON, DOUGHTY & BOLTON, 1941; LEWIS, 1950; HELWIG & SETCHELL, 1960; BURROWS & WAY, 1975; CHENG et al., 1985; RADOSTITS et al., 2000, McKENZIE et al., 2004) eqüinos (DAVISON, DOUGHTY & BOLTON, 1941; VALLI, 1993; RADOSTITS et al., 2000) suínos (McPARLAND, McRORY & BELL, 1980; RADOSTITS et al., 2000), alpacas (*Lama pacos*) (McKENZIE et al., 2009), cães (VALLI, 1993) e coelhos (DOLLAHITE & ROWE, 1980).

Os suínos são os animais mais susceptíveis, seguidos pelos bovinos, ovinos e equinos (RADOSTITS et al., 2000). Os ovinos são mais resistentes que bovinos a intoxicação (BRADLEY, EPPSON & BEATH et al., 1939; ALABOUDI & JONES, 1985), devido sua maior capacidade de converter nitrito em amônia, ocorrendo intoxicação quando o nitrito é ingerido pré-formado (RADOSTITS et al., 2000).

2.4 PATOGENIA, SINAIS CLÍNICOS E LESÕES

Intoxicação por nitrato e intoxicação por nitrito são usadas sinonimamente, especialmente em herbívoros, pela redução no trato alimentar do nitrato em nitrito, após a ingestão de forragens com elevados níveis de nitrato. Porém a ação tóxica dos nitratos é diferente das dos nitritos (ROSENBERGER, 1975; TOKARNIA, DÖBEREINER & PEIXOTO, 2000).

A intoxicação por nitrato, embora incomum, é observada em cães e eqüinos com ingestão de elevadas quantidades de nitrato de potássio. O nitrato de potássio é um irritante de mucosa alimentar e urinária (ROSENBERGER, 1975), e os sinais de intoxicação se referem a esses sistemas, mas sem lesões específicas. Excessivas doses resultam em severa anemia

hemolítica e icterícia. A redução de nitrato a nitrito, nessas circunstâncias não ocorre (VALLI, 1993; TOKARNIA, DÖBEREINER & PEIXOTO, 2000).

Os sinais clínicos observados são salivação (ASBURG & RHODE; 1964; RADOSTITS et al., 2000) fortes cólicas com diarreia (ROSENBERGER, 1975; RADOSTITS et al., 2000; TOKARNIA, DÖBEREINER & PEIXOTO, 2000), timpanismo (TOKARNIA, DÖBEREINER & PEIXOTO, 2000), micções frequentes (DAVISON, DOUGHTY & BOLTON, 1941; ROSENBERGER, 1975; VAN DIJK et al., 1983), e vômito mesmo nos ruminantes (RADOSTITS et al., 2000). As lesões consistem em hemorragias extensas nos pré-estômagos, abomaso e intestino, não há metemoglobinemia (TOKARNIA, DÖBEREINER e PEIXOTO, 2000).

Nos herbívoros, o nitrato ingerido é reduzido a nitrito no rúmen e posteriormente em amônia (WANG, GARCIA-RIVERA & BURRIS, 1961; KOZLOSKI, 2009). Dependendo de diversos fatores, incluindo a concentração inicial de nitrato, a flora ruminal, e a dieta do animal, a conversão de nitrito em amônia é inadequada, causando absorção de nitrito pela corrente sanguínea e metemoglobinemia (RIET-ALVARIZA, 1993; RADOSTITS et al., 2000; TOKARNIA, DÖBEREINER e PEIXOTO, 2000). A capacidade da flora ruminal em detoxificar o nitrato ou o nitrito derivado dele, é energia dependente, tornando-se reduzida em condições alimentares precárias (VALLI, 1993).

Na face externa das bactérias que estão aderidas ao epitélio, pelas enzimas nitrato redutase e nitrito redutase que são produzidas somente quando há presença de substrato, o nitrato (NO_3^-) é reduzido a nitrito (NO_2^-) e posteriormente amônia (NH_4), (Figura 1). Os doadores de elétrons, de hidrogênio molecular (H_2), NADH, FADH_2 , piruvato, lactato ou succinato, são provenientes do citoplasma bacteriano. A amônia que não é incorporada nos compostos nitrogenados microbianos é absorvida através do epitélio ruminal e entra na circulação portal, chegando ao fígado, é convertida em uréia, a qual retorna em parte novamente ao trato gastrointestinal via saliva ou transepitelial, e o restante eliminado (KOZLOSKI, 2009).

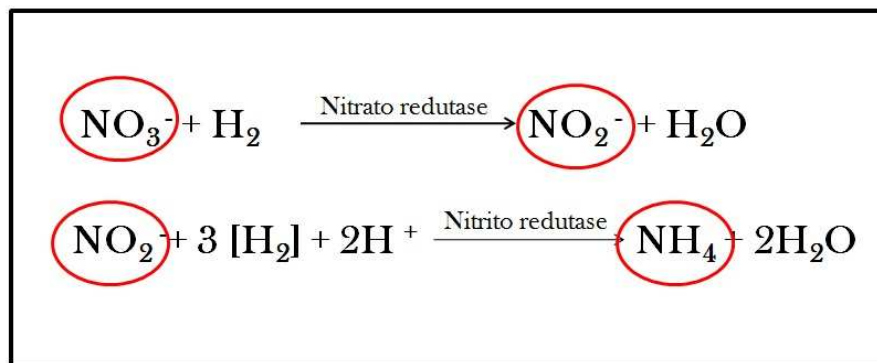


Figura 1- Reações de redução do nitrato em amônia que ocorre na face externa das bactérias ruminais.

A necessidade de equivalentes de redução (elétrons e hidrogênio), para reduzir nitrato a nitrito, é bem menor que para reduzir este último a amônia, de modo que a taxa de redução de nitrato é cerca de 2,5 vezes mais alta que a redução do nitrito. Em função disso quando a taxa de nitratos no rúmen é alta, ocorre acumulação de nitrito (WANG, GARCIA-RIVERA & BURRIS, 1961; ALLISON, 1978; KOZLOSKI, 2009). O que foi comprovado por Wang, Garcia-Rivera & Burris, (1961) em experimento com bovinos fistulados, onde administravam nitrato de potássio diretamente no rúmen, e os níveis de nitrato diminuíam drasticamente, e aumentavam de amônia e nitrito, que atingiam concentrações máximas em três horas após administração de nitrato por fistula ruminal.

Uma vez acumulado no rúmen, o nitrito é absorvido pelos capilares ruminais chegando a corrente sanguínea. O nitrito oxida a molécula heme que é oxidada do estado ferroso (Fe^{2+}) para o estado férrico (Fe^{3+}). A forma oxidada da hemoglobina é chamada de metemoglobina. Essa por sua vez não carrega oxigênio (O_2), resultando nos sinais clínicos característicos de hipóxia e anóxia tecidual (ROSENBERGER, 1975; RADOSTITS, 2000).

O nitrito possui ainda função vasodilatadora (ASBURG & RHODE, 1964; ROSENBERGER, 1975; SCHNEIDER & YEARY, 1975; RADOSTITS et al., 2000), contribuindo para hipóxia em decorrência da insuficiência circulatória periférica, porém tem pouca importância na formação dos sinais clínicos (ASBURG & RHODE, 1964; RADOSTITS et al., 2000).

No sangue de bovino em condições normais tem-se 1-2% (no máximo 5%) de metemoglobina, com tolerância de 15-40%. Com valores acima de 40%, o sangue aparece escuro; com valores de 50-60% começam a expressar sinais de falta de oxigênio e os casos fatais ocorrem com 80% de metemoglobina (ROSENBERGER, 1975).

Ruminantes que tem dieta com concentrações elevadas de nitrato, podem se adaptar rapidamente, pois as taxas de redução de nitrato e nitrito aumentam drasticamente pelo aumento do número de bactérias redutoras de nitrato (REDDY et al., 1979). O uso de monensina mesmo em níveis recomendados, faz com que aumente o risco de intoxicação por nitrato em dietas com índices normais ou elevados desse componente, por promover rápida mudança na população microbiana do rúmen em favor da produção de nitrito, aumentando a conversão do nitrato em nitrito (ROGERS & HOPE-CAWDERY, 1980; RADOSTITS et al., 2000).

