

UFRRJ
INSTITUTO DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA
VETERINÁRIA
PATOLOGIA ANIMAL

TESE

**Comparação da toxicidade de *Vicia villosa* e *Vicia sativa* na
alimentação de Bovinos**

Luciane Orbem Veronezi

2016



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA
VETERINÁRIA
PATOLOGIA ANIMAL**

COMPARAÇÃO DA TOXICIDADE DE *VICIA VILLOSA* E *VICIA SATIVA* NA ALIMENTAÇÃO DE BOVINOS

LUCIANE ORBEM VERONEZI

Sob a Orientação dos Professores
Carlos Maria Antonio Hubinger Tokarnia (*In memoriam*)
Aldo Gava

e Co-orientação da Professora
Marilene de Farias Brito

Tese submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Doutora em Medicina Veterinária**, Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Área de Concentração em Patologia e Ciências Clínicas.

Seropédica, RJ
Julho de 2016

636.208959
V549c
T

Veronezi, Luciane Orbem, 1982-
Comparação da toxicidade de Vicia
villosa e Vicia sativa na
alimentação de bovinos / Luciane
Orbem Veronezi. - 2016.
71 f.: il.

Orientador: Marilene de Farias Brito.
Tese (doutorado) - Universidade
Federal Rural do Rio de Janeiro,
Curso de Pós-Graduação em Medicina
Veterinária - Patologia Animal.
Bibliografia: f. 56-61.

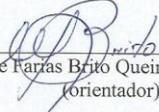
1. Bovino - Toxicologia - Teses.
2. Bovino - Doenças - Teses. 3.
Plantas venenosas para o gado -
Teses. 4. Bovino - Alimentação e
rações - Teses. 5. Testes de
toxicidade - Teses. 5. Toxicologia
veterinária - Teses. I. Brito,
Marilene de Farias, 1960- II.
Universidade Federal Rural do Rio de
Janeiro. Curso de Pós-Graduação em
Medicina Veterinária - Patologia
Animal. III. Título.

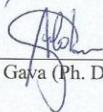
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE MEDICINA VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA

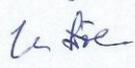
LUCIANE ORBEM VERONEZI

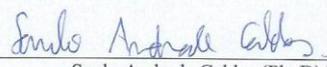
Tese submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Doutor em Ciências**, no Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, área de Concentração em Patologia Animal.

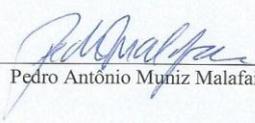
TESE APROVADA EM 27/07/2016


Marilene de Farias Brito Queiroz (Ph. D) UFRRJ
(orientador)


Aldo Gava (Ph. D) UDESC


Jurgen Dobereiner (Ph. D) EMBRAPA


Saulo Andrade Caldas (Ph. D) UFRRJ


Pedro Antônio Muniz Malafaia (Ph. D) UFRRJ

DEDICO

A Deus e a todos que de forma direta ou indireta contribuíram para que mais essa etapa de minha profissionalização e crescimento pessoal se concretizassem.

À minha mãe Laura, ao meu pai Egeu, aos meus irmãos Patricia e Egeu Augusto por terem me dado todo o apoio e incentivo que precisei para realizar este grande sonho.

Ao professor Carlos Hubinger Tokarnia (*In memoriam*) pela referência de ética, profissionalismo e dedicação à Medicina Veterinária.

“Ich wär’ ein Elefant, ich jauchzte laut, nicht wegen des Elfenbein, sondern wegen der dicken Haut.”

D. Martin Niemöller

“Se eu fosse um elefante, eu jubilava em voz alta, não pelo marfim, mas pela pele grossa.”

Tradução Jürgen Döbereiner

“Você não pode provar uma definição. O que você pode fazer é mostrar que ela faz sentido.”

Albert Einstein

AGRADECIMENTOS

A Deus pelo dom da existência, pelos que a geraram e por todos os que me cercaram de cuidados, amor e carinho no decorrer destes anos. Agradeço-lhe PAI, pela força que me impulsionou a chegar até aqui e poder realizar mais um sonho.

A UFRRJ e a PPGMV pela oportunidade de realização do curso.

A UDESC e ao LAPA pela concessão dos recursos e espaço físico para a realização dos procedimentos experimentais.

A EPAGRI - Estação Experimental de Lages pela seção do uso do Laboratório de Moinhos para preparação das amostras.

A Capes pelo apoio financeiro concedido através da bolsa de doutorado.

Aos meus familiares

Aos meus pais extraordinários, Laura e Egeu, pela constante educação, incentivo e apoio. Não poderiam se mostrar mais empenhados, durante toda minha vida, para garantir que eu tivesse todas as oportunidades possíveis para realizar meus sonhos. Agradeço-lhes pelo amor e pelo sacrifício!

Aos meus irmãos Patricia e Egeu Augusto, pelo companheirismo, cumplicidade e incentivo e toda ajuda necessária para realização deste trabalho.

Ao meu namorado e companheiro Erisson Josué, pelo amor, carinho, presença, amizade, compreensão e acima de tudo a sua enorme paciência.

A família Orbem e Veronezi, pelo carinho, incentivo e constante preocupação. Em especial a vó Luiza (*in memorian*), as tias Adelir, Maria Delourdes, Anita e Izaléia, ao tio Angelo e aos primos Kátia, Roberval e Angela.

A família Paes e Souza, pelo carinho, incentivo e hospitalidade. Agradeço em especial ao seu Eris (sogra) e a Gilmara (sogra).

Todos de uma forma ou de outra contribuíram para a realização deste sonho.

Aos professores

Ao mestre Carlos Hubinger Tokarnia (in memorian)

“Algumas pessoas marcam a nossa vida, deixam mensagens que nunca se apagam das nossas mentes, que se tornam aprendizados que levamos para sempre conosco”.

Professor, você foi uma das pessoas mais marcantes em toda a minha formação. Suas marcas deixadas foram por meio de palavras, mas principalmente foram por meio de suas ações. Sua ética, generosidade, amizade e humildade foram atitudes e qualidades que ficaram de exemplo e inspiração. Eu o admiro profundamente e tenho, assim como sempre terei uma

grande estima pela sua pessoa. Obrigado por dedicar-se ao seu trabalho com tanto entusiasmo e verdade, proporcionando a todos que tiveram a oportunidade de conviver com o senhor experiências únicas e de valores imensuráveis.

Carlos, você será sempre para mim uma referência, a melhor referência de ética, amor, e dedicação à Medicina Veterinária. Enfim, tudo o que eu gostaria de lhe dizer se resume em uma simples frase adaptada de Isaac Newton, “**Professor se consegui ver mais longe hoje, foi por estar de pé sobre ombros de gigantes**”. **Eterna gratidão!!!**

Sinto muito não ter concluído nosso trabalho antes de sua partida!

A minha orientadora, co-orientadora e professora **Marilene Farias de Brito** pela disponibilidade de orientação, dedicação, paciência, e principalmente pela amizade e hospitalidade durante minha passagem pela UFRRJ e durante o processo de confecção da tese. Obrigada por continuar o belo legado deixado pelo professor Carlos.

Ao meu orientador e professor **Aldo Gava** pelos ensinamentos e oportunidades concedidas, e principalmente pelo incentivo e paciência que me fizeram crescer muito profissionalmente e pessoalmente. Obrigada por despertar em mim a paixão pela Patologia e Plantas Tóxicas. Professor o senhor foi o maior responsável pela realização deste sonho. Obrigada por não desistir de mim!

Ao professor **André Thaler** pela concessão do uso das instalações do Projeto Tambo Leiteiro, CAV/UEDESC e do fornecimento de animais para realização dos experimentos. Agradeço de coração a sua ajuda, apoio e incentivo.

A professora **Mari Lucia Campos**, do Departamento de Solos e Recursos Naturais do CAV/UEDESC, pelos valiosos conselhos, empatia e estima, pessoa de caráter excepcional a quem devo parte dos conhecimentos obtidos neste período. Obrigada por não poupar seu tempo no ensino e auxílio das minhas análises.

A professora **Cileide Maria Medeiros de Coelho**, do Departamento de Sementes CAV/UEDESC, pela seção do laboratório para realização das análises experimentais, assim como pela atenção, ajuda e conhecimentos concedidos. Sou eternamente grata.

Ao professor **Henrique M. N. Ribeiro-Filho**, do Departamento de Nutrição, CAV/UEDESC, pela realização das análises bromatológicas.

Ao setor de Patologia Animal da UFRRJ e da UDESC

Aos colegas de pós-graduação pelos bons momentos vividos e conhecimentos compartilhados.

Aos bolsistas e estagiários da mesma forma agradeço a todos.

Aos funcionários pela ajuda, amizade e pelo convívio diário.

Na execução dos experimentos

Que a lembrança de teus nomes seja capaz de demonstrar meus sinceros e profundos agradecimentos pela possibilidade de tornar, de diversas maneiras, a realização de toda a parte experimental deste trabalho.

Ao Júnior, Fernando, Guilherme, Maurício, Mateus, Ana, Daiane, Barbara e Franciele o meu agradecimento.

A Rita, técnica em laboratório, pelo auxílio na confecção das lâminas e pelo carinho e amizade.

Ao seu Airton, técnico do laboratório de moinhos, pela ajuda, companheirismo e ensinamentos passados.

A todos que me auxiliaram, sem exceção, agradeço de coração!

RESUMO

VERONEZI, Luciane Orbem. **Comparação da toxicidade de *Vicia villosa* e *Vicia sativa* na alimentação de Bovinos**. 2016. 69 p. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária, Patologia Animal). Instituto de Veterinária. Departamento de Medicina Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2016.

No presente estudo caracterizou-se a epidemiologia, os sinais clínicos, as lesões macroscópicas e microscópicas da intoxicação espontânea e experimental por *Vicia villosa*, bem como a avaliação da possível toxicidade de *Vicia sativa* em bovinos. A doença granulomatosa sistêmica (DGS ervilhaca-associada) foi verificada em 7 propriedades distribuídas nos Estados de Santa Catarina, Paraná e Rio Grande do Sul, onde a alimentação principal era aveia e/ou azevém consorciados com *V. villosa* e/ou de azevém consorciado com *V. villosa* e em menor quantidade *V. sativa*. Todos os bovinos que desenvolveram a doença eram vacas, em lactação e da raça Holandês. A DGS ervilhaca-associada foi reproduzida em seis vacas holandesas em lactação, através do fornecimento de *V. villosa* verde no cocho e em pastagens de *V. villosa* e azevém. Nos demais grupos experimentais (grupo 3, *V. villosa*/*V. sativa*/vacas, pastejo; grupo 4, *V. sativa*/vacas, pastejo; grupo 5, *V. villosa*/*V. sativa*/novilhas e grupo 6, *V. villosa*/novilhas, pastejo) não verificou-se alterações clínicas e patológicas relacionadas a DGS ervilhaca-associada. Das seis vacas que desenvolveram a doença granulomatosa sistêmica, uma vaca apresentou quadro clínico leve (grupo 2/vaca 6/*V. villosa*, pastejo), quatro vacas desenvolveram o quadro moderado da doença (grupo 1, vacas 1 e 2/*V. villosa*/cocho e grupo 2, vacas 4 e 5/*V. villosa*/pastejo) e apenas em uma vaca verificou-se o quadro grave da doença (grupo 2, vaca 3/*V. villosa*/pastejo). *V. villosa* foi tóxica para bovinos, produzindo doença granulomatosa crônica quando ingerida em quantidades superiores a 38,2g/kg/dia, por um período de 71 ou, em pastoreio direto por um período superior a 28 dias. As principais manifestações clínicas consistiam em áreas de alopecia e crostas na pele, coceira, febre, conjuntivite, diarreia, queda na produção de leite e perda de peso. Macroscopicamente verificaram-se múltiplos nódulos branco-acinzentados principalmente em linfonodos, rins e coração, e na histologia estes caracterizavam um infiltrado granulomatoso composto por macrófagos, linfócitos, células gigantes, células epitelioides, plasmócitos e eosinófilos. As pastagens de *V. villosa* quando ingerida por bovinos jovens, por um período 68 dias não produziu alterações clínicas. As pastagens de *V. sativa* quando ingerida por vacas de alta produção leiteira por um período de 76 dias não produziu doença granulomatosa crônica. A ingestão de *V. villosa* por períodos prolongados conduziu a baixos índices produtivos como: baixa produção leiteira, baixos índices reprodutivos e pode predispor o surgimento de doenças infecciosas. Na análise bromatológica determinou-se a presença de fitato, em pequenas quantidades, nas amostras de *Vicia* utilizadas na experimentação, em diferentes fases do seu crescimento. Os resultados das análises bioquímicas de amostras de sangue e fezes evidenciaram baixas quantidades séricas de zinco e excessivas perdas fecais de Ca e Zn nos animais intoxicados por *V. villosa* que desenvolveram a doença granulomatosa na forma moderada e grave, indicando um possível envolvimento de distúrbios de ordem metabólica na patogênica da doença.

Palavras-chave: *Vicia villosa*. *Vicia sativa*. Intoxicação experimental. Vacas. Novilhas.

ABSTRACT

VERONEZI, Luciane Orbem. **Comparison of the toxicity of *Vicia villosa* and *Vicia sativa* in feed for cattle.** 2016. 69 p. Thesis (PhD in Veterinary Medicine, Animal Pathology). Veterinary Institute. Veterinary Medicine Department, Federal Rural University of Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2016.

In this study the epidemiology, clinical signs, macroscopic and microscopic lesions related to spontaneous and experimental intoxication by *Vicia villosa* and the evaluation of the possible toxicity of *Vicia villosa* in cattle were characterized. The systematic granulomatous disease (SGD associated with vetch) was verified in 7 localities distributed in Paraná, Santa Catarina and Rio Grande do Sul States, with main feed that includes oats and/or ryegrass in association and *V. villosa* and/or ryegrass associated with *Vicia sativa*, and in lower quantity. All cattle that developed the disease were cows, lactating and Dutch. The SGD associated with vetch was reproduced in six lactating Dutch cows, by supplying green *V. villosa* in the trough and *V. villosa* and ryegrass pasture. In the other experimental groups (group 3, *V. villosa* / *V. sativa*/cows, grazing; group 4, *V. sativa*/cows, grazing; group 5, *V. villosa*/*V. sativa*/heifers and group 6, *V. villosa*/heifers, grazing) do not verified clinical and pathological alterations related to the SGD associated with vetch. Six cows developed the SGD, one cow presented a leigh clinical condition (group 2/cow 6/*V. villosa*, pasture), four cows developed a moderated clinical condition (group 1, cows 1 and 2/*V. villosa*/trough and group 2, cows 4 and 5/*V. villosa*, grazing), and just one cow presented a severe clinical condition (group 2, cow 3/*V. villosa*/pasture. *V. villosa* was toxic to cattle and produced a chronic granulomatous disease when ingested in amounts greater than 38.2 g/kg/day for 71 days, or in direct grazing for a period of more than 28 days The main clinical signs consisted of alopecia and cutaneous crusts, pruritus, fever, conjunctivitis, diarrhea, reduction of milk production and weight loss. Macroscopically, multiple white-grayish nodules were observed, specifically in the lymph nodes, kidneys and heart, and histology revealed a granulomatous infiltrate composed of macrophages, lymphocytes, giant cells, epithelioid cells, plasma cells and eosinophils. When ingested by young cattle, the *V. villosa* pasture, for a period of 68 days, do not produce clinical modifications. When ingested by cows with high milk yield, the *V. sativa* pasture, for a period of 78 days, does not produce chronic granulomatous disease. Ingestion of *V. villosa* for a long time led to low production rates, such as low milk production, low reproduction rates and predisposition to infection diseases. In the bromatological analysis, the presence of phytate, in low levels, in the samples of *Vicia* used in experimental works, in different phases of the culture was determined. The biochemical blood and feces results showing lower amounts of serum sinc and loss of Ca and Zn feces in animals poisoned by *V. villosa*, that developed granulomatous disease in severe and moderate conditions, possibly indicated the presence of a metabolic disorder in the pathogen of the disease.

Keywords: *Vicia villosa*. *Vicia sativa*. Experimental poisoning. Cows. Heifers.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Estudo experimental de doença granulomatosa sistêmica em bovinos, Setor de Patologia Animal, CAV/UEDESC.	30
Tabela 2: Descrição dos animais utilizados no estudo experimental da doença granulomatosa sistêmica em bovinos, Setor de Patologia Animal, CAV/UEDESC.	31
Tabela 3: Surtos de doença espontânea por <i>Vicia villosa</i> , acompanhados no período de 2006 a 2010, Setor de Patologia Animal, CAV/UEDESC.	35
Tabela 4: Período de consumo da planta para o início das alterações clínicas, a intensidade dos sinais relacionados ao tempo de ingestão e a evolução do quadro clínico. Estudo experimental da doença granulomatosa sistêmica em bovinos, Setor de Patologia Animal, CAV/UEDESC.	38

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** *Vicia sativa*. **A.** Folhas e flores de *Vicia sativa*. Inflorescências avermelhadas ou purpúreo-azuladas, emparelhadas, e na maioria das vezes únicas. **B.** Detalhe das hastes delgadas com folhas compostas alternadas, caule cilíndrico e ereto. Na extremidade de cada haste há a presença de gavinhas. 20
- Figura 2:** *Vicia villosa*. **A.** Pastagem com folhas e flores de *Vicia villosa*. Inflorescências papilionáceas, de coloração roxa a azul de até 1 cm de comprimento e 7 mm de diâmetro. **B.** Detalhe hastes delgadas com folhas compostas alternadas e inflorescência em rácermos com 10 a 30 flores. Na extremidade de cada haste há a presença de gavinhas. 22
- Figura 3:** *Vicia villosa*. **A.** Haste delgada com folhas compostas alternadas de aspecto aveludado. **B.** Inflorescências papilionáceas, de coloração roxa a azul. **C.** Detalhe das inflorescências e formação da vagem. **D.** Detalhe das vagens com 4-8 sementes globulares no seu interior. 23
- Figura 4:** **A.** Sementes de *Vicia sativa* (ervilhaca comum). **B.** Sementes de *Vicia villosa* (ervilhaca peluda). Estudo experimental da doença granulomatosa sistêmica em bovinos, Setor de Patologia Animal, CAV/UDESC. 31
- Figura 5:** **A.** Múltiplas áreas de alopecia na face, orelhas e pescoço. Observa-se avermelhamento e rachaduras ao redor da narina e no plano nasolabial. **B.** Placas crostosas e avermelhadas nos tetos, úbere e face medial dos membros pélvicos. **C. Rim** com múltiplos pontos esbranquiçados na superfície capsular. Estudo natural da doença granulomatosa sistêmica em bovinos, Setor de Patologia Animal, CAV/UDESC. 36
- Figura 6:** **A.** Coração com múltiplas áreas esbranquiçadas a amareladas no miocárdio. **B.** Linfonodo inguinal com múltiplas nodulações brancas a acinzentadas. Estudo natural da doença granulomatosa sistêmica em bovinos, Setor de Patologia Animal, CAV/UDESC. 37
- Figura 7:** **A.** Aparecimento de áreas irregulares de alopecia na face (28° ao 33° dia). **B.** Extensão das lesões alopecicas na face e pescoço (36° dia). **C.** Áreas multifocais de alopecia na face, orelha e pescoço; aumento do linfonodo pré-escapular (37° dia) (seta). Ingestão de *Vicia villosa*, Vaca 3. CAV/UDESC. 41
- Figura 8:** **A.** Emagrecimento progressivo e anorexia (40° dia). O animal permanecia nesta posição a maior parte do tempo. **B.** Rugosidade, ressecamento e formação de feridas e crostas na pele da face e pescoço (47° ao 50° dia). **C.** Áreas de alopecia na região abdominal lateral em paliçadas, dispostas obliquamente ou transversalmente (45° ao 50° dia). Ingestão de *Vicia villosa*, Vaca 3. CAV/UDESC. 42
- Figura 9:** **A.** Fígado aumentado de tamanho. **B.** Coração com estrias e pequenas áreas levemente branco-amareladas na superfície pericárdica. **C.** Baço com aumento de volume dos folículos linfóides com colorações branco-acinzentados e proeminentes no parênquima esplênico. Ingestão de *Vicia villosa*, Vaca 3. CAV/UDESC. 44
- Figura 10:** **A. e B.:** Linfonodo com infiltrado inflamatório granulomatoso. A infiltração granulomatosa substitui grandes extensões de tecido linfático. HE. Obj. 10. **C.** Detalhe do infiltrado inflamatório granulomatoso com a formação de células multinucleadas. HE, Obj. 40. 45
- Figura 11:** **A.** Coração com infiltrado inflamatório granulomatoso no miocárdio. A infiltração granulomatosa destrói e substitui grandes extensões de tecido miocárdico. HE. Obj. 10. **B.** Infiltrado inflamatório granulomatoso no interstício renal deslocando e 46

destruindo as estruturas normais do néfron. HE. Obj. 20. **C.** Segmento da pele com erosões e úlceras e a formação de crostas serocelulares. Dermatite perivascular e perianexal granulomatosa. HE. Obj. 10. Ingestão de *Vicia villosa*, Vaca 3. CAV/UDESC.

Figura 12: A e B. Tireoide e glândula salivar submandibular com infiltrado inflamatório granulomatoso, respectivamente. A infiltração granulomatosa substitui grandes extensões de tecido glandular tireoidiano e submandibular. **C.** No fígado, observaram-se congestão, vacuolização moderada difusa e necrose de coagulação multifocal. O infiltrado granulomatoso localizava-se difuso encontrando-se principalmente na região centrolobular e nas tríades portais. HE. Obj. 10. Ingestão de *Vicia villosa*, Vaca 3. CAV/UDESC.

