LUCIANA CASTRO DA CUNHA

Estudo fitoquímico biomonitorado de *Amorimia rigida* (Malpighiaceae):

1. Purificação e caracterização do monofluoroacetato de sódio
2. Avaliação bioquímica dos efeitos tóxicos em ratos

São Paulo

2012

LUCIANA CASTRO DA CUNHA

Estudo fitoquímico biomonitorado de *Amorimia rigida* (Malpighiaceae):

1. Purificação e caracterização do monofluoroacetato de sódio

2. Avaliação bioquímica dos efeitos tóxicos em ratos

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental e Comparada da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências

Departamento:

Patologia

Área de Concentração:

Patologia Experimental e Comparada

Orientador:

Profª. Drª. Silvana Lima Górniak

São Paulo
2012

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virginie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

T.2617
FMVZ

Cunha, Luciana Castro da
Estudo fitoquímico biomonitorado de *Amorimia rigida* (Malpighiaceae): 1. Purificação e caracterização do monofluoroacetato de sódio. 2. Avaliação bioquímica dos efeitos tóxicos em ratos / Luciana Castro da Cunha. -- 2012.
95 p. : il.

Tese (Doutorado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Patologia, São Paulo, 2012.

Programa de Pós-Graduação: Patologia Experimental e Comparada.

Área de concentração: Patologia Experimental e Comparada.

Orientador: Profa. Dra. Silvana Lima Górniak.

1. Planta tóxica. 2. Composto 1080. 3. *Mascagnia rigida*. 4. Cromatografia. 5. Espectroscopia de infravermelho. I. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
Comissão Bioética

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Identificação do fluoroacetato de sódio: detecção em plantas causadoras de morte súbita e em material biológico. I - Estudos experimentais em ratos. II - Avaliação de amostras provenientes de animais com suspeita clínica da intoxicação", protocolado sob o nº1427/2008, utilizando 60 (sessenta) ratos, sob a responsabilidade da Profa. Dra. Silvana Lima Górniak, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da Comissão de Bioética da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado "ad referendum".

We certify that the Research "Identification of sodium fluoroacetate: detection in plants that cause sudden death and in biological material. I - Experimental studies in rats. II - Evaluation of samples originating from animals with clinical suspicion of intoxication", utilizing 60 (sixty) rats, protocol number 1427/2008, under the responsibility Profa. Dra. Silvana Lima Górniak, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by Bioethic Commission of the School of Veterinary Medicine and Animal Science of University of São Paulo and was approved "ad referendum" of the meeting.

São Paulo, 21 de agosto de 2008

Prof. Dr. José Luiz Bernardino Merusse
Presidente da Comissão de Bioética
FMVZ/USP

Av. Prof. Dr. Orlando Marques de Paiva, nº87
Cidade Univrsitária "Armando de Salles Oliveira"
São Paulo/SP – Brasil
05508-270

Fone/Fax: +55 11 3032-2224 / 3091-7757
+ 55 11 3091-7671/7676
E-mail: fmvz@usp.br
http://www.fmvz.usp.br

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: CUNHA, Luciana Castro da
Título: Estudo fitoquímico biomonitorado de *Amorimia rigida* (Malpighiaceae): 1. Purificação e caracterização do monofluoroacetato de sódio. 2. Avaliação bioquímica dos efeitos tóxicos em ratos

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental e Comparada da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências

Data: __/__/__

Banca Examinadora

Prof. Dr._____

Instituição:_____Julgamento:_____

Prof. Dr._____

Instituição:_____Julgamento:_____

Prof. Dr._____

Instituição:_____Julgamento:_____

Prof. Dr._____

Instituição:_____Julgamento:_____

Prof. Dr._____

Instituição:_____Julgamento:_____

"...Em tempos em que quase ninguém se olha nos olhos, em que a maioria das pessoas pouco se interessa pelo que não lhe diz respeito, só mesmo agradecendo àqueles que percebem nossas descrenças, indecisões, suspeitas, tudo o que nos paralisa, e gastam um pouco da sua energia conosco, insistindo."

Martha Medeiros

Aos meus pais, Joaquim e Sandra,
que por uma vida de dedicação, amor e
trabalho sempre possibilitaram a seus filhos a
oportunidade de realizar sonhos e conquistas.

Aos meus irmãos,Gabriela e Guilherme.
Aos meus queridos primos, Adriano e
Amanda.
Exemplos de dignidade, bondade e caráter.

AGRADECIMENTOS

À minha querida orientadora, Profa. Dra. Silvana Lima Górniak, pelos conhecimentos transmitidos, pela amizade, confiança, exemplo e principalmente pela paciência e inestimável apoio prestados durante a realização deste trabalho. Obrigada.

Agradeço especialmente à minha coorientadora Profa. Dra. Luciana Retz de Carvalho, do Instituto de Botânica de São Paulo, por ser um exemplo de competência, profissionalismo, compromisso, uma pessoa brilhante. Gostaria de ressaltar ainda, sua disposição em ajudar, dar boas idéias, discutir resultados, gráficos, dados, protocolos, artigos, etc... Obrigada também pela amizade e carinho. A você, minha admiração e respeito !!

Ao Prof. Dr. João H. G. Lago, da Universidade Federal de São Paulo, pela ajuda e apoio durante a fase de caracterização da substância, parte essencial deste trabalho.

Ao Departamento de Patologia (VPT), Laboratório de Farmacologia e Toxicologia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ) da Universidade de São Paulo (USP), local onde este trabalho foi desenvolvido.

A todos os professores do Departamento de Patologia (FMVZ/USP), pelo incentivo e auxílio e especialmente Jorge Camilo Florio, Luciano Freitas Felício, Lílian Rose Marques de Sá, Paulo César Maiorka, Helenice de Souza Spinosa e

Isis Machado Hueza pelas idéias, ensinamentos transmitidos e pelo auxílio quando necessário.

Ao Fernando Pípole, pela companhia constante e tão querida, sacrifício ilimitado em todos os sentidos, por alivar minhas horas difíceis, me alimentando de certezas, força e alegria. Fê, obrigada por toda ajuda e carinho e claro pelas risadas maravilhosas que demos durante todos esses anos. Que isto, não acabe jamais. Sua amizade é um presente em minha vida. Obrigada, meu grande amigo !!!

À Fabiana Elias, exemplo de fé, força e coragem. Obrigada, pela amizade sincera, pela confiança depositada em mim, por toda ajuda e carinho mesmo que de longe.e claro pelas risadas intermináveis.

À minha grande amiga Cynthia Bavinck, pela cumplicidade, por todo amor, carinho, confiança e por toda a sua compreensão principalmente na fase final deste estudo. Obrigada pelo amor e por compartilhar todos os momentos de alegria e tristeza comigo !!

À minha grande amiga Katia Domingues (Khelf), que nem mesmo a distância separou, estando sempre presente em minha vida. Obrigada por seu esforço para que eu alcance sucesso profissional, pelas risadas mais gostosas e pela amizade incondicional.

Às minhas grandes amigas Luciana Lippi e Camila Lima por dividir comigo momentos muito agradáveis regados de gargalhadas, risos, alegrias, indecisões, angústias, frustrações, etc, etc, etc... Nossa, são tantos sentimentos misturados e compratilhados que é melhor pararmos por aqui. E além de toda amizade

agradeço a ajuda sempre que necessária nos experimentos e discussões científicas. Não esqueçam jamais, "Tá tudo no meu nome"....kkkk.

Aos funcionários do biotério do VPT Cláudia, Idalina, Nelson, Rosiris, Luciana e Mauro pelos cuidados dispensados aos animais utilizados nos experimentos, por todo auxílio e ótima convivência.

Aos técnicos do laboratório de Farmacologia Aplicada e Toxicologia do VPT Nicole, Wagner e Heculano, pela paciência, auxílio nos experimentos e amizade.

Às secretárias do VPT, da pós-graduação da FMVZ, Adriana, Milena, Claúdia, Daura, Henrique, pelo auxílio sempre que preciso e principalmente a Cristina secretária da pós-graduação do VPT por toda disposição, muita paciência e também pela sua amizade.

À todas as funcionárias da biblioteca da FMVZ, pelo auxílio sempre que necessário.

Aos meus irmãos científicos: Andréia, Beatriz, Aline, Geanne (IBot), Maria Izabel, Marcos, Vânius e André que de diferentes formas contribuíram com a minha vida acadêmica.

A todos os colegas da pós-graduação do VPT: Alison, Andréa, Carolina, Daniel Cohn, Daniel Sanches, Denise, Eduardo, Glaucie, Mariana Sayuri, Milena, Rodrigo, Thaísa, Tereza, Thiago, Viviane e Wanderley. Um enorme BEIJO NO OMBRO !!!

E a todos aqueles que, apesar de não terem sido mencionados individualmente, contribuíram para a realização deste trabalho.

RESUMO

CUNHA, L. C. **Estudo fitoquímico biomonitorado de *Amorimia rigida* (Malpighiaceae):** 1. Purificação e caracterização do monofluoroacetato de sódio. 2. Avaliação bioquímica dos efeitos tóxicos em ratos. [Bioassay-guided phytochemical study of *Amorimia rigida* (Malpighiaceae): 1. Purification and characterization of sodium monofluoroacetate. 2. Biochemical analysis of the toxic effects in rats]. 2012. 95 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

A ocorrência de monofluoroacetato de sódio (MFA-Na) em plantas foi registrada, pela primeira vez, em *Dichapetalum cymosum.* Posteriormente, esta substância tóxica foi encontrada em outras espécies de plantas, como *Palicourea marcgravii*, causadora de "morte súbita". *Amorimia rigida,* que é bastante conhecida e frequente no Nordeste do Brasil, está entre as plantas tóxicas, que também causam "morte súbita" em bovinos, com quadro clínico semelhante ao decorrente da ingestão de plantas que contém fluoroacetato de sódio e ao apresentado por animais intoxicados experimentalmente com este tóxico. À *A. rigida* são imputadas significativas perdas econômicas, motivo pelo qual o objetivo do presente estudo foi identificar a substância tóxica nela presente e também estabelecer bioindicadores de efeito, quando da intoxicação por esta planta. No estudo por cromatografia em camada delgada de celulose - tendo como fase móvel solução de etanol/hidróxido de amônio/piridina/água (95:3:1:1, v/v/v/v) e como agente derivatizante o azul do Nilo - do extrato aquoso obtido da planta seca e moída, foi detectada a presença de MFA-Na. O fracionamento do extrato hidroalcoólico de *A. rigida* em coluna XAD-2 forneceu 4 frações: H_2O 100% (F1), H_2O:MeOH 80/20 (F2), H_2O:MeOH 40/60 (F3) e MeOH 100% (F4) das quais, como indicado pelo monitoramento por CCDC, apenas a fração F1 continha o MFA-Na. Essa fração foi submetida à cromatografia em camada delgada preparativa, para isolamento do princípio ativo o qual, em estudo por espectrometria de infravermelho e em comparação com padrão de MFA-Na, comprovou a presença de mistura de mono, di e trifluoroacetato nas folhas desta planta. No estudo bioquímico, animais intoxicados com o padrão de MFA-Na e com o extrato de *A. rigida* apresentaram alterações nos níveis séricos de cálcio e citrato,

sendo estas moléculas consideradas bioindicadoras de efeito a exposição ao MFA-Na.