O processo de ensilagem reduz os níveis de nitrato; com a fermentação anaeróbica ocorre redução do nitrato a óxido, dióxido e tetraóxido de nitrogênio, que são gases de coloração marrom-amarelados que, dependendo sua concentração, também são tóxicos (CHEEKE, 1998).

Os sinais clínicos de metemoglobinemia aparecem de súbito, se manifestam por cansaço (DAVISON, DOUGHTY & BOLTON, 1941; ASBURG & RHODE; 1964; McKENZIE et al., 2004; McKENZIE et al., 2009), taquipnéia ou dispnéia progressiva (THORP Jr, 1937; DAVIDSON, DOUGHTY & BOLTON, 1941; ASBURG & RHODE; 1964; ROSENBERGER, 1975; EGYED & SHLOSBERG, 1980; TOKARNIA, DÖBEREINER e PEIXOTO, 2000; MEDEIROS et al., 2003; OZMEN, 2003; VILLAR, 2003; McKENZIE et al., 2004), sialorréia (ASBURG & RHODE; 1964; ROSENBERGER, 1975), gemidos e ranger dos dentes, frequência e pulso cardíacos aumentados (ASBURG & RHODE, 1964; ROSENBERGER, 1975; EGYED & SHLOSBERG, 1980; McKENZIE et al., 2004), tremores musculares (OZMEN, 2003; McKENZIE et al., 2004), ataxia (EGYED & SHLOSBERG, 1980; OZMEN, 2003; VILLAR, 2003; McKENZIE et al., 2004), andar cambaleante (DAVIDSON, DOUGHTY & BOLTON, 1941; ROSENBERGER, 1975; EGYED & SHLOSBERG, 1980; OZMEN, 2003; McKENZIE et al., 2004), as mucosas se apresentam cianóticas ou cor de chocolate (NEWSOM et al., 1937; BRADLEY, BEATH, EPPSON, 1939; DAVISON, DOUGHTY & BOLTON, 1941; ASBURG & RHODE; 1964; ROSENBERGER, 1975; EGYED & SHLOSBERG, 1980; RADOSTITS, et al., 2000; TOKARNIA, DÖBEREINER e PEIXOTO 2000; MEDEIROS et al., 2003; OZMEN, 2003). O quadro inicia em poucas horas, quatro horas (KELLERMAN, COETZER & NAUDÉ, 1990), nove horas (MEDEIROS et al., 2003), 10 horas (NEWSOM et al., 1937), 14 horas (THORP Jr 1937), após ingestão de pastagens que contem nitrato. A morte é rápida (TOKARNIA, DÖBEREINER e PEIXOTO 2000; OZMEN, 2003) em torno de 30 minutos (DAVIDSON, DOUGHTY & BOLTON, 1941; MEDEIROS et al., 2003).

O aborto ocorre como consequência do surto agudo (ROSENBERGER, 1975; YERUHAM et al., 1997; McKENZIE et al., 2009), dias após a exposição (RADOSTITS et al., 2000) ou em animais que se recuperam (NEWSOM et al., 1937; BRADLEY, BEATH, EPPSON, 1939), ou este ocorre, quando o nitrato contido na dieta está em níveis subletais (ROSENBERGER, 1975; TOKARNIA, DÖBEREINER e PEIXOTO, 2000). Cheeke (1998), relata outros problemas que a intoxicação por nitrato/nitrito crônica causa, como redução no crescimento, hipovitaminose A, aborto, infertilidade, bócio e outros problemas inespecíficos, mas em geral, esses problemas não são baseados em experimentação.

Na necropsia o sangue apresenta coloração escura (cor de chocolate) (NEWSOM et al., 1936; THORP Jr, 1937; DAVISON, DOUGHTY & BOLTON, 1941; ROSENBERGER, 1975; EGYED & SHLOSBERG, 1980; CARRIGAN & GARDNER, 1982; BOERMANS, 1990; BROWN, BURROWS & EDWARDS, 1990; VALLI, 1992; YERUHAM et al., 1997; RADOSTITS et al., 2000; OZMEN, 2003; McKENZIE et al., 2004; LUCIOLI et al., 2007) e com baixa coagulabilidade (NEWSOM et al., 1937; CARRIGAN e GARDNER, 1982; BROWN, BURROWS e EDWARDS, 1990; RADOSTITS et al., 2000; OZMEN, 2003); a musculatura esquelética e cardíaca apresentam-se vermelho intenso (cereja) (THORP Jr, 1937; DAVISON, DOUGHTY & BOLTON, 1941). Algumas hemorragias no epicárdio são observadas (NEWSOM et al., 1937; THORP Jr, 1937; BOERMANS, 1990; OZMEN, 2003), como na serosa do intestino delgado (NEWSOM et al., 1937; CARRIGAN e GARDNER, 1982; BROWN, BURROWS e EDWARDS, 1990). A parede dos pré-estômagos e pulmões podem estar congestos e apresentar hemorragias nas serosas e mucosas (NEWSOM et al., 1937; THORP Jr, 1937; ROSENBERGER, 1975; YERUHAM et al., 1997; TOKARNIA, DÖBEREINER e PEIXOTO, 2000; RADOSTITS et al., 2000). A carcaça recém aberta exala um cheiro forte de gases nitrosos (DAVISON, DOUGHTY & BOLTON, 1941; ROSENBERGER, 1975; TOKARNIA, DÖBEREINER e PEIXOTO, 2000). Horas após a morte do animal a metemoglobina retorna a hemoglobina, desaparecendo a coloração escura do sangue (NEWSOM et al., 1937; BROWN, BURROWS & EDWARDS, 1990; VALLI, 1993; TOKARNIA, DÖBEREINER e PEIXOTO, 2000) e em cinco horas após a morte desaparece a coloração escura da musculatura (CAWLEY, COLLINGS & DYSON, 1977; TOKARNIA, DÖBEREINER & PEIXOTO, 2000).

Na histologia não são observadas lesões significativas (CARRIGAN e GARDNER, 1982; McKENZIE et al., 2004; RADOSTITS et al., 2000; MEDEIROS et al., 2003) somente congestão e edema pulmonar (CARRIGAN e GARDNER, 1982).

2.5 TRATAMENTO

Para tratamento terapêutico na intoxicação por nitrato/nitrito é recomendado Azul de Metileno (BURROWS & WAY, 1975; ROSENBERGER, 1975; VAN DIJK et al., 1983; BOERMANS, 1990; RADOSTITS et al., 2000; VILLAR, 2003) a 1%, na dose de 1 a 2 mg/kg de peso vivo por via endovenosa (VAN DIJK et al., 1983; YERUHAM et al., 1997; RADOSTITS et al., 2000). A meia vida do azul de metileno nos tecidos situa-se em torno de duas horas, a resposta é rápida, em poucos minutos as mucosas retornam ao normal (RADOSTITS et al., 2000).

2.6 DIAGNÓSTICO

Realiza-se pelos dados epidemiológicos, sinais clínicos e alterações macroscópicas, podendo ser confirmado pela rápida resposta ao tratamento com azul de metileno (RIET-ALVARIZA, 1993).

Para detecção dos nitratos e nitritos pode-se realizar a prova da difenilamina em materiais como pastagens (RIET-ALVARIZA, 1993), fluidos corpóreos, soro, urina, fluidos oculares (HOUSHOLDER, DOLLAHITE & HULSE, 1966; RIET-ALVARIZA, 1993).

Os sinais clínicos de dispnéia aguda, evolução rápida, tremores e convulsões, lembram outras causas de anóxia. A intoxicação por nitrato/nitrito deve ser diferenciada da intoxicação por ácido cianídrico (ROSENBERGER, 1975; RIET-ALVARIZA, 1993; RADOSTITS et al., 2000) do enfisema e edema pulmonar agudo (RADOSTITS et al., 2000).

3 MATERIAIS E MÉTODOS

O trabalho foi desenvolvido através da coleta de históricos, dados epidemiológicos, necropsias de bovinos que morreram da doença espontânea e reprodução experimental no Laboratório de Patologia Animal (LAPA)/CAV-UDESC. Além, da realização do teste da difenilamina e análise de nitrato de amostras de pastagens onde ocorreram os surtos.

3.1 DOENÇA ESPONTÂNEA, HISTÓRICOS E DADOS EPIDEMIOLÓGICOS

3.1.1 Doença espontânea

1. Os históricos foram obtidos de médicos veterinários e produtores dos municípios de Rio do Sul, Pouso Redondo, Seara, Faxinal dos Guedes, Chapecó, Concórdia, Água Doce, Treze Tílias, Otacílio Costa, Petrolândia e Lages.