LISTA DE ABREVIATURAS

%	Porcentagem ou percentagem
μ /L	Microlitros por litro
^a	Numeral ordinal
AST	Aspartato aminotransferase
BHC	Laboratório de Análises Clínicas de Humanos e Animais
Ca	Cálcio
Capes	Comissão de Aperfeiçoamento de Pessoal do Nível Superior
CAV	Centro de Ciências Agroveterinárias
CETEA	Comitê de Ética na Experimentação Animal
cm	Centímetros
d	Dias
DGS	Doença granulomatosa sistêmica
DUIB	Diuriedo isobutano
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
et al.	Colaboradores
EUA	Estados Unidos da América
g	Gramas
g/gL	Gramas por decilitro
g/Kg	Gramas por quilograma
g/Kg/dia	Gramas por quilograma de peso vivo por dia
GB	Gordura bruta
GGT	Gamaglutamil transferase
H&E	Hematoxilina e Eosina
HE	Hematoxilina e eosina
HPB	Holandês preto e branco
IV	Número quatro em algarismo romano
Kg	Quilogramas
Kg/d	Quilograma por dia
L	Litro
LAPA	Laboratório de Patologia Animal
m	Metros
mm	Milímetros
mm ³	Milímetro cúbico
mmol/l	Moléculas por litro
MS	Matéria seca
NE	Não foi examinado
Nº	Número
Obj.	Objetiva microscopia óptica
°C	Graus centígrados
p	Páginas
pH	Potencial de hidrogênio
PPGMV	Programa de pós-graduação em Medicina Veterinária
ppm	Partes por milhão
PR	Paraná
PV	Peso vivo
PV/d	Peso vivo por dia

PV/dia	Peso vivo por dia
RJ	Rio de Janeiro
RS	Rio Grande do Sul
SC	Santa Catarina
sp.	Uma espécie
spp.	Várias espécies
subsp	Subespécie
UDESC	Universidade do Estado de Santa Catarina
UFRRJ	Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro
V.	<i>Vicia</i>
VR	Valor de Referência
X	Verso
Zn	Zinco

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	17
1 OBJETIVOS	18
1.1 Objetivos Gerais	18
1.2 Objetivos Específicos	18
2 REVISÃO DE LITERATURA	19
2.1 Gênero <i>Vicia</i> (Fabaceae)	19
2.1.1 <i>Vicia sativa</i>	19
2.1.1.1 Aspectos botânicos, distribuição e habitat	19
2.1.1.2 Toxides de <i>Vicia</i> spp e <i>Vicia sativa</i> L.	21
2.1.2 <i>Vicia villosa</i> (Roth)	21
2.1.2.1 Aspectos botânicos, distribuição e habitat	21
2.1.2.2 Toxidez de <i>Vicia villosa</i>	23
2.1.2.2.1 Toxidez para monogástricos	24
2.1.2.2.2 Toxidez para poligástricos	24
2.1.2.2.2.1 Intoxicação espontânea	25
2.1.2.2.2.2 Intoxicação experimental	29
3 MATERIAL E MÉTODOS	30
3.1 Doença espontânea	30
3.2 Estudo experimental	30
4 RESULTADOS	34
4.1 Doença espontânea	34
4.2 Estudo experimental	37
4.2.1 Sinais clínicos	38
4.2.2 Necropsia	43
4.2.3 Histologia	43
4.2.4 Bromatologia	48
4.2.5 Hemograma	48
4.2.6 Pesquisa de zinco sérico	48
4.2.7 Pesquisa de zinco e cálcio hepáticos	48
4.2.8 Pesquisa de zinco e cálcio fecais	48
4.2.9 Determinação do Ácido Fítico	49
5 DISCUSSÃO	50
6 CONCLUSÕES	55
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	56
ANEXOS	62

INTRODUÇÃO

Vicia spp são plantas forrageiras, conhecidas popularmente por ervilhacas ou vicas e usadas como pastagens em várias regiões do mundo, principalmente na Europa, América do Norte e América do Sul. No Brasil essas plantas são cultivadas nas regiões Sul e Sudeste e utilizadas para alimentação de bovinos e para adubação verde, particularmente, como cobertura do solo em plantio direto.

A mortalidade de bovinos que pastejam em pastagens constituídas por “ervilhaca” vem preocupando técnicos e produtores rurais. No passado a “ervilhaca” (*Vicia sativa*) era utilizada na alimentação de bovinos sem restrições, exceto pela possibilidade de ocorrer timpanismo. No entanto, nos últimos anos, houve o surgimento de uma enfermidade granulomatosa sistêmica. Os bovinos acometidos apresentam lesões de pele que se caracterizam por áreas alopecicas e crostosas principalmente na cabeça, no pescoço, no períneo e nas mamas. À necropsia são observados múltiplos nódulos branco-acinzentados em diversos órgãos dos animais afetados. Ao exame histológico observa-se infiltrado inflamatório constituído de macrófagos, linfócitos, células epitelioides, células multinucleadas, plasmócitos e eosinófilos (BARROS et al., 2001). Essa enfermidade foi observada, principalmente, em vacas de alta produção leiteira, mantidas em pastagens constituídas por *Vicia villosa* e não por *Vicia sativa*. A doença espontânea tem sido observada a partir de 45 dias após início do pastoreio (BARROS et al., 2001).

Embora, a enfermidade produzida por “ervilhaca” tenha sido diagnosticada inicialmente nos Estados Unidos (PANCIERA; JOHSON; OSBURN, 1966), no Brasil foi diagnosticada pela primeira vez no Rio Grande do Sul (BARROS et al., 2001) e posteriormente, em Santa Catarina e no Paraná (dados resgistrados no Setor de Patologia Animal – Lages - SC). A causa da doença ainda não é conhecida. Uma doença clínica e lesionalmente idêntica à enfermidade produzida por “ervilhaca” ocorre também em vacas de alta produção leiteira quando alimentadas com bagaço de laranja peletizado (GAVA; BARROS, 2007).

O presente trabalho tem por objetivo descrever surtos de intoxicação espontânea por *Vicia villosa* em bovinos, reproduzir experimentalmente a doença granulomatosa sistêmica nessa espécie e comparar a toxicidade de *Vicia villosa* com *Vicia sativa*.

1 OBJETIVOS

1.1 Objetivos Gerais

- Avaliar o quadro clínico-patológico da doença granulomatosa sistêmica crônica (DGS ervilhaca - associada) em sete surtos da doença espontânea.
- Reproduzir experimentalmente a doença granulomatosa sistêmica crônica em vacas de alta produção leiteira, através da alimentação com *Vicia villosa* e elucidar a possível interação com *Vicia sativa* na produção da doença.

1.2 Objetivos Específicos

- Avaliar quadro clínico-patológico da doença granulomatosa sistêmica em bovinos alimentados com *Vicia villosa* e sua possível relação com distúrbios de ordem metabólica.
- Verificar o tempo de pastoreio e a quantidade de planta necessária para o surgimento dos sinais clínicos da doença.
- Avaliar a possível toxicidade de *Vicia sativa* para vacas de alta produção leiteira.
- Verificar o potencial tóxico de pastagens consorciadas de *Vicia villosa* e *Vicia sativa* para alimentação de vacas e novilhas leiteiras.
- Avaliar a possível toxicidade de *Vicia villosa* para novilhas da raça Holandês.
- Avaliar possíveis alterações de hemograma de bovinos alimentados com *Vicia villosa*.
- Determinar as dosagens séricas de zinco (Zn) e fecais de cálcio (Ca) e zinco (Zn) dos bovinos alimentados com *Vicia villosa* e *Vicia sativa* separada ou consorciadamente.
- Verificar os teores de ácido fítico de *Vicia villosa* e *Vicia sativa*.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Gênero *Vicia* (Fabaceae)

A Família Fabaceae, também conhecida como Leguminosae, contém mais de 650 gêneros e 18.000 espécies distribuídas ao longo das regiões mais temperadas da Europa, Ásia e das Américas. O gênero *Vicia* (V.) possui uma variedade de espécies como *V. sativa*, *V. ervilia*, *V. cercorpes*, *V. lutea*, *V. narbonensis*, *V. faba* e *V. villosa*. (MIRALI; EL-KHOURI; RIZK, 2007). No Brasil existem diferentes espécies nativas de *Vicia*, porém as espécies exóticas como *Vicia sativa* L. e *Vicia villosa* Roth são de grande interesse econômico (BASTOS; MIOTTO, 1996; BARROS et al., 2001; FIGHERA, 2004).

Vicia spp são plantas leguminosas, trepadeiras, anuais ou perenes, amplamente utilizadas como forragem devido ao seu alto valor nutricional e sua resistência ao frio e à seca (ODRIOZOLA et al., 1990). As plantas do gênero *Vicia* spp são utilizadas como pastagens de inverno em vários países de clima temperado ou subtropical, e são conhecidas popularmente como ervilhaca ou vica (GREEN; KLEYNHANS, 1989).

As ervilhacas exóticas são semeadas no início do outono, em março ou abril (PUPO, 1979; MORAES, 1995), e atinge excelente volume de massa verde para pastejo animal principalmente em junho-agosto (MORAES, 1995). A floração geralmente ocorre 90 dias após a semeadura (PUPO, 1979).

Espécies de ervilhaca são ocasionalmente plantadas como cultivo singular para a proteção e adubação verde do solo, mas, na maioria das vezes, são consorciadas com aveia, centeio, cevada, azevém, trigo, falaris e festuca. Essas culturas consorciadas servem de apoio, (as vicas são plantas trepadeiras) para o crescimento das ervilhacas e para propiciar maior volume de forragem de valor nutritivo mais equilibrado (MORAES, 1995).

A maioria das espécies de ervilhacas (*Vicia* spp) possui um longo tronco, composto por folhas alternadas. A planta se prende por gavinhas a outras plantas e possui uma ou múltiplas flores em ramos subsésseis ou pedunculados na axila das folhas (ODRIOZIOLA et al., 1990), como descrito a seguir.

2.1.1 *Vicia sativa*

2.1.1.1 Aspectos botânicos, distribuição e habitat

Vicia sativa L., conhecida como ervilhaca comum, é originária do sul da Europa, porém encontra-se generalizada na bacia do Mediterrâneo, Ásia Central, China, Ásia Oriental, Índia e nos Estados Unidos (EUA). Esta ervilhaca é moderadamente tolerante ao frio e pode crescer em áreas com invernos brandos (UC SAREP, 2006; SATTELL et al., 1998). É encontrada em áreas com precipitação anual que variam de 310 a 1.630 milímetros (mm) e em uma grande variedade de solos, com uma preferência para os bens drenados e moderadamente férteis, com um pH variando de 6,0 a 7,0 (FAO, 2010; UC SAREP, 2006).

A ervilhaca comum possui uma raiz fina, muito ramificada que pode ir de 1-1,5m de profundidade. Suas hastes são delgadas, angulares, rastejantes e ramificadas, que alcançam até 2m. As folhas são compostas com 3-8 pares de folíolos opostos e 2-3 gavinhas terminais que servem de sustentação, uma vez que são plantas trepadeiras. Os folhetos são elípticos ou oblongos, 1,5-3,5cm de comprimento, 5-15 mm de largura. Caules e folhas são glabros. As flores, suportadas nas axilas das folhas, são avermelhadas ou purpúreo-azuladas, podendo ser brancas, emparelhadas, e na maioria das vezes únicas. Os caules são cilíndricos, eretos e com

3,5-8cm de comprimento. Suas sementes são acastanhadas e muitas vezes pretas (ver Figura 1 A e B) (FAO, 2010; UC SAREP, 2006; SATTELL et al., 1998).

Vicia sativa é uma forragem palatável, tanto na forma fresca, como em feno e silagem. Também é utilizada como cobertura orgânica e adubação verde do solo (SATTELL et al., 1998).



Figura 1: *Vicia sativa*. **A.** Folhas e flores de *Vicia sativa*. Inflorescências avermelhadas ou purpúreo-azuladas, emparelhadas, e na maioria das vezes únicas. **B.** Detalhe das hastes delgadas com folhas compostas alternadas, caule cilíndrico e ereto. Na extremidade de cada haste há a presença de gavinhas.

2.1.1.2 Toxidez de *Vicia spp* e *Vicia sativa* L.

A intoxicação pela ingestão de *Vicia spp* tem sido relatada em mamíferos domésticos e em seres humanos. As sementes e as partes vegetativas de várias espécies de *Vicia spp* foram citadas como causa de intoxicação por conter glicosídeos cianogênicos, bem como substâncias que induzem à hepatite tóxica e fotossensibilização (KELLERMAN; COETZER; NAUDÉ, 1988). Em seres humanos, no Mediterrâneo, com deficiência hereditária de glicose-6-fosfato-desidrogenase em eritrócitos, a ingestão ou aspiração do pólen de *Vicia faba* (feijão-fava) induziu à anemia hemolítica aguda, uma condição conhecida como Favismo (BURROWS; TYLR, 2001; FIGHERA, 2001). A fotossensibilização pode ser resultante da ingestão de ervilhaca comum (*Vicia sativa* L) (PANCIERA; JOHSON; OSBURN, 1966).

As sementes de *V. sativa* contêm numerosos fatores antinutricionais, como aminoácidos e glicosídeos cianogênicos que são comprovadamente tóxicos para os animais monogástricos. A quantidade de substâncias tóxicas é inversamente proporcional ao tamanho das sementes. A toxina mais importante é o γ -glutamil- β -cianoalanina, que afeta a conversão de metionina em cisteína, e tem efeitos indiretos sobre o metabolismo da glutatona (COLLINS et al., 2002). As toxinas são prejudiciais para o sistema nervoso e levam a convulsões e paralisia dos membros inferiores. Cavalos alimentados com sementes de ervilhaca comum apresentaram edema cerebral agudo (ENNEKING, 1995).

2.1.2 *Vicia villosa* (Roth)

2.1.2.1 Aspectos botânicos, distribuição e habitat

Vicia villosa (Roth), ervilhaca peluda, vica ou vicia de inverno (WHYTE et al, 1955), é nativa do sul da Europa, Bacia do Mediterrâneo e da Ásia Ocidental. Ela é naturalizada em regiões mais temperadas, subtropicais e tropicais de ambos os hemisférios (UNDERSANDER et al., 1990). É encontrada em terrenos baldios, áreas antrópicas, beiras de estradas e barrancos, bem como nos campos de cultivo (COOK et al, 2005; HANNAWAY; LARSON, 2004). Desenvolve-se bem em áreas com temperaturas médias que variam de 8°C a 19°C e onde a precipitação anual é de 350-1.000 mm. Esta ervilhaca tolera ambientes mais secos, porém não os locais alagados ou encharcados. Cresce em solos com pH que varia de 6,0 a 7,5 e é mais tolerante à acidez do solo do que muitas outras leguminosas forrageiras (COOK et al., 2005).

A ervilhaca peluda (*V. villosa*) é uma leguminosa anual ou perene com uma aparência aveludada devido aos longos pelos macios suportados no caule e folhas (FAO, 2014; COOK et al, 2005; UNDERSANDER et al, 1990) e permanece verde por um período mais prolongado se comparada com a ervilhaca comum (*V. sativa*). Suas flores e sementes surgem no final da época de crescimento, muitas vezes sobrevivem à estação seca, e recupera-se quase completamente durante o próximo período chuvoso (GÖHL, 1982).

Vicia villosa tem crescimento rasteiro quando jovem. Quando madura atinge uma altura de 30-70 cm nas pastagens (COOK et al., 2005). Esta ervilhaca pode atingir 1-2 m de altura quando usada como suporte a outras plantas para o crescimento vertical (HANNAWAY; LARSON, 2004). Ela possui uma raiz principal rasa (até 1m), e muitas raízes laterais secundárias. A planta produz de 3 a 10 hastes delgadas, que são finamente estriadas e terminam em forma angular. As hastes são muito fracas, porém podem atingir até 4 m de comprimento, quando apoiadas em outras vegetações. As folhas são compostas alternativas, pinadas, com até 10 pares de folhetos. Em sua extremidade se encontra um cacho terminal que permite à planta crescer verticalmente. Os folhetos são estritamente oblongos, 10-25 mm de comprimento. As inflorescências são ráculos tipo vagens com 7 cm de comprimento que

levam de 10 a 30 flores (COOK et al., 2005; HANNAWAY; LARSON, 2004). As flores são papilionáceas, de coloração roxa a azul e, muitas vezes de cor branca, de até 1 cm de comprimento e 7 mm de diâmetro (TENAGLIA, 2014). As sementes da ervilhaca peluda são alongadas, finamente peludas, fulvas e com vagens deiscentes. Cada vagem contém 4-8 sementes globulares, de cor castanho-escuro com 3-5 mm de diâmetro (ver Figura 2 A e B e Figura 3 A, B, C e D) (COOK et al., 2005), menores se comparadas aos da ervilhaca comum (HANNAWAY; LARSON, 2004).



Figura 2: *Vicia villosa*. **A.** Pastagem com folhas e flores de *Vicia villosa*. Inflorescências papilionáceas, de coloração roxa a azul de até 1 cm de comprimento e 7 mm de diâmetro. **B.** Detalhe das hastes delgadas com folhas compostas alternadas e inflorescência em ráceros com 10 a 30 flores. Na extremidade de cada haste há a presença de gavinhas.

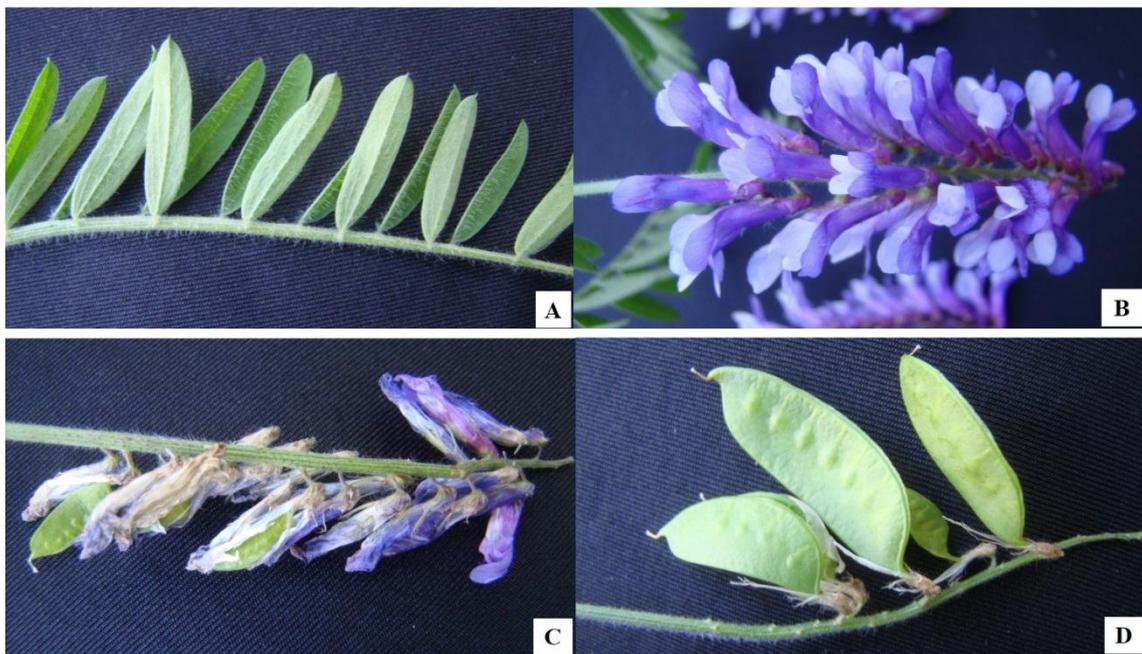


Figura 3: *Vicia villosa*. **A.** Haste delgada com folhas compostas alternadas de aspecto aveludado. **B.** Inflorescências papilionáceas, de coloração roxa a azul. **C.** Detalhe das inflorescências e formação da vagem. **D.** Detalhe das vagens com 4-8 sementes globulares no seu interior.

A ervilhaca peluda não é muito palatável, do ponto de vista nutricional à pecuária (SARE, 2008). Quando comparada a outras leguminosas, como várias espécies de trevo (*Trifolium incarnatum*, *Trifolium vesiculosum*, *Trifolium nigrescens*, *Trifolium hirtum*) a vica peluda apresenta uma palatabilidade intermediária a baixa (TERRILL et al., 2004).

2.1.2.2 Toxidez de *Vicia villosa*

Não se conhece o princípio ativo da planta nem a patogênese da intoxicação por *V. villosa* (PANCIERA; JOHSON; OSBURN, 1966; PANCIERA, 1978; PANCIERA; MOSIER; RITCHEY, 1992; BARROS et al., 2001; FIGHERA; BARROS, 2004; RIET-CORREA et al., 2007). As lesões histológicas indicam se tratar de uma reação de hipersensibilidade do tipo IV. Panciera; Mosier; Ritchey, (1992) realizaram teste de hipersensibilidade cutânea com lectinas de *V. villosa* em três animais intoxicados experimentalmente, porém sem obter resultados positivos ao teste. Uma proposta da patogênese é que antígenos da planta em forma de haptenos ou como antígenos completos possam sensibilizar linfócitos e desenvolver uma resposta imune em exposições repetidas (HARGIS; GINN, 2007).

Sonne et al. (2010) demonstraram, através de testes imunohistoquímicos, o envolvimento da reação de hipersensibilidade tardia na patogênese da doença.

A toxicidade da semente é conhecida como resultado do ácido prússico observado nesta parte da planta (HARGIS; GINN, 2007). Onda et al. (2008) observaram casos de dermatite por contato causada pela cianamida de cálcio, que foi espalhado no piso do galpão de bovinos para prevenção da mastite ambiental. Nos casos observados, os bovinos apresentam sinais clínicos e histopatológicos similares com os de intoxicação por ervilhaca (ONDA et al., 2008).

Kamo; Hirade; Fujii (2003) descreveram uma cianamida que é biossintetizada por *V. villosa*, sugerindo assim que essa possa ser um dos componentes tóxicos da ervilhaca.

2.1.2.2.1 Toxidez para monogástricos

A doença granulomatosa sistêmica geralmente é associada à ingestão de *V. villosa* (ervilhaca peluda), porém pode ser induzida por outras variedades como *V. villosa dasycarpa*, uma variedade híbrida ou somente *V. dasycarpa* (PEET; GARDNER, 1986). Contudo, existe uma controvérsia entre os taxonomistas botânicos quanto à classificação exata de *V. dasycarpa* (PEET; GARDNER, 1986, JOHNSON et al. 1992), que de acordo com o consenso geral a *V. dasycarpa* seria diferente de *V. villosa*.

Anderson e Divers (1983) descreveram uma doença granulomatosa sistêmica em um equino que pastava em locais com grande quantidade de *V. villosa* (ervilhaca peluda). As lesões macroscópicas e microscópicas encontradas foram semelhantes às observadas na intoxicação por *V. villosa* em bovinos. Tentativas de reprodução experimental da doença em equinos foram realizadas, porém sem sucesso (ANDERSON; DIVERS, 1983).

Woods et al. (1992) relataram a ocorrência de doença granulomatosa sistêmica em um cavalo que pastava *V. benghelensis* (um híbrido de *V. villosa* com *V. dasycarpa*), no estado da Califórnia. Esta ervilhaca ocorre intimamente relacionada com a *V. dasycarpa*.

Sonne (2010) descreveu que a ingestão experimental de folhas de ervilhaca peluda (1,5 a 4,5g/kg PV) ou sementes (5g/kg PV) causou intoxicação em coelhos domésticos no Brasil.

2.1.2.2.2 Toxidez para poligástricos

A espécie *V. villosa* foi relacionada a intoxicações em bovinos (PANCIERA; JOHNSON; OSBURN, 1966; PANCIERA, 1978; PEET; GARDNER, 1986; ODRIOZOLA, et al., 1991; PANCIERA; MOSIER; RITCHEY, 1992; BURROUGHS et al., 1993). A doença foi descrita em bovinos da raça Holandes (PANCIERA; JOHNSON; OSBURN, 1966; PANCIERA, 1978; KERR; EDWARDS, 1982; BURROUGHS et al., 1993; BARROS et al., 2001; RECH et al., 2004; FIGHERA; BARROS, 2004; GAVA et al, 2009; SONNE et al., 2011), Aberdeen Angus (PANCIERA; JOHNSON; OSBURN, 1966; KERR; EDWARDS, 1982; PEET; GARDNER, 1986; ODRIOZIOLA et al., 1991; JOHNSON et al., 1992; PANCIERA; MOSIER; RITCHEY, 1992), Murray Grey e cruza de Hereford com Bradford (HARPER et al., 1993), e um caso numa novilha Limousin (JOHNSON et al., 1992).