Palavras-chave: Planta tóxica. Composto 1080. *Mascagnia rigida*. Cromatografia. Espectroscopia de infravermelho.

ABSTRACT

CUNHA, L. C. **Bioassay-guided phytochemical study of *Amorimia rigida* (Malpighiaceae):** 1. Purification and characterization of sodium monofluoroacetate. 2. Biochemical analysis of the toxic effects in rats. [Estudo fitoquímico biomonitorado de *Amorimia rigida* (Malpighiaceae): 1. Purificação e caracterização do monofluoroacetato de sódio 2. Avaliação bioquímica dos efeitos tóxicos em ratos]. 2012. 95 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

The first occurrence of sodium monofluoroacetate in plants was reported in *Dichapetalum cymosum*. Further, this toxic substance was found in other plant species, as *Palicourea marcgravii*, which causes "sudden death". *Amorimia rigida*, which is well known and frequent in northeastern Brazil, it is among the poisonous plants that have identical lethal effects in cattle to that caused by the ingestion of plants containing sodium fluoroacetate. These intoxication signs are the same that one's presented by experimentally poisoned animals with this toxic. Significant economic losses can be imputed to *A. rigida*, therefore our aim was to identify its toxic compound and also to establish its biomarkers of effect. The study by cellulose thin layer chromatography – using as mobile phase solution of ethanol /ammonium hydroxide/pyridine/water (95:3:1:1, v/v/v/v) and Nile blue as the derivatizing agent - of the aqueous extract of milled dried plant showed the presence of MFA-Na. The fractionation of the hydroalcoholic extract of *A. rigida* by XAD-2 column chromatography gave four fractions: 100% H_2O (F1), H_2O: MeOH 80/20 (F2) H_2O: MeOH 40/60 (F3) and 100% MeOH (F4); only F1 fraction contained MFA-Na, according to CCDC monitoring. This fraction was subjected to preparative thin layer chromatography, in order to isolate the toxic principle which, in a study by infrared spectroscopy and by comparison with standard MFA-Na, confirmed being a mixture of mono-, di and trifluoroacetate. In the biochemical study, animals intoxicated by MFA-Na and by *A. rigida* extract showed serum calcium/citrate imbalances; such alterations may be considered biomarkers of MFA-Na exposure effect.

Key words: Toxic plant. Sodium monofluoroacetate. *Mascagnia rigida*, chromatography. Infrared spectroscopy.

SUMÁRIO

1 **INTRODUÇÃO**. 16
1.1 SOBRE AS PLANTAS TÓXICAS 17
1.2 SOBRE A TOXICIDADE DO MONOFLUORACETATO DE SÓDIO 22
2 **OBJETIVOS** 25
2.1 OBJETIVOS GERAIS 26
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS 26
3 **MATERIAL E MÉTODOS** 27
3.1 LABORATÓRIOS ONDE SE DESENVOLVEU O ESTUDO 28
3.2 ANIMAIS 28
3.3 MATERIAL VEGETAL 29
3.4 REAGENTES E EQUIPAMENTOS 29
3.5 PROCEDIMENTOS CROMATOGRÁFICOS EXPERIMENTAIS EMPREGADOS NESTE ESTUDO 31
3.5.1 **Coluna cromatográfica** 32
3.5.2 **Cromatografia em camada delgada** 32
3.5.2.1 Cromatografia em camada delgada comparativa (CCDC), usada para detectar ou caracterizar substâncias, segundo sua classe química 32
3.5.2.2 Cromatografia em camada delgada preparativa (CCDP) 36
3.6 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL PARA CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL EMPREGADO NESTE ESTUDO 37
3.6.1 **Espectroscopia de infravermelho** 37
3.7 PROCEDIMENTOS: PARTE I: ESTUDO QUÍMICO 39
3.7.1 **Avaliação da influência de diferentes tratamentos sobre a atividade dos extratos aquoso e hidroalcoólico de *A. rigida* – Um estudo bioguiado** 39
3.7.1.1 Preparo do extrato aquoso 39
3.7.1.2 Avaliação da estabilidade da substância ativa do extrato por influência de mudanças de pH e de diferentes métodos de secagem 39
3.7.1.3 Avaliação da estabilidade da substância ativa em extrato hidroalcoólico 40
3.7.1.3.1 Preparo do extrato hidroalcoólico 40
3.7.2 **Escolha da técnica cromatográfica para a pré-purificação do extrato hidroalcoólico de *A. rigida* – Monitoramento da presença do princípio ativo por CCDC** 41
3.7.2.1 Tratamento da coluna Oasis 41
3.7.3 **Pré-purificação do extrato hidroalcoólico por cromatografia em coluna, na fase polimérica XAD-2** 42
3.7.3.1 Tratamento da coluna XAD-2 43
3.7.4 **Isolamento do princípio tóxico por Cromatografia em Camada Delgada Preparativa** 44
3.7.5 **Caracterização estrutural do princípio tóxico de *A. rigida*** 44
3.7.5.1 Espectroscopia de Infravermelho 44
3.8 PROCEDIMENTOS: PARTE II: ESTUDO BIOLÓGICO 45
3.8.1 **Administração dos extratos obtidos e do padrão de monofluoroacetato de sódio** 45

3.8.2 **Princípio da utilização do *Rota Rod*** 46
3.8.3 **Coleta de amostra de sangue** 47
3.8.4 **Dosagem bioquímica** 47
3.8.5 **Análise estatística** 47
4 **DELINEAMENTO EXPERIMENTAL E RESULTADOS** 48
4.1 ESTUDO QUÍMICO 49
4.1.1 **Experimento 1: Avaliação da influência de diferentes tratamentos sobre a atividade dos extratos aquoso e hidroalcoólico de *A. rigida* – Um estudo bioguiado** 49
4.1.1.1 Resultados 49
4.1.2 **Experimento 2: Escolha da técnica cromatográfica para a pré-purificação do extrato hidroalcoólico de *A. rigida* – Monitoramento da presença do princípio ativo por CCDC** 51
4.1.2.1 Resultados 51
4.1.3 **Experimento 3: Pré-purificação do extrato hidroalcoólico por cromatografia em coluna, na fase polimérica XAD-2**. 52
4.1.3.1 Resultados 52
4.1.4 **Experimento 4: Isolamento do princípio tóxico por Cromatografia em Camada Delgada Preparativa** 54
4.1.4.1 Resultados 54
4.1.5 **Experimento 5: Caracterização estrutural do princípio tóxico de *A. rigida,* por espectroscopia de infravermelho** 56
4.1.5.1 Resultados 56
4.2 ESTUDO BIOLÓGICO 60
4.2.1 **Experimento 6: Comparação entre os efeitos causados pela administração de monofluoroacetato de sódio e do extrato de *A. rigida*, em ratos. Avaliação bioquímica** 60
4.2.1.1 Resultados 60
5 **DISCUSSÃO** 64
5.1 ESTUDO QUÍMICO 65
5.2 ESTUDO BIOLÓGICO 72
6 **CONCLUSÕES** 77
REFERÊNCIAS 79
APÊNDICE 91

Introdução

1 INTRODUÇÃO

1.1 SOBRE AS PLANTAS TÓXICAS

Segundo Steyn (1934), em seu livro intitulado "*The toxicology of plants in South africa together with a consideration of poisonous foodstuffs and fungi*", denominam-se plantas tóxicas todo o vegetal que, introduzido no organismo dos homens ou de animais domésticos, em condições naturais, é capaz de causar danos que se refletem na saúde e vitalidade desses seres. Estes vegetais ocasionam um desequilíbrio que se traduz no paciente como sintomas de intoxicação.

Vários são os países, principalmente aqueles grandes produtores e exportadores de alimentos, como Estados Unidos, Austrália, Nova Zelândia, Argentina e Brasil, nos quais as plantas tóxicas comprometem significantemente a criação animal, podendo produzir grandes perdas econômicas. Estes prejuízos podem advir tanto devido a perdas diretas, como morte, alterações reprodutivas (como abortos e teratogênese), queda no ganho de peso e de produção, entre outros efeitos. As perdas econômicas podem ocorrer também de maneira indireta, e estas incluem, entre outras, os custos de controlar as plantas tóxicas nas pastagens, as medidas de manejo para evitar as intoxicações como a utilização de cercas e pastoreio alternativo, a redução do valor da forragem devido ao atraso na sua utilização, a redução do valor da terra, a compra de bovinos que substituam os animais mortos, os gastos associados ao diagnóstico das intoxicações e o tratamento dos animais afetados (JAMES, 1994).

A descrição sobre o problema de plantas tóxicas no nosso país data dos primórdios da colonização, sendo descritos inúmeros casos de mortalidade dos animais já na introdução das primeiras cabeças de gado. Neste sentido, o senhor de engenho Gabriel Soares de Souza, em 1587, no seu "Tratado descritivo do Brasil", já afirmava que o Brasil possuía grandes fontes de recursos na sua rica flora, fauna e solo, mas também que o gado morria em consequência à ingestão de ervas (HOEHNE, 1939).

As perdas econômicas causadas pelas intoxicações por plantas são complexas de ser estimadas porque não existem dados confiáveis sobre todos

esses componentes; no entanto, pode-se supor que a mortalidade por vegetais tóxicos em animais de produção no Brasil produza um impacto de milhões de dólares anuais. Neste sentido, sabe-se que a intoxicação por plantas está entre as três causas mais comuns de mortes de bovinos adultos no nosso país (RIET-CORREA; MEDEIROS, 2001; RIET-CORREA et al., 2007). Deve-se ressaltar que na região Norte, as plantas tóxicas são a principal *causa mortis* desses animais, sendo responsáveis por mais óbitos, quando comparadas a raiva e ao botulismo (ROSSETTI; CORSI, 2009).

No Brasil, as plantas denominadas como aquelas que causam "morte súbita" são consideradas as mais importantes no que diz respeito aos prejuízos econômicos (TOKARNIA et al., 2000). Neste sentido, Tokarnia et al. (1990) consideram que as plantas pertencentes a este grupo são responsáveis por, aproximadamente, 60% de todas as perdas causadas por plantas tóxicas no país. As plantas que compõem este grupo apresentam, como característica comum, produzir, no animal intoxicado, alterações que se traduzem, de maneira geral, por instabilidade, tremores musculares, relutância para realizar movimentos, dificuldade respiratória, taquicardia, normalmente se deita ou cai ao solo em decúbito lateral, movimentos de pedalagem, convulsão e morte (TOKARNIA et al., 2000).