2. Paralelamente, foram visitadas 12 propriedades rurais, sendo seis no município de Seara, duas em Faxinal dos Guedes, uma em Petrolândia, uma em Rio do Sul, uma Pouso Redondo e uma em Lages. As visitas foram nos meses de junho a outubro, que correspondem ao período vegetativo da aveia e do azevém, facilitando a realização do teste da difenilamina e a coleta de amostras de pasto para posterior análise de nitrato. Adicionalmente foram coletadas amostras dos reservatórios de água que os animais consumiam da propriedade em Pouso Redondo (propriedade 2) e de uma propriedade em Seara (propriedade 6).

3.2 REPRODUÇÃO EXPERIMENTAL²

Para reprodução experimental da doença, foram coletadas amostras de aveia (Figura 2a) e azevém (Figura 2b) de quatro propriedades que tiveram casos de intoxicação e fornecidas a sete bovinos nas dependências do LAPA, na forma verde e na forma de feno.

² Projeto de pesquisa aprovado no comitê de ética de experimentação animal (CETEA) da Universidade do Estado de Santa Catarina (CAV/UDESC) sob o protocolo 1.08.07.



Figura 2- **a.** Aveia (*Avena sativa*). **b.** Azevém (*Lolium* spp.).

Na forma verde as amostras eram conservadas em câmara fria e para obtenção de feno as amostras foram secadas a sombra e fornecidas *in natura*, no cocho, *ad libitum*. Os experimentos realizados estão delineados na tabela 1.

Tabela 1 - Delineamento experimental em relação aos bovinos utilizados, pastagens, sua origem, quantidade e período de ingestão.

Nº BOV.	RAÇA	SEXO	PESO (Kg)	PASTAGENS/ PROPRIEDADE DA COLETADA	TOTAL DE PLANTA INGERIDA (Kg/PERÍODO)
131	Jersey	Macho	75	Azevém verde/prop.2	96,8/10 dias
136	HPB	Macho	110	Aveia verde/prop.1	90/5 dias
137	Jersey	Macho	105	Feno de azevém/prop.2	8.24/6 dias
138	HPB	Fêmea	272	Feno de azevém/prop.2	4.64/10 horas
130	HPB	Macho	120	Feno de azevém/prop.2	4,4/ 3 dias
140	Mestiço	Macho	108	Feno de aveia/prop.7	1,4/9 horas
141	Mestiço	Macho	109	Aveia verde/prop.3	68,85/3 dias

Os animais em experimento eram mantidos em baias individuais de alvenaria, com água ad libitum, e avaliados clinicamente várias vezes ao dia, após o início da ingestão e observados até a morte ou recuperação. Foram avaliadas alterações de comportamento, de coloração de mucosas, dos movimentos respiratórios, cardíacos e ruminais, o aspecto das fezes e da frequência de micções.

Os animais que morreram, foram necropsiados e foram coletados fragmentos de coração, fígado, baço, pulmão, rim, abomaso, omaso, retículo, rúmen, intestino, linfonodo e sistema nervoso central e fixados em formalina a 10%. As amostras foram desidratadas em álcool, clarificadas em xilol e incluídas em parafina. Secções de três micras de espessura foram coradas pela técnica de hematoxilina e eosina (HE) (PROPHET et al., 1992), para exame histológico em microscópio ótico.

Em um bovino (bov. n° 140) em experimentação, foi aplicado Azul de Metileno a 1%, 2 mg por kg, por via endovenosa, quando manifestava os sinais clínicos da doença.

3.3 TESTE DA DIFENILAMINA

Nas propriedades onde ocorreu a enfermidade e onde não houve históricos da doença e que foram visitadas, realizou-se o teste da Difenilamina. Este consiste na obtenção de três gotas de extrato vegetal das folhas verdes de aveia ou azevém obtidas por pressão manual (Figura 3a), expostas sobre lâminas de vidro, e sobre estas adicionada uma gota do reagente (Figura 3b) e observado a reação por alguns segundos. A reação é considerada positiva, quando em menos de 10 segundos se forma uma coloração azul intensa (Figura 3c).

A solução de difenilamina usadas nos testes é composta por 0,5 g de difenilamina, 20 ml de água destilada e ácido sulfúrico concentrado em quantidade para completar 100 ml (RADOSTITS et al., 2000).



Figura 3 - Teste da Difenilamina. **a.** Pressão de amostra de pastagem para obtenção de três gotas do fluido vegetal. **b.** Adição de uma gota da solução da difenilamina sobre o extrato vegetal. **c.** Reação azul forte em menos de 10 segundos considerada positiva.

3.4 ANÁLISE DE NITRATO NAS PASTAGENS E NA ÁGUA

As amostras de pastagens foram coletadas de propriedades que ocorreu a enfermidade e de propriedades com histórico de sinais clínicos compatíveis com a doença. Foram colhidas amostras de diferentes áreas dos piquetes onde tiveram os surtos. Estas foram secadas a sombra e armazenadas em sacos plásticos.

As amostras foram analisadas no Laboratório de Química e Fertilidade do Solo do CAV-UDESC usando o método de destilação a vapor (TEDESCO et al., 1995). O procedimento utiliza a extração por cloreto de potássio (KCl) 1Molar (M) e faz a determinação de amônio + nitrito + nitrato mineral ($N-NO_3$). As amostras foram secadas em estufa a 60° C, moídas e pesadas em 1g. Estas foram adicionadas em frascos de destilação com 15 ml de KCl 1M; as amostras foram agitadas no agitador elétrico por cinco minutos; no aparelho de destilação a vapor, as amostras foram destiladas após adição de 0,2g de óxido de Magnésio (MgO), colhidas em 3 a 4 minutos, 35-40 ml do destilado inicial, este foi descartado, pois continha o teor de amônio. Após a extração do amônio, adicionou-se ao frasco contendo a amostra e o KCl, 0,2 g de liga devarda e reiniciou-se a destilação, colhendo novamente após 3 a 4 minutos, 35-40 ml do destilado em um frasco contendo 5 ml de indicador de ácido-bórico. A amostra contendo o segundo destilado + ácido bórico foi titulada com ácido sulfúrico (H_2SO_4) a 0,0025M, anotando-se a quantidade necessária em ml de ácido para igualar-se ao branco.

Após as titulações fez-se os cálculos descritos na metodologia de Tedesco et al. (1995), encontrando-se os valores em ppm ou mg/kg e percentual de $N-NO_3$.

Na determinação do nitrato por destilação, o valor encontrado é referente a concentração de nitrogênio (N) que faz parte do nitrato ($N-NO_3$). Para converter para nitrato

(NO₃), multiplica-se por 4,43. O peso molecular do nitrato é 62 e do nitrogênio é 14. Para cada 14 ppm de nitrogênio tem-se 62 ppm de nitrato. Para cada 1ppm de N temos 4,43 de nitrato.

Adicionalmente, foram coletadas amostras dos reservatórios de água, de duas propriedades (propriedade 2 em Pouso Redondo e na propriedade 6, em Seara) onde os animais tinham acesso e que continham grande quantidade de matéria orgânica. As amostras foram processadas pela ENOPS Engenharia Ltda, responsável pelas análises de água da Secretaria Municipal de Águas e Abastecimento de Lages (SEMASA).

4 RESULTADOS

4.1 DOENÇA ESPONTÂNEA

De acordo com levantamento efetuado a partir de informações registradas no Setor de Patologia Animal do Centro de Ciências Agroveterinárias, (CAV/UDESC), dois surtos de intoxicação por nitrato/nitrito em bovinos foram diagnosticados no município de Rio do Sul e Pouso Redondo, SC, nos meses de junho a agosto de 2006. Na propriedade 1 (Rio do Sul), a pastagem era constituída por aveia (*Avena sativa*) e azevém (*Lolium spp*). De um total de 78 vacas, adoeceram 12 animais (15,38%), dessas 10 morreram (12,82%) e dois foram necropsiados. Na propriedade 2 (Pouso Redondo), de 75 bovinos mantidos em pastagem constituída somente por azevém, 19 adoeceram (25,33%), oito morreram (10,66%) e um foi necropsiado. Em ambas as propriedades, as pastagens foram previamente adubadas com ureia na proporção de 150 Kg por hectare. A enfermidade iniciou uma semana após a ocorrência de chuva, precedida de um período seco. Nas duas propriedades o reservatório de água consumida pelos animais continha grande quantidade de matéria orgânica.