No Brasil Rissi et al. (2007) descreveram que a intoxicação por *V. villosa* foi responsável por 1,54% das intoxicações por plantas e micotoxinas em bovinos diagnosticadas pelo Laboratório de Patologia da Universidade Federal de Santa Maria (RS). Pedroso et al. (2007), descreveram que a intoxicação por *Vicia* spp foi a sexta causa de morte em ruminantes por plantas tóxicas diagnosticadas no Setor de Patologia Veterinária da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, no período de 1996 a 2005, juntamente com outras plantas como *Trema micrantha* e *Sida carpinifolia*.

Em Santa Catarina, no ano de 2009 foram relatados cinco surtos de intoxicação por ervilhaca, em propriedades de bovinos de leite (GAVA et al, 2009). Nesta mesma ocasião, outros relatos de bovinos intoxicados por *Vicia* spp, no Paraná, também foram descritos (GAVA et al, 2009).

Sonne et al. (2011) registraram a intoxicação por *V. villosa* em cinco bovinos no Rio Grande do Sul no período compreendido entre os anos de 2005 e 2008.

As intoxicações por *V. villosa* em bovinos ocorreram associadas ao pastejo em pastagens contendo ervilhaca nos Estados Unidos (PANCIERA; JOHNSON; OSBURN, 1966; PANCIERA, 1978; PANCIERA; MOSIER; RITCHEY, 1992; KERR; EDWARDS, 1982; JOHNSON et al., 1992), Austrália (PEET; GARDNER, 1986; HARPER et al., 1993), África do Sul (BURROUGHS et al., 1993), Argentina (ODRIOZOLA et al., 1991) e Brasil

(BARROS et al., 2001; RECH et al., 2004; FIGHERA; BARROS, 2004; FIGHEIRA; SOUZA; BARROS, 2005; GAVA et al, 2009; SONNE et al., 2010; SONNE et al., 2011). Também foi relatado um surto de intoxicação por feno de ervilhaca peluda na Turquia (ORUC et al., 2012).

2.1.2.2.1 Intoxicação espontânea

Em bovinos a intoxicação tem sido associada a três manifestações clínicas. A primeira associada ao consumo da semente causando distúrbios nervosos agudos e morte (CLAUGHTON; CLAUGHTON, 1954). A segunda síndrome está associada ao consumo da pastagem ocasionando pápulas na cabeça, pescoço e corpo, além de erupções herpetiformes na mucosa oral, descarga nasal purulenta, tosse, avermelhamento da mucosa nasal, queda de pelo, anorexia e dispneia (FRÖHNER; VÖLKER, 1950; PANCIERA; JOHSON; OSBURN, 1966; PANCIERA; MOSIER; RITCHEY, 1992). A morte ocorre em 12 a 15 dias. Lesões de necropsia incluem efusões serossanguinolentas no tecido subcutâneo correspondente à localização das pápulas, inflamação extensa dos pré-estômagos, inflamação catarral do abomaso em um caso, leve broncopneumonia, edema de glote, fígado cor de tijolo e, esporadicamente, nefrite (FRÖHNER; VÖLKER, 1950).

A terceira manifestação clínica é a mais estudada e se caracteriza por uma Doença Granulomatosa Sistêmica (DGS ervilhaca-associada). Clinicamente esta síndrome é caracterizada por dermatite, prurido, febre, conjuntivite, lacrimejamento, diarreia, tosse, dispneia, desidratação, queda na produção de leite e perda de peso (PANCIERA; JOHSON; OSBURN, 1966; PEET; GARDNER, 1986; PANCIERA; MOSIER; RITCHEY, 1992; BARROS et al., 2001; FIGHERA; BARROS, 2004). A temperatura corporal pode estar normal ou marcadamente elevada (PANCIERA; JOHSON; OSBURN, 1966; PANCIERA, 1978; PANCIERA; MOSIER; RITCHEY, 1992; JOHNSON et al., 1992).

Panciera; Johnson; Osburn, (1966) descreveram quadros de diarreia grave e sanguinolenta em casos avançados da intoxicação. Hiperemia interdigital também foi relatada em animais com doença granulomatosa associada à ervilhaca (HARPER et al., 1993). Abortos (JOHNSON et al., 1992) e urina vermelha (pigmento não identificado) (PANCIERA; JOHSON; OSBURN, 1966; PANCIERA, 1978; PANCIERA; MOSIER; RITCHEY, 1992; HARPER et al., 1993; JOHNSON et al., 1992) também têm sido associados com a intoxicação por ervilhaca. Nesta forma clínica, quando ocorrem surtos, a morbidade varia de 1 a 68% e a letalidade de 0 a 100% (ODRIOZOLA et al., 1991; BARROS et al., 2001; FIGHERA; BARROS, 2004; GAVA et al., 2009; SONNE et al., 2011).

Sonne et al. (2010) relataram uma manifestação incomum da intoxicação por ervilhaca peluda em bovino, caracterizada por mielite granulomatosa associada a uma síndrome hemorrágica. Neste caso as lesões granulomatosas típicas da intoxicação por *V. villosa* também estiveram presentes.

Panciera; Jonhson; Osburn (1966) descreveram a ocorrência de aborto em um de 19 bovinos que apresentaram a forma granulomatosa sistêmica da doença. Nesta mesma ocasião um fazendeiro relatou três abortos em um grupo de 90 bovinos, onde sete dos quais tinham sinais óbvios da doença. Outro caso de aborto associado à intoxicação por ervilhaca peluda foi descrito em um bovino Angus de cinco anos de idade (JOHNSON et al., 1992). A vaca abortou um feto de 4,5 meses, uma semana após o início da doença, e morreu duas semanas após o início dos sinais clínicos (JOHNSON et al., 1992).

Na Turquia, Oruc et al. (2012) descreveram casos de doença granulomatosa sistêmica em bovinos alimentados com feno de ervilhaca peluda associada à Babesiose. Na mesma ocasião foi relatado um caso de aborto, com oito meses de gestação, em uma das vacas

afetadas. O feto apresentava na pele, nos pelos e nos lábios uma camada de cor cinza esbranquiçada.

Normalmente são afetados bovinos acima de três anos de idade, principalmente das raças Holandês e Angus (PANCIERA; JOHNSON; OSBURN, 1966; PANCIERA, 1978; JOHNSON et al., 1992; PANCIERA; MOSIER; RITCHEY, 1992; BARROS et al., 2001; FIGHERA; BARROS, 2004). Casos em bovinos jovens também foram relatados, porém a manifestação da doença ocorreu com menor frequência e intensidade, com altas taxas de sobrevivência, embora tenha ocorrido morte de bezerros (PANCIERA; MOSIER; RITCHEY, 1992; BURROUGHS et al., 1993). Não ocorre predileção por sexo (PANCIERA; MOSIER; RITCHEY, 1992), e há relatos de casos em vacas (PANCIERA; JOHNSON; OSBURN, 1966; PEET; GARDNER, 1986; PANCIERA; MOSIER; RITCHEY, 1992; BARROS et al., 2001; FIGHERA; BARROS, 2004; GAVA et al., 2009; SONNE et al., 2010; SONNE et al., 2011), touros (KERR; EDWARDS, 1982; ODRIOZOLA et al. 1991), novilhas (JOHNSON et al., 1992) e bezerros (PEET; GARDNER, 1986). Os animais acometidos sempre consomem a planta por mais de duas semanas (geralmente acima de seis semanas) e a morte ocorre de 12 a 15 dias após o início dos sinais clínicos (PANCIERA; JOHNSON; OSBURN, 1966; PANCIERA, 1978; KERR; EDWARDS, 1982; ODRIOZOLA et al. 1991; JOHNSON et al., 1992; BARROS et al., 2001; FIGHERA; BARROS, 2004; GAVA et al., 2009; SONNE et al., 2010; SONNE et al., 2011). Não há tratamento eficiente para a intoxicação pela ervilhaca (RIET-CORREA et al., 2007), porém a retirada dos animais das pastagens contendo ervilhaca proporcionou relativa melhora nos casos mais brandos da doença (JOHNSON, et al., 1992).

Na maioria dos relatos sobre a intoxicação por *V. villosa*, não foram observadas alterações significativas nos exames hematológicos realizados (PANCIERA; JOHNSON; OSBURN, 1966). No entanto, na reprodução experimental da doença granulomatosa sistêmica, a vaca que consumiu 100 kg de ervilhaca apresentou leucocitose ($13,500 - 18,00/\text{mm}^3$) a partir do 14º dia de experimento até o final da experimentação (PANCIERA; MOSIER; RITCHEY, 1992).

Casos de intoxicação por *V. villosa* subsp. *dasycarpa* e *V. benghalensis*, descritos na Austrália, revelaram alterações hematológicas como eosinofilia ($2,0 \times 10^9/\text{L}$), aumento das enzimas gama-glutamil transferase (GGT) e aspartato aminotransferase (AST) (199 e 160 μL , respectivamente), no rebanho 3. Também se observou aumento de ureia (748 mmol/L e 76 mmol/L, respectivamente), creatinina (673 mmol/L e 1256 mmol/L, respectivamente), GGT (174 μL e 357 μL , respectivamente), AST (435 μL e 714 μL , respectivamente), nos rebanhos 8 e 9, e apenas aumento de AST (88 μL e 177 μL , respectivamente) e GGT (105 μL e 257 μL , respectivamente) nos rebanhos 4 e 7, dias antes dos animais morrerem. Os rebanhos 5 e 7 apresentaram anemia, sendo severa em uma vaca do rebanho 7 (PVC 0,08 L/L) (HARPER et al., 1993)

Barros et al. (2001) observaram, no hemograma realizado em uma das vacas afetadas, elevação no número de eosinófilos ($1.920 \text{ células}/\text{mm}^3$ de sangue) e de monócitos ($1.408 \text{ células}/\text{mm}^3$ de sangue). Estes valores são considerados por alguns autores como eosinofilia e monocitose em bovinos (SCHALM; JAIN; CARROLL, 1975). Tanto o eritrograma quanto o plaquetograma estavam normais (BARROS et al., 2001).

Fighera e Barros (2004) realizaram a coleta de sangue em cinco vacas intoxicadas por ervilhaca e observaram leve a moderada monocitose ($864 \text{ células}/\text{mm}^3$ de sangue (12%) para $1.809 \text{ células}/\text{mm}^3$ de sangue (27%)). Uma das vacas apresentou um desvio à esquerda e linfopenia leve.

Woods et al. (1992) descreveram um quadro de anemia normocítica normocrômica (hematócrito 19,5%) juntamente com monocitose leve ($1860/\mu\text{l}$) em um equino que pastejava ervilhaca (*Vicia* spp.).

A doença granulomatosa sistêmica (DGS ervilhaca-associada) se caracteriza macroscopicamente por áreas coalescentes de alopecia, formação de pápulas, podendo apresentar um exsudato amarelado que resulta na formação de crostas (PANCIERA; JOHNSON; OSBURN, 1966; PANCIERA; MOSIER; RITCHEY, 1992; BURROUGHS et al., 1993; HARPER et al., 1993; BARROS et al., 2001; FIGHERA; SOUZA; BARROS, 2005). As lesões de pele se distribuem principalmente na cabeça e pescoço bem como no tronco, períneo e úbere (FIGHEIRA; SOUZA; BARROS, 2005). As lesões cutâneas eram distribuídas sem levar em conta a pigmentação (PANCIERA; JOHNSON; OSBURN, 1966; KERR; EDWARDS, 1982; PANCIERA; MOSIER; RITCHEY, 1992; BURROUGHS, et al., 1993; HARPER et al., 1993; BARROS et al., 2001; FIGHERA; SOUZA; BARROS, 2005).

Nódulos brancos acinzentados moderadamente firmes, multifocais a coalescentes infiltram múltiplos órgãos como linfonodos, fígado, córtex renal e miocárdio (PANCIERA; JOHNSON; OSBURN, 1966; PANCIERA; MOSIER; RITCHEY, 1992; BURROUGHS et al., 1993; HARPER et al., 1993; BARROS et al., 2001; FIGHERA; BARROS, 2004). O fígado pode estar levemente aumentado e com acentuação do padrão lobular (PEET; GARDNER, 1986; PANCIERA; MOSIER; RITCHEY, 1992; FIGHERA; BARROS, 2004; RIET-CORREA et al., 2007; SONNE et al., 2011).

Os rins geralmente estão pálidos, aumentados de volume e com numerosos focos e estrias branco acinzentados multicocais, de 1-2 mm, na superfície capsular e de corte (PANCIERA; MOSIER; RITCHEY, 1992; ODRIOZIOLA et al., 1991; BURROUGHS, et al., 1993; HARPER et al., 1993; BARROS et al., 2001; FIGHERA; BARROS, 2004; SONNE et al., 2010; SONNE et al., 2011).

O coração pode se apresentar aumentado e com estrias e áreas irregulares branco-amareladas, proeminentes, na superfície epicárdica. Estas áreas são bem visualizadas na superfície de corte, bem como no endocárdio (PANCIERA; JOHNSON; OSBURN, 1966; PANCIERA; MOSIER; RITCHEY, 1992; JOHNSON et al., 1992; HARPER et al., 1993; BARROS et al., 2001; FIGHERA; BARROS, 2004; SONNE et al., 2011). A adrenal está frequentemente aumentada devido ao infiltrado inflamatório multifocal ou difuso, com perda da distinção entre a região cortical e medular (ODRIOZOLA et al., 1991; PANCIERA; MOSIER; RITCHEY, 1992)

O baço geralmente está aumentado, com hiperplasia da polpa branca e os linfonodos se apresentam aumentados e edematosos (ODRIOZOLA et al., 1991; PANCIERA; MOSIER; RITCHEY, 1992; FIGHERA; BARROS, 2004). Na superfície de corte dos linfonodos podem-se perceber dois padrões, no primeiro o córtex apresenta-se com múltiplos nódulos de 2-8 mm de diâmetro, focais ou coalescentes, e no segundo padrão a superfície nodal está totalmente obliterada por tecido homogêneo, sem diferenciação entre córtex e medular (BARROS et al., 2001; FIGHERA; BARROS, 2004).

As lesões granulomatosas também são descritas nas glândulas tireoides, e estas podem estar aumentadas de tamanho (PANCIERA; JOHNSON; OSBURN, 1966). Odrizola et al. (1991) descrevem ainda áreas de hemorragia no abomaso e petéquias nos órgãos abdominais em animais intoxicados pela *V. villosa*. As hemorragias no abomaso e em serosas da cavidade abdominal também foram descritas por Peet e Gardner (1986), assim como em outros órgãos incluindo abomaso, intestino delgado, bexiga e músculo esquelético, em casos de intoxicação por *V. villosa*, subsp. *dasycarpa*.

Histologicamente observa-se infiltrado inflamatório constituído de linfócitos, plasmócitos, histiócitos, eosinófilos, macrófagos epitelioides e, ocasionalmente, células multinucleadas (BARROS et al., 2001). O infiltrado é mais prevalente na região do córtex renal, miocárdio, região cortical e medular da adrenal e na derme. O infiltrado ocorre menos frequentemente na tireoide, parótida, pâncreas, baço, linfonodos e áreas portais do fígado.

Outros órgãos como traqueia, pulmão, vesícula biliar, intestino, ovário e endométrio podem ocasionalmente conter o infiltrado celular (PANCIERA; MOSIER; RITCHEY, 1992).

Na pele, pode ser observada, principalmente, dermatite perivascular superficial granulomatosa (PANCIERA; MOSIER; RITCHEY, 1992; FIGHERA; SOUZA; BARROS, 2005). Dermatite perivascular profunda, perifoliculite, foliculite mural, hiperqueratose ortoqueratótica, erosões, ulcerações, degeneração hidrópica, espongirose, microabscessos de Munro, acantólise, corpúsculos de Civatte, exocitose linfoplasmocitária, edema superficial, incontinência pigmentar, mineralização distrófica de colágeno, tumefação do núcleo de células endoteliais e ectasia das glândulas sudoríparas foram achados encontrados ao exame histológico da pele de animais intoxicados por *Vicia* spp. (FIGHERA; SOUZA; BARROS, 2005).

No sistema nervoso central pode ocorrer meningoencefalite granulomatosa, caracterizada por infiltração de linfócitos, macrófagos epitelioides e eosinófilos. Segundo Rech et al. (2004) os infiltrados inflamatórios no sistema nervoso central se localizam nas leptomeninges e como manguitos perivasculares no interior do encéfalo. No encéfalo as regiões afetadas foram o diencéfalo, mesencéfalo à altura dos colículos rostrais, ponte, pedúnculos cerebelares, bulbo à altura do óbex, lobo frontal, à altura do joelho do corpo caloso e cerebelo (RECH et al., 2004).

Sonne et al., (2010) descreve um quadro de mielite granulomatosa e síndrome hemorrágica associada à ingestão de ervilhaca peluda, em uma vaca no noroeste do Rio Grande do Sul, Brasil.

A intoxicação pela polpa cítrica tem sinais clínicos e achados histopatológicos similares aos da intoxicação pela ervilhaca, sendo diferenciada principalmente pelo histórico (MATTHEWS; SHREEVE, 1978; TURNER; KELLY; SPACKMAN, 1978; THOMAS, 1978; GRIFFITHS; DONE, 1991; SAUNDERS et al., 2000; IIZUKA et al., 2005). Na intoxicação pela polpa cítrica também se visualizam lesões granulomatosas sistêmicas, porém geralmente é associada a hemorragias devido à presença de infiltrado na medula óssea levando a substituição do tecido normal por tecido granulomatoso (GAVA et al., 1996; GAVA; BARROS, 2007).

Em bovinos intoxicados por bagaço de laranja peletizado, foi possível observar, nas amostras de soro e de fígados coletados, baixos níveis de zinco (Zn) e excessiva excreção de cálcio (Ca) pelas fezes (GAVA, 2003. Dados não publicados). A deficiência de Zn em bovinos pode ocorrer devido ao excesso de ingestão de cálcio, e ou alimentos ricos em fitase. Em bovinos, a deficiência desse mineral resulta em lesões cutâneas, assim como determina baixa resistência a doenças, hemorragias e consequente morte dos animais (BETTGER; O'DELL, 1993).

Outras doenças semelhantes à intoxicação pela ervilhaca foram descritas. Uma síndrome caracterizada por pirexia, prurido e dermatite foi relatada em bovinos (MORRIS; MCINNES, 1978; TURNER; KELLY; SPACKMAN, 1978; BREUKING et al., 1978). Os animais apresentavam infiltração de linfócitos, plasmócitos, histiócitos e eosinófilos em diferentes órgãos. Autores descrevem como a possível causa da síndrome a utilização de silagem contendo o aditivo químico Sylade, no Reino Unido (aditivo contendo formalina e ácido sulfúrico) (MATTHEWS; SHREEVE, 1978; TURNER; KELLY; SPACKMAN, 1978; THOMAS, 1978).

Breuking et al. (1978) descrevem a síndrome de pirexia com dermatite em bovinos, na Holanda, que receberam concentrado contendo diuriedo-isobutano (DUIB) em animais que não recebiam o aditivo Sylade. Esta doença foi reproduzida experimentalmente em dois bovinos com a administração de 5-6 kg de ração contendo 3% de DUIB e feno de composição não especificada, por um mês (BREUKING et al., 1978).

O diagnóstico diferencial das lesões de pele ocasionado pela intoxicação por ervilhaca deve ser feito com infestações por ectoparasitas, micoses cutâneas, urticária, deficiência de Zn, fotossensibilização, dermatites virais (por exemplo, *Poxvirus* spp.) e não apresentam dificuldades, uma vez observado o histórico do rebanho, o tipo e a distribuição das lesões, a evolução clínica da doença e a presença ou ausência de sinais clínicos sistêmicos (BARROS, et al., 2001; FIGHERA; BARROS, 2004).

2.1.2.2.2 Intoxicação experimental

A doença foi reproduzida experimentalmente em uma vaca da raça Angus, que, no ano anterior havia manifestados sinais clínicos da doença espontânea e se recuperou. A vaca consumiu 100kg de ervilhaca durante o experimento, divididos em 9 kg diários, e desenvolveu os sinais clínicos característicos da doença após o 11º dia de experimentação, encerrando o fornecimento 11 dias após o início dos sinais (PANCIERA; MOSIER; RITCHEY, 1992).

Outras tentativas de reprodução experimental da doença ocorreram, porém sem sucesso. Panciera (1978) tentou reproduzir a doença submetendo três bovinos, holandês, machos, castrados, de 15 meses de idade, em pastagens contendo grandes quantidades de ervilhaca peluda durante 28 dias, e não resultou na doença. Nenhuma alteração clínica e patológica foi observada.

Peet e Gardner (1986) forneceram ervilhaca à vontade para uma novilha Holandês, de seis meses de idade, durante quatro semanas. Não houve alterações clínicas e patológicas significativas após o fornecimento da planta.

Sonne (2010) forneceu folhas e sementes a dois bovinos durante um período de 30 dias. O bovino utilizado na intoxicação experimental por folhas de *V. villosa*, recebeu diariamente 1,7 kg de folhas secas. Nenhuma alteração de pele característica da doença foi observada, porém apresentou lesões macro e microscópicas nos linfonodos; essas lesões eram semelhantes às observados em casos naturais da doença. O bovino que recebeu as sementes consumiu 655 g (gramas) das mesmas misturadas com sucedâneo e água e não apresentou sinais clínicos compatíveis com a intoxicação pela planta.

3 MATERIAL E MÉTODOS

O presente estudo foi realizado em duas etapas, uma composta pelo acompanhamento e pela descrição de casos naturais da intoxicação por *Vicia villosa* (ervilhaca peluda) e a outra etapa pelo estudo experimental da doença.

3.1 Doença espontânea

Foram acompanhados sete surtos de doença granulomatosa sistêmica produzida pela *Vicia villosa* em bovinos. Os dados epidemiológicos e clínicos foram obtidos nas propriedades onde ocorreu a doença e realizaram-se sete necropsias com coleta de amostras para exame histopatológico.

3.2 Estudo experimental

Para experimentação foram utilizadas 14 vacas em lactação e 8 novilhas, todas da raça holandesa, as quais foram divididas em seis grupos. Para complementação as vacas em lactação recebiam adicionalmente três quilos de ração comercial/dia. O número de bovinos por grupo, a planta utilizada, a forma de ingestão, o quilograma de sementes por hectares utilizados e ano/período de pastejo constam na tabela 1. Na figura 4 (A e B) encontram-se as sementes que foram utilizadas para o plantio das pastagens de ervilhaca. A descrição e identificação dos animais de cada grupo, assim como a idade em meses, o período em lactação e a produção média encontram-se na tabela 2.

A parte experimental foi desenvolvida nas dependências no Setor de Bovinocultura de Leite do Centro de Ciências Agroveterinárias, CAV/UDESC - Lages - SC.