No mundo, já foram catalogadas cerca de 60 espécies de plantas causadoras de "morte súbita", sendo que estas estão distribuídas principalmente nas regiões tropicais, subtropicais e temperadas, como Austrália, África do Sul e América do Sul (TWIGG; KING, 1991; TWIGG et al., 1996a, b).

No Brasil, até o momento foram identificadas 12 espécies de plantas que causam esta síndrome, a saber: *Palicourea marcgravii* (PACHECO; CARNEIRO, 1932; DÖBEREINER; TOKARNIA, 1959), *P. grandiflora* (TOKARNIA et al., 1981), *P. juruana* (TOKARNIA; DÖBEREINER, 1982) e *P. aeneofusca* (TOKARNIA et al., 1983) da família Rubiaceae; *Arrabidaea japurensis* (TOKARNIA e DÖBEREINER, 1981), *A. bilabiata* (DÖBEREINER et al., 1983) e *Pseudocalymma elegans* (MELLO; FERNANDES, 1941; TOKARNIA et al., 1969) da família Bignoniaceae; *Mascagnia rigida* (TOKARNIA et al., 1961), *M. aff. rigida* (TOKARNIA et al., 1985), *M. pubiflora* (FERNANDES; MACRUZ, 1964), *M. elegans* (COUCEIRO et al., 1976) e *Mascagnia sp* (GAVA et al., 1997) da família Malpighiaceae.

Alguns gêneros, por meio de estudos filogenéticos, foram divididos em outros, como é o caso do gênero *Mascagnia*, o qual foi dividido em *Mascagnia* e *Amorimia*.

Desta forma, seguindo-se a atual classificação, *Mascagnia rigida* (A. Juss.) Griseb é catalogada como *Amorimia rigida* (A. Juss.) W.R. Anderson (ANDERSON, 2006; DAVIS; ANDERSON, 2010).

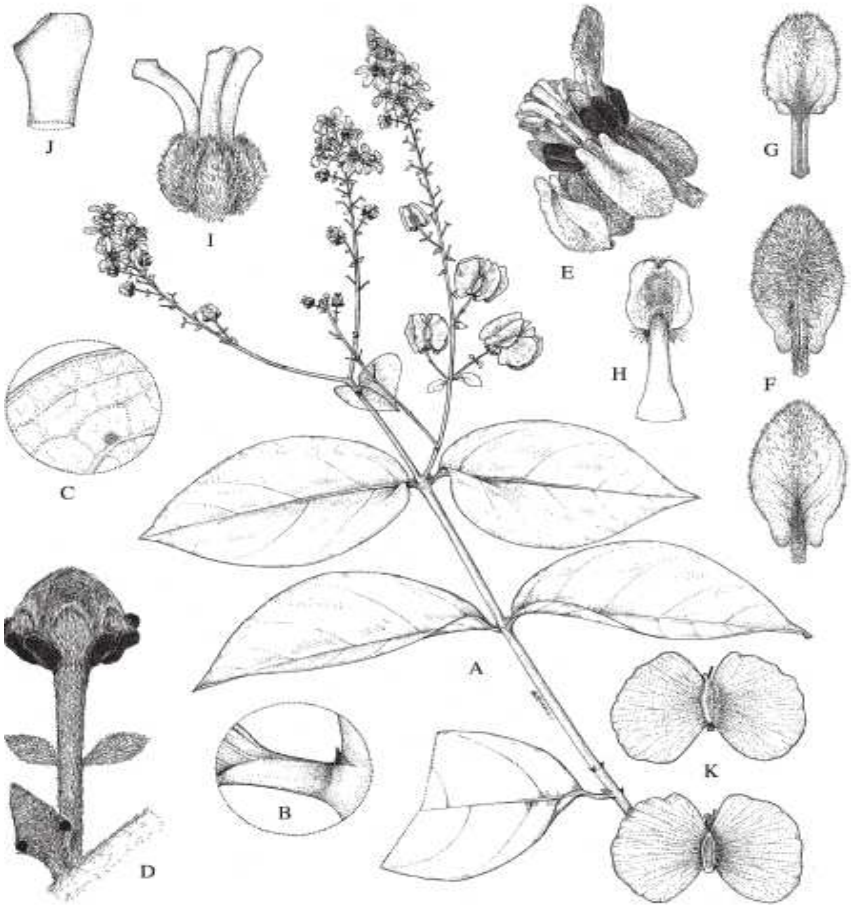
Dentre as plantas tóxicas que causam morte súbita no Brasil, a *Palicourea marcgravii*, é a planta tóxica mais importante, causando um número elevado de perdas de bovinos em quase todo o país; neste sentido, calcula-se que cerca de 50% de morte de bovinos adultos no Brasil, seja decorrente da intoxicação por esta planta (GÓRNIAK; SPINOSA, 1990). Os principais motivos pelos quais é considerada a principal planta tóxica estão relacionados a três fatores: apresenta ampla distribuição geográfica (HELAYEL et al., 2011); já que esta planta é encontrada em todo o país, com exceção da Região Sul e do Estado de Mato Grosso do Sul. Além disto, possui alta toxicidade, portanto, uma pequena quantidade de planta já promove a intoxicação e a morte do animal. Ainda, deve-se considerar que a *P.marcgravii* apresenta alta palatabilidade para bovinos; deste modo, ao contrário do que ocorre com outras plantas tóxicas que, de maneira geral, apresentam baixa palatabilidade, os animais consomem a *P.marcgravii* mesmo quando há forrageira abundante disponível. (TOKARNIA et al., 2000).

A *P. marcgravii*, tem como princípio ativo tóxico o monofluoracetato de sódio (MFA-Na) – Oliveira (1963), o qual tem sido isolado de diversas plantas tóxicas em outras partes do mundo, como na África do Sul, onde foi detectado este mesmo princípio ativo na *Dichapetalum cymosum* (MARAIS, 1944) e na Austrália, onde estudos químicos também revelaram a presença desta substância nas plantas *Acacia georginae, Oxylobium parviflarum e Gastrolobium grandiflorum* (APLIN et al., 1983).

No nosso país, o MFA-Na foi detectado, além da *P. marcgravii*, também na *Arrabidaea bilabiata* (KREBS et al., 1994), a qual é encontrada abundantemente em muitas áreas da Bacia Amazônica, mas ocorre somente nas partes baixas que se inundam durante o período de “cheia”, isto é, nas margens do rio Amazonas (TOKARNIA et al., 2000). Por outro lado, embora todas as outras plantas pertencentes ao grupo daquelas que causam morte súbita promovam sintomatologia de intoxicação idêntica àquelas descritas para a *P.marcgravii* e a *A.bilabiata*, até o momento, inexistem estudos que comprovem ser ou não o MFA-Na o princípio ativo tóxico.

Dentre estas plantas que ainda não tem seu(s) princípios(s) ativo(s) tóxico(s) identificado(s), destaca-se a *A.rigida.* Esta planta desenvolve-se nos lugares mais frescos como um cipó ou arbusto escandente com folhas elípticas, opostas e flores pequenas amarelas. Fruto do tipo sâmara, com quatro asas membranosas (VON MARTIUS, 1858) - Figura 1.

Figura 1 - *Amorimia rigida* (A. Jussieu in A. St.-Hilaire) W. R. Anderson



Legenda - A) ramo com flores e frutos imaturos; B) Pecíolo e estípula; C) Superfície abaxial da lâmina mostrando glândula; D) Botão de flor; E) Flor, vista lateral, pétala superior posterior; F) Pétala lateral, vista abaxial (acima) e vista adaxial (abaixo); G) Pétala posterior, vista adaxial; H) Estame, vista abaxial; I) Gineceu; J) Ápice, do gineceu; K) Sâmara, vista abaxial (acima) e vista adaxial (abaixo).Escala barras equilvalentes: A, 4 cm; B–D, 4 mm; E, 5.7 mm; F & G, 4 mm; H & I, 2 mm; J, 0.7 mm; K, 2 cm. A–J, Anderson 13691 (MICH); K, Noblick 3876 (MICH). Fonte: Novon: A Journal for Botanical Nomenclature, 16(2):168-204. 2006

Desde 1961, tem sido descritas intoxicações, responsabilizadas pelo consumo da *A.rigida*, em diferentes espécies animais, como bovinos, caprinos e suínos, tanto na região nordeste, como na sudeste do Brasil. Assim, esta planta, também conhecida vulgarmente como “tingui”, foi primeiramente descrita como causadora de intoxicações em diferentes municípios dos estados do Pará e Ceará (TOKARNIA et al., 1961) e, posteriormente, no norte do estado do Espírito Santo (TOKARNIA et al., 1985), nordeste de Minas Gerais (TOKARNIA et al., 2000), no Rio Grande do Norte (PACÍFICO da SILVA et al., 2008) e em várias regiões do estado da Paraíba (MEDEIROS et al., 2002; VASCONCELOS et al., 2008a, b).

Bovinos acometidos pela intoxicação por *A. rigida* apresentam alterações idênticas àquelas descritas para os animais intoxicados pela *P.marcgravi*, entretanto, ao contrário do que ocorre com esta última, os bovinos que não são obrigados a realizar movimentos podem vir a se recuperar. De fato, esta aparente dessemelhança na capacidade de recuperação dos animais, intoxicados por uma ou outra planta, deve-se às possíveis diferenças entre as concentrações de princípios ativos presentes nas plantas.

De fato, é amplamente conhecido que a concentração de metabólitos secundários nas diferentes espécies vegetais varia de acordo com vários fatores inerentes à própria planta (ALVES; PAVANI, 1991). Desta maneira, pode haver variações consideráveis de quantidade de um determinado princípio ativo, mesmo considerando-se um mesmo gênero, um exemplo é a *Manihot esculenta*, denominada vulgarmente de “mandioca brava” que apresenta elevados níveis de glicosídeo cianogênico, a linamarina o que pode levar à intoxicação e morte se não devidamente processada, enquanto que na *Manihot utilíssima*, conhecida como “mandioca mansa”, a concentração de cianeto é bem baixo, permitindo o uso como alimento, inclusive pelo ser humano (JONES, 1998).

Em relação às lesões produzidas pela *A.rigida* os estudos de histopatologia revelam que o tecido renal apresenta frequentemente degeneração hidrópico-vacuolar dos túbulos contornados distais o que também é relatado para a *P.marcgravii* (DÖBEREINER; TOKARNIA, 1959; TOKARNIA; DÖBEREINER, 1986), bem como para outras plantas que causam morte súbita (TOKARNIA et al., 1990).

1.2 SOBRE A TOXICIDADE DO MONOFLUORACETATO DE SÓDIO

O MFA-Na, também chamado de fluoroacetato ou ácido fluoroacético**,** foi sintetizado pela primeira vez por Swarts, em Gent (Bélgica), no ano de 1896. Entretanto, somente na década de 1920, seu efeito nocivo a insetos foi identificado, quando foi patenteado como agente antitraça. Foi introduzido pela primeira vez nos Estados Unidos, na década de 1940, durante a II Guerra Mundial, com o intuito de proteger o exército contra o ataque de roedores, sendo amplamente utilizado como potente rodenticida no controle da população de vertebrados selvagens. Recebeu também a denominação de composto 1080 para representar seu número de série em laboratório (KALMBACH, 1945; TWIGG; KING, 1991).