De acordo com informações obtidas, a enfermidade ocorria entre 15 a 20 minutos após a ingestão de água e caracterizava-se por mucosas de coloração marrom, taquipnéia, andar cambaleante, micção frequente, timpanismo, decúbito lateral e morte em poucos minutos, ou recuperação algumas horas após. Adicionalmente duas vacas que apresentaram esses sinais e não morreram, abortaram no dia seguinte. Nenhum animal clinicamente doente foi acompanhado por veterinário.

Nos três bovinos necropsiados, os principais achados de necropsia consistiram de sangue escuro (Figura 4a), não coagulável, e quando em contato com superfícies as manchava como se fossem pinceladas. Os músculos cardíaco e esqueléticos tinham coloração vermelho intenso (Figura 4b). Os órgãos claros, como pulmão e SNC apresentavam-se levemente marrons (Figura 4c e 4d). Microscopicamente, nenhuma alteração foi observada.



Figura 4 – Intoxicação espontânea por Nitrato/nitrito. Bovino, Necropsia n° 28601, município de Rio do Sul - SC. **a.** Sangue escuro. **b.** Musculatura esquelética da coxa vermelho intenso. **c** e **d.** pulmões e SNC com tonalidade marrom.

Posteriormente a realização do diagnóstico de intoxicação por nitrato/nitrito, 14 bovinos, três da propriedade 1 e 11 da propriedade 2, que manifestaram os sinais clínicos da doença foram tratados com 4 mg/Kg de azul de metileno na concentração de 1%, por via intravenosa, pelo proprietário. Todos recuperaram, em média, após trinta minutos.

Na propriedade 1, o quadro clínico cessou após os animais terem sido transferidos para um piquete que não havia sido adubado com ureia. Os sinais clínicos de metemoglobinemia continuaram na propriedade 2 mesmo após a ingestão do rebrote do azevém que havia sido roçado. A enfermidade só desapareceu após deslocamento dos animais para outra área com pastagem não cultivada.

A avaliação bromatológica de quatro amostras de aveia e azevém coletadas nas duas propriedades revelaram teores de nitrato que variaram de 2,33 a 3,36%. A dosagem de nitrato das amostras de água coletadas do reservatório da propriedade 2, realizado no intervalo de uma semana, revelou a concentração de 6,6 ppm e 7,2 ppm de NO_3 na primeira e segunda coleta, respectivamente.

Nos anos de 2007, 2008 e 2009 uma enfermidade de bovinos com sinais clínicos compatíveis com intoxicação por nitrato/nitrito foi observada em vários municípios do estado, principalmente em Seara, Faxinal dos Guedes, Chapecó, Concórdia, Água Doce, Treze Tílias, Otacílio Costa, Petrolândia e Lages. Informações obtidas de veterinários e produtores caracterizaram a enfermidade como uma doença de aparecimento rápido, que ocorria em vacas produtoras de leite. Na maioria dos casos as vacas eram encontradas mortas poucas horas após a introdução em áreas constituídas por aveia e ou azevém. Alguns produtores relataram que ao recolher as vacas, algumas manifestavam respiração ofegante que se agravava rapidamente, urinavam com frequência, a conjuntiva tinha coloração marrom e a morte ocorria entre 15 a 20 minutos. Alguns veterinários que observaram animais clinicamente doentes confirmaram as informações de produtores e acrescentaram que os animais tinham coloração escura do sangue, também visível através de necropsia e um odor forte exalado dos animais necropsiados.

Na maioria das propriedades as pastagens eram exuberantes e constituídas por aveia e algumas por azevém e ou, consorciadas (aveia x azevém) e haviam sido adubadas com matéria orgânica principalmente de suínos (7 propriedades), de aves (1 propriedade), e em duas propriedades (Lages e Petrolândia) onde a adubação das pastagens foi com ureia. Todas as pastagens observadas tinham crescimento exuberante (Figura 5).



Figura 5 – Aveia (*Avena sativa*) em solo adubado com esterco de suíno. Propriedade nº 7. Seara, SC.

Detalhes sobre informações de produtores obtidas durante a visita às propriedades onde ocorreram surtos da enfermidade constam na Tabela 2.

Tabela 2 – Identificação das propriedades visitadas e municípios, tipo de pastagem utilizada, total de bovinos, número de bovinos doentes e número de bovinos mortos por propriedade, adubação utilizada, teores de nitrato em ppm e em percentagem nas amostras de pastagens obtidos pela destilação a vapor, e resultados do teste da difenilamina nas pastagens, por propriedade.

PROP.	PASTAGEM	TOTAL DE ANIMAIS/Nº DOENTES/Nº MORTOS	TIPO DE ADUBAÇÃO	mg/kg ou ppm (NO ₃)	% (NO ₃)	TESTE DA DIFENILAMINA
RIO DO SUL						
1	Aveia + Azevém	78/12/10	Adubação química (NPK) + Ureia	33616,00	3,36	Não realizado
POUSO REDONDO						
2	Azevém	75/19/8	Adubação química (NPK) + Ureia	23340,00	2,33	Não realizado
SEARA						
3	Aveia	21/1/1	Esterco de suínos	4775,54	0,4784	Positivo
3*	Aveia	21/1/1	Esterco de suínos	4394,56	0,4385	Positivo
4	Aveia e azevém	12/4/1	Esterco de suínos	5409,03	0,5405	Positivo
5	Aveia	18/2/1	Esterco de suínos + Nitrato de amônio	5732,43	0,5715	Positivo
6	Aveia	23/2/1	Esterco de suínos	7911,98	0,793	Positivo
7	Aveia	20/1/1	Esterco de suínos	7911,98	0,793	Positivo
7*	Aveia	20/1/1	Esterco de suínos	4288,24	0,443	Não realizado
8	Aveia	16/1/1	Esterco de aves	5218,54	0,5227	Positivo
FAXINAL DOS GUEDES						
9	Aveia	26/2/2	Esterco de suínos	3003,54	0,3012	Positivo
10	Aveia	23/8/8	Esterco de suínos	5001,47	0,5006	Positivo
PETROLÂNDIA						
11	Azevém	45/8/8	Adubação química (NPK***) + uréia	Não realizado	Não realizado	Positivo
LAGES						
12	Aveia	45/2/2	Adubação química (NPK) + uréia	Não realizado	Não realizado	Não realizado
13	Aveia	25/5/0	Esterco de aves	4088,89	0,4076	Levemente Azul
CAMPO BELO						
14	Aveia	15/1/0	Adubação química (NPK) + uréia	4545,18	0,4563	Levemente Azul

*Amostras que foram realizadas experimentação.

**A doença ocorreu com sinais clínicos leves, sem morte.

***NPK: Adubos comerciais trazem a sigla NPK o qual possui na fórmula concentrações variáveis de Nitrogênio (N), Fósforo (P) e Potássio (P).

A avaliação bromatológica das amostras das pastagens revelaram teores de nitrato que oscilaram de 3003,54 ppm a 7911,98 ppm por kilo de matéria seca. Os valores de nitrato de amostra de água coletada em uma propriedade, no município de Seara, a concentração de nitrato equivalente foi 8,5 ppm. Da mesma forma, os testes de difenilamina realizados com amostras de folhas verdes, de pastagens onde ocorreram surtos da enfermidade, todas resultaram positivamente (Figuras 6a, 6b e 6c). Amostras coletadas de propriedades sem a enfermidade tiveram resultado negativo. Os valores da análise bromatológica e o resultado do teste de difenilamina, de amostras de pastagens coletadas nas propriedades, estão delineadas na tabela 2.



Figura 6 - Teste da Difenilamina. Reações positivas. **a.** Amostras de pastagens coletadas no município de Faxinal dos Guedes-SC. **b. e c.** Amostras de pastagens coletadas no município de Seara-SC.

Nas amostras de vísceras, enviadas ao Laboratório de Patologia Animal de 10 bovinos encontrados mortos, ou, que tinham sinais clínicos e o histórico compatível com a intoxicação por nitrato e enviadas para avaliação histológica, não foram observadas lesões. Detalhes sobre as amostras enviadas e tipo de pastagens utilizadas nas propriedades de origem das amostras, constam na Tabela 3.