Das vacas necropsiadas, tanto da doença espontânea, como da experimental foram coletadas amostras de fígado, rim, coração, pulmão, trato digestório, sistema linfático, sistema nervoso, sistema endócrino, músculo e medula óssea vermelha. Essas amostras foram fixadas em formalina a 10%, com exceção das amostras de musculatura que permaneceram em temperatura ambiente durante aproximadamente oito horas antes da fixação e processadas rotineiramente para exame histológico de acordo com a técnica de Hematoxilina e Eosina (H&E), no Setor de Patologia Animal, CAV/UDESC - Lages - SC.

Tabela 1: Estudo experimental de doença granulomatosa sistêmica em bovinos, Setor de Patologia Animal, CAV/UDESC.

Grupos experimentais	Nº de animais	Kg/sementes/ha	Pastagem/Forma de alimentação	Dias de pastejo/Ano
Grupo 1	2 vacas	-	<i>V. villosa</i> , ad libitum/cocho	71/2010-2011
Grupo 2	4 vacas	60kg <i>V. villosa</i> + 30kg <i>Lolium</i> sp	<i>V. villosa</i> + <i>Lolium</i> sp/pastejo	49-72/2012
Grupo 3	4 vacas	30kg <i>V. villosa</i> + 30kg <i>V. sativa</i> + 30kg <i>Lolium</i> sp	<i>V. villosa</i> + <i>V. sativa</i> + <i>Lolium</i> sp/pastejo	68/2012
Grupo 4	4 vacas	60kg <i>V. sativa</i> + 30kg <i>Lolium</i> sp	<i>V. sativa</i> + <i>Lolium</i> sp /pastejo	76/2013
Grupo 5	4 novilhas	30kg <i>V. villosa</i> + 30kg <i>V. sativa</i> + 30kg <i>Lolium</i> sp	<i>V. villosa</i> + <i>V. sativa</i> + <i>Lolium</i> sp/pastejo	70/2012
Grupo 6	4 novilhas	60kg <i>V. villosa</i> + 30kg <i>Lolium</i> sp	<i>V. villosa</i> + <i>Lolium</i> sp /pastejo	55/2013

Tabela 2: Descrição dos animais utilizados no estudo experimental da doença granulomatosa sistêmica em bovinos, Setor de Patologia Animal, CAV/UDESC.

Grupos experimentais	Descrição dos animais/Brinco (n°)	Idade dos animais (meses)	Dias em lactação (d)/Produção média (L)
Grupo 1	Vaca 1 (n°132)	85 meses	138d/26L
	Vaca 2 (n°140)	75 meses	108d/34L
Grupo 2	Vaca 3 (n°1)	50 meses	77d/19,4
	Vaca 4 (n°2)	84 meses	58d/20,4L
	Vaca 5 (n°157)	75 meses	Gestando
	Vaca 6 (n°168)	30 meses	41d/18,5
Grupo 3	Vaca 7 (n°3)	39 meses	94d/17,4L
	Vaca 8 (n°4)	28 meses	50d/18L
	Vaca 9 (n°183)	36 meses	34d/23,9L
	Vaca 10 (n°189)	30 meses	270d/10,3L
Grupo 4	Vaca 11 (n°172)	64 meses	44d/33L
	Vaca 12 (n°187)	51 meses	226d/18,8L
	Vaca 13 (n°191)	39 meses	330d ¹ /18,8L
	Vaca 14 (n°193)	37 meses	1d/NE ²
Grupo 5	Novilha 1 (n°196)	21 meses	-
	Novilha 2 (n°198)	16 meses	-
	Novilha 3 (n°201)	14 meses	-
	Novilha 4 (n°202)	15 meses	-
Grupo 6	Novilha 5 (n°208)	18 meses	-
	Novilha 6 (n°210)	15 meses	-
	Novilha 7 (n°211)	16 meses	-
	Novilha 8 (n°212)	15 meses	-

¹Vaca 13 com 180 dias de gestação; ²NE não estabelecido.

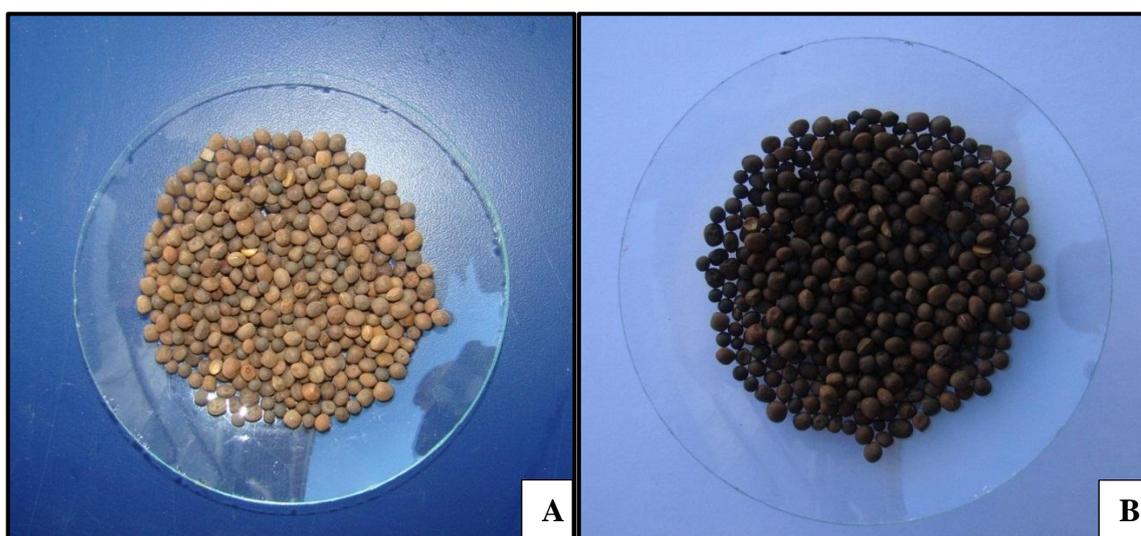


Figura 4: A. Sementes de *Vicia sativa* (ervilhaca comum). B. Sementes de *Vicia villosa* (ervilhaca peluda). Estudo experimental da doença granulomatosa sistêmica em bovinos, Setor de Patologia Animal, CAV/UDESC.

Todos os procedimentos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética na Experimentação Animal, CETEA, da Universidade do Estado de Santa Catarina,

CAV/UEDESC, Lages, Resolução Nº. 714 de 20 de Junho de 2002 do Conselho Federal de Medicina Veterinária.

As vacas foram selecionadas de acordo com sua produção leiteira, levando-se em consideração os animais de melhor produção no rebanho e nenhum contato prévio com a planta.

Todos os bovinos foram avaliados clinicamente antes e semanalmente durante o período experimental, através da determinação das frequências cardíaca e respiratória, temperatura retal, e avaliação dermatológica (que consistiu em observação de áreas de alopecia, principalmente na cabeça, pescoço e úbere, e formação de vesículas e crostas no úbere) e ingestão de água e alimentos. Também foi avaliada a produção leiteira dos bovinos em lactação semanalmente.

Amostras de *V. villosa* e *V. sativa* nos diferentes estágios de crescimento da planta foram coletadas, levando-se em consideração a alternância dos piquetes, e os ciclos de pastejo; estas foram secadas em estufa a 65°C durante 72 horas, moídas em moinho (tipo Willye) com peneira contendo crivos de 2 mm, para posterior realização da análise bromatológica. A análise bromatológica foi realizada no Setor de Bromatologia e no Setor de Sementes do Centro de Ciências Agroveterinárias da Universidade do Estado de Santa Catarina (CAV/UEDESC).

A análise bromatológica, no Setor de Bromatologia, CAV/UEDESC teve a finalidade de estimar o valor nutritivo da forragem por amostragem, simulando o pastejo dos bovinos, por no mínimo três coletas a cada semana. Consistiu na observação das áreas, da altura e dos componentes da pastagem que estavam sendo pastejados com colheita manual posterior de amostras. A amostragem foi realizada durante um dos turnos do dia (em torno de 200g por coleta), com posterior mistura de amostras por piquete (EDLEFSEN et al., 1960). Foi determinada a composição química em termos de matéria seca, matéria mineral, proteína bruta, fibra bruta e gordura bruta (MORAES, 1995).

A análise da *V. villosa* e *V. sativa*, no Setor de Sementes, CAV/UEDESC, teve a finalidade da determinação de ácido fítico, se presente nas amostras, segundo a metodologia proposta por Latta e Eskin (1980) e realizada neste Setor.

Amostras de sangue com anticoagulante (EDTA) foram coletadas de todos os bovinos antes do início do experimento e a cada 15 dias até o final da experimentação, e encaminhadas ao Laboratório de Análises e Pesquisas BHC, Lages, SC, onde se realizou o hemograma completo pela metodologia de microscopia/automação. Ainda foram coletadas amostras de sangue em tubos específicos para pesquisa de minerais as quais foram encaminhadas ao mesmo laboratório de análises clínicas para identificação de Zn por espectrofotometria de absorção atômica.

Amostras de fezes foram coletadas antes do início do experimento e semanalmente (grupo 1) e quinzenalmente (grupos 2, 3, 4, 5 e 6) até o final da experimentação, pesadas, secadas em estufa a 65°C durante 72 horas, moídas em moinho (tipo Willye) com peneira contendo crivos de 2 mm, para posterior realização de pesquisa de cálcio (Ca) e zinco (Zn) por espectrofotometria de absorção atômica, após a digestão em água régia. Esta análise foi realizada no Setor de Análise dos Solos do Centro de Ciências Agroveterinárias da Universidade do Estado de Santa Catarina (CAV/UEDESC).

Amostras de fígado dos bovinos mortos durante a experimentação foram coletadas e conservadas por congelamento. Após o descongelamento amostras de 100g de fígado foram pesadas, lavadas com água destilada, retirada sua cápsula protetora com lâmina de aço inoxidável, e clivadas seguindo-se o procedimento indicado na literatura (NOMURA; OLIVEIRA, 2006). Após, as amostras foram secadas em estufa a 65°C durante 72 horas, moídas em moinho com peneira contendo crivos de 2 mm e digeridas em bloco digestor, através técnica de Digestão em Água Régia, para posterior realização da pesquisa de Ca e Zn

por espectrofotometria de absorção atômica. Para interpretação dos valores analíticos do tecido hepático foram considerados os seguintes teores, baseando-se nos dados obtidos por Underwood (1977) e utilizados por Tokarnia e colaboradores (2010). Esses teores são para Ca: 30-200 ppm e Zn: valores normais de 100-200 ppm. Esta análise também foi realizada no Setor de Análise dos Solos do Centro de Ciências Agroveterinárias da Universidade do Estado de Santa Catarina (CAV/UDESC).

4 RESULTADOS

4.1. Doença espontânea

A doença granulomatosa sistêmica foi verificada em 7 propriedades distribuídas nos Estados de Santa Catarina, Paraná e Rio Grande do Sul, onde a alimentação principal era aveia e/ou azevém consorciados com *V. villosa* (surto 1, 2, 6 e 7) e de azevém consorciado com *V. villosa* e em menor quantidade *V. sativa* (surto 3, 4, e 5). Todos os bovinos que desenvolveram a doença eram vacas, em lactação e da raça Holandês. Com exceção do surto 7, todos os demais eram constituídos por vacas da raça Holandês. No entanto, na propriedade onde se verificou o surto 7 era constituída por vacas Holandês e vacas e novilhas de aptidão para corte. As informações referentes a cada surto constam na tabela 3.

A morbidade variou entre 5% (surto 4) e 35% (surto 2), a mortalidade encontrada ficou entre 5% (surto 4) e 10% (surto 2, 5 e 7) e a letalidade oscilou entre 25% (surto 1) e 100% (surto 3, 4 e 6).

A doença ocorreu entre os meses de agosto (surto 7) e entre os meses de outubro e novembro (surto 1, 2, 3, 4, 5 e 6). Em todas as propriedades os sinais clínicos iniciaram após pastejo em *V. villosa* por um período superior a 50 dias.

Ao exame clínico observou-se inicialmente anorexia, hipertermia, queda brusca na produção de leite, perda de peso, diarreia e avermelhamento do úbere. Na pele os sinais iniciavam-se com a formação de áreas elevadas com pelos arrepiados que posteriormente evoluíam para formação de placas alopecicas que ocorriam a princípio na cabeça e no pescoço e depois envolviam o restante do corpo (Figura 5 A e B). Havia ainda enrugamento e formação de vesículas na pele do úbere e tetos (Figura 5 B) e em alguns animais verificou-se hiperemia da conjuntiva e lacrimenjamento acompanhado de avermelhamento e rachaduras na narina (Figura 5 A). Adicionalmente, em um bovino do surto 5 havia epistaxe. Diferentemente dos demais, no surto 7 o primeiro sinal clínico observado foi à formação de placas crostosas e eritematosas nos tetos e úberes que sangravam durante a ordenha.

Tabela 3: Surtos de doença espontânea por *Vicia villosa*, acompanhados no período de 2006 a 2010, Setor de Patologia Animal, CAV/UEDESC.

Surtos (n°)	Localidade	Ano/mês	Pastagens/período de consumo	Total de animais	Doentes	Morte
1°	Francisco Beltrão (PR)	2006 (Setembro)	<i>V. villosa</i> + aveia (<u>maio a setembro</u>)	35 vacas HPB	4	1
2°	Francisco Beltrão (PR)	2006 (Outubro)	<i>V. villosa</i> + azevém (<u>julho a outubro</u>)	20 vacas HPB	7	2
3°	Urubici (SC)	2007 (Outubro)	<i>V. villosa</i> + <i>V. sativa</i> (< ¹ quantidade) + azevém (<u>agosto a outubro</u>)	15 vacas HPB	1	1
4°	Urubici (SC)	2007 (Novembro)	<i>V. villosa</i> + <i>V. sativa</i> (< quantidade) + azevém (<u>agosto a novembro</u>)	20 vacas HPB	1	1
5°	Anita Garibaldi (SC)	2008 (Outubro)	<i>V. villosa</i> + <i>V. sativa</i> (< quantidade) + azevém (<u>julho a outubro</u>)	20 vacas HPB	3	2
6°	Veranópolis (RS)	2008 (Outubro)	<i>V. villosa</i> + azevém (<u>agosto a novembro</u>)	15 vacas HPB	1	1
7°	Monte Carlos (SC)	2010 (Outubro e Novembro)	<i>V. villosa</i> + aveia + azevém (<u>julho a novembro</u>)	20 vacas HPB	4	4
TOTAL	5 localidades	2006 a 2010	<i>Vicia villosa</i> (predominante ou única espécie de ervilhaca)	145 animais	21 animais	12 animais

¹Menor quantidade.



Figura 5: **A.** Múltiplas áreas de alopecia na face, orelhas e pescoço. Observa-se avermelhamento e rachaduras ao redor da narina e no plano nasolabial. **B.** Placas crostosas e avermelhadas nos tetos, úbere e face medial dos membros pélvicos. **C.** Rim com múltiplos pontos esbranquiçados na superfície capsular. Estudo natural da doença granulomatosa sistêmica em bovinos, Setor de Patologia Animal, CAV/UEDESC.

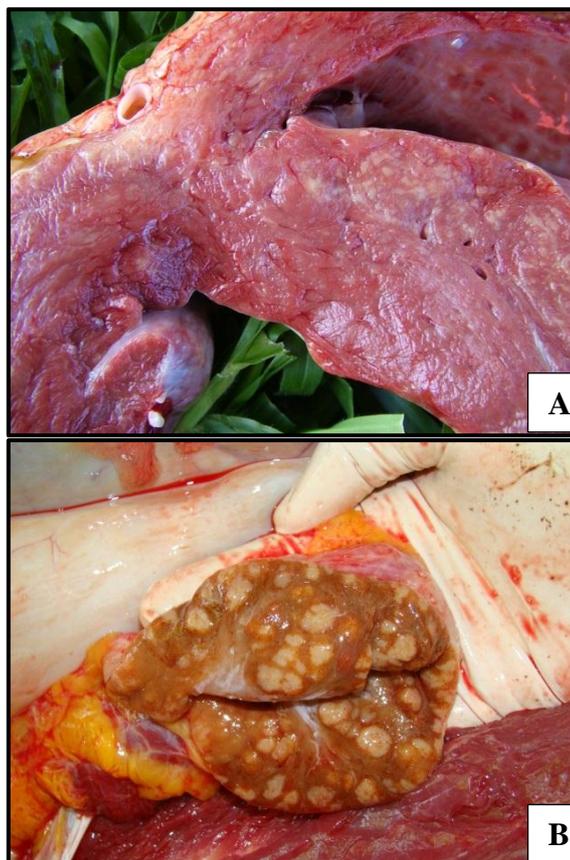


Figura 6: **A.** Coração com múltiplas áreas esbranquiçadas a amareladas no miocárdio. **B.** Linfonodo inguinal com múltiplas nodulações brancas a acinzentadas. Estudo natural da doença granulomatosa sistêmica em bovinos, Setor de Patologia Animal, CAV/UEDESC.

Na necropsia os achados mais notáveis foram às lesões de pele alopecias, e algumas crostosas na cabeça, pescoço, tórax, abdomen, úbere, membros torácicos e pélvicos. Observou-se múltiplas nodulações brancas a cinzentadas (variando de 0,2 a 5,0cm de diâmetro) com maior frequência em linfonodos (Figura 6B) (principalmente nos mamários, mesentéricos, ilíacos e hepáticos), rins (Figura 5C), baço, fígado e coração (Figura 6A). Adicionalmente verificou-se aumento moderado de volume destes órgãos, evidenciado na superfície de corte. Ainda, no bovino 4 haviam estrias cinza pálidas acompanhando o sentido das fibras da musculatura esquelética.

À microscopia dos diversos órgãos observou-se infiltrado inflamatório constituído de linfócitos, macrófagos, células epitelioides, células gigantes multinucleadas, alguns plasmócitos, neutrófilos e eosinófilos, especialmente nos rins, linfonodos, coração, fígado e baço. Na pele verificou-se hiperqueratose ortoqueratótica com formações de crostas e infiltrado granulomatoso leve a moderado na derme superficial e profunda, principalmente perivascular.

4.2 Estudo experimental

A doença granulomatosa sistêmica foi reproduzida em seis vacas holandesas em lactação, através do fornecimento de *V. villosa* verde no cocho (grupo 1, vacas 1 e 2) e em pastagens de *V. villosa* e azevém (grupo 2, vacas 3, 4, 5 e 6). Nos demais grupos experimentais (grupo 3, *V. villosa/V. sativa*/vacas, pastejo; grupo 4, *V. sativa*/ vacas, pastejo, grupo 5, *V. villosa/V. sativa*/novilhas e grupo 6, *V. villosa*/novilhas, pastejo) não verificou-se

alterações clínicas e patológicas relacionadas a doença granulomatosa sistêmica associada ao consumo de ervilhaca.

As vacas alimentados com *V. villosa* verde no cocho (grupo 1/vacas 1 e 2) consumiram, em média, respectivamente, 46,7g e 38,2g/Kg PV/dia, de *V. villosa* durante os 71 dias de experimento. As quatro vacas do grupo 2 que pastorearam exclusivamente sobre *Vicia villosa* e avezém os primeiros sinais clínicos surgiram entre o 28° ao 56° dia experimentação. Nos demais grupos submetidos à reprodução experimental (grupo 3, *V. villosa*/*V. sativa*/vacas em lactação; grupo 4, *V. sativa*/vacas em lactação; grupo 5, *V. villosa*/*V. sativa*/novilhas; grupo 6, *V. villosa*/novilhas) não foram observadas alterações compatíveis com DGS ervilhaca-associada.

4.2.1 Sinais clínicos

Das seis vacas que desenvolveram a doença granulomatosa sistêmica, as duas vacas do grupo 1 (*V. villosa*/vacas, cocho) e as 4 vacas do grupo 2 (*V. villosa*/vacas, pastejo) apresentaram o quadro clínico leve, moderado a grave. Os dados referentes aos grupos experimentais, o período de consumo, o início dos sinais clínicos e a evolução do quadro constam na tabela 4.

Tabela 4: Período de consumo da planta para o início das alterações clínicas, a intensidade dos sinais relacionados ao tempo de ingestão e a evolução do quadro clínico. Estudo experimental da doença granulomatosa sistêmica em bovinos, Setor de Patologia Animal, CAV/UEDESC.

Grupos	Bovinos	Dias de Consumo	Início dos sinais clínicos (dias)			Evolução	
			Leves ¹	Moderados ²	Acentuados ³	Morte (dias)	Recuperação (dias)
1 <i>Vicia villosa</i> /vaca/ cocho	1	71	21	63	- ⁴	-	21
	2	71	21	62	-	(+)872 ⁵	21
2 <i>Vicia villosa</i> /vaca/ pastejo	3	49	28	40	46	(+)50	-
	4	72	45	52	-	(+)333 ⁵	30
	5	72	40	45	-	(+)75	-
	6	72	56	-	-	-	30
3 <i>Vicia villosa</i> / <i>Vicia sativa</i> /vacas/ pastejo	7	68	-	-	-	-	-
	8	68	-	-	-	-	-
	9	68	-	-	-	-	-
	10	68	-	-	-	-	-
4 <i>Vicia sativa</i> /vacas/ pastejo	11	76	-	-	-	-	-
	12	76	-	-	-	-	-
	13	76	-	-	-	-	-
	14	76	-	-	-	-	-
5 <i>Vicia villosa</i> / <i>Vicia sativa</i> /novilha /pastejo	1	70	-	-	-	-	-
	2	70	-	-	-	-	-
	3	70	-	-	-	-	-
	4	70	-	-	-	-	-
6 <i>Vicia villosa</i> /novilh as/ pastejo	5	68	-	-	-	-	-
	6	68	-	-	-	-	-
	7	68	-	-	-	-	-
	8	68	-	-	-	-	-

¹Leves: pelos arrepiados, rarefeitos e com perda de brilho, lacrimejamento, conjuntiva hiperêmica, hipertermia e queda na produção de leite.

²Moderados: além dos sinais leves, incluem emagrecimento, prurido, aumento dos linfonodos inguinais bilateralmente e pequenas áreas alopécicas na face.

³Acentuados: além dos sinais moderados, incluem prurido intenso, múltiplas áreas de alopecia na região da face, pescoço, lateral do corpo e membros anteriores e posteriores, andar cambaleante e sinais neurológicos.

⁴Ausência de alterações.

⁵Recuperaram-se com morte após 872 (Bovino 2) e 333 (Bovino 4) dias do período de experimentação.

A morbidade variou entre 0% (grupos 3, 4, 5 e 6) e 100% (grupos 1 e 2), a mortalidade e a letalidade oscilaram de entre 0% (grupos 3, 4, 5 e 6) e 75% (grupo 2).

Sinais clínicos leves foram evidenciados a partir do 28º dia (grupo 2, vaca 6) no vaca em pastejo de *Vicia villosa* consorciada com azevém e caracterizaram-se por corrimento seroso ocular e nasal que fazia com que o animal lambesse o nariz frequentemente, e leve prurido.