O MFA-Na é uma substância hidrossolúvel, inodora e insípida, podendo ser adicionada a qualquer tipo de isca e, por isso, tem grande vantagem em relação aos outros rodenticidas (OSWEILER et al., 1985; MINNAAR et al., 2000).

Por ser uma substância de difícil detecção química, alta toxicidade para roedores, ser humano e outros mamíferos, o que proporcionaria ser a causa de várias intoxicações acidentais, aliado ao fato de inexistir tratamento eficiente para os casos dessas intoxicações, o MFA-Na passou a ter seu uso proibido em diversos países (HARRIS, 1975; COLLICCHIO, 2006). Naqueles com uso restrito, como nos Estados Unidos, Austrália e Nova Zelândia, essa substância está relacionada principalmente ao controle de predadores domésticos, tais como, coelhos, raposas, cães selvagens e gatos selvagens, pois esses animais causam perda na produção agrícola e danos ao meio ambiente por meio da remoção da vegetação nativa e/ou predando animais nativos (PALERMO-NETO; MORAES-MOREAU, 1995; O'HAGAN, 2004; AUSTRÁLIA, 2008). Embora no nosso país seja proibida a produção, importação e comercialização dos ácidos fluoroacéticos, conforme decisão publicada na Portaria n° 326, de novembro de 2005, do Ministério da Saúde (BRASIL, 2005) faz-se de forma ilegal, sendo vários os relatos de uso do MFA-Na principalmente como rodenticida (GÓRNIAK, 2008)

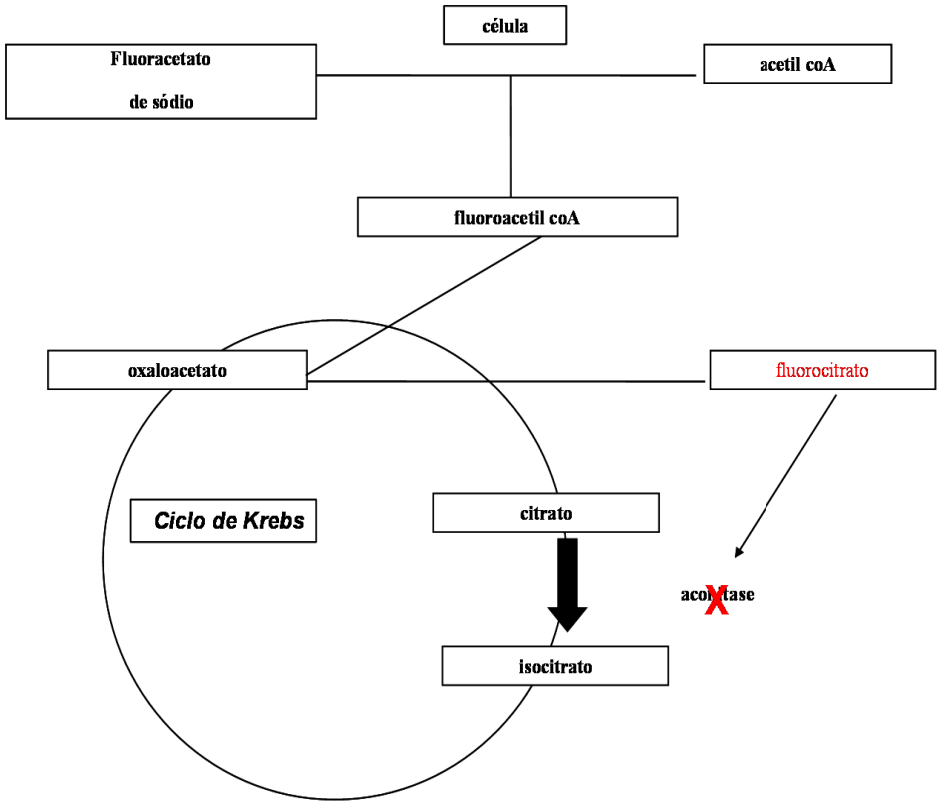
O mecanismo de ação do MFA-Na já é bem conhecido; este composto é biotransformado em fluorocitrato no interior das mitocôndrias, bloqueando a ação da enzima aconitase, interrompendo, assim, o ciclo de Krebs e a produção de ATP, o que acarreta em acúmulo de citrato e de lactato e queda do pH sanguíneo no

organismo intoxicado (PETERS, 1963) - figura 2. Assim, esta interrupção, resulta em um acentuado efeito tóxico sobre o funcionamento do coração e do sistema nervoso central (SNC).

A predominância de efeitos cardíacos ou neurológicos depende da espécie animal afetada; assim, em bovinos o coração é o órgão mais afetado (TOKARNIA et al., 2002), enquanto em cães o principal é o sistema nervoso central (GOH et al., 2005).

Adicionalmente há hipocalcemia, uma vez que o citrato, em concentrações elevadas no organismo, exerce um efeito quelante sobre o cálcio (OMARA, SISODIA, 1990; EASON, 2002; COLLICCHIO-ZUANAZE et al., 2006). Outras enzimas secundariamente afetadas são piruvato desidrogenase, piruvato quinase, succinato desidrogenase (MEHLMAN, 1967), fosfofrutoquinase (GODOY; CARMEN, 1974) e citrato ATPase (ROKITA; WALSH, 1983).

Figura 2 - Ciclo de Krebs e o bloqueio deste pelo fluorocitrato de sódio



As alterações histopatológicas dos animais intoxicados pelo MFA-Na não contribuem para o diagnóstico, sendo encontrada, a exemplo dos animais intoxicados por *P. marcgravii* e *A. rigida*, em alguns casos, a degeneração hidrópico-vacuolar nas células dos túbulos distais contornados do rim (GÓRNIAK, 2008).

Assim, levando-se em consideração que os animais intoxicados por *A. rigida* apresentam, basicamente, os mesmos sinais clínicos descritos em animais intoxicados por MFA-Na, bem como, já referido anteriormente, em animais intoxicados por plantas como a *P.marcgravii* e *A.bilabiata*, as quais sabidamente encerram tal princípio ativo tóxico em sua composição, e ainda apoiando-se nos dados obtidos em estudos anteriores, realizados em nosso laboratório, empregando-se cromatografia em camada delgada (CCD), os quais revelaram resultados positivos quando o extrato bruto de *A. rigida* foi comparado com o padrão de MFA-Na, foi objetivo principal do presente estudo confirmar a identidade do princípio tóxico de *A. rigida* por meio de técnicas de isolamento e caracterização química deste composto.

Objetivos

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

- Realizar o estudo químico da *Amorimia rigida* (A. Jussieu in A. St.-Hilaire) W. R. Anderson, visando o isolamento e caracterização estrutural de seu princípio tóxico.
- Avaliar os parâmetros bioquímicos de ratos intoxicados com o extrato aquoso de *A. rigida* e com o padrão de monofluoroacetato de sódio.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a influência de diferentes tratamentos sobre a atividade dos extratos aquoso e hidroalcoólico de *A. rigida;*
- Avaliar a estabilidade da substância ativa em diferentes extratos;
- Selecionar a técnica cromatográfica adequada para o procedimento de pré-purificação do extrato de *A. rigida;*
- Realizar a pré-purificação do extrato de *A. rigida*;
- Isolar o princípio tóxico de *A. rigida,* por meio de Cromatografia em Camada Delgada Preparativa.
- Caracterizar a estrutura do princípio tóxico de *A. rigida*, por Espectroscopia de Infravermelho.

Material e métodos

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 LABORATÓRIOS ONDE SE DESENVOLVEU O ESTUDO

O presente trabalho foi desenvolvido nos seguintes laboratórios: Laboratório de Farmacologia e Toxicologia Aplicada, Campus de São Paulo e Centro de Pesquisa em Toxicologia Veterinária (CEPTOX) Campus de Pirassununga, ambos pertencentes ao Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (FMVZ/USP); Laboratório de Química do Núcleo de Pesquisa em Ficologia do Instituto de Botânica de São Paulo (IBot) e Departamento de Ciências Exatas e da Terra, do Instituto de Ciências Ambientais, Químicas e Farmacêuticas da Universidade Federal de São Paulo, Campus de Diadema (UNIFESP).

3.2 ANIMAIS

Foram utilizados ratos *Wistar*, machos, com aproximadamente 60 dias de idade, pesando entre 270 a 320g, provenientes do Biotério do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ–USP). Os animais permaneceram durante todo o experimento em caixas plásticas medindo 30 x 38 x 16 cm, forradas com maravalha esterilizada, as quais foram mantidas em sala com aeração, exaustão, temperatura (22°C ± 2°C) e umidade (45% - 65%) controladas, em um ciclo claro/escuro de 12 h; água e ração foram fornecidos *ad libitum*. Antes de cada experimento, os animais foram mantidos em jejum alimentar por 8 horas. Todos os procedimentos realizados neste estudo estão de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da Comissão de Bioética da FMVZ-USP e estão protocolados sob o nº 1427/2008.

3.3 MATERIAL VEGETAL

Folhas de *A. rigida* foram coletadas em Cabeceiras, Município do estado da Paraíba. Uma exsicata foi autenticada por Clarice Ricardo de Macedo Pessoa e depositada no Herbário do Centro de Saúde e Tecnologia Rural-CSTR da Universiade Federal de Campina Grande - Paraíba, sob o número (HCSTR – 1294).

3.4 REAGENTES E EQUIPAMENTOS

- Acetato de etila PA-ACS,ISO, Reag. Ph Eur (Merck®);
- Acetona PA-ACS (Merck®);
- Álcool etílico PA-ACS (Merck®);
- Álcool metílico PA-ACS (Merck®);
- Fluoroacetato de sódio (99,7% - Pestanal®);
- Hidróxido de sódio PA (Merck®);
- Azul do Nilo PA-ACS (Sigma-Aldrich®);
- "Kits" comerciais para dosagem bioquímica: glicose, uréia, creatinina e cálcio (Biocli$^{n®}$) e citrato (Abnov$^{a®}$);
- Hidróxido de amônio PA-ACS (Synth®);
- Piridina PA-ACS (Merck®);
- Resina adsorvente Amberlite XAD-2
- Trietanolamina PA-ACS (Merck®);
- Aplicador automático (CAMAG® Linomat 5)
- Autoanalisador Bioquímico (Celm® SBA-200);
- Balões volumétricos, bastões de vidro (Pirex®)
- Bomba de vácuo (Millipore®)
- Centrífuga refrigerada (Sanyo-Harrier 18/80®)
- Espectrofotômetro, Perkin-Elmer®, modelo 1750
- Freezer -20°C (Reubly®)
- Kitassato e funil de Buchner (Pirex®)

- Liofilizador (Thermo®, E-C MODULYO);
- Moinho (Marconi® MA 048);
- Nebulizador (Pirex®)
- Papel cromatográfico (Whatman® nº 1);
- Placas de celulose microcristalina 20 x 20 cm (Merck®);
- Rota Rod (Insight®);
- Rotaevaporador (Fisaton®);
- Sistema de purificação de água (Milipore®);
- *SpeedVac*, (Savant®)
- Tubos plásticos, volume de 2 mL (*Ependorff* ®)
- Ultrasson (Unique® UltraSonic Cleaner – USC-2800)

3.5 PROCEDIMENTOS CROMATOGRÁFICOS EXPERIMENTAIS EMPREGADOS NESTE ESTUDO

Cromatografia é o conjunto de técnicas utilizadas para separação de um analito (substância tóxica), a partir de uma matriz (extrato de planta).