Tabela 3 – Amostras de bovinos com sinais clínicos e histórico compatível com intoxicação por nitrato/nitrito, enviadas ao Laboratório de Patologia Animal – CAV/UDESC, no período de julho de 2006 a setembro de 2010.

Nº da amostra	DATA	RAÇA/ IDADE	LOCAL	PASTAGENS/ PARTICULARIDADES
30139	Jul/07	HPB 7 meses	Concórdia (SC)	Aveia ração balanceada com ionóforos; Adubação: não inf.
30198	Jul/07	HPB 4 anos	Concórdia (SC)	Azevém; Adubação: não inf.
30407	Jul/07	HPB 3 anos	Faxinal dos Guedes (SC)	Azevém; Adubação: esterco de suínos
31831	Jul/08	HPB 28 meses	Xaxim (SC)	Aveia; Adubação: não inf.
32172	Out/08	HPB 7anos	Jaborá (SC)	Aveia + azevém; Adubação: não inf.
32178	Out/08	HPB não inf..	Lindóia do Sul (SC)	Azevém; Adubação: esterco de suínos
33338	Jun/09	Jersey não inf.	Faxinal dos Guedes (SC)	Aveia; Adubação: esterco de suínos
33523	Jul/09	Mestiça 1ano	Quitandinha (PR)	Azevém; Adubação: esterco de galinha
33744	Set/09	Jersey 1,5anos	Catanduvas (SC)	Aveia; Adubação: nitrogenada
34011	Nov/09	Jersey não inf.	Concórdia (SC)	Azevém; Adubação: esterco de suínos

4.2 REPRODUÇÃO EXPERIMENTAL

Dos sete bovinos utilizados para experimentação, quatro morreram (bov. nº 136, nº 137, nº 138 e nº 139), dois se recuperaram (bov. nº 131 e nº 140) e um não adoeceu (bov. nº 141). Dos quatro animais que morreram, três (bov. nº 136, nº 137 e nº 139) morreram durante a noite e não foram observadas alterações clínicas prévias. Um bovino (nº 138), apresentou de forma rápida, cansaço, mucosas marrons, taquipnéia, taquicardia, incoordenação, decúbito com dificuldade de levantar-se e morte 20 minutos após o início dos sinais. Na necropsia, todos os animais em experimentação apresentavam as mucosas marrons (Figura 7a) e o

sangue de coloração escura (Figura 7b). O pulmão (Figura 7c) e o cérebro tinham coloração marrom. Dois bovinos(nº 137 e 138) apresentaram a musculatura esquelética (Figura 7d) e miocárdio esquerdo de coloração vermelho intenso (Figura 7e). O animal 139, apresentou mucosa do abomaso vermelha (Figura 7f). Em todos os animais que morreram em decorrência da experimentação, não foram observados lesões microscópicas.



Figura 7 - Intoxicação Experimental por Nitrato/Nitrito. **a.** Mucosa ocular marrom (bov. nº 136). **b.** Sangue escuro (bov. nº 136). **c.** Pulmões de tonalidade levemente marrom. **d.** Musculatura esquelética vermelho intenso (bov. nº 137) **e.** Miocárdio esquerdo vermelho intenso (bov. nº 139). **f.** Abomaso com mucosa avermelhada (bov. nº 139).

O bovino nº 140, que recebeu feno de aveia, administrado por via oral durante 9 horas, proveniente da propriedade 7 (Seara), apresentou os sinais clínicos aproximadamente 20 minutos após, e foi tratado com azul de metileno a 1%, na dose de 2 mg/kg, por via endovenosa e 10 minutos após, apresentava-se alerta. Decorridos mais 20 minutos, levantou normalmente e assim permaneceu até o dia seguinte, quando voltou a se alimentar

O bovino nº 141 recebeu por três dias, aveia verde proveniente de uma propriedade do município de Seara, SC, onde uma vaca havia adoecido com sinais clínicos compatíveis com intoxicação por nitrato e teve melhora rápida após tratamento com azul de metileno. Nenhuma alteração clínica foi observada.

Os resultados experimentais estão delineados na tabela 4.

Tabela 4 - Números dos bovinos, peso, tipo de pastagem e número da propriedade, quantidade de planta ingerida e tempo de ingestão, principais sinais clínicos e evolução, da intoxicação experimental por nitrato/nitrito.

Nº BOV	PESO (Kg)	PASTAGEM/ Nº DA PROPRIEDADE	TOTAL PLANTA INGERIDA Kg/PERÍODO	PRINCIPAIS SINAIS CLÍNICOS	EVOLUÇÃO
131	75	Azevém verde/2	96,8/10 dias	Mucosas levemente marrom, Lacrimejamento, Diarréia	Recuperação
136	110	Aveia verde/1	90/5 dias	Não observados	Morte
137	105	Feno de azevém/2	8,24/6 dias	Não observados	Morte
138	272	Feno de azevém/2	4,64/10 horas	Mucosas marrom, taquipnéia, taquicardia, incoordenação, decúbito	Morte
130	120	Feno de azevém/2	4,4/ 3 dias	Não observados	Morte
140	108	Feno de aveia/7	1,4/9 horas	Mucosas marrom, taquipnéia, taquicardia, incoordenação, decúbito	Recuperação 10 minutos após tratamento com azul de metileno
141	109	Aveia verde/3	68,85/3 dias	Não apresentou sinais clínicos	-

5 DISCUSSÃO

No estado de Santa Catarina, a intoxicação por nitrato/nitrito pode ser considerada como doença emergente. Essa enfermidade foi diagnosticada pela primeira vez em 2006 e a ocorrência de novos surtos vem aumentando anualmente.

No presente estudo foram caracterizados a epidemiologia, os sinais clínicos e as lesões da intoxicação por nitrato/nitrito em bovinos alimentados com aveia (*Avena sativa*) e azevém (*Lolium spp.*).

A doença ocorre em diferentes regiões do Estado sempre que há adubação química e/ou orgânica excessivas. A maior parte dos surtos se concentrou na região oeste, e se caracterizou por uso de matéria orgânica, geralmente esterco de suínos e ou de aves e por excessiva adubação nitrogenada. A maioria das propriedades do estado são pequenas áreas, com pecuária e agricultura, onde há a necessidade de máximo aproveitamento das áreas disponíveis. As propriedades não são mantidas somente para produção de leite, mas há integração de suínos e ou, de aves, o que possibilita o livre acesso a quantidades elevadas de esterco, o qual é utilizado em excesso sobre as pastagens, a fim de maior aproveitamento das áreas disponíveis para pastejo.

O uso excessivo de matéria orgânica contribui para o acúmulo de nitrato em algumas plantas. Além desta prática, as freqüentes estiagens que acometem a Região Oeste do estado, contribuem significativamente para a ocorrência de surtos de intoxicação por nitrato/nitrito. O uso excessivo de matéria orgânica e a escassez de chuvas são fatores fundamentais para o acúmulo de nitrato em algumas plantas (ROSENBERGER, 1975; RIET-ALVARIZA, 1993; CHEEKE, 1998; RADOSTITS et al., 2000; RIET-CORREA et al., 2007). Segundo Ozmen (2003), durante a seca há baixa disponibilidade de água no solo comprometendo a absorção de nutrientes pelas plantas. Após a chuva o crescimento das plantas é acelerado e estas incorporam grande quantidade de nitrato que não é transformado em aminoácidos, proteínas e outros compostos nitrogenados (OZMEN, 2003). Nessas situações há maior acúmulo de nitrato nas plantas que se ingeridas pelos animais pode produzir alterações clínicas e morte.

Em situações semelhantes essa enfermidade foi diagnosticada no estado de Paraíba, em bovinos alimentados com capim elefante (*Pennisetum purpureum*) e capim mandante (*Echinochloa polystachya*), (MEDEIROS et al., 2003).

O'Hara & Fraser (1975), relatam que as intoxicações por nitrato/nitrito podem ocorrer principalmente em períodos com dias chuvosos, com poucas horas de sol e baixas temperaturas. Essas alterações climáticas ocorreram no estado de Santa Catarina durante o inverno e primavera dos anos de 2008 e 2009, o que pode ter contribuído para um maior número de casos de intoxicação por nitrato/nitrito nesse período.