Os sinais clínicos considerados moderados foram observados nas vacas 1 e 2 (grupo 1, *Vicia villosa*/vacas/cocho) a partir do 21º dia de experimentação e nas vacas 4 e 5 (grupo 2, *Vicia villosa*/vacas/pastejo) aos 45º e 52º dias de experimentação, respectivamente, e consistiam de pelos arrepiados e com pouco brilho, queda de pelos, prurido leve, apatia, lacrimejamento, conjuntiva hiperêmica, exsudação nasal serosa a catarral, emagrecimento, respiração ofegante, diarreia, tosse esporádica, queda na produção de leite e hipertermia (40,4°C, vaca 5). Um sinal comum a estes animais foi o avermelhamento da pele do úbere, geralmente nas porções craniais e laterais de ambos os lados, iniciando a partir do 26º dia de experimento. Os linfonodos superficiais (pré-escapulares e pré-curais) estavam moderadamente aumentados de tamanho. No 56º dia, na vaca 5, observou-se uma pequena área circular com desprendimento do pelo (tufo) abaixo do ramo esquerdo da mandíbula, no início de formação de uma área de alopecia. Concomitante verificou-se descamação sebácea (seborreia) associada à formação de crostas superficiais na região lombar (garupa) bilateralmente. Adicionalmente áreas de pele levemente espessa, associada à rarefação de pelos na cabeça, pescoço e flanco, foram visualizadas em duas vacas a partir do 63º (grupo 1, vaca 1) e no 62º dia (grupo 1, vaca 2) de experimento.

Os sinais clínicos considerados graves foram observados apenas na vaca 3 (grupo 2, *Vicia villosa*/vacas/pastejo), a partir do 28º dia de experimentação. Além dos sinais clínicos leves e moderados descritos anteriormente, verificou-se que as lesões de pele caracterizadas por alopecia iniciaram-se na face (28º a 32º dia, variando de 0,5 a 1,0cm de diâmetro) (Figuras 7 (A, B e C); 8 (A, B e C)). Estas lesões progrediam rapidamente, encontrando-se nas orelhas e entre os ramos da mandíbula (36º dia, 3 a 4cm de diâmetro), com formação de crostas ao redor do focinho (37º dia). Após estas áreas se estendiam às regiões laterais do pescoço, na região inguinal próximo ao úbere (37º dia), na região torácica lateral, abdominal lateral e ventral, na região lombar, nos membros, e abaixo das articulações úmero-rádio-ulnar, direita e esquerda (cotovelo) e fêmur-tíbio-patelar direita e esquerda (joelho) (39º dia). Ainda verificou-se lesões crostosas no úbere (pequenas vesículas no quarto mamário anterior direito (0,5 a 1cm de diâmetro) e crostas no quarto mamário posterior direito (de 1 a 3cm de diâmetro) (39º dia).

As lesões de pele se intensificavam, com o passar dos dias, e em alguns locais tornavam-se confluentes, apresentando formatos irregulares e tamanhos variados, principalmente na face, pescoço, região abdominal lateral e membros (torácicos e pélvicos). Ao tracionar os pelos estes se soltavam facilmente. Na região abdominal lateral as áreas de alopecia apresentavam-se em paliçadas, dispostas obliquamente ou transversalmente (45º dia, 8 a 15cm de comprimento).

As lesões de pele aumentaram progressivamente com queda quase total dos pelos da face, orelhas e pescoço (aproximadamente 70%). Nestas regiões a pele encontrava-se enrugada, inelástica, ressecada e espessa, onde se podiam observar inúmeras rachaduras/fissuras na forma de pequenos riscos (47º ao 50º dia). Observou-se ainda o enrugamento da pele na região inguinal caudalmente, na inserção do úbere e cranialmente ao mesmo (44º dia). Adicionalmente verificou-se avermelhamento moderado nos membros pélvicos abaixo da articulação do joelho (articulação fêmoro-tíbio-patelar), e na articulação do jarrete (articulação társica) (41º dia).

Concomitantemente às lesões observadas na pele verificaram-se prurido, hipertermia (temperaturas superiores a 40°C), dificuldade respiratória, às vezes ofegante, tosse, lacrimejamento, conjuntiva hiperêmica, sialorreia, irritação, lambeduras frequentes, principalmente nas narinas e nos membros, exsudação nasal catarral, diarreia, anorexia, apatia, e queda acentuada na produção de leite. Observou-se também aumento bilateral dos linfonodos inguinais (iniciando no 34º dia, 10x4cm) e pré-escapulares (iniciando no 37º dia, 15x8cm).

O prurido inicialmente era leve (37º dia), tornando-se intenso, fazendo com que as áreas de alopecia tivessem um aumento considerável diariamente. Frequentemente observou-se a vaca 3 atritando-se contra obstáculos presentes na sala de espera para ordenha, nos piquetes ou nos moirões e estacas das cercas. Devido aos atritos verificaram-se múltiplas escoriações pelo corpo. Percebeu-se que o prurido intenso ocorria nas horas mais quentes do dia, e/ou quando o sol era intenso. Associado ao prurido observou-se que o animal lambia e/ou mordida frequentemente as regiões dos membros, abdômen lateral e ventralmente, úberes e narinas. Estas últimas eram vistas avermelhadas com frequência.

Observou-se ainda, irritação cutânea e agitação constante da cauda, coices no abdômen, balanço da cabeça para os flancos e movimentos constantes de esfregar o tórax (a partir do 37º dia). Verificou-se sangramento pelo orifício anal (44º dia).

Por fim, a vaca 3 ainda apresentou dificuldade de locomoção, com relutância em se movimentar, andar cambaleante, permanência na maior parte do tempo em decúbito esternal e, às vezes em decúbito lateral, olhos sempre fechados ou mesmo compressos (46º dia) e cabeça voltada para cima e para trás (posição de olhar as estrelas) (49º dia).

A temperatura retal dos bovinos leve, moderado e gravemente intoxicados a partir do 36º dia permaneceu, na maior parte do tempo, superior a 39,0°C. A temperatura máxima aferida foi de 41,2°C no 59º dia na vaca 1 (grupo 1) (observou-se temperaturas superiores a 40°C no período entre os dias 57º e 61º), 40,6°C no 64º dia na vaca 2 (grupo 1) (observou-se temperaturas superiores a 40°C entre os dias 64º; 67º), 40,6°C no 36º dia de experimento na vaca 3 (grupo 2) e persistiu durante todo o período de experimentação, com temperatura máxima verificada no 46º dia (41,1°C) e 40,4°C, vaca 5 (grupo 2), a partir do 52º dia até o final da experimentação.

Com relação à produção leiteira, inicialmente todos os animais, alimentados com *V. villosa* verde no cocho, pastejo de *V. villosa* consorciada com azevém ou ainda *V. villosa*, *V. sativa* e azevém obtiveram aumentos significativos na produção, aumento este que variava de 6 a 12L somados aos produzidos diariamente. Posteriormente houve alterações expressivas durante o terço médio e o período final de experimentação, com produção significativamente reduzida.

Além disso, uma vaca do grupo 1 e três vacas do grupo 2 manifestaram mastite clínica com quadros recidivantes de mastite clínica, enquanto as vacas dos grupos 3 e 4 não manifestaram quadros de mastite.

Várias tentativas de inseminação artificial foram realizadas, nas vacas 1, 2, e 4, durante e após a experimentação, porém sem sucesso, levando-os posteriormente ao descarte.

Com o término do consumo de ervilhaca os sinais clínicos regrediram até desaparecer entre três a cinco semanas. Das seis vacas que desenvolveram a doença granulomatosa sistêmica, morreram quatro animais, sendo uma vaca do grupo 1 (*V. villosa*/vacas, cocho) e três vacas do grupo 2 (*V. villosa*/vacas, pastejo) e estas foram necropsiadas. A vaca 2 morreu após 872 (*V. villosa*/vacas, cocho) dias de experimentação; a vaca 3 (*V. villosa*/vacas, pastejo) aos 51 dias de experimentação; a vaca 4 (*V. villosa*/vacas, pastejo) morreu durante após 333 dias de experimentação e a vaca 5 (*V. villosa*/vacas, pastejo) após três dias do término do estudo experimental.



Figura 7: A. Aparecimento de áreas irregulares de alopecia na face (28° ao 33° dia). B. Extensão das lesões alopécicas na face e pescoço (36° dia). C. Áreas multifocais de alopecia na face, orelha e pescoço; aumento do linfonodo pré-escapular (37° dia) (seta). Ingestão de *Vicia villosa*, Vaca 3. CAV/UDESC.

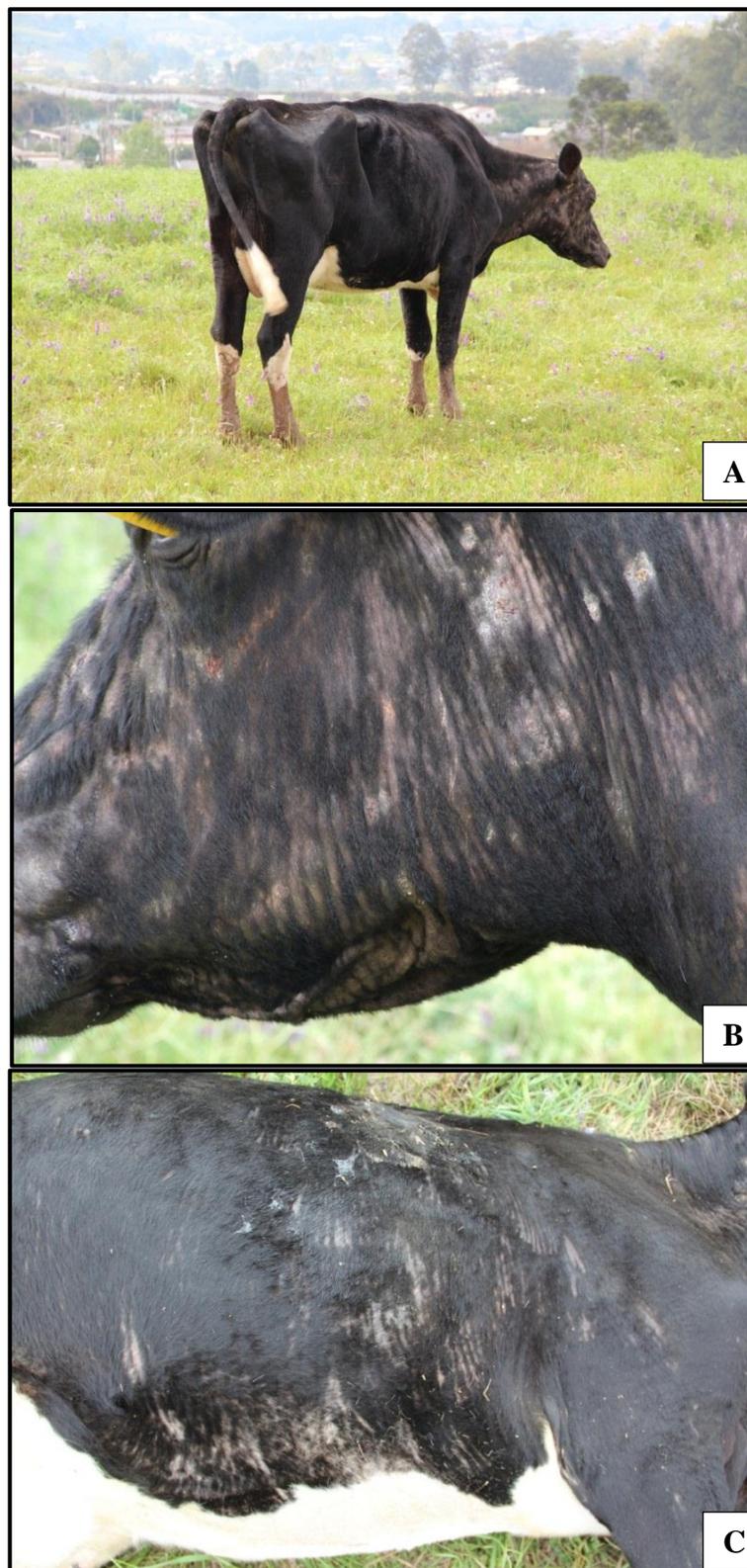


Figura 8: A. Emagrecimento progressivo e anorexia (40º dia). O animal permanecia nesta posição a maior parte do tempo. B. Rugosidade, ressecamento e formação de feridas e crostas na pele da face e pescoço (47º ao 50º dia). C. Áreas de alopecia na região abdominal lateral em paliçadas, dispostas obliquamente ou transversalmente (45º ao 50º dia). Ingestão de *Vicia villosa*, Vaca 3. CAV/UEDESC.

4.2.2 Necropsia

À necropsia, havia um padrão de lesão que consistia de áreas cinza-pálidas, de 1mm a 2mm de diâmetro, multifocais a coalescentes, visíveis tanto na superfície capsular e de corte, em linfonodos principalmente inguinais, pré-escapulares e mamários, no baço, nos rins e no coração (Figura 9 A, B e C).

As lesões macroscópicas no fígado consistiam de aumento do volume e leve acentuação do padrão lobular, caracterizada por áreas mais claras entremeadas com pontos escuros (Figura 9A). Na vaca 3 do grupo 2 (*V. villosa*/vacas, pastejo), na serosa da vesícula biliar havia hemorragias multifocais. Adicionalmente a vaca 5 do grupo 2 (*V. villosa*/vacas, pastejo) tinham rins e urina de coloração escura.

4.2.3 Histologia

As lesões histológicas consistiram de infiltrado inflamatório granulomatoso composto de proporções variáveis de macrófagos epitelioides, linfócitos, plasmócitos, células gigantes multinucleadas, neutrófilos e alguns eosinófilos. Estas lesões foram acentuadas nos linfonodos, baço, rins, glândula tireoide e miocárdio (Figuras 10 (A, B e C); 11 (A, B e C); 12 (A, B e C)). No fígado, observaram-se congestão, associada a degeneração vacuolar, necrose de coagulação de intensidade leve predominantemente centrolobultra e infiltrado de macrófagos na periferia do lóbulo.

As lesões na pele consistiam de discreta a moderada hiperqueratose ortoqueratística e em alguns segmentos observaram-se erosões e crostas na epiderme (Figura 11C). Na derme observou-se infiltrado de macrófagos, plasmócitos e linfócitos, associado perivascular e dilatação das glândulas sudoríparas.

O infiltrado de macrófagos, plasmócitos linfócitos e raramente células gigantes também foram observados em menor grau na tireoide, glândulas salivares, na adrenal, pâncreas na musculatura esquelética, pâncreas, intestinos delgado e grosso, glândulas mamária, medula óssea, rúmen, retículo, omaso e olho (íris e músculo ciliar). Infiltrado mononuclear também foi observado em pequena quantidade na íntima de vasos no sistema nervoso.

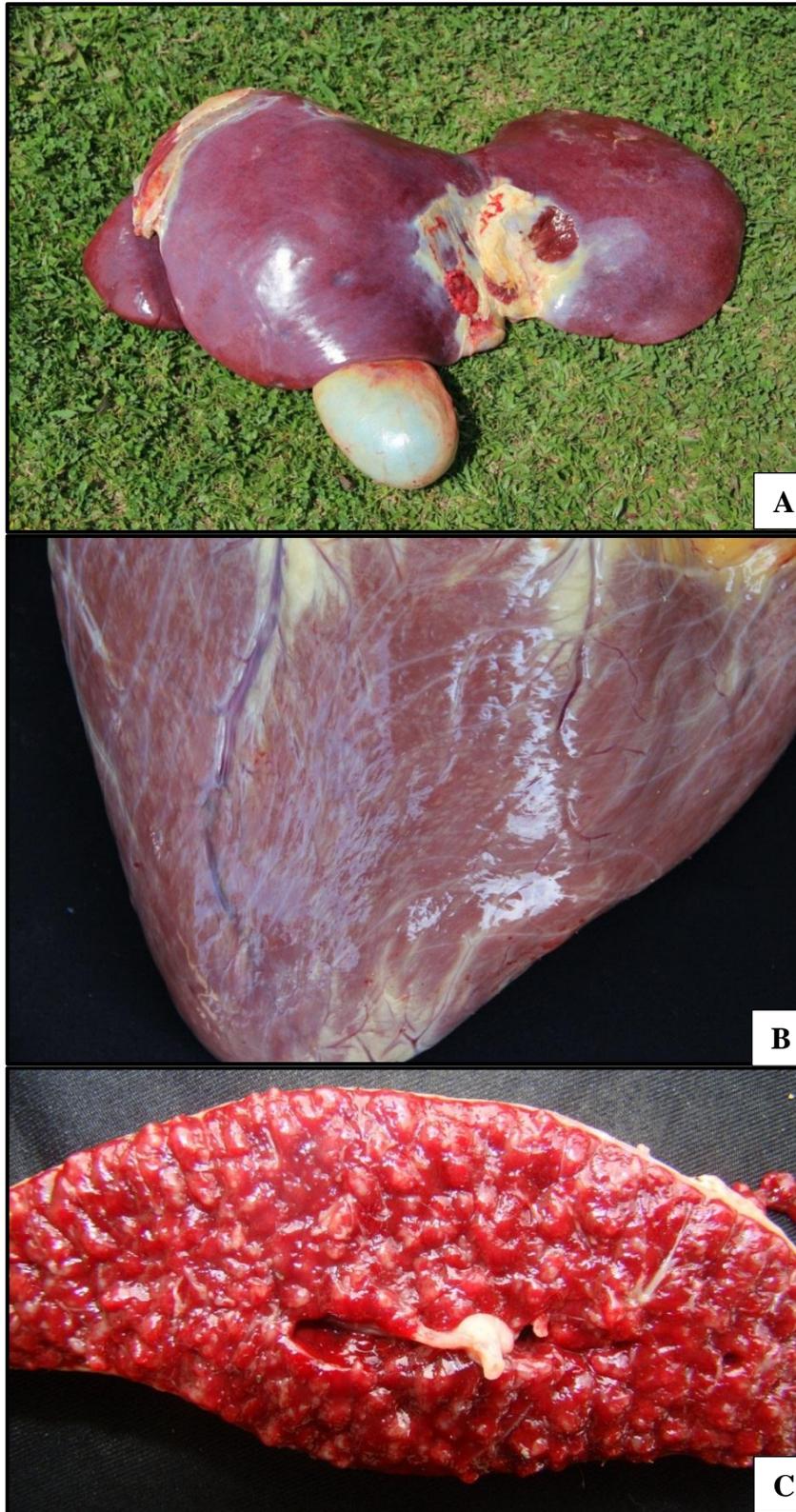


Figura 9: A. Fígado aumentado de tamanho. B. Coração com estrias e pequenas áreas levemente branco-amareladas na superfície pericárdica. C. Baço com aumento de volume dos folículos linfóides com colorações branco-acinzentados e proeminentes no parênquima esplênico. Ingestão de *Vicia villosa*, Vaca 3. CAV/UDESC.

Não foram detectados microorganismos nos cortes corados com hematoxilina e eosina, bem como nos corados pela técnica de Ziehl-Neelsen.

As lesões histológicas observadas na vaca 2 do grupo 1 e na vaca 3 do grupo 2, eram basicamente relacionadas à Tristeza Parasitária Bovina, porém havia, lesões bem definidas da doença granulomatosa sistêmica crônica, acrescidas de estase biliar, nos canalículos e pela coloração de May-Grunwald Giemsa, em secções de fígado e rim foi observado *Babesia bigemina*, em hemácias.

Na tabela 1 do Anexo A encontram-se sumarizados a distribuição e a intensidade das lesões granulomatosas observadas no exame histológico dos quatro bovinos necropsiados, submetidos à experimentação com *V. villosa* no cocho e consorciada com azevém (*Lolium* sp).

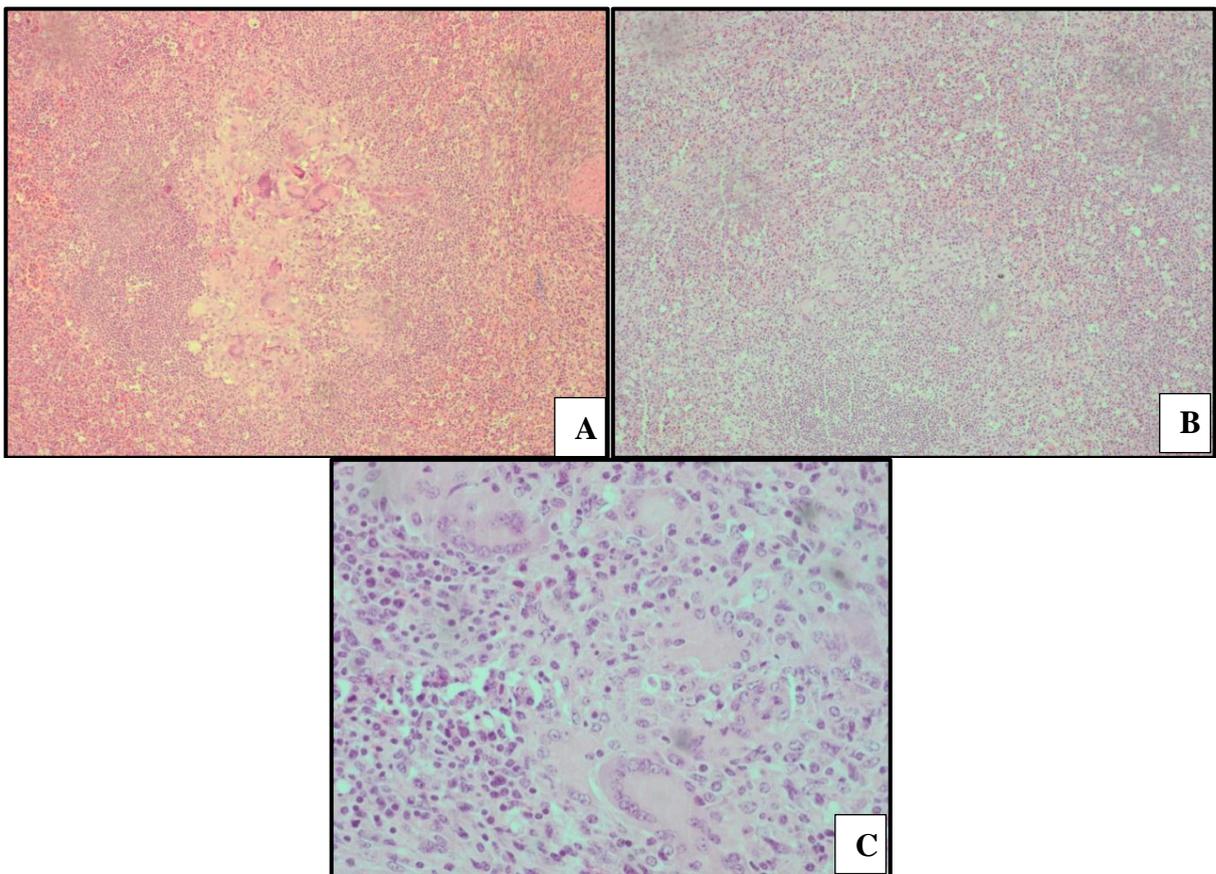


Figura 10: A. e B.: Linfonodo com infiltrado inflamatório granulomatoso. A infiltração granulomatosa substitui grandes extensões de tecido linfático. HE. Obj. 10. C. Detalhe do infiltrado inflamatório granulomatoso com a formação de células multinucleadas. HE, Obj. 40.