Para a realização de uma separação cromatográfica são necessários: fase estacionária, fase móvel e suporte. É possível usar diferentes suportes, os quais designarão os diferentes tipos de cromatografia como: cromatografia planar ou em camada delgada (placa ou papel), em coluna e em capilar (COLLINS et al., 2006).

A fase estacionária, que é constituída por um sólido ou um líquido depositado sobre um sólido inerte, é o elemento que, tendo em conta propriedades físicas e químicas dos solutos da amostra, promove a separação entre eles. Assim, na cromatografia de adsorção, as separações ocorrem devido a interações electrostáticas e forças de Van Der Waals entre a fase estacionária (sólido) e os analitos, retardando ou promovendo a sua eluição. A cromatografia de partição é baseada nas diferenças de solubilidade dos analitos na fase estacionária (líquido) e na fase móvel (líquido). A cromatografia de troca iônica consiste na troca entre os íons da amostra em solução e os íons de mesmo sinal, localizados na fase estacionária. A cromatografia de exclusão molecular separa os componentes da amostra segundo o tamanho efetivo das moléculas e na cromatografia de afinidade ocorre uma ligação molecular específica e reversível entre o analito e um ligante, imobilizado na fase estacionária (COLLINS et al., 2006).

Assim, a fase estacionária pode ser constituída por sílica, sílica modificada, celulose, resinas de troca iônica, polímeros, alumina, entre outras.

A fase móvel pode ser um único solvente líquido misturas de vários solventes ou mesmo um gás.

Para observar os resultados do processo de separação, é necessário o emprego de detectores, que podem ser reagentes químicos (agentes derivatizantes) ou equipamentos capazes de emitir radiação ultravioleta, fluorescência, espalhamento de luz ou ainda espectrômetros de massas ou de ressonância magnética nuclear.

3.5.1 Coluna cromatográfica

A cromatografia em coluna pode ser feita à pressão ambiente (coluna aberta), sob pressão (cromatografia líquida de alta eficiência) ou ainda a vácuo (cromatografia *flash*).

As colunas são tubos de vidro abertos em uma das extremidades e dotados de torneira na outra extremidade e são preparadas preenchendo-se parte delas com a fase estacionária escolhida, misturada ou não à fase móvel. Após "equilibrar" a coluna com a fase móvel, a amostra é aplicada no topo da fase estacionária e a coluna é eluída com a fase móvel previamente selecionada. O material eluído é coletado em frações e submetido à derivatização, para detecção da substância de interesse. As colunas sob pressão ou a vácuo seguem o mesmo princípio (COLLINS et al., 2006).

Em nosso estudo, foi utilizada uma coluna de vidro com 30 cm de altura e 2,5 cm de diâmetro, empacotada por via seca com fase estacionária polimérica Amberlite XAD-2, previamente lavada em aparelho de *Soxlet*, com acetona, conforme indicado pelo fabricante.

A fase estacionária foi condicionada com metanol (MeOH), seguido de H_2O e sobre ela foi aplicada a amostra, sendo eluída com a seguinte série de solventes: H_2O 100%; H_2O:MeOH 80/20, H_2O:MeOH 40/60 e MeOH 100%. Cada um dos solventes foi coletado separadamente, concentrado, submetido à Cromatografia em Camada Delgada de Celulose e posterior derivatização.

3.5.2 Cromatografia em camada delgada

3.5.2.1 Cromatografia em camada delgada comparativa (CCDC), usada para detectar ou caracterizar substâncias, segundo sua classe química.

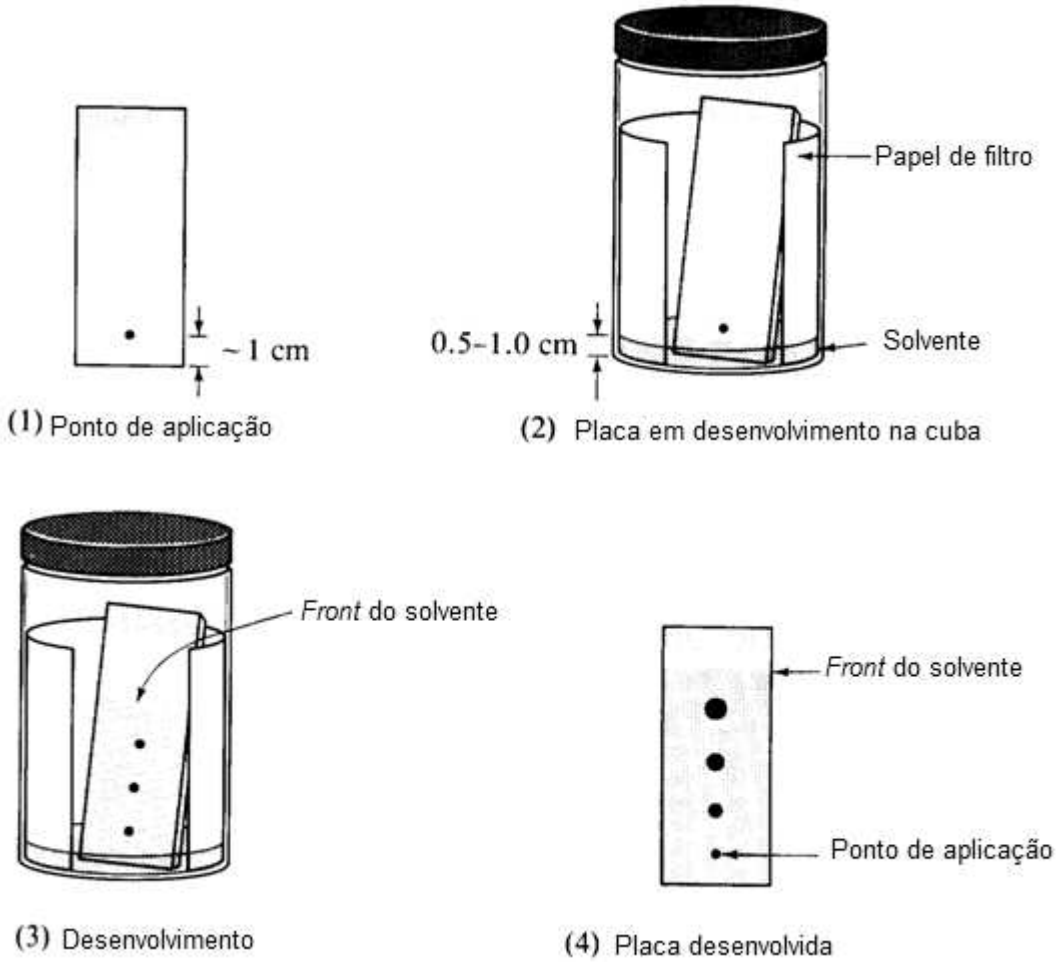
Na cromatografia em camada delgada comparativa (CCDC), a fase estacionária é espalhada, de maneira uniforme e com espessura determinada, sobre

uma placa que pode ser de vidro, celulose ou alumínio. A fase estacionária pode ser de sílica (fase normal), sílica modificada (fase reversa), sílica de alto desempenho, celulose microcristalina, entre outras. As placas recobertas por celulose sucederam ao papel cromatográfico, folhas de papel de qualidade especial.

Para a execução do estudo cromatográfico, as amostras são aplicadas a 1 cm da base inferior da placa recoberta com fase estacionária previamente escolhida, com auxílio de um capilar ou aplicador automático. Após a aplicação, a placa é colocada em cuba de vidro contendo a fase móvel adequada e com atmosfera saturada pelos vapores do solvente. Esse equilíbrio é conseguido cobrindo-se as faces laterais e do fundo da cuba com papel de filtro, colocando-se a fase móvel e tampando-se hermeticamente (BAUER et al., 1991; COLLINS et al., 2006).

A fase móvel ascenderá por capilaridade e o cromatograma deverá ser retirado da cuba quando a linha do solvente estiver próxima (de 1 a 2 cm) da borda superior da placa, sem, contudo atingi-la; esta linha é denominada "*front*". A placa deverá ser seca em corrente de ar ou de nitrogênio e a seguir derivatizada, ou seja, nebulizada com o(s) reagente(s) químico(s) específico(s) para caracterizar os analitos distribuídos pela fase estacionária (Figura 3).

Figura 3 - Representação da cromatografia em camada delgada



Fonte: Adaptado de http://dc97.4shared.com/doc/Tn4ojH-r/preview.html

Em cromatogramas desenvolvidos em condições idênticas, com amostras contendo o mesmo analito, este analito deverá atingir a mesma altura, em cada repetição, pois esta é determinada pela interação do conjunto de propriedades físico-químicas deste analito e da fase estacionária. Com base nesta observação, foi definido o fator de retenção (R_f) que é característico e constante para cada substância, como a razão entre a distância percorrida pela substância em questão e a distância percorrida pela fase móvel (BAUER et al., 1991) - figura 4 e fórmula.

Figura 4 - Esquematização de um cromatograma obtido por CCD

Fonte: Química nova na escola - Cromatografia n° 7, maio 1998

$$R_f = \frac{\text{distância do composto à linha de origem}}{\text{distância da frente de solvente à linha de origem}}$$

Pelos mesmos motivos é possível, nos processos cromatográficos, caracterizar substâncias, por comparação com seu padrão.

Em nosso estudo, foram empregadas placas de cromatofolhas de alumínio, revestidas com celulose microcristalina (Merck®) 20x20 cm, espessura de 0,1 mm, sem ativação, sendo as amostras aplicadas manualmente (com capilar) ou com auxílio do aplicador CAMAG® Linomat 5, a 1 cm da base, juntamente com o padrão MFA-Na (99,7% - Pestanal®). A fase móvel empregada foi etanol/hidróxido de amônio/piridina/água (95:3:1:1,v/v/v/v).

Os cromatogramas foram desenvolvidos até a altura de 10 cm (*front*), foram secos em corrente de ar e nebulizados com o derivatizante azul do Nilo, preparado

segundo o protocolo[1]; as manchas resultantes da derivatização tiveram seus R_fs determinados.