Os demais surtos verificados nas regiões do Alto Vale do Itajaí e do Planalto Serrano estão relacionados ao uso de adubação química excessiva. Essa afirmação está respaldada em observações de outros autores que também citam o uso excessivo de adubo químico rico em nitrogênio, como causa de acúmulo de nitrato em plantas, entre elas a aveia e azevém (NEWSOM et al., 1937; BRADLEY, BEATH & EPPSON, 1939; NICHOLLS, 1980; CHEEKE, 1998; RADOSTITS et al., 2000; SMITH, 2000; VILLAR et al., 2003; KOZLOSKI, 2009).

A água também pode conter teores elevados de nitrato, quando esta possuir elevados teores de matéria orgânica (ROSENBERGER, 1975; RADOSTITS et al., 2000), ou quando contaminada por fertilizantes (ROSENBERGER, 1975; YERUHAM et al., 1997; CHEEKE, 1998; RADOSTITS et al., 2000; SMITH, 2000; VILLAR et al., 2003). Em duas propriedades, uma no município de Rio do Sul (Propriedade 1) e outra em Seara (Propriedade 6) foi verificado que a água consumida pelos bovinos continha matéria orgânica e os níveis de nitrato foram de 7,2 ppm e 8,5 ppm respectivamente. É possível que bovinos que ingeriram alimentos que contenham valores significativos de nitrato, mesmo não suficientes para produzir intoxicação, mas se ao mesmo tempo beberem água também com concentrações de nitrato, a soma desse elemento pode resultar em intoxicação.

Em 2010, a ocorrência de mortes por intoxicação por nitrato/nitrito foi menor que nos últimos três anos. Isto pode ser explicado pela não ocorrência de período seco durante o inverno e primavera. Também pode ter contribuído para este fato, o baixo desenvolvimento das pastagens de inverno, que por motivos não conhecidos, foi verificado em todo o estado.

Em bovinos, o nitrato ingerido é convertido em nitrito (WANG et al., 1961; KOZLOSKI, 2009). O nitrito é responsável pela transformação da hemoglobina em metemoglobina e o pico de metemoglobinemia ocorre, ao redor de cinco horas após a ingestão do nitrato (BOERMANS, 1990; OZMEN, 2003). O tempo de apresentação da doença até a morte varia conforme a quantidade de nitrato ingerida e a quantidade de metemoglobina formada. Em bovinos valores entre 50-60% começam a expressar sinais de falta de oxigênio e os casos fatais ocorrem com 80% de metemoglobina (ROSENBERGER, 1975). Na maioria das propriedades onde a enfermidade ocorreu, os animais eram soltos nas pastagens pela

manhã e quando recolhidos á tarde, encontrava-se animais mortos, ou, alguns apresentavam cansaço, respiração ofegante, conjuntiva, marrom, urinavam com freqüência e morriam entre 15 a 30 minutos.

Os animais acometidos eram as melhores vacas, produtoras de leite, ou novilhas com fome. Isto pode ser explicado pelo fato de que nessas circunstâncias os animais ingerem maior volume de pasto e conseqüentemente maior quantidade de nitrato. O fornecimento de outros alimentos, como silagem e rações antes de colocar os animais em pastagens de risco pode evitar a ocorrência da enfermidade. Segundo Radostits et al. (2000), dietas ricas em carboidratos diminuem o risco de intoxicação e animais adaptados gradualmente podem ingerir dietas com até 8% de nitrato de potássio na MS.

No estudo experimental, o quadro clínico obtido foi idêntico aos descritos na literatura (THORP Jr, 1937; BRADLEY, BEATH & EPPSON, 1939; O'HARA & FRASER, 1975; EGYED & SHLOSBERG, 1980; VAN DIJK 1983, BOERMANS 1990; RADOSTITS et al., 2000; TOKARNIA, DÖBEREINER & PEIXOTO, 2000; MEDEIROS et al., 2003; OZMEN, 2003; McKENZIE et al., 2004; McKENZIE et al., 2009) e são observados na doença espontânea.

As lesões macroscópicas encontradas em bovinos que morreram pela intoxicação espontânea e experimental por nitrato/nitrito do presente estudo foram semelhantes às encontradas por outros autores (NEWSOM et al., 1936; THORP Jr, 1937; EGYED & SHLOSBERG, 1980; CARRIGAN & GARDNER, 1982; BOERMANS, 1990; BROWN, BURROWS & EDWARDS, 1990; VALLI, 1992; YERUHAM et al., 1997; RADOSTITS et al., 2000; OZMEN, 2003; McKENZIE et al., 2004) e no Brasil (MEDEIROS et al., 2003; LUCIOLI et al., 2007). No entanto, somente Thorp Jr (1937) descreve coloração vermelho intenso dos músculos cardíacos e esqueléticos (cor de cereja) e Davidson, Doughty & Bolton (1941), coloração vermelho intenso da musculatura esquelética.

O principal pigmento da musculatura é a mioglobina. Em presença de nitrito e outros subprodutos de reação deste composto, os pigmentos da musculatura podem sofrer numerosas alterações que dependem de fatores intrínsecos (pH, potencial de óxido-redução, atividade enzimática) e extrínsecos (aditivos, acidificação e aquecimento). Como o nitrito é um agente oxidante da mioglobina, provavelmente a reação inicial consiste na conversão da mioglobina e oximioglobina em metamioglobina. O óxido nítrico pode combinar-se com a metamioglobina originando a nitrosometamioglobina, que pode reduzir-se ao nitrosomioglobina que dá a coloração vermelha mais intensa da musculatura (ROÇA, 2000). Os quatro bovinos que morreram através de experimentação e os quatro que morreram pela

doença espontânea, todos apresentaram coloração vermelha intensa do miocárdio esquerdo e da musculatura esquelética. Dessa forma, é provável que todos esses animais morreram em decorrência da ação do nitrito oriundo da transformação do nitrato em nitrito e não pelo efeito direto do nitrato, apesar que um bovino (bov. n° 139) tinha coloração vermelho intenso da mucosa do abomaso. Essa alteração é atribuída ao efeito do nitrato (RADOSTITS et al. 2000).

Tokarnia, Döbereiner & Peixoto (2000) descrevem que a carcaça recém-aberta exala um cheiro forte de gases nitrosos. Os animais do presente estudo e que foram necropsiados, bem como por informações de veterinários que realizaram necropsias de bovinos que morreram por essa enfermidade, o odor forte das carcaças sempre estava presente.

Ao exame histológico de amostras de vísceras dos bovinos que morreram pela intoxicação espontânea e experimental não foram encontradas lesões. A ausência de lesões microscópicas também é descrita por outros autores (CARRIGAN E GARDNER, 1982; VAN DIJK, 1983; BOERMANS, 1990; CHOON, BRANDOW & HOWLETT, 1990; RIET-ALVARIZA, 1993; CHEEKE, 1998; RADOSTITS et al 2000; MEDEIROS et al. 2003; OZMEN 2003; MCKENZIE et al., 2004; TOKARNIA, DÖBEREINER E PEIXOTO, 2000; LUCIOLI et al., 2007; McKENZIE et al., 2009).

O tratamento com Azul de metileno a 1% é descrito como o antídoto específico para intoxicação por nitrito (VAN DIJK et al., 1983; BOERMANS, 1990; YERUHAM et al., 1997; RADOSTITS et al., 2000). O Azul de metileno combina-se com a enzima metemoglobina redutase e tem ação de carrear elétrons para o substrato metemoglobina, que por redução converte a metemoglobina em hemoglobina (VAN DIJK et al., 1983). Os bovinos intoxicados espontaneamente que receberam azul de metileno a 1%, na dose de 4 mg/kg PV/IV e o bovino submetido a experimentação que recebeu azul de metileno a 1% na dose de 2 mg/kg PV/IV apresentaram melhora, em poucos minutos após aplicação, levantando-se e mostrando inclusive apetite. Dependendo da quantidade de nitrato e conseqüentemente nitrito convertido no rúmen e a formação de metemoglobina pode-se aumentar essa dose em até 20 mg/Kg PV, porém elevadas doses de Azul de metileno podem causar metemoglobinemia (RADOSTITS et al., 2000).

O aborto é registrado com freqüência, como seqüela em surtos de intoxicação, sendo possível que episódios de anóxia grave possam causar danos ao concepto (RADOSTITS et al., 2000). Yeruham et al. (1997) descrevem que vacas prenhas que adoeeceram e não morreram, abortaram após o sexto dia da ocorrência do surto. Informações obtidas dos produtores referem-se a casos de aborto em vacas que pastoreavam em pastagem onde ocorreram casos e intoxicação por nitrato/nitrito.