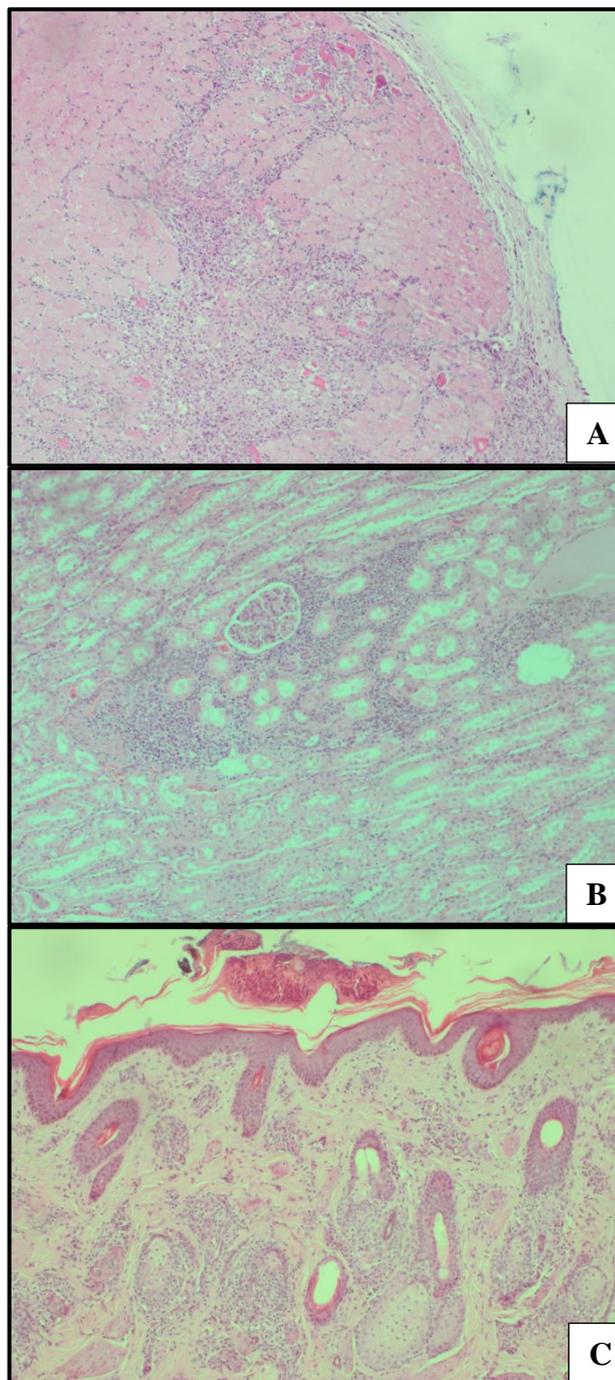


Figura 11: **A.** Coração com infiltrado inflamatório granulomatoso no miocárdio. A infiltração granulomatosa destrói e substitui grandes extensões de tecido miocárdico. HE. Obj. 10. **B.** Infiltrado inflamatório granulomatoso no interstício renal deslocando e destruindo as estruturas normais do néfron. HE. Obj. 20. **C.** Segmento da pele com erosões e úlceras e a formação de crostas serocelulares. Dermatite perivascular e perianexal granulomatosa. HE. Obj. 10. Ingestão de *Vicia villosa*, Vaca 3. CAV/UDESC.

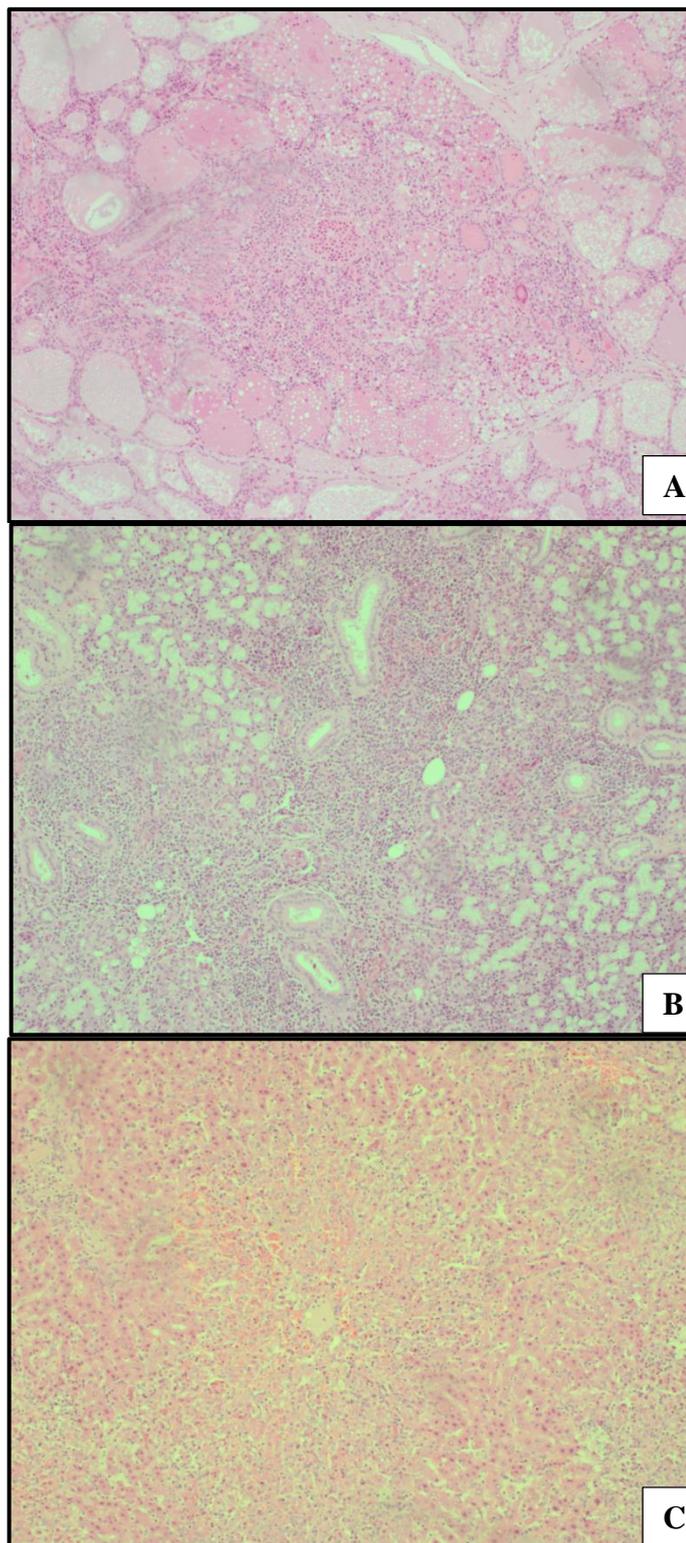


Figura 12: A e B. Tireoide e glândula salivar mandibular com infiltrado inflamatório granulomatoso, respectivamente. A infiltração granulomatosa substitui grandes extensões de tecido glandular tireoidiano e mandibular. **C.** No fígado, observaram-se congestão, vacuolização moderada difusa e necrose de coagulação multifocal. O infiltrado granulomatoso localizava-se difuso encontrando-se principalmente na região centrolobular e nas tríades portais. HE. Obj. 10. Ingestão de *Vicia villosa*, Vaca 3. CAV/UDESC.

4.2.4 Bromatologia

Os valores obtidos pela análise bromatológica de amostras de pastagens utilizadas na experimentação estão descritas na tabela 2 no anexo B. Verificou-se, na composição química das ervilhacas, valores elevados para matéria mineral (Grupo 1, 2, 3, 4, 5, e 6) e para gordura bruta (Grupo 2), e valores baixos para proteína bruta (Grupo 3 e 6) e gordura bruta (Grupo 1).

4.2.5 Hemograma

As alterações observadas no hemograma dos bovinos submetidos à experimentação foram inconstantes. As principais alterações encontram-se relacionadas na tabela 3 no anexo C. Houve alterações no leucograma dos bovinos durante a experimentação, inclusive nos grupos que não apresentaram sinais clínicos e patológicos associados à intoxicação granulomatosa sistêmica por *V. villosa* e *V. sativa*, ambas, consorciada com azevém e pastagens de *V. villosa* com *V. sativa* e azevém. Verificou-se leucocitose devido à linfocitose e/ou monocitose nos grupos 1 (vaca 1), 3 (vaca 8) e 6 (novilhas 6, 7, e 8), apenas leucocitose nos grupos 2 (vacas 3, 4, 5 e 6), 3 (vacas 7, 9 e 10), 4 (vaca 11) e grupo 5 (novilhas 1, 2, 3 e 4) e apenas monocitose nos grupos 4 (vacas 12, 13 e 14) e 6 (novilha 5). Observou-se ainda alteração no eritrograma dos bovinos nos grupos 2 (vacas 3 e 5), 5 (novilha 4) e no grupo 6 (novilhas 5, 6 e 8) e no plaquetograma nos grupos 2 (vaca 3), 3 (vaca 9) e no grupo 6 (novilha 8).

4.2.6 Pesquisa de zinco sérico

Houve alterações significativas, na dosagem do Zn sérico dos bovinos submetidos à experimentação com *V. villosa* verde no cocho (grupo 1; vacas 1 e 2), em pastejo de *V. villosa* com azevém (grupo 2; vacas 3, 5 e 6); em pastejo de *V. villosa* e *V. sativa* com azevém (grupo 3; vacas 10) e em pastejo de *V. sativa* e azevém (grupo 4; vaca 11) sumarizados na tabela 4 do anexo D.

4.2.7 Pesquisa de zinco e cálcio hepáticos

Realizou-se a determinação dos valores analíticos de Ca e Zn do tecido hepático dos bovinos necropsiados dos grupos 1 (vaca 2) e 2 (vacas 3, 4 e 5). Os teores obtidos estão situados dentro dos valores de referência para espécie, segundo Tokarnia e colaboradores (2010), para a determinação do Zn e do Ca.

4.2.8 Pesquisa de zinco e cálcio fecal

Realizou-se a pesquisa de Zn e Ca nas fezes dos bovinos submetidas à experimentação com *V. villosa* no cocho (grupo 1), em pastagens de *V. villosa* e azevém (*Lolium* sp) (grupos 2 e 5), em pastagens de *V. sativa* e azevém (*Lolium* sp) (grupo 4) e em pastagens de *V. villosa* e *V. sativa* consorciadas com azevém (*Lolium* sp) (grupos 3 e 4). Houve alterações significativas nas dosagens de Ca e Zn nas fezes de todos os bovinos submetidos à reprodução da doença granulomatosa sistêmica. As dosagens fecais de Zn e Ca estiveram aumentadas

desde o início até o final do período experimental, sendo que os valores tiveram aumentos crescentes durante o decorrer dos experimentos.

4.2.9 Determinação do Ácido Fítico

Determinou-se a quantidade de ácido fítico, ou fitato, nas amostras de ervilhaca, utilizadas para intoxicação experimental em bovinos. Os valores obtidos estão representados na Tabela 5 no anexo E. Estes foram extremamente baixos, nas diferentes fases do desenvolvimento da planta, se comparados com os valores observados para grãos e sementes (teores já conhecidos).

5 DISCUSSÃO

Neste estudo foi caracterizada a epidemiologia, os sinais clínicos, as lesões macroscópicas e microscópicas da intoxicação espontânea e experimental por *Vicia villosa*, bem como a avaliação da possível toxicidade de *Vicia sativa* em bovinos.

A dose de *V. villosa* necessária para produzir sinais clínicos leves e moderados em bovinos foi de 46,7g e 38,2g/kg/dia (vacas 1 e 2), consumindo 25,5kg e 26,9kg diários da planta, totalizando 1810,4kg e 1909,4kg, respectivamente, durante os 71 dias de experimento e os sinais clínicos iniciaram a partir do 21º dia de fornecimento da planta no cocho. Panciera; Mosier e Ritchey (1992), também reproduziram a doença experimentalmente no cocho, em uma vaca da raça Angus que havia se recuperado da doença um ano antes. Na ocasião a vaca consumiu 100kg de ervilhaca durante o experimento, divididos em 9kg diários e desenvolveu os sinais clínicos característicos da doença após o 11º dia de experimentação, diferentemente do observado no presente trabalho.

Os surtos da doença granulomatosa sistêmica associada à ervilhaca (DGS ervilhaca-associada) descritos por Panciera; Johson e Osburn, (1966) e Panciera, (1978) ocorreram principalmente durante a estação de crescimento máximo da planta. No presente experimento, para o grupo 1 (*V. villosa* verde no cocho) a planta foi fornecida no estágio de inflorescência e formação completa das vagens, enquanto que nos demais grupos a planta foi ingerida a partir da fase inicial de crescimento antes do início da floração e as vacas (grupo 2/*V. villosa*/pastejo) adoeceram antes mesmo da formação das vagens. Isto demonstra que a planta pode produzir a enfermidade em diferentes fases de desenvolvimento.

Na tentativa de intoxicação experimental tomou-se o cuidado de utilizar animais sem contato prévio com a planta evitando-se assim um possível efeito acumulativo da dose tóxica, conforme descrito por Panciera; Mosier e Ritchey, (1992).

Os sinais clínicos considerados moderados a graves foram observados em 6 vacas (grupos 1 e 2). Na literatura não constam dados sobre a reprodução experimental em bovinos em pastejo direto sobre *V. villosa*. A única tentativa de reprodução em pastagens contendo grandes quantidades dessa planta foi realizada com um bovino, Holandês, macho, de 15 meses de idade, e não resultou na doença (PANCIERA, 1978). Segundo Barros e colaboradores (2001), a reprodução experimental da doença granulomatosa sistêmica em bovinos é muito difícil, uma vez que requer grande quantidade da planta e possivelmente um contato prévio com a mesma. No presente trabalho, foi possível constatar que, para a ocorrência da DGS ervilhaca-associada, não há necessidade de ingestão prévia da planta, pois, a enfermidade foi reproduzida em 6 vacas que ingeriram a planta pela primeira vez.

A doença granulomatosa causada por *V. villosa* e seus híbridos (*V. villosa* cruzada com *V. dasycarpa*) foi diagnosticada em bovinos das raças Aberdeen Angus (PANCIERA; JOHSON; OSBURN, 1966; KERR; EDWARDS, 1982; PEET; GARDNER, 1986; ODRIOZIOLA et al., 1991; JOHNSON et al., 1992; PANCIERA; MOSIER; RITCHEY, 1992), Limousine (JOHNSON et al., 1992), Holandês (PANCIERA; JOHSON; OSBURN, 1966; PANCIERA, 1978; KERR; EDWARDS, 1982; BURROUGHS et al., 1993) e poucos casos em Murray Grey e cruza de Hereford com Bradford (HARPER et al., 1993). No Brasil, até o presente momento essa enfermidade foi observada somente em bovinos da raça Holandês (BARROS et al., 2001; RECH et al., 2004; FIGHERA; BARROS, 2004; GAVA et al., 2009; SONNE et al., 2011). Da mesma forma, os 7 surtos da doença espontânea do presente estudo também ocorreram em vacas da raça Holandês e, segundo os proprietários, a enfermidade só acometeu vacas de maior produção (acima de 20 litros) e não foi observada em vacas secas e novilhas. Esses dados contribuíram para a escolha dos animais utilizados para experimentação, cujos resultados foram semelhantes aos observados na doença espontânea.

O quadro clínico-patológico da DGS ervilhaca-associada é muito semelhante à doença granulomatosa produzida em bovinos que ingerem bagaço de laranja peletizado (GRIFFITHS & DONE, 1991, SAUNDERS et al., 2000, GAVA & BARROS, 2001). Essa enfermidade foi diagnosticada, principalmente, em vacas de alta produção leiteira (GAVA & BARROS, 2001) como descrito no presente estudo. No entanto, alguns casos de intoxicação por bagaço de laranja peletizados estão associados a tendências hemorrágicas, característica raramente relatada em casos de intoxicação por ervilhaca (ODRIOZIOLA et al., 1991).

Experimentalmente, o quadro clínico-patológico seguido de morte produzido em decorrência da ingestão de grandes quantidades de *V. villosa* iniciou a partir do 28º e 45º dia e a morte ocorreu 22 e 27 dias após o início dos sinais clínicos (grupo 2, vacas 3 e 5, respectivamente). Situação semelhante foi verificada nos sete surtos da doença espontânea acompanhados no presente estudo e também nos casos descritos na literatura (PANCIERA; JOHNSON; OSBURN, 1966; PANCIERA, 1978; JOHNSON et al., 1992; PANCIERA; MOSIER; RITCHEY, 1992; FIGHERA; BARROS, 2004).

Nos demais grupos submetidos à reprodução experimental (grupo 3, *V. villosa/V. sativa*/vacas em lactação; grupo 4, *V. sativa*/vacas em lactação; grupo 5, *V. villosa/V. sativa*/novilhas; grupo 6, *V. villosa*/novilhas) não foram observadas alterações compatíveis com DGS ervilhaca-associada. Tal condição era esperada uma vez que nos sete surtos espontâneos verificados no presente estudo e naqueles descritos na literatura (PANCIERA; JOHNSON; OSBURN, 1966; PANCIERA, 1978; EDWARDS, 1982; PEET; GARDNER, 1986; ODRIOZOLA et al., 1991; PANCIERA; MOSIER; RITCHEY, 1992; KERR; JOHNSON et al., 1992; HARPER et al., 1993; BURROUGHS et al., 1993; BARROS et al., 2001; RECH et al., 2004; FIGHERA; BARROS, 2004; FIGHEIRA; SOUZA; BARROS, 2005; GAVA et al., 2009; SONNE et al., 2010; SONNE et al., 2011), a enfermidade ocorreu em bovinos com idade acima de três anos e pastoreavam em áreas com predominância de *V. villosa*.

Com relação à palatabilidade, os maiores consumos de *V. villosa* foram verificados durante o período de crescimento, antes do início da inflorescência e formação dos legumes. Após este período, todos os animais envolvidos na experimentação, passaram a ingerir maior quantidade de *Lolium* sp e, aqueles mantidos nas áreas de consorciação *V. villosa/V. sativa*, ingeriam preferencialmente a *V. sativa*. Segundo Sattell et al. (1998), *V. sativa* fornece pastagem bem mais palatável se comparada com *V. villosa*, sendo que esta última geralmente apresenta uma palatabilidade intermediária a baixa, quando comparada a outras leguminosas. Dessa forma, a melhor palatabilidade demonstrada pelos bovinos para com *V. sativa* e a não reprodução da doença nas vacas que pastorearam em áreas exclusivamente constituídas por ela, pode-se afirmar que essa espécie de ervilhaca, não produz doença granulomatosa em bovinos.

Nos casos espontâneos da doença granulomatosa sistêmica a morbidade variou entre 5% e 35%, a mortalidade ficou entre 5% e 10% e a letalidade oscilou entre 25% e 100%. Na doença experimental a morbidade variou entre 0% e 100%, a mortalidade e a letalidade oscilaram de entre 0% e 75%. Taxas semelhantes foram descritas na literatura, onde a taxa de mortalidade foi variável, mas normalmente é baixa (PANCIERA; JOHNSON; OSBURN, 1966; PANCIERA, 1978; KERR; EDWARDS, 1982; JOHNSON et al., 1992; PANCIERA; MOSIER; RITCHEY, 1992), e as taxas de letalidade variaram de 50 a 100% (KERR; EDWARDS, 1982; ODRIOZIOLA et al., 1991). Segundo diversos autores, quando ocorrem os surtos, a morbidade varia de 1 a 68% (média de 15%) e a letalidade varia de 0 a 100% (média de 50%) (ODRIOZOLA et al., 1991; BARROS, et al. 2001; FIGHERA; BARROS, 2004; GAVA et al., 2009; SONNE et al., 2011), semelhantemente ao observado no presente estudo.

Os dados epidemiológicos, o quadro clínico-patológico, as lesões macroscópicas e microscópicas da doença granulomatosa sistêmica nos bovinos ocorrida de forma espontânea e experimental foram semelhantes aos descritos na literatura (PANCIERA; JOHSON; OSBURN, 1966; PANCIERA, 1978; EDWARDS, 1982; PEET; GARDNER, 1986; ODRIOZOLA et al., 1991; PANCIERA; MOSIER; RITCHEY, 1992; KERR; JOHNSON et al., 1992; HARPER et al., 1993; BURROUGHS et al., 1993; BARROS et al., 2001; RECH et al., 2004; FIGHERA; BARROS, 2004; FIGHEIRA; SOUZA; BARROS, 2005; GAVA et al., 2009; SONNE et al., 2010; SONNE et al., 2011).

As primeiras manifestações clínicas verificadas na experimentação foram: pelos arrepiados e com perda do brilho, seguidas de coceira e avermelhamento da pele, coincidentes com as áreas despigmentadas. Em virtude do “ato de coçar” contra obstáculos as lesões cutâneas aumentavam gradativamente, provocando ulcerações e até lacerações na mesma. Casos semelhantes de aumento das lesões de pele devido ao traumatismo auto-infligido pelo “ato de se coçar” foram descritos por outros autores (PANCIERA; JOHSON; OSBURN, 1966; PANCIERA; MOSIER; RITCHEY, 1992; BARROS et al., 2001; FIGHEIRA; SOUZA; BARROS, 2005). Também foi observado aumento de volume, dos linfonodos pré-escapulares e pré-curais. Essas alterações foram relatadas também na doença espontânea causada por *Vicia hibrida* (*V. villosa*/*V. dasycarpa*), (BURROUGHS et al., 1993), e em *Vicia* spp (FIGHERA; BARROS, 2004).

No presente trabalho, as lesões de pele iniciaram-se na face, evoluindo para as orelhas, pescoço, tronco e membros. Porém as lesões mais acentuadas foram verificadas predominantemente na face e pescoço. Casos semelhantes foram descritos por Figueira, Souza e Barros (2005). Alguns autores afirmam que as lesões ocorrem principalmente no períneo, úbere, cauda e pescoço (PANCIERA; JOHSON; OSBURN, 1966), e que após algum tempo aparecem na cabeça, tronco e membros (PANCIERA; JOHSON; OSBURN, 1966; KERR; EDWARDS, 1982), o que não foi visto no presente trabalho. Em outros surtos descritos na literatura as lesões iniciaram na base da cauda e pescoço, posteriormente espalhando-se para o tronco e membros (KERR; EDWARDS, 1982), ou se manifestaram inicialmente na cabeça, períneo, cauda e úbere, sendo vistas no pescoço, tronco e membros após alguns dias (BURROUGHS et al., 1993). Num surto em touros na Argentina apenas a pele da cabeça e do peito foi afetada (ODRIOZOLA et al., 1991).

Sangramento pelos orifícios nasal e anal também foi observado em uma vaca experimentalmente intoxicada (grupo 2, vaca 3) e em várias vacas dos surtos espontâneos. Panciera, Johson e Osburn (1966) descreveram quadros de diarreia grave e sanguinolenta em casos avançados da doença, porém, no presente estudo foi observada diarreia sem sangue, em alguns animais.