3.5.2.2 Cromatografia em camada delgada preparativa (CCDP)

A cromatografia em camada delgada preparativa (CCDP) difere da comparativa, apenas pelo emprego de fases estacionárias de maior espessura, o que permite a aplicação de maior quantidade da amostra, possibilitando que, por extração da fase estacionária com solventes adequados, seja possível obter o analito isolado e purificado.

Todos os procedimentos relativos ao preparo das placas cromatográficas são idênticos, exceto pela quantidade de amostra, que é aplicada em forma de faixa estreita, sobre a linha de origem do cromatograma. Após o desenvolvimento e secagem da placa, sem derivatizá-la, marca-se o R_f da substância que se deseja isolar e raspa-se a fase estacionária, à qual está aderida a substância de interesse. Esta fase estacionária é submetida à extração com solvente adequado, que será concentrado, obtendo-se, assim, o analito purificado (BAUER et al., 1991).

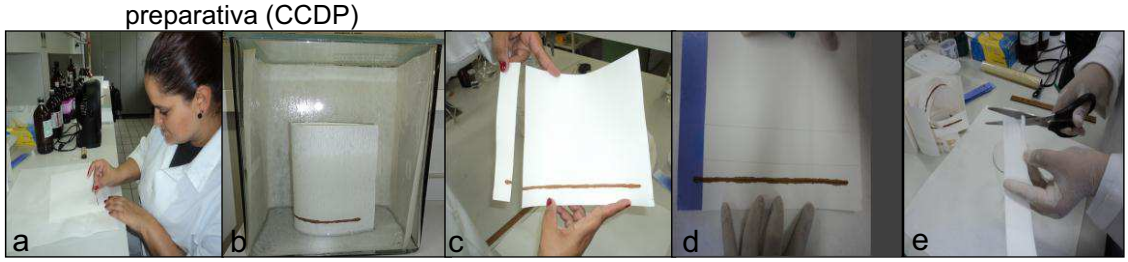
Em caso de a fase estacionária ser constituída por papel, a faixa correspondente ao R_f da substância em análise será recortada, picotada e submetida à extração com solvente adequado; o extrato obtido será concentrado e analisado.

No presente estudo, para a realização da CCDP, foram utilizados papéis cromatográficos (20x20 cm; Whatman nº 1). Em todos os outros detalhes, o processo empregado foi idêntico ao utilizado nos estudos por cromatografia em camada delgada comparativa, até a secagem da placa. De cada placa, retirou-se, com auxílio de tesoura, uma estreita faixa longitudinal, que foi derivatizada com Azul do Nilo, para comprovação da exata posição da faixa contendo a substância de interesse.

[1] O protocolo para o preparo do derivatizante azul do Nilo é seguido da seguinte maneira: dissolver 20 mg de azul do Nilo em 5 mL de etanol; acrescentar trietanolamina até que a solução desenvolva coloração púrpura e acrescentar mais 5 mL de etanol.

Após essa comprovação, a faixa contendo a substância em questão foi cortada do cromatograma, repicada e extraída, com assistência de ultrassom (Unique® UltraSonic Cleaner – USC-2800A, 100 W, 5 min) com água deionizada ; o extrato foi filtrado, congelado e liofilizado, a seguir (Figura 5).

Figura 5 - Ilustração de procedimentos para a realização da cromatografia em camada delgada preparativa (CCDP)



Legenda: a) aplicação da amostra na placa; b) placa em desenvolvimento dentro de uma cuba previamente saturada contendo fase móvel; c) após desenvolvimento é retirada uma tira da lateral da placa e revelado; d) a tira retirada é colocada novamente ao lado do restante da placa para a marcação da faixa onde se encontra a substância de interesse; e) a faixa de interesse é recortada para posterior extração.

3.6 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL PARA CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL EMPREGADO NESTE ESTUDO

3.6.1 Espectroscopia de infravermelho

Esta técnica pode ser utilizada para identificar uma substância ou investigar a composição de uma amostra. Quase todas as substâncias que tenham ligações covalentes, sejam orgânicos ou inorgânicos, absorvem várias frequências de radiação eletromagnética na região do infravermelho do espectro eletromagnético. Essa região envolve comprimentos de onda maiores do que aqueles associados à luz visível, que vão de aproximadamente 400 a 800 nm (1 nm = 10^{-9} m), mas menores do que aqueles associados a micro-ondas, que são maiores que 1 mm. A região vibracional do infravermelho inclui radiação com comprimentos de ondas (λ) entre 2,5 μm e 25 μm (1 μm = 10^{-6} m) (BARBOSA, 2007) - Figura 6.

Figura 6 – Ilustração do espectro eletromagnético

Fonte: Adaptado de http://pt.wikipedia.org/wiki/Ficheiro:EM_Spectrum_Properties_edit.svg

Um dos usos mais importantes do espectro infravermelho é fornecer informações sobre o tipo de ligações presentes em uma molécula. As absorções de cada tipo de ligação (N-H, C-H, O-H, C-X, C=O, C-O, C-C, C=C, C≡C, C≡N, entre outros) são, em geral, encontradas apenas em certas pequenas regiões do infravermelho vibracional. Uma pequena faixa de absorção pode ser definida para cada tipo de ligação. (BARBOSA, 2007).

Para o presente estudo, os espectros de absorção na região do infravermelho foram obtidos no espectrofotômetro da Perkin-Elmer®, modelo 1750 equipado com divisor de feixe de KBr e detector de sulfato de triglicina deuterada (DTGS). Os espectros foram registrados no intervalo 400 – 4000 cm^{-1}, que corresponde à região de transmitância.

Os espectros foram registrados ajustando-se os vários parâmetros do instrumento que são interdependentes, tais como: largura das fendas, velocidade de varredura, constante de tempo, ganho e tensão da fotomultiplicadora, num compromisso que corresponde à melhor utilização do aparelho.

3.7 PROCEDIMENTOS: PARTE I: ESTUDO QUÍMICO

3.7.1 Avaliação da influência de diferentes tratamentos sobre a atividade dos extratos aquoso e hidroalcoólico de *A. rigida* – Um estudo bioguiado.

3.7.1.1 Preparo do extrato aquoso

Folhas de *A. rigida* secas, foram trituradas em um moinho (Marconi® MA 048) e pesadas (200g), em seguida, foram submetidas à extração a 90ºC, com água deionizada (500 mL), por uma hora. O procedimento de extração foi repetido por cinco vezes, empregando-se, no total, 2.500 mL.

Os extratos obtidos foram combinados e filtrados em funil de Buchner, sob pressão reduzida, alcançando o volume final de 1.640 mL e apresentando pH neutro.

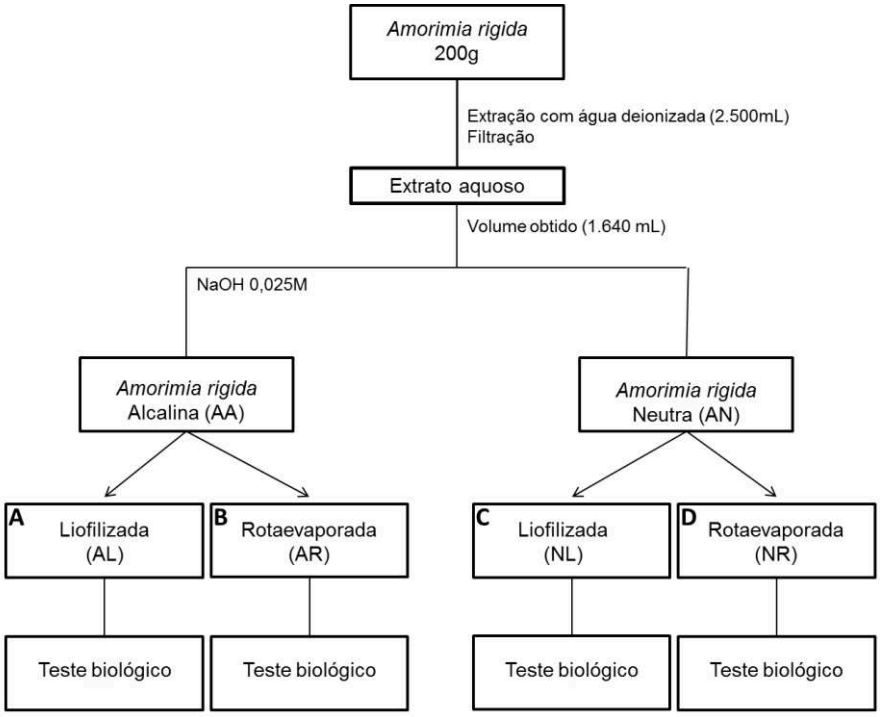
3.7.1.2. Avaliação da estabilidade da substância ativa do extrato por influência de mudanças de pH e de diferentes métodos de secagem

O extrato aquoso (1.640 mL) foi dividido em duas partes iguais (820 mL) sendo uma parte alcalinizada (denominada amostra alcalinizada - AA) com solução de hidróxido de sódio (NaOH 0,025M) - pH 11 e a outra parte, mantida neutra (denominada amostra neutra -AN), com pH 7. A porção alcalinizada (AA) foi novamente dividida em duas partes iguais (410 mL), uma delas concentrada sob pressão reduzida, em rotaevaporador (Fisatom®) a 40^0C, até consistência pastosa (AR) (denominada amostra alcalinizada rotoevaporada) e a outra porção (AL), congelada em balão e liofilizada (denominada amostra alcalizada liofilizada).

A porção neutra foi submetida a este mesmo processo, dando origem a duas outras porções: NR (denominada amostra neutra rotoevaporada) e NL (denominada amostra neutra liofilizada) (Figura 7).

Cada uma das amostras obtidas (AL, AR, NL e NR) foi submetida a ensaio biológico.

Figura 7 – Esquema da avaliação do extrato aquoso da *A. rigida* sob influência de diferentes tratamentos



3.7.1.3 Avaliação da estabilidade da substância ativa em extrato hidroalcoólico

3.7.1.3.1 Preparo do extrato hidroalcoólico

As folhas secas de *A. rigida*, foram trituradas em um moinho (Marconi® MA 048), pesadas (843g) e maceradas a frio, em solução hidroalcoólica 70% (v/v), por sete dias. O resíduo sólido foi separado da solução hidroalcoólica por filtração em funil de Buchner, sob pressão reduzida e submetido a processo idêntico (maceração) por outras quatro vezes. Os filtrados foram reunidos e concentrados sob pressão reduzida, em rotoevaporador, a 40^0C, até consistência pastosa. Este concentrado foi congelado e liofilizado, fornecendo 185g de material em forma de

pó. Este extrato (denominado extrato hidroalcoólico - EH) foi submetido a ensaio biológico, juntamente com as amostras AL, AR, NL e NR.

3.7.2 Escolha da técnica cromatográfica para a pré-purificação do extrato hidroalcoólico de *A. rigida* – Monitoramento da presença do princípio ativo por CCDC.