O teste da difenilamina realizado nas pastagens onde ocorreram surtos, foram positivos, obtendo-se coloração azul forte em menos de 10 segundos. Esse mesmo teste realizado em pastagens sem o histórico da enfermidade resultou negativo ou, apenas em reações de levemente azul. Isso pode ser confirmado pelos resultados do teor de nitrato de amostras de pastagens obtidas através de exame bromatológico, onde amostras com valores menores, de 3003,54 ppm ou 0,3% de nitrato na MS tiveram reação positiva para o teste de difenilamina. O'Hara e Fraser (1975), encontraram amostras positivas em pastagens com níveis de nitrato de 0,5% na MS. Dessa forma o teste da difenilamina pode se tornar um grande aliado para indicar a presença de nitrato nas pastagens, antes que estas sejam utilizadas para alimentação de bovinos.

Teores de nitrato de potássio nas plantas acima de 1,5% (RADOSTITS et al., 2000) e 0,5 a 4,0% de nitrato (ROSENBERGER, 1975) podem produzir intoxicação em bovinos. As amostras avaliadas pela técnica de destilação a vapor, do presente estudo, revelaram teores de nitrato que variaram de 0,30% a 3,36%. Essa concentração indica que em todas as propriedades onde ocorreram os surtos as pastagens eram potencialmente tóxicas.

Amostras coletadas de duas propriedades da Região Serrana, que tiveram históricos de bovinos com manifestação de timpanismo quando colocados em pastagem de aveia, indicaram concentrações 0,4563 e 0,4076% de nitrato na matéria seca. Este fato sugere que essas concentrações de nitrato estariam no limite da quantidade necessária para produzir intoxicação em bovinos. Esses valores são semelhantes aos descritos por Rosenberg (1975) onde as concentrações mínimas de nitrato na matéria seca das plantas suficiente para produzir intoxicação estão entre 0,5, a 4,0%.

O diagnóstico da intoxicação por nitrato/nitrito pode ser efetuado através da epidemiologia, sinais clínicos, lesões encontradas na necropsia, teste de difenilamina na pastagem suspeita e análise da concentração de nitrato nas pastagens. As lesões de necropsia são sugestivas, desde que feita logo após a morte do animal, uma vez que algumas horas após a morte do animal a metemoglobina retorna a hemoglobina, desaparecendo a coloração escura do sangue, da carcaça e musculatura (NEWSOM et al., 1936; BROWN, BURROWS & EDWARDS, 1990; BOERMANS, 1990; VALLI, 1992; TOKARNIA, DÖBEREINER e PEIXOTO, 2000; CAWLEY, COLLINGS & DYSON, 1977). Esses fatores dificultam a formação do diagnóstico, principalmente se a necropsia não for realizada rapidamente após a morte.

6 CONCLUSÕES

Pastagens de aveia (*Avena sativa*) e ou de azevém (*Lolium spp*) cultivadas em solos com uso excessivo de matéria orgânica, principalmente de suínos e de aves e ou, fertilizantes químicos ricos em nitrogênio podem acumular nitrato e produzir intoxicação em bovinos.

A enfermidade caracterizada principalmente por respiração ofegante, sangue de coloração escura, mucosas de coloração marrom e morte rápida que acomete bovinos durante o período de inverno e primavera está relacionada á ingestão de pastagens com alto teor de nitrato.

A ocorrência da intoxicação por nitrato em bovinos foi observada somente em pastagens cultivadas em solos super adubados e principalmente após chuvas, antecedidas por período seco e ou, após um período de tempo nublado.

O teste da difenilamina é efetivo, apesar de qualitativo, nas pastagens que contém mais de 3000 ppm de nitrato e pode ser fundamental para prevenir contra o uso de pastagens ricas em nitrato.

O diagnóstico de intoxicação por nitrato/nitrito em bovinos pode ser efetuado através do histórico, dados epidemiológicos, sinais clínicos, lesões macroscópicas e ausência de lesões microscópicas, pelo teste de difenilamina e avaliação das concentrações de nitrato na pastagem.

O azul de metileno em concentração a 1%, quando aplicado por via endovenosa na dose de 2-4 mg/kg, é o tratamento curativo para a intoxicação por nitrato/nitrito.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALLABOUDI, A. R.; JONES, G. A. Effect of acclimation to high nitrate intakes on some rumen fermentation parameters in sheep. **Canadian Journal of Animal Science**, v. 65, p.841-849, 1985.

ALLISON, M. J. The role of ruminal microbes in the metabolism of toxic constituents from plants. In: KEELER, R. F.; VAN KAMPEN, K. R.; JAMES L. F. (ed.) Effects of poisonous plants on livestock. p. 101-118. Academic Press, New York, 1978.

ASBURG, A. C.; RHODE, E. A. Nitrite intoxication in Cattle: The effects of lethal doses of nitrite on blood pressure. **American Journal of Veterinary Research**, v. 25, n. 107: 1010-1103, 1964.

BRADLEY, W. B.; BEATH, O. A.; EPPSON, H. F. Oat hay poisoning. **Science**. v. 21, p. 365, 1939.

BRADLEY, W. B.; EPPSON, H. F.; BEATH, O. A. Nitrate as the cause of Oat Hay poisoning. **Journal American Veterinarian Medicine Association**, v. XCIV, p. 541-542, 1939.

BOERMANS H. J. Diagnosis of nitrate toxicosis in cattle, using biological fluids and a rapid chromatographic method. **American Journal of Veterinary Research**, v. 51, n. 3, p. 491-495, 1990.

BURROWS, G. E.; WAY, J. L. Methylene Blue vs. Nitrite. **Proceedings - Annual Meeting of the United States Animal Health Association**, v. 79, p. 266-270, 1975.

BROWN, C. M.; BURROWS, G. E.; EDWARDS W. C. Nitrate intoxication. **Veterinary and Human Toxicology**, v. 32, n. 5, p. 481-482, 1990.

CARRIGAN, M. J.; GARDNER, I. A. Nitrate poisoning in cattle fed sudax (*Sorghum* sp. hybrid) hay. **Australian Veterinary Journal**, v. 59, p. 155-157, 1982.

CAWLEY, G. D.; COLLINGS, D. F.; DYSON, D. A. Nitrate poisoning. **Veterinary Record**, v. 101, p. 305-306, 1977.

CHEEKE, P. R. Natural Toxicans in Feeds. **Forages, and poisonous Plants**. 2ª ed. Interstate Publishers: Illinois. 1998. 479p.

CHENG, K. J. et al. Induction of nitrate and nitrite metabolism in bovine rumen fluid and the transfer of this capacity to untreated animals. **The Canadian Veterinary Journal**, v. 65, p. 647-653, 1985.

DAVISON, W. B.; DOUGHTY, J. L.; BOLTON, J. L. Nitrate Poisoning of Livestock. **Canadian Journal of Comparative Medicine**, v. V, n. 11, p. 303-313, 1941.

DODD, D. C.; COUP, M. R. Poisoning of cattle by certain nitrate-containing plants. **New Zealand Veterinary Journal**, v. 5, p. 51-54, 1957.

EGYED, M. N.; SHLOSBERG, A. Ammonium nitrate poisoning in a herd of cattle. **Refuah Veterinarith**, v. 37, p. 101-103, 1980.

FLOSS, E. L. Manejo forrageiro de aveia (*Avena sativa*) e azevém (*Lolium sp*). In: PEIXOTO, A. M.; MOURA, J. C.; FARIA, V. P. Plantas forrageiras de pastagens. FEALQ: Piracicaba pp.191-228, 1995.

HALIBURTON, J. C. & EDWARDS W.C. Nitrate poisoning in Oklahoma Cattle during the winter of 1977-1978. **Veterinary and Human Toxicology**, v.20, p. 401-403, 1978.

HARRIS, D. J.; RHODES, H. A. Nitrate and Nitrite poisoning in cattle in Victoria. **Australian Veterinary Journal**, v.45, p. 590-591, 1969.

HELWIG, D. M.; SETCHELL, B. P. Observations on the diagnosis of nitrite poisoning in sheep. **The Australian Veterinary Journal**, p.14-17, 1960.

HIBBS, C. M.; STENCEL, E. L.; HILL, R. M. Nitrate toxicosis in cattle. **Veterinary and Human Toxicology**, v. 20, p. 1-2, 1978.