Outro fato verificado no bovino com doença granulomatosa sistêmica grave foi à permanência deste, em grande parte do experimento, com os olhos fechados ou mesmo bem compressos, além do lacrimejamento constante. Por ocasião da necropsia verificou-se uma pequena opacidade na córnea em ambos os olhos e na histologia evidenciou-se infiltrado granulomatoso moderado na íris e no músculo ciliar. O lacrimejamento foi descrito frequentemente nos relatos naturais de DGS ervilhaca-associada (PANCIERA; JOHSON; OSBURN, 1966; PEET; GARDNER, 1986; PANCIERA; MOSIER; RITCHEY, 1992; BARROS et al., 2001; FIGHERA; BARROS, 2004). No entanto, não se encontrou na literatura referências de casos de lesões em globo ocular em animais intoxicados naturalmente pela ervilhaca, tanto a nível macro como microscopicamente.

Outra característica anteriormente não citada na DGS ervilhaca-associada foi mastite clínica, verificada em 4 vacas (grupo 1, vaca 2/*V. villosa* no cocho; grupo 2, vacas 3, 4 e 5/pastagem de *V. villosa*). Esta observação também foi citada por proprietários onde ocorreu a doença espontânea.

As vacas em experimentação que desenvolveram os sinais clínicos da DGS ervilhaca-associada e sobreviveram, também manifestaram distúrbios reprodutivos como ausência de fecundação após sucessivas inseminações e foram enviadas para descarte. No exame histológico dos órgãos do trato reprodutivo (útero (endométrio), ovário e cérvix), observaram-se lesões leves associadas à intoxicação por ervilhaca. Panciera, Mosier e Ritchey (1992) descrevem que órgãos como útero (endométrio) e o ovário podem conter ocasionalmente o infiltrado celular presente na intoxicação, porém não há menção na literatura a respeito de infertilidade ou, não prenhez em animais alimentados por *Vicia* spp. No entanto, vale ressaltar que a ocorrência de aborto foi descrita em dois casos em animais que apresentavam a forma granulomatosa da doença (PANCIERA; JOHNSON; OSBURN, 1966; JOHNSON et al., 1992).

Oruc et al. (2012) relacionam um caso de Babesiose em vaca alimentada *V.villosa*. Durante o desenvolvimento dos experimentos uma vaca (grupo2, vaca 5) e um novilha (grupo 5, novilha 4/*V.villosa/V.sativa*) manifestaram sinais clínicos de tristeza parasitária.

Vale ressaltar aqui que a vaca 2 do grupo 1 (*V. villosa* no cocho), que desenvolveu os sinais moderados da intoxicação, também manifestou sinais clínicos de Babesiose e morreu após 2 anos e 4 meses do término do período experimental. Ao exame histológico, as lesões observadas eram basicamente relacionadas à tristeza parasitária bovina, porém havia lesões remanescentes da intoxicação experimental por *V. villosa*. Isso demonstra que mesmo ao se retirar o animal do contato com a planta (consumo), as lesões, uma vez formadas, permanecem. Embora haja suspeita de que os bovinos que manifestam a DGS ervilhaca-associada tenham imunidade baixa, não se pode afirmar que esses casos de Babesiose estejam relacionados a esta enfermidade.

Outro fato verificado no presente trabalho foi a não recuperação da produtividade leiteira das vacas que adoeceram e não morreram. Burroughs et al. (1983), também descreveram casos de não recuperação da produção leiteira após cessar o contato com a planta. Na ocasião duas vacas jovens moderadamente afetadas recuperaram sua condição corpórea, após cinco semanas, porém não sua produção leiteira. Isto se deve provavelmente à ocorrência de lesões histológicas granulomatosas sistêmicas em diversos órgãos, assim como na glândula mamária que mesmo sem manifestar sinais clínicos permanecem após o contato, como verificado no presente trabalho, com a vaca 2 do grupo 1 (*V. villosa* no cocho), que morreu de Babesiose.

As lesões macroscópicas e microscópicas encontradas nos bovinos experimentalmente intoxicados e nos surtos espontâneos aqui descritos, foram semelhantes às descritas na literatura para os casos espontâneos de DGS ervilhaca-associada (PANCIERA; JOHNSON; OSBURN, 1966; PANCIERA, 1978; KERR; EDWARDS, 1982; PEET; GARDNER, 1986; ODRIOZOLA et al., 1991; PANCIERA; MOSIER; RITCHEY, 1992; JOHNSON et al., 1992; HARPER et al., 1993; BARROS et al., 2001; FIGHERA; BARROS, 2004; FIGHEIRA; SOUZA; BARROS, 2005; GAVA et al, 2009; SONNE et al., 2010).

No presente estudo, também foi observado infiltrado granulomatoso moderado na íris, no corpo ciliar, e na musculatura esquelética da região lombar (vaca 3, grupo 2).

Na maioria dos relatos sobre a intoxicação por *V. villosa*, não foram observadas alterações significativas nos exames hematológicos realizados (PANCIERA; JOHNSON; OSBURN, 1966). No presente estudo alguns bovinos apresentaram linfocitose, monocitose e eosinofilia que poderiam estar relacionados a situações de estresse, devido ao manejo diário dos animais.

As vacas 3 e 4 do Grupo 2/ *Vicia villosa*, apresentaram anemia na 8ª semana de experimento. Casos de anemia também foram descritos em surtos de intoxicação por *V. villosa* subespécie *dasycarpa* e *Vicia benghalensis*, descritos na Austrália (HARPER et a., 1993).

Nas análises séricas de Zn verificaram-se alterações significativas nos bovinos intoxicados por *V. villosa* que desenvolveram a doença granulomatosa na forma grave (vacas 3 e 5/grupo 2), assim como excessivas perdas de Ca e Zn nas fezes. Estes valores indicaram uma deficiência absoluta de Zn, uma vez que as reservas fisiológicas, mediante a diminuição da concentração sérica, são prontamente liberadas, o que não foi verificado aqui. Ainda, nas análises séricas de Zn, não houve alterações significativas nos animais, em pastagens de *V. sativa* (vacas), de *V. villosa* (novilhas) e nas consorciadas de *V. sativa* e *V. villosa* (vacas e novilhas), exceto vaca 10 (grupo 3/*V. villosa*/*V. sativa*) onde os valores de Zn foram abaixo dos de referência na 1ª e 6ª sexta semanas de experimentação.

Segundo Bettger e O'dell (1993), a deficiência de Zn em bovinos resulta em lesões cutâneas, assim como determina baixa resistência a doenças, hemorragias e conseqüentemente a morte dos animais. Este fato, em parte, pode explicar a susceptibilidade a outras doenças e as hemorragias observadas nas vacas do presente estudo. Gava, (2003, dados não publicados), observou alterações semelhantes em bovinos intoxicados com bagaço de laranja peletizado. Na ocasião, determinaram-se nas amostras de fígados coletados, baixos níveis de Zn e excessiva excreção de Ca pelas fezes.

Com relação à composição química das ervilhacas utilizadas nas intoxicações experimentais, estas apresentaram parâmetros semelhantes aos citados na literatura (MORAIS, 1995), excetuando-se o valor da gordura bruta (GB) de amostras de *V. villosa* que estavam acima dos teores aceitáveis. Este fato se deve possivelmente à adubação dos solos com fosfatos, uma vez que a mesma ocasiona um aumento na concentração de nutrientes na parte aérea de gramíneas e leguminosas e na sua produção de biomassa (ARAÚJO, 2005). Observando os resultados de análises bromatológicas, Araújo (2005) verificou que a adubação com fósforo provocou um acréscimo significativo na concentração de proteína e gordura bruta em pastagens de leguminosas e gramíneas, o que também se observou no presente trabalho.

Na determinação do fitato (ou ácido fítico), nas amostras de ervilhaca peluda em diferentes fases do crescimento, verificou-se que este se encontrava em baixas quantidades se comparadas com os valores encontrados para grãos e sementes (teores já conhecidos). No entanto, deve-se ter cautela em definir estes valores como sendo baixos, uma vez que não se encontrou nenhuma referência na literatura determinando os valores de fitato nas diversas partes da planta e em suas diferentes fases do crescimento, que não em grãos e sementes. Deste modo, o fitato é depositado nas sementes e armazenado dentro de uma organela como corpos proteicos (REDDY et al., 1989). Assim esperar-se-ia encontrá-lo apenas nestes locais e não em outras partes da planta, conforme verificado no presente trabalho.

Com o presente trabalho evidenciou-se a necessidade de repetições experimentais, com um número maior de bovinos intoxicados, para melhor esclarecer as hipóteses levantadas, de que a DGS ervilhaca-associada possa estar relacionada a distúrbios metabólicos e ou, a hipersensibilidade do tipo IV. Contudo, as tentativas de determinação de hipótese imunológica, como a hipersensibilidade cutânea e os testes de blastogênese de linfócitos não apoiaram ser uma reação de hipersensibilidade (PANCIERA; MOSIER; RITCHEY, 1992). Com isso os autores sugerem a inclusão de uma variedade de antígenos presente na ervilhaca como possíveis agentes sensibilizadores; a continuação do estudo experimental vai ajudar a elucidar a patogenia e os mecanismos desta doença, que em nossa percepção tem vários mecanismos envolvidos, não se descartando a hipótese de hipersensibilidade nem a de envolvimento de distúrbios metabólicos.

6 CONCLUSÕES

1. *V. villosa* foi tóxica para bovinos, produzindo doença granulomatosa crônica ou sistêmica quando ingerida em quantidades superiores a 38,2g/kg/dia, por um período de 71 ou, em pastoreio direto por um período superior a 28 dias.
2. Pastagens de *Vicia villosa* quando ingerida por bovinos jovens, por um período 68 dias não produziu alterações clínicas.
3. Pastagens de *Vicia sativa* quando ingerida por vacas de alta produção leiteira por um período de 76 dias não produziu doença granulomatosa crônica.
4. A ingestão de *Vicia villosa* por períodos prolongados conduzem a baixos índices produtivos: baixa produção leiteira, baixos índices reprodutivos e pode predispor o surgimento de doenças infecciosas.
5. Bovinos que ingerem *Vicia villosa* por longos períodos podem ter baixos valores de Zn sérico e eliminam altas quantidades de Zn e Ca pelas fezes o que pode resultar em baixa imunidade.
6. Determinou-se a presença de fitato, em pequenas quantidades, nas amostras de *Vicia villosa* e *Vicia sativa* e *Vicia villosa*, em diferentes fases do seu crescimento.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDERSON, C. A.; DIVERS, T. J. Systemic granulomatous inflammation in a horse grazing hairy vetch. **Journal of the American Veterinary Medical Association**. 183:569-570. 1983.

ARAUJO, M. M. 2001. Efeito de fósforo sobre gramíneas e leguminosas cultivadas em solos aluviais do semi árido. **Ver. Cient. Anim.**, v.7, n.1, p.28, 2005.

BARROS, C. S. L.; FIGHERA R. A.; ROZZA D. B.; RECH R. R.; SALLIS S. V.; LANGOHR I. M. Doença granulomatosa sistêmica em bovinos no Rio Grande do Sul associada ao pastoreio de ervilhaca (*Vicia* spp). **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.21, p.162-171, 2001.

BASTOS N. R.; MIOTTO S. T. S. 1996. O gênero *Vicia* (Leguminosae_Faboideae) no Brasil. **Pesquisas. Botânica** 46:85-180.

BETTGER W. J.; O'DELL B. L. Physiological roles of zinc in the plasma membrane of mammalian cells. **Journal Nutrition Biochemistry**, v.4, p.194-207, 1993.

BREUKINK H. H.; HOLZHAUER C.; WESTENBROCK A. C. J. M. Pyrexia with dermatitis in dairy cows. **The Veterinary Record**, v.2, p.221-222, 1978.

BURROUGHS, W. G.; NESER, J. A.; KELLERMAN, T. S.; VAN NIEKERK, F. A. Suspected hybrid vetch (*Vicia villosa* crossed with *Vicia dasycarpa*) poisoning of cattle in the Republic of South Africa. **Journal of the South African Veterinary Association**. n.54, v.2, p.75-79, 1983

BURROWS, G. E.; TYLR, R. J. Toxic Plants of North America. Iowa States University Press, Ames: p.628-631, 2001.

CLAUGHTON, W. P.; CLAUGHTON, H. D. Vetch seed poisoning. **Auburn Veterinarian**, v.10, p.125-126, 1954.

COLLINS, C. L.; HENMAN, D. J.; KING, R. H.; DUNSHEAE, F. R. Common vetch (*Vicia sativa* cv Morava) is an alternative protein source in pig diets. Proceedings of the nutrition Society of Australia. **Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition**. vol.26, 11(supl): 249p., 2002.

COOK, B. G.; PENGELLY, B. C.; BROWN, S. D.; DONNELLY, J. L.; EAGLES, D. A.; FRANCO, M. A.; HANSON, J.; MULLEN, B. F.; PARTRIDGE, I. J.; PETERS, M.; SCHULTZE-KRAFT, R. 2005. Tropical forages. <http://www.tropicalforages.info>. Acesso 05.01.2015.

EDLEFSEN, J.L., COOK, C.W., BLAKE, J.T. 1960. Nutrient content of the diet as determined by hand plucked and esophageal fistula samples. **J. Anim. Sci.**, 19 (2):560-567.

ENNEKING, D. 1995. The toxicity of *Vicia* species and their utilization as grain legumes. Center for legumes in Mediterranean Agriculture. http://members.westnet.com.au/enneking/enneking_thesis.html. Acesso 05.01.2015.

FAO, 2010. Grassland Index. Um catálogo pesquisável de gramíneas e forrageiras/leguminosas. <http://www.fao.org/ag/AGP/AGPC/doc/CBASE/default.html>. Acesso 05.01.2015.

FAO, 2014. Grassland Index a searchable catalogue of grass and forage legumes. FAO, Rome, Italy. <http://www.fao.org/ag/AGP/AGPC/doc/GBASE/commonnames/commonsearch.html>. Acesso 05.01.2015.

FIGHERA, R A: Anemia in Veterinary Medicine. Santa Maria, Brazil: 125-126, 2001. (In Portuguese).

FIGHERA, R. A. **Dissertação de mestrado**: Doença granulomatosa sistêmica em bovinos no Rio Grande do Sul associada ao pastoreio de ervilhaca (*Vicia spp*). Santa Maria. UFSM, 2004. 118p.

FIGHERA, R. A.; BARROS, C. S. L. Systemic granulomatous disease in Brazilian cattle grazing pasture containing vetch (*Vicia spp*). **Veterinary and Human Toxicology**, v.46, n.2, p.62-66, 2004.

FIGHERA, R. A.; SOUZA T. M.; BARROS, C. S. L. Lesões de pele em bovinos com doença granulomatosa sistêmica associada ao pastoreio de ervilhaca (*Vicia spp*). **Ciência Rural**, v.35, n.2, p.406-411, 2005.

FRÖHNER, E; VÖLKER R: Lehrbuch der Toxikologie für Tierärzte, 6th Ed. Ferdinand Enke, Stuttgart, 272-273, 1950.

GAVA, A. Dados não publicados. Reprodução experimental da síndrome pruriginosa-pirético-hemorrágica com polpa cítrica (bagaço de laranja peletizado) em bovinos. [Arquivo pessoal]. 2003.

GAVA, A. et al. Síndrome pirético-hemorrágica-pruriginosa em bovinos, Lages, SC, 1996. In: ENCONTRO DE LABORATÓRIOS DE DIAGNÓSTICO VETERINÁRIO DO CONE SUL, 1., 1996, Campo Grande, MS. Anais...Campo Grande: UFMS, 1996. v.1, 310 p. p.129.

GAVA, A.; BARROS, C. S. L. Intoxicação por polpa cítrica. In: RIET-CORREA F.; SCHILD A. L.; MÉNDEZ M. C.; LEMOS R. A. A. **Doença de ruminantes e equídeos**. 3.ed. Santa Maria: Pallotti, 2007. p.90-94.

GAVA, A.; FURLAN, F.; TRAVERSO, S. D.; VERONEZI, L. O.; JONCK, F.; Vetch (*Vicia villosa*) Poisoning in Cattle in the State of Santa Catarina. In: FRANKLIN RIET-CORREA; JIM PFISTER; ANA LUCIA SCHILD AND TERRIE WIERENGA. (Org.). Poisoning by Plants, Mycotoxins and Related Toxins. Poisoning by Plants, Mycotoxins and Related Toxins. Oxfordshire UK: CAB Internacional, 2009, v. 01, p. 430-432.

GÖHL, B. 1982. Les aliments du bétail sous les tropiques. FAO, Division de Production et Santé Animale, Roma, Italy. http://www.fastonline.org/CD3WD_40/JF/414/05-222.pdf. Acesso 06.01.2015.

GREEN J. R. & KLEYNHANS J. E. Suspected vetch (*Vicia benghalensis* L) poisoning in a Friesland cow in the Republic of South Africa. **Journal of the South African Veterinary Association** 60(2):109-110., 1989.

GRIFFITHS, I. B; DONE, S. H. Citrinin as a possible cause of pruritis, pyrexia, haemorrhagic syndrome in cattle. **The Veterinary Record**, v.129, p.113-117, 1991.

GRÜNER, M.; HORVATÍĆ, M.; GACIC, M.; BANOVIC, M. Molar ratio of phytic acid and zinc during cereal flake production. et al., **Journal Science Food Agriculture**. 70(3):355-358,1996.

HANNAWAY, D. B., LARON, C. 2004. Hairy vetch (*Vicia villosa* Roth). Oregon State University. Species Selection Information System.
http://forages.oregonstate.edu/php/fact_sheet_print_legumephp/SpecID=41. Acesso 04.01.2015.

HARGIS, A. M.; GINN, P. E. The integument. In: Pathologic basis of veterinary disease, 4 ed., pp1107-1162, **Mosby Elsevier**, St Louis, 2007.

HARPER, P. A.; COOK, R. W.; GILL, P. A.; FRASER, G. C.; BADCOE, L. M.; & POWER, J. M. Vetch toxicosis in cattle grazing *Vicia villosa* ssp *dasycarpa* and *V. benghalensis*. **Australian Veterinary Journal**, n.70, v.4, p.140-4,1993.

IIZUKA, A., HARITANI M., SHIONO M., SATO M., FUKUDA O., HAGIWARA A., MYIAZAKI S., TANIMURA N., KIMURA K., NAKAZAWA K., KOBIAISHI M., TAKAWASHI T., SAITO T. & FUKAI K. An outbreak of systemic granulomatous disease in cows with high milk yields. **Journal Veterinary Medicine Science**, v.67, p.693-699, 2005.

JOHNSON, B.; MOORE, J.; WOODS, L. W.; GALEY, F. D. Systemic granulomatous disease in cattle in California associated with grazing hairy vetch (*Vicia villosa*). **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v.4, p.360-362, 1992.

KAMO, T.; HIRADES, S.; FUJII, Y. First isolation of natural cyanamide as a possible allelochemical from hairy vetch (*Vicia villosa*). **Journal of Chemical Ecology**, v.29, n.2, p.275-283, 2003.

KELLERMAN T S, COETZER J A W, NAUDÉ T W: Plant Poisonings and Mycotoxicosis of Livestock in Southern Africa. **Oxford University Press**, Cape Town: p.215-255, 1988.

KERR, L. A.; EDWARDS, W. C. Hairy vetch poisoning of cattle. **Veterinary Medicine Small Animal Clinician**. v.79, p.257-258, 1982.

LATTA, M.; ESKIN, M. A simple method for phytate determination. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 28, n. 6, p. 1313-1315, 1980.

MATTHEWS, J. G.; SHREEVE, B. J. Pyrexia/pruritus/haemorrhagic syndrome in dairy cows. **The Veterinary Record**, v.28, p.408, 1978.

- MIRALI, N.; EL-KHOURI, S.; RIZK, F. Genetic diversity and relationships in some *Vicia* species as determined by SDS-PAGE of seed proteins. **Biologia Plantarum**. 51(4): 660-666, 2007.
- MORAES, Y.J.B. de. **Forrageiras: conceitos, formação e manejo**. Guaiabá Agropecuária, 1995. p.130-131.
- MORRIS, J.; MCINNES, I. J. Pirexia with dermatitis in dairy cows. **The Veterinary Record**, v.22, p.368, 1978.
- NOMURA C. S.; OLIVEIRA P. V. Preparação de amostra de fígado bovino e estudo de micro homogeneidade para a determinação de Cd e Pb por espectrometria de absorção atômica com atomização eletrotérmica e amostragem direta de sólido. **Quim. Nova**, vol. 29, n. 2, p.234-239, 2006.
- ODRIOZOLA E.; PALOMA E.; LOPEZ T.; CAMPERO C. An outbreak of *Vicia villosa* (hairy vetch) poisoning in grazing Aberdeen Angus Bulls in Argentina. **Veterinary and Human Toxicology**, v.33, p.278-280, 1991.
- ONDA, K.; YAGISAWA, T.; MATSUI, T.; TANAKA, H.; YAKO, J.; UNE, Y.; WADA, Y. Contact dermatitis in dairy cattle caused by calcium cyanamide. **Veterinary Record**, v. 163, n.14, p.418-422, 2008.
- ORUC, H. H.; SENTURK, S.; KAHRAMAN, M.; CIRAK, V. Y.; AKDESIR, E. Suspected hairy vetch (*Vicia villosa*) poisoning with a concomitant babesiosis in dairy cows in Turkey. **Pakistan Veterinary Journal**, 32(3): 471-473, 2012.
- PANCIERA R. J. 1978, Hairy vetch (*Vicia villosa* Roth) poisoning in cattle. **In: Effects of poisonous plants on livestock**, ed. Keeler RF, Van Kamper KR, James LF, pp.555-563. Academic Press, New York, NY.
- PANCIERA, R. J.; JOHNSON, L.; OSBURN, B. I. A disease of cattle grazing hairy vetch pasture. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.148, p.804-808, 1966.
- PANCIERA, R. J.; MOSIER, D.A.; RITCHEY, J.W. Hairy vetch (*Vicia villosa* Roth) poisoning in cattle: update and experimental induction of disease. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v.4, p.318-325, 1992.
- PEDROSO, P. M. O.; PESCADOR, C. A.; OLIVEIRA, E. C. de; SONNE, L.; BANDARRA, P. M.; RAYMUNDO, D. L.; DRIEMEIER, D. Intoxicações naturais por plantas em ruminantes diagnosticadas no Setor de Patologia Veterinária da UFRGS no período de 1996-2005. **Acta scientiae veterinariae**. Porto Alegre, v. 35, n. 2, p. 213-218, 2007.
- PEET R. L.; GARDNER J. J. Poisoning of cattle by hairy or wooly-pod vetch, *Vicia villosa* subspecies *dasycarpa*. **Australian Veterinary Journal**. 63:381-382. 1986.
- PUPO, N. H. 1979. **Manual de Pastagens e Forrageiras**. Instituto Campineiro de Ensino Agrícola, Campinas, p.172-206.

RECH, R. R.; FIGHERA, R. A.; OLIVEIRA, F. N.; BARROS, C. S. L. Meningoencefalite granulomatosa em bovinos em pastoreio de ervilhaca (*Vicia* spp). **Pesquisa Veterinária Brasileira: Seropédica**. v.24, n.3, p.169-172, 2004.