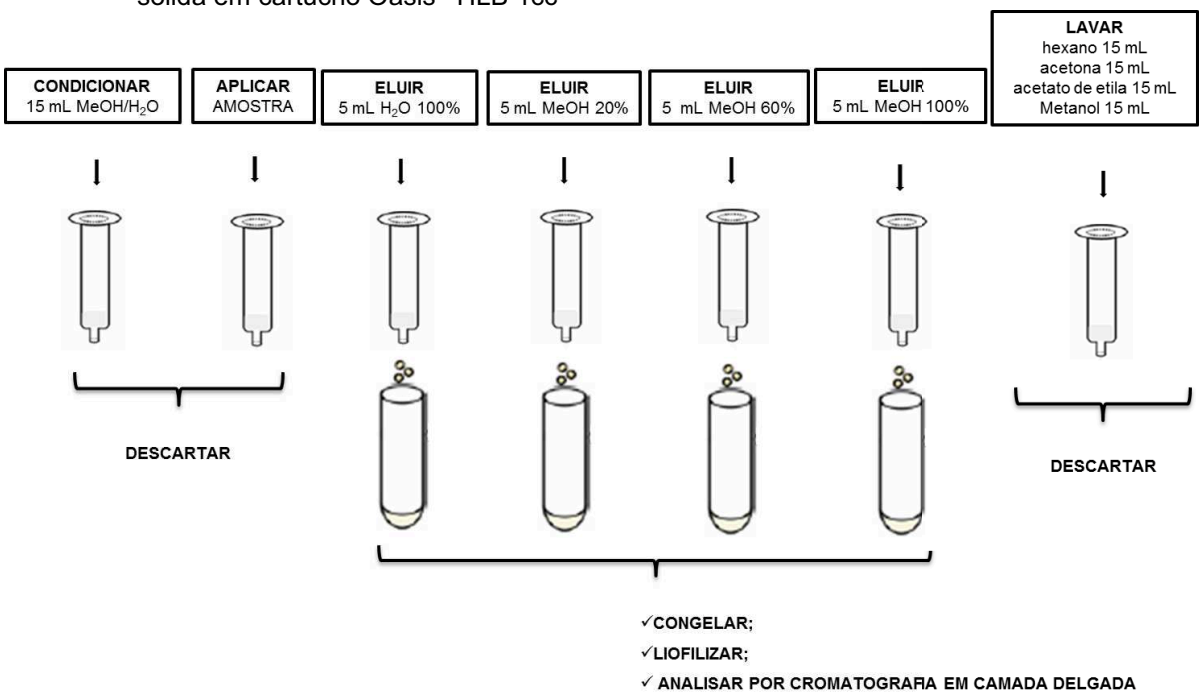
O material liofilizado adquirido na seção *3.7.1.3.1* (360 mg) foi dividido em 36 amostras de 10 mg que, separadamente, foram ressuspensas em água deionizada, filtradas sob pressão reduzida e aplicadas a cartucho previamente condicionado de fase reversa polimérica Oasis® HLB 1cc (Waters). O cartucho foi eluído com a sequência de solventes constituída por: H_2O 100% (f_1), H_2O:MeOH 80/20 (f_2), H_2O:MeOH 40/60 (f_3) e MeOH 100% (f_4), que foram coletados individualmente; em cada repetição, foram empregados 5 ml de cada um dos solventes.

As frações eluídas com solventes iguais foram reunidas: a fração aquosa resultante foi congelada e liofilizada e as contendo metanol foram secas em concentrador a vácuo (*SpeedVac*®, Savant); as amostras secas foram mantidas a – 20^0C. Cada uma das frações eluídas (f_1,f_2,f_3 e f_4) foi submetida a CCDC, para a detecção do princípio ativo.

3.7.2.1 Tratamento da coluna Oasis

A coluna foi condicionada, segundo as indicações do fabricante, com 7,5 mL de MeOH seguidos de 7,5 mL de H_2O. Após cada procedimento, também seguindo o protocolo do fabricante, a coluna era submetida à limpeza com alíquotas de 15 mL de cada um dos seguintes solventes: hexano, acetona, acetato de etila e metanol, empregados nesta ordem, como ilustrado na figura 8.

Figura 8 - Esquema ilustrativo do procedimento de fracionamento do extrato por extração em fase sólida em cartucho Oasis® HLB 1cc



3.7.3 Pré-purificação do extrato hidroalcoólico por cromatografia em coluna, na fase polimérica XAD-2

Uma amostra do extrato obtido (seção *3.7.1.3.1*) foi ressuspensa em água deionizada e filtrado a vácuo, em Celite (terra de diatomáceas) sendo o filtrado congelado e liofilizado (13,5 g), para posterior fracionamento em coluna. Este liofilizado foi dividido em 9 amostras de 1,5 g que, separadamente, foram ressuspensas em água deionizada e aplicadas à coluna de fase polimérica Amberlite XAD-2. As colunas foram eluídas com a sequência de solventes constituída por: H_2O 100% (F1), H_2O:MeOH 80/20 (F2), H_2O:MeOH 40/60 (F3) e MeOH 100% (F4), que foram coletados individualmente; em cada repetição, foram empregados 200 ml de cada um dos solventes.

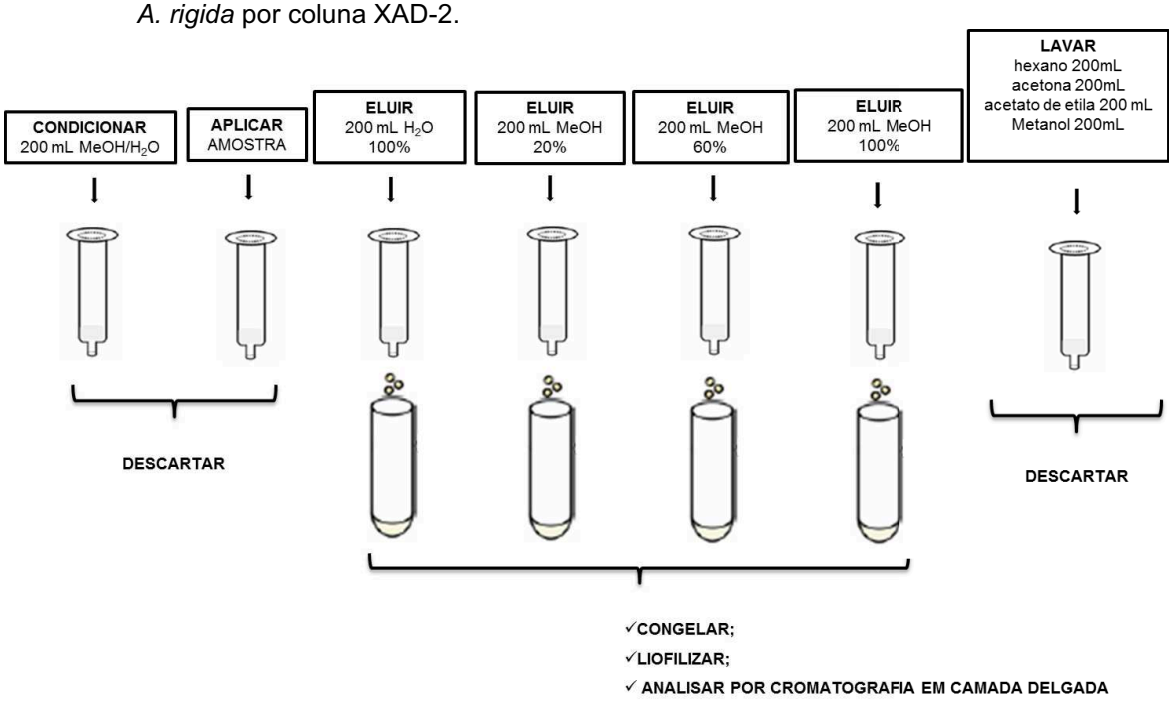
As frações eluídas com solventes iguais foram reunidas; a fração aquosa resultante foi congelada e liofilizada e as contendo metanol foram secas em concentrador a vácuo (*SpeedVac*®, Savant); as amostras secas foram mantidas a

– 20^0C, até o momento da análise. por CCDC, empregando-se como agente derivatizante azul do Nilo e como padrão, o MFA-Na.

3.7.3.1 Tratamento da coluna XAD-2

A coluna foi condicionada, segundo as indicações do fabricante, com 200 mL de MeOH seguidos de 200 mL de H_2O. Após cada procedimento, também seguindo o protocolo estabelecido por Pietrzyk (1989), a coluna era submetida à limpeza com alíquotas de 200 mL de cada um dos seguintes solventes: hexano, acetona, acetato de etila e metanol, empregados nesta ordem, como ilustrado na figura 9.

Figura 9 - Esquema ilustrativo do procedimento de fracionamento do extrato hidroalcoólico de *A. rigida* por coluna XAD-2.



3.7.4 Isolamento do princípio tóxico por Cromatografia em Camada Delgada Preparativa

A fração aquosa (F1) obtida na seção 3.7.1 liofilizada (2 g), foi dividida em 15 porções de aproximadamente a 135 mg, que, separadamente, foram ressuspensas em água deionizada e aplicadas manualmente, com auxílio de capilar, a papel cromatográfico (20 x 20 cm, Whatman nº 1) sendo cada um dos cromatogramas desenvolvido e seco como descrito na seção 3.5.2.2.

Para localizar exatamente, em cada cromatograma, a faixa que continha o princípio tóxico, uma tira estreita (cerca de 1 cm) foi recortada longitudinalmente e derivatizada com azul do Nilo. Após a derivatização, esta tira foi justaposta ao cromatograma, na exata posição que ocupava anteriormente, para servir de guia, na marcação da faixa de interesse (Figura 5).

Após a demarcação da faixa contendo o princípio ativo, esta foi recortada, picada e submetida à extração, com água deionizada, assistida por ultrassom (5x, 100 W, 10 min.). Os extratos combinados foram filtrados em membrana filtrante de fibra de vidro (Millipore® Sigma-Aldrich – AP2504700) e centrifugados para a retirada de resíduos, congelados, liofilizados e pesados (231 mg).

Do material seco (231 mg), foi retirada uma amostra, que foi submetida à CCDC, juntamente com o padrão MFA-Na e o extrato aquoso de *P. marcgravii*, nas condições descritas anteriormente (seção 3.5.2.1).

3.7.5 Caracterização estrutural do princípio tóxico de *A. rigida*

3.7.5.1 Espectroscopia de Infravermelho

Uma amostra de 10 mg da substância obtida segundo o processo descrito na seção 3.7.4, foi submetida a estudo por espectroscopia de infravermelho, no equipamento Perkin-Elmer®, modelo 1750 equipado com divisor de feixe de KBr e detector de sulfato de triglicina deuterada (DTGS).

Em paralelo, uma amostra de 10 mg do padrão de MFA-Na foi também submetido, nas mesmas condições, ao mesmo estudo.