HIBBS, M. C. Cyanide and nitrate toxicoses of cattle. **Veterinary and Human Toxicology**, v. 21, n. 6, p. 401-403, 1979.

HOUSHOLDER, G. T.; DOLLAHITE, J. W.; HULSE, M.T.R. Dyphenylamine for the diagnosis of nitrate intoxication. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 148, p. 662-665, 1966.

JONCK, F. et al. Nitrate/nitrite poisoning in cattle fed oats (*Avena sativa*) and Ryegrass (*Lolium multiflorum*) in the state of Santa Catarina, Brazil. In: 8th Internatinal Symposium on Poisonous Plants. João Pessoa, Program and Abstracts, 2009.

JONES, T. C.; HUNT, R. D.; KING, N. W. Moléstias decorrentes de substâncias tóxicas e venenosas estranhas. **Patologia Veterinária**. 6^a Ed. Barueri: Manole, 2000. p. 705-794.

KELLERMAN, T. S.; COETZER, J. A. W.; NAUDÉ, T. W. Haemopoietic system. In: _____. **Plant poisonings and mycotoxicoes of livestock in Southern Africa**. Cape Town: Oxford University Press, 1990. cap 7, p. 193-213.

KISSMANN, K. G. **Plantas Infestantes e Nocivas**. Tomo I- 2^a Edição, 1997. BASF 825p.

KOZLOSKI, G. V. **Bioquímica dos ruminantes**. Santa Maria: Editora da Universidade Federal de Santa Maria, 2002. 140p. Bioquímica Microbiana Ruminal. p. 11-66.

LEWIS, D. The metabolism of nitrate and nitrite in the sheep. **Biochemical Journal**, v. 48, p. 175-180, 1950.

LORENZI, H. **Plantas Daninhas do Brasil**. Nova Odessa: Franciscana, 1982. 425p.

LUCIOLI et al, Intoxicação por nitrato/nitrito em bovinos. In: ENCONTRO NACIONAL PATOLOGIA VETERINÁRIA, 13^o, 2007. Campo Grande. **Anais do 13^o ENAPAVE**, 2007. CD-ROM

McPARLAND, P. J.; McRORY, F. J.; BELL, N. Nitrite poisoning in pigs. **The Veterinary Record**, v. 106, p. 201, 1980.

MCKENZIE R. A., et al. Nitrate-nitrite toxicity in cattle and sheep grazing *Dactyloctenium radulans* (button grass) in stockyards. **Australian Veterinary Journal**, v. 82, n. 10, p. 630-604, 2004.

MCKENZIE, R. A. et al. Alpaca plant poisonings: nitrate-nitrite and possible cyanide. **Australian Veterinary Journal**, v. 87, n. 3, p. 113-115, 2009.

MEDEIROS, R. M. T. et al. Intoxicação por nitratos e nitritos em bovinos por ingestão de *Echinochloa polystachya* (capim-mandante) e *Pennisetum purpureum* (capim-elefante) no sertão da Paraíba. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. v. 23, n. 1, p. 17-20, 2003.

MORAES, Y. J. B. **Forrageiras: conceitos, formação e manejo**. Livraria e Editora Agropecuária, Guaíba, 1995. 205p.

NEWSOM I. E. et al. Oat Hay Poisoning. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. XC, p. 66-75, 1937.

NOVAIS R.F.; MELLO, J.W.V. Relação Solo-Planta. In: Novais, R.F. et al. **Fertilidade do Solo**. 1 ed. Viçosa: SBCS, 2007. 1017 p. p.133-204.

O'HARA, P. J.; FRASER, A. J. Nitrate Poisoning in Cattle grazing crops. **New Zealand Veterinary Journal**. v. 23, n. 4, p. 45-53, 1975.

OZMEN, O. Nitrate poisoning in cattle fed *Chenopodium album* hay. **Veterinary and Human Toxicology**, v. 45, n. 2, p.83-84, 2003.

PICKRELL, J. A.; OEHME, F. W.; HICKMAN, S. R. Drought increases forage nitrate and cyanide. **Veterinary and Human Toxicology**, v. 33, n. 3, p.247-251, 1991.

PROPHET, E. B. et al. **Laboratory methods in histotechnology**. Washington: American registry of pathology, 1992. 274p.

ROÇA A, R.O. Tecnologia da carne e produtos derivados. Botucatu: Faculdade de Ciências Agrônômicas, UNESP, 2000, 202p.

RADOSTITS, O. M., et al. Doenças causadas por toxinas de plantas, fungos, cianofitas, clavibactéria e por venenos de carrapatos e animais vertebrados. In:_____. **Clínica**

veterinária: um tratado de doenças dos bovinos, ovinos, suínos, caprinos e eqüinos. 9 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000. cap.32, p. 1472-1547.

RIET-ALVARIZA, F. Intoxicação por nitratos e nitritos. In: RIET-CORREA, F.; MÉNDEZ, M. C.; SCHILD, A. L. **Intoxicações por Plantas e Micotoxicoses em Animais Domésticos.** vol.1. Montevideo: Editorial Agropecuaria Hemisferio Sur, 1993. cap.15, p. 291-297.

RIET-CORREA, F., MENDÉZ, M. D. C. Intoxicação por plantas e micotoxinas. In:_____. **Doenças de Ruminantes e Eqüídeos.** 3. ed. vol. 2. Santa Maria: Pallotti, 2007. cap.2, p.99-221.

ROGERS, P. A. M; HOPE-CAWDERY, M. J. Monensin, ketosis and nitrate toxicity in cows. **Veterinary Record**, v. 106, p. 311-312, 1980.

ROSENBERGER, G. Avvelenamenti. In:_____. **Malattie del Bovino.** Piacenza:Essegivi, 1975. p. 1120-1364

SÁ, J. P. G. Utilização da aveia na alimentação animal. **Instituto Agrônômico do Paraná (IAPAR)** Circular n°87, março, 1995.

SCHNEIDER, N. R.; YEARY, R. A. Nitrate and Nitrite pharmacokinetics in the dog, sheep, and pony. **American Journal of Veterinary Research**, v. 36, n. 7, p. 941-947, 1975.

SMITH, B. P. Distúrbios provocados por substâncias tóxicas. In:_____. **Medicina interna de grandes animais.** Barueri: Manole, 2002. p. 1614-1648.

TEDESCO, M. J. et al. **Análises de solo, plantas e outros materiais.** Boletim Técnico de Solos, 5. Porto Alegre : Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Agronomia 1995. 174p.

THORP Jr, F. Further observations on oat hay poisoning. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. XCII, p.159-170, 1937.

TOKARNIA C. H. Comunicação pessoal. Lages 2009.

TOKARNIA C. H., DÖBEREINER J. & PEIXOTO P. V. **Plantas Tóxicas do Brasil.** Rio de Janeiro: Editora Helianthus, 2000. 320p. Plantas que Causam Intoxicação por Nitratos/nitritos. p. 222-224.

VALLI, V. E. O. The Hematopoietic System. In: JUBB, K. V. F.; KENNEDY, P. C.; PALMER, N. **Pathology of Domestic Animals.** 4.ed. San Diego: Academic Press, 1992. v. 3, p. 101-265.

VAN DIJK A., et al. Treatment of nitrate intoxication in a cow. **Veterinary Record**, v. 112, n. 12, p. 272-279, 1983.

VILLAR, D. et al. Acute poisoning of cattle by fertilizer-contaminated water. **Veterinary and Human Toxicology**, v.45, n. 2, p. 88-90, 2003.

WANG, L. C.; GARCIA-RIVERA, J.; BURRIS, R.H. Metabolism of nitrate by cattle. **Biochemical Journal**, v. 81, n. 237, p. 237-242, 1961.

WRIGHT, M. J.; DAVISON, K. L. Nitrate accumulation in crops and nitrate poisoning in animals. **Advances in Agronomy**, v. 16, p. 197-247, 1964.

YERUHAM, I. et al. Nitrate toxicosis in beef and dairy cattle herds due to contamination of drinking water and whey. **Veterinary and Human Toxicology**, v. 39, n. 5, p. 296-298, 1997.

YONG, C.; BRANDOW, R. A.; HOWLETT, P. An unusual cause of nitrate poisoning in cattle. **The Canadian Veterinary Journal**, v. 31, p. 118, 1990.