REDDY, N. R.; PIERSON, M. D.; SATHE, S. K.; SALUNKHE, D. K. Phytates in cereals and legumes. Boca Raton: CRC Press, 152pp. 1989.

RIET-CORREA, F; SCHILD, A. L.; LEMOS, R. A. A.; BORGES, J.R. **Plantas e micotoxinas que afetam a pele e outros órgãos**. In: RIET-CORREA, F; SCHILD, A. L.; LEMOS, R. A. A.; BORGES, J.R. Doença de ruminantes e equídeos. 3.ed. Santa Maria: Pallotti, 2007. v.2., p.209-211, 2007.

RISSI, D. R.; RECH, R. R.; PIEREZAN, F.; GABRIEL, A. L.; TROST, M. E.; BRUM, J. S.; KOMMERS, G. D.; BARROS, C. S. L. Intoxicações por plantas e micotoxinas associadas a plantas e, bovinos no Rio Grande do Sul:246 casos. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.27, n.7, p.261-268, 2007.

SARE, 2008. Managing cover crops profitably (3rd Edition). SARE Outreach. In: Clark (Ed.), Diane Publishing, 2008. <http://www.sare.org/Learning-Center/Books/Managing-Cover-Crops-Profitably-3rd-Edition>. Acesso 04.01.2015.

SATTELL, R.; DICK, R.; LUNA, J.; MC GRATH, D.; PEACHEY, E. 1998. Common Vetch (*Vicia sativa* L.). In: Oregon cover crops. Oregon State University Extension Service, Corvallis. <http://extension.oregonstate.edu/catalog/html/em/em8695>. Acesso 05.01.2015.

SAUNDERS, G. K.; BLODGETT, D. J.; HUTCHINS, T. A.; PRATER, R. M.; ROBERTSON, J. L.; FRIDAY, P. A.; SCARRAT W. K. Suspected citrus pulp toxicosis in dairy cattle. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v.12, p.269-271, 2000.

SCHALM, O.W.; JAIN, N. C.; CARROLL, E. J. 1975. **Veterinary Hematology**. Lea & Febiger, Philadelphia. 1122 p.

SONNE, L., 2010. Intoxicações experimentais e naturais por *Vicia villosa* em coelhos e bovinos. Tese de Doutorado em Veterinária da Universidade Federal do Rio Grande do Sul - Brasil, 103 p.

SONNE, L.; RAYMUNDO, D. L.; ANTONIASSE, N. A. B.; BANDARRA, P. M.; ALMEIDA, P. R.; JÚNIOR, I. S. V.; DRIEMEIER, D. Mielite granulomatosa associada à síndrome hemorrágica devido ao consumo de *Vicia villosa* em um bovino. **Ciência Rural**, Santa Maria. v.40, n.8, p.1848-1851, 2010.

SONNE, L.; RAYMUNDO, D. L.; BOABAID, F. M.; WATANABE, T. T. N.; OLIVEIRA, L. G. S.; VAZ JR, I. S.; DRIEMEIER, D. Achados patológicos e imuno-histoquímicos em bovinos com doença granulomatosa sistêmica pelo consumo de *Vicia villosa* (Leg. Papilionoideae) no Rio Grande do Sul. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, n.31, v.4, p.307-312, 2011.

TENAGLIA, D, 2014. *Vicia villosa* Roth. Missouriplants.com, Photographs and descriptions of the flowering and non-flowering plants of Missouri, USA. http://www.missouriplants.com/Bluealt/Vicia_villosa_page.html. Acesso em 06.01.2015

TERRILL, T. H.; WHITEHEAD, W. F.; DURHAM, G.; HOVELAND, C. S.; SINGH, B. P.; GELAYE, S. Preference of grazing goats for cool-season annual clovers. **South Afr. J. Anim. Sci.**, 24 (Suppl 1): 92-94., 2004.

THOMAS G. W. Pyrexia with dermatitis in dairy cows. **The Veterinary Record**, v.22. p.368, 1978.

TOKARNIA, C. H.; PEIXOTO, P. V.; BARBOSA J. D.; BRITO M. de F.; DOBEREINER, J.; **Deficiências minerais em animais de produção**. Rio de Janeiro: Helianthus, 1ed. 2010, 97p.

TURNER, S. J.; KELLY, D. F.; SPACKMAN, D. Pyrexia with dermatitis in dairy cows. **The Veterinary Record**, v.102, p.488-489, 1978.

UC SAREP, 2006. Dados da cobertura vegetal. University of California, Sustainable Agriculture Research & Education Program, Davis. <http://www.sarep.ucdavis.edu>> Acesso 06.01.2015.

UNDERSANDER, D. J.; EHLKE, N. J.; KAMINSKI, A. R.; DOLL, J. D.; KELLING, K. A. 1990. Hairy vetch. In: Alternative Field Crop Manual, University of Wisconsin, Cooperative Extension. <https://www.hort.purdue.edu/newcrop/afcm/vetch.html>. Acesso 06.01.2015.

UNDERWOOD, E. J. Trace elements in human and animal nutrition. 4. ed. New York: Academic Press, 1977. 545p

WHYTE, R.O.; NILSON, G.; TRUMBLE, H.C. **Las leguminosas em La agricultura**. Rome, FAO, p.322, 1955.

WOODS L. W.; JOHNSON B.; HIETALA S. K.; GALEY F. D.; GILLEN D. Systemic granulomatous disease in a horse grazing pasture-containing vetch (*Vicia* sp.). **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v.4, p.356-360, 1992.

ANEXOS

ANEXO A

Tabela 1: Distribuição e intensidade das lesões granulomatosas observadas no exame histológico dos quatro bovinos necropsiados, intoxicados experimentalmente por *Vicia villosa* verde no cocho (bovino 2) por *Vicia villosa* consorciada com azevém (*Lolium multiflorum*), (bovinos, 3, 4 e 5).

ÓRGÃOS	BOVINO 2	BOVINO 3	BOVINO 4	BOVINO 5
Abomaso	+	+	+	+
Adrenais	-	++	NE	++
Baço	+	++	+	+
Bexiga	++	-	+	-
Coração	+	+++	+	+
Esôfago	-	+	-	-
Fígado	+	+++	+	+
Gânglio trigêmio	+	+	+	-
Glândula mamária	+	++	+	+
Glândula salivar	-	-	-	-
Globo ocular	NE ^b	++	NE	+
Hipófise	-	-	+	-
Intestino delgado	+	++	+	-
Intestino grosso	+	+	+	+
Linfonodos (mediastínicos, cervicais, mesentéricos, mamários, hepáticos, ilíacos internos, pré-crurais)	++	+++	+	++
Medula óssea	-	++	-	++
Músculo esquelético	+	++	NE	+
Omaso	+	+	+	+
Ovários	-	+	+	+
Pâncreas	-	++	-	+
Pele	+	+++	-	-
Pulmões	-	-	-	-
Retículo	+	+	+	+
Rins	+	+++	+	++
Rúmen	+	+	+	+
Sistema nervoso central	-	-	-	-
Medula espinhal	-	-	-	-
Tireoides	-	+++	-	-
Traqueia	-	+	-	+
Útero	+	++	+	+

^a+++ Lesão acentuada; ++ Moderada; + Leve; - Ausente.

^bNE: não examinado

ANEXO B

Tabela 2: Análise bromatológica das pastagens utilizadas na reprodução experimental da doença granulomatosa sistêmica em bovinos nos anos de 2010 a 2013, CAV/UDESC.

Composição Química* (%) em relação à Matéria Seca (MS)						
Grupo	Amostra	Matéria seca (%) ¹	Matéria Mineral (% na MS) ²	Proteína Bruta (% na MS) ³	Fibra Bruta (% na MS) ⁴	Gordura Bruta (% na MS) ⁵
Grupo 1	<i>Vicia villosa</i> ^a	93,7	7,5	25,1	30,0	1,60
Grupo 2	<i>Vicia villosa</i>	90,2	6,8	25,0	24,8	4,24
Grupo 3	<i>Vicia villosa</i> + <i>Vicia sativa</i> ^b	90,00	6,70	17,30	28,20	2,58
Grupo 4	<i>Vicia sativa</i>	90,2	6,8	25,0	24,8	2,15
Grupo 5	<i>Vicia villosa</i> + <i>Vicia sativa</i>	90,80	6,80	21,20	24,20	2,98
Grupo 6	<i>Vicia villosa</i>	92,60	7,20	17,50	29,80	2,67

*Valores de Referência (VR): ¹100%; ²2,85%; ³24,85%; ⁴26,13%; ⁵2,43% (MORAIS, 1995).

^bValores de Referência (VR): ¹87,9%; ²2,50%; ³23,00%; ⁴25,40%; ⁵2,43% (MORAIS, 1995).

ANEXO C

Tabela 3: Principais alterações verificadas no hemograma dos bovinos submetidos à experimentação com *Vicia villosa* no cocho, pastagens de *Vicia villosa* e azevém e pastagens consorciadas de *Vicia villosa* com *Vicia sativa* e azevém.

Grupo experimental	Bovino	Alteração no hematócrito	Período em experimentação	Observação
Grupo 1 (<i>Vicia villosa</i> no cocho, 2010)	Vaca 1	Leucocitose	3 semana até 3 semanas pós término (27.100 leucócitos/uL)	
		Neutrófilos segmentados	12ª semana (de 14.363 neutrófilos segmentados/uL).	
		Neutrófilos bastonetes	11ª semana de experimento até duas semanas após o término do experimento (198 neutrófilos bastonetes/uL)	
		Linfocitose	4ª semana (17.670 linfócitos/uL)	
		Monocitose	3ª semana e da 11ª semana do experimento até a 2ª semana após o término do experimento (1.826 monócitos/uL)	
		Eosinofilia	3ª e 8ª semana do experimento (2.490 e 2.700 eosinófilos/uL)	
	Vaca 2	Neutrófilos segmentados	4ª (4.522 neutrófilos segmentados/uL) e 7ª semanas (4.746 neutrófilos segmentados/uL) do experimento.	
		Neutrófilos bastonetes	11ª semana até a 1ª semana após o término do experimento (concentração máxima verificada foi de 198 neutrófilos bastonetes/uL na 11ª semana do experimento)	
		Eosinofilia	6ª (2.405 eosinófilos/uL), 7ª (2.938 eosinófilos/uL) e 8ª semanas (2.657 eosinófilos/uL) do experimento.	
Grupo 2 (<i>Vicia villosa</i> + azevém, pastejo, 2012)	Vaca 3	Hematócrito	Queda nos valores do na 7ª (23,9%, 45º dia) e na 8ª (21,80%, 50º dia da eutanásia) semana de experimento.	Anemia absoluta
		Plaquetas	Diminuídas na 7ª semana (80.000mm ³ , 43º dia)	
		Linfocitopenia	5ª semana (17%, 31º dia)	
		Leucocitose	5ª (13,740mm ³ , 31º dia) e na 8ª semana (19.100mm ³ , 50º dia).	
	Vaca 4	Nº de eritrócitos	Diminuição na 1ª (4,96 milhões/mm, 2º dia), na 2ª (4,23 milhões/mm, 14º dia) e na 5ª (4,92 milhões/mm, 31º dia) semanas após o término dos experimentos.	
		Neutrófilos segmentados	1ª (55%, 2º dia) e na décima (77%, 68º dia) semanas de experimentação.	
		Linfocitopenia	1ª até a 10ª semana (39%, 2º dia; 41%, 39º dia; e 40%, 68º dia)	
		Leucocitose	Moderada na 10ª semana (14.700 mm ³ , 68º dia) de experimentação.	
	Vaca 5	Nº de eritrócitos	6ª semana (39º dia) e na 11ª semana (4º dia após o término dos experimentos) (4,59 e 1,83 milhões/mm)	Anemia macrocítica hipocrômica
Hemoglobina		6ª semana (39º dia) e na 11ª semana (4º dia após o término dos experimentos) (7,30 e 3,40g/dL),		

		Hematócrito	6ª semana (39º dia) e na 11ª semana (4º dia após o término dos experimentos) (21,80 e 10,60%)	
		Leucocitose	4º dia após o término dos experimentos (16.309mm ³)	
		Neutrófilos segmentados	4º dia após o término dos experimentos (69%)	
	Vaca 6	Leucocitose	5ª (18.330mm ³ , 31º dia) até a 7ª semana após o final do período de experimentação (15.160mm ³)	
Grupo 3 (<i>Vicia villosa</i> + <i>Vicia sativa</i> + azevém, pastejo, 2012)	Vaca 7	Leucocitose	1ª (14.680 mm ³ , 1º dia) e na 6ª (14.100 mm ³ , 36º dia) semanas e quatro dias (13.090mm ³) após o término dos experimentos.	
	Vaca 8	Leucocitose	Durante todo o processo experimental, com valores de 24.900mm ³ e 19.600 mm ³ na 1ª (1º dia) e 6ª semanas (36º dia) de experimentos, respectivamente e 31.020 mm ³ , quatro dias após o término.	
		Linfocitose	6ª semana (36º dia) e quatro dias após, 80% e 84%, respectivamente.	
	Vaca 9	Leucocitose	17.600 e 15.090mm ³ no 1º dia e 4º dia após o término, respectivamente.	
		Plaquetas	Baixa (91.000mm ³ (1º dia), 42.000mm ³ (4º dia após) e 74.000mm ³ (52º dia após)).	
Vaca 10	Leucocitose	15.180 e 16.400mm ³ , 1º e 36º dias respectivamente.		
Grupo 4 (<i>Vicia sativa</i> + azevém, pastejo, 2013)	Vaca 11	Leucocitose	3ª (19º dia) e 4ª (28º dia) semanas, com 17.100mm ³ e 21.000mm ³ , respectivamente.	
	Vaca 12	Monocitose	Entre a 9ª (10%, 60º dia) e 10ª (8%, 70º dia) semanas.	
	Vaca 13	Monocitose	Entre 3ª semana (10%, 19º dia), na 4ª (9%, 28º dia), na 9ª (11%, 60º dia) e na 10ª semanas (9%, 70º dia) de experimento.	
	Vaca 14	Monocitose	Um dia antes de iniciar os experimentos (17%), na 3ª (10%, 19º dia), e na 9ª semanas (11%, 60º dia) de experimentação.	
Grupo 5 (<i>Vicia villosa</i> + <i>Vicia sativa</i> + azevém, pastejo, 2012)	Novilha 1	Leucocitose	6ª semana de experimentação (13.200mm ³ , 35º dia).	
	Novilha 2	Leucocitose	5ª semana (15.100mm ³ , 35º dia) e um dia após (15.170mm ³) o término dos experimentos.	
	Novilha 3	Leucocitose	Desde o início até o fim do período experimental (16.100mm ³ , de leucócitos na 5ª semana (35º dia)).	
	Novilha 4	Nº de eritrócitos	Queda na 8ª semana (56º dia), (2,83milhões/mm)	Anemia macrocítica hipocrômica.
		Hemoglobina	Queda na 8ª semana (56º dia), (4,60g/gL)	
		Hematócrito	Queda na 8ª semana (56º dia), (13,70%)	
Plaquetopenia		Queda na 8ª semana (56º dia), (50.000mm ³)		
	Leucopenia	Queda na 8ª semana (3.620mm ³)		
Grupo 6 (<i>Vicia villosa</i> + azevém, pastejo, 2013)	Novilha 5	HCM	Aumento 5ª semana de experimentação (52º dia) (23,08 pg)	
		Nº de eritrócitos	Queda 5ª semana de experimentação (52º dia) (4,55milhões/mm)	
		Monocitose	3ª semana de experimentação (10%, 15º dia)	
		VCM	Menores valores verificados no 23º dia, na 4ª semana (36,90pg) e no 41º dia, na 6ª semana (36,50 pg)	
		Nº de eritrócitos	Queda (4,29 milhões/mm, no 15º dia e 4,61 milhões/mm, no 52º dia).	

Novilha 6	Leucocitose	Durante todo o período experimental, com valores maiores verificados na 3ª (16.200mm ³ , 15º dia) e na 4ª (18.400mm ³ , 23º dia) semana.	
	Monocitose	Durante o período experimental com valores máximos na 6ª (11%, 41º dia), 9ª (10%, 52º dia) e 10ª (10%, um dia após o término) semanas.	
Novilha 7	Leucocitose	Final do período experimental, entre a 8ª (52º dia, 14.000mm ³) e a 10ª (1º pós-experimento, 14.400mm ³) semana.	
	Neutrófilos segmentados	Queda (12%, 41º dia, 6ª semana)	
	Monocitose	Entre a 6ª (41º dia) e 8ª (52º dia) semanas (9,0% e 10%, respectivamente) no dia seguinte ao término do processo experimental (12 e 83%, respectivamente).	
Novilha 8	HCM	Queda durante todo o período experimental, com os menores valores registrados na 3ª (11,75pg, 15º dia) e 4ª (11,82pg, 23º dia) semanas.	
	Plaquetograma	Aumento no número de plaquetas na 6ª semana (1.010.000mm ³ , 41º dia).	
	Leucocitose	3ª (14.000mm ³ , 15º dia) e 4ª (15.700mm ³ , 23º dia) semanas.	
	Monocitose	3ª (12%, 15º dia) e 8ª (9,0%, 52º dia) semanas de experimento.	

ANEXO D

Tabela 4: Resultado da dosagem sérica de Zn dos bovinos submetidos à experimentação com *Vicia villosa* no cocho, pastagens de *Vicia villosa* e azevém e pastagens consorciadas de *Vicia villosa* com *Vicia sativa* e azevém.

Grupo experimental	Bovino	Dias em experimentação/Valores em ppm*
Grupo 1	Vaca 1	Diminuição 5 ^a (2,8ppm, 26 ^o dia) e a 7 ^a (2,0ppm, 43 ^o dia) semanas de experimento.
	Vaca 2	Diminuição 10 ^a (3,1ppm, 64 ^o dia) e 11 ^a (2,4ppm, 71 ^o dia) semana de experimento.
Grupo 2	Vaca 3	Diminuição entre a 6 ^a (0,50ppm) e a 8 ^a (0,62ppm) semana de experimento.
	Vaca 5	Diminuição desde o início dos experimentos e durante toda a fase experimental (entre a 1 ^a e a 11 ^a semana). O menor valor foi de 0,60ppm e o maior foi de 0,70ppm.
	Vaca 6	Valores de Zn sérico baixos na 1 ^a (2 ^o dia; 0,57ppm) e na 6 ^a semana (39 ^o dia;0,50ppm) de experimentação.
Grupo 3	Vaca 10	Diminuição 0,60ppm e 0,65ppm na 1 ^a (1 ^o dia) e 6 ^a (36 ^o dia) semanas de experimentação, respectivamente.
Grupo 4	Vaca 11	Diminuição 4 ^a semana (0,60ppm, no 28 ^o dia), porém, na 9 ^a semana (1,20ppm, no 60 ^o dia).

* Valores de referência: 0,8 a 1,4 ppm.

AENXO E

Tabela 5: Resultado da determinação do ácido fítico em amostras de *Vicia villosa* fornecidas no cocho, em pastagens de *Vicia villosa* e azevém, em pastagens consorciadas de *Vicia villosa* e *Vicia sativa* e azevém e em pastagens de *Vicia sativa* e azevém utilizadas na reprodução experimental da doença granulomatosa sistêmica em bovinos nos anos de 2010 a 2013, CAV/UEDESC.

Determinação do Ácido Fítico ^{1,2}					
Grupo experimental	Procedência da Amostra	Data da Coleta	Fase de Crescimento	ppm (mg/kg no extrato)	Porcentagem (%)
Grupo 1 <i>V.villosa</i> / vacas/ cocho	Curitibanos, SC	22.12.10	Vegetativa com florescimento inicial	0,04	0,008
	Curitibanos, SC	24.11.10	Vegetativa sem inflorescência	0,15	0,030
	Localidade de Frei Rogério, SC	24.11.10	Vegetativa com florescimento	0,24	0,048
	Localidade de Frei Rogério, SC	24.11.10	Vegetativa com florescimento	0,31	0,062
	Piquetes LAPA, CAV/UEDESC, Lages, SC	30.12.10	Florescimento, início da formação dos legumes	0,12	0,024
Grupo 2 <i>V.villosa</i> /vacas/pastejo	2º ciclo, piquete 3, LAPA	26.09.12	Vegetativa	0,51	0,102
	2º ciclo, piquete 5, LAPA	02.10.12	Vegetativa sem florescimento	0,36	0,072
	2º ciclo, piquete 9, LAPA	12.10.12	Vegetativa com florescimento	0,51	0,102
	Sementes de <i>Vicia villosa</i> /Piquete patologia CAV	13.10.12	Sementes imaturas	0,40	0,080
Grupo 3 <i>V. villosa</i> / <i>V. sativa</i> /vacas/pastejo	1º Ciclo, Piquete 3, Bovinocultura de Leite, CAV, Lages	22.10.12	Vegetativa	0,61	0,122
	1º Ciclo, Piquete 7, Bovinocultura de Leite, CAV, Lages	06.11.12	Vegetativa sem inflorescência	0,41	0,055
	2º Ciclo, Piquete 3, Bovinocultura de Leite, CAV, Lages	24.11.12	Vegetativa com florescimento e início dos legumes	0,19	0,025
Grupo 4 <i>V. sativa</i> /vacas/pastejo	1º Ciclo, Piquete 7, Bovinocultura de Leite, CAV, Lages	16.10.13	Vegetativa	0,40	0,08
	1º Ciclo, Piquete 7, Bovinocultura de Leite, CAV, Lages	15.11.13	Vegetativa sem inflorescência	0,28	0,04
	2º Ciclo, Piquete 7, Bovinocultura de Leite, CAV, Lages	24.11.13	Vegetativa com florescimento	0,10	0,02
	2º Ciclo, Piquete 3, Bovinocultura	22.12.13	Vegetativa com florescimento e	1,42	0,28

	de Leite, CAV, Lages		início dos legumes		
Grupo 5 <i>V. villosa/V.</i> <i>sativa/novilhas/pastejo</i>	1º Ciclo, Piquete 3, Bovinocultura de Leite, CAV, Lages	16.10.12	Vegetativa	0,57	0,11
	1º Ciclo, Piquete 7, Bovinocultura de Leite, CAV, Lages	30.11.12	Vegetativa sem inflorescência	0,30	0,06
	2º Ciclo, Piquete 7, Bovinocultura de Leite, CAV, Lages	24.11.12	Vegetativa com florescimento e início dos legumes	0,15	0,03
Grupo 6 <i>V.</i> <i>villosa/novilhas/pastejo</i>	1º ciclo, piquete 3, LAPA	8.10.13	Vegetativa	0,29	0,058
	1º ciclo, piquete 10, LAPA	5.11.13	Vegetativa sem inflorescência	0,23	0,046
	1º ciclo, piquete 18, LAPA	24.11.13	Vegetativa com florescimento	0,43	0,086
	2º ciclo, piquete 3, LAPA	22.12.13	Vegetativa com florescimento	0,56	0,112

¹Concentrações normais abaixo de 10%, para grãos e sementes (MOREIRA et al., 2012).

²Concentrações normais: 0,4 a 6,4% nos cereais e legumes (LEHRFELD, 1989; SHAMSUDDIN, 1995).