De ambas as amostras, foram preparadas pastilhas de KBr e o espectro resultante de cada um dos estudos, analisado. Os valores correspondentes às bandas obtidas foram tabelados, em conjunto com dados da literatura, resultantes de estudos espectrométricos em infravermelho dos ácidos mono, di e trifluoracético, do ácido acético e do acetato de sódio, para posterior comparação (CHILDERS; STRUTHERS, 1955; KAGARISE, 1957; BARCELÓ; OTERO, 1962; NIEMINEN et al., 1993; MAX; CHAPADOS, 2004).

3.8 PROCEDIMENTOS: PARTE II: ESTUDO BIOLÓGICO

3.8.1 Administração dos extratos obtidos e do padrão de monofluoroacetato de sódio

Os extratos obtidos conforme seções 3.7.1.2 e *3.7.1.3.1* foram diluídos com água potável e administrados aos ratos em dose única de 6 g/kg. Os animais utilizados para a dosagem bioquímica sérica receberam o extrato aquoso de *A. rigida* nas doses de 3,2 e 6 g/kg.

Para a administração do padrão de MFA-Na, foi preparada uma solução com água potável na dose de 7 mg/kg. A opção da dose oral tóxica utilizada neste estudo baseou-se inicialmente nos valores, encontrados na literatura, da DL_{50} oral para roedores, que variam de 0,2 a 7 mg/kg (HUMPHREYS, 1988).

As doses aqui empregadas foram estabelecidas em estudos anteriores (CUNHA, 2008); todos os tratamentos foram agudos e administrados via oral (*gavage*). Os animais pertencentes ao grupo controle receberam, pela mesma via, o mesmo volume de água potável, durante o mesmo período que os diferentes grupos experimentais.

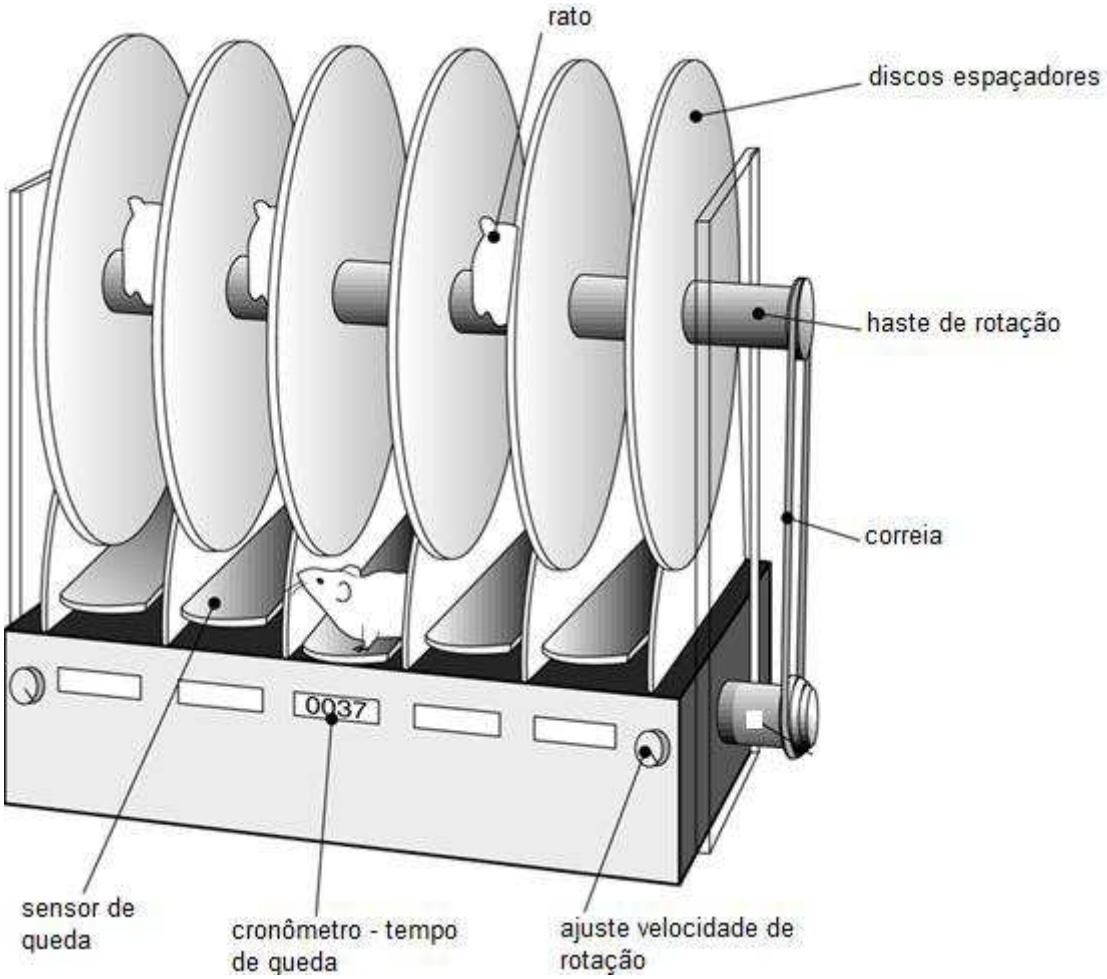
3.8.2 Princípio da utilização do *Rota Rod*

Logo após a administração tanto do padrão de MFA-Na quanto do extrato obtido conforme seção 3.7.1.1, os animais foram estimulados periodicamente ao exercício, no *Rota Rod*, com rotatividades que variaram entre 5 a 37 rpm, tendo sido colocado um animal por baia.

O detector deste equipamento consta de um circuito microprocessado que registra as quedas do animal por meio do impacto (Figura 10).

Após o período de latência para o iníco dos sinais clínicos, os animais foram anestesiados e submetidos à exsanguinação, realizada por meio de punção cardíaca para a obtenção do soro.

Figura 10 - Ilustração do equipamento *Rota Rod*



3.8.3 Coleta de amostra de sangue

Os animais foram anestesiados com xilazina e cetamina, via intra-peritonial, fixados em decúbito dorsal em uma prancha de parafina e, em seguida, realizou-se punção cardíaca usando seringas descartáveis sem anticoagulante. O sangue obtido foi acondicionado em tubos de ensaio e mantido em temperatura ambiente até a formação de coágulo (45 min), sendo então centrifugado (centrífuga Sanyo-Harrier 18/80®, 10 min, 4000 rpm). Em seguida, o soro obtido foi armazenado a - 20°C, até o momento da análise.

3.8.4 Dosagem bioquímica

Foram determinados os níveis séricos de uréia, creatinina, glicose, cálcio e citrato dos animais experimentais e controle por meio do Autoanalisador CELM SBA-200® utilizando-se kits comerciais Bioclin® e Abnova®.

3.8.5 Análise estatística

Para análise dos dados foi utilizado o *software* estatístico *GraphPad Prism* 5.00® (*GraphPad Software*, Inc., San Diego, CA, USA). Para verificar a homocedasticidade dos dados, utilizou-se o teste de Bartlett. Para dados paramétricos, foi utilizada a análise de variância ANOVA, seguida do teste de Dunnett, para comparação dos grupos experimentais com o grupo controle. Foram consideradas estatisticamente significantes as análises que apresentaram nível de significância de $p<0,05$. Os dados estão expressos como média ± erro padrão da média (epm) e os dados de porcentagem estão expressos como mediana (mínimo – máximo).

Delineamento experimental e Resultados

4 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL E RESULTADOS

4.1 ESTUDO QUÍMICO

4.1.1. Experimento 1: Avaliação da influência de diferentes tratamentos sobre a atividade dos extratos aquoso e hidroalcoólico de *A. rigida* – Um estudo bioguiado.

Para esta avaliação, os extratos aquoso e hidroalcoólico de *A. rigida*, obtidos segundo as seções 3.7.1.1 e 3.7.1.3.1 foram submetidos a diferentes tratamentos (seção 3.7.1.2).

Nos ensaios biológicos para detecção da presença da toxina nas amostras (AL, AR, NL, NR e EH), foram empregados 18 ratos Wistars, separados em 6 grupos iguais: um grupo controle (Co) e cinco grupos experimentais (n=3/grupo).

Os animais dos grupos experimentais receberam, por via oral (*gavage*), dose única de 6 g/kg dos diferentes extratos e os animais do grupo controle receberam apenas água, pelo mesmo período e via de administração. Todos os animais foram submetidos a exercício físico, como descrito na seção 3.8.2, e então observados por um período de até 24 horas, para a avaliação dos sinais clínicos. Após este período, os animais foram submetidos à eutanásia, por meio de decaptação.

4.1.1.1 Resultados

Todos os extratos (AL, AR, NL, NR e EH) submetidos ao ensaio biológico apresentaram resultados positivos, para a presença do princípio tóxico, porém em diferentes proporções.

O quadro clínico apresentado pelos animais foi caracterizado por prostração e convulsão; também apresentaram resistência ao exercício, quando forçados a caminhar no *Rota rod* (Tabela 1).

Tabela 1 – Sinais clínicos apresentados pelos animais intoxicados experimentalmente pelas AL, AR, NL, NR e EH: frequência e descrição

Grupos de animais que receberam as diferentes frações	Sinais Clínicos	Frequência (n=3)
AL	prostração	3/3
	convulsão	1/3
AR	prostração	3/3
	convulsão	2/3
NL	prostração	3/3
	convulsão	1/3
NR	prostração	3/3
	convulsão	3/3
EH	prostração	3/3
	convulsão	2/3

As convulsões apresentadas foram do tipo tônica e também tônico-clônica, caracterizadas por decúbito lateral e movimentos de pedalagem dos membros anteriores. A latência para o início dos sinais clínicos gerais foi de 40 a 60 minutos e para o início dos sinais clínicos neurológicos foi de 2,5 a 6 horas. Todos os animais recuperaram-se dentro de 24 horas.

4.1.2 Experimento 2: Escolha da técnica cromatográfica para a pré-purificação do extrato hidroalcoólico de *A. rigida* – Monitoramento da presença do princípio ativo por CCDC.

A pré-purificação do extrato obtido como descrito na seção 3.7.1.3.1 foi realizada pela técnica de extração em fase sólida, em cartucho Oasis® HLB (seção 3.7.2) e a detecção da substância ativa, nas frações eluídas (f_1,f_2,f_3 e f_4) foi realizada por CCDC, sendo utilizado como derivatizante o corante azul do Nilo e como padrão MFA-Na.

4.1.2.1 Resultados

Na triagem para detecção do princípio tóxico, por CCDC, das frações (f_1,f_2,f_3 e f_4) eluídas do cartucho Oasis HLB, apenas a fração f_1 (H_2O 100%) apresentou mancha de coloração azul intenso, com R_f. 0,18, idêntica à apresentada pelo padrão de monofluoroacetato de sódio. As demais frações não apresentaram reação positiva, neste teste (Tabela 2).

Tabela 2 – Monitoramento cromatográfico das frações eluídas do cartucho Oasis HLB

Fração	MFA-Na
f_1	+
f_2	-
f_3	-
f_4	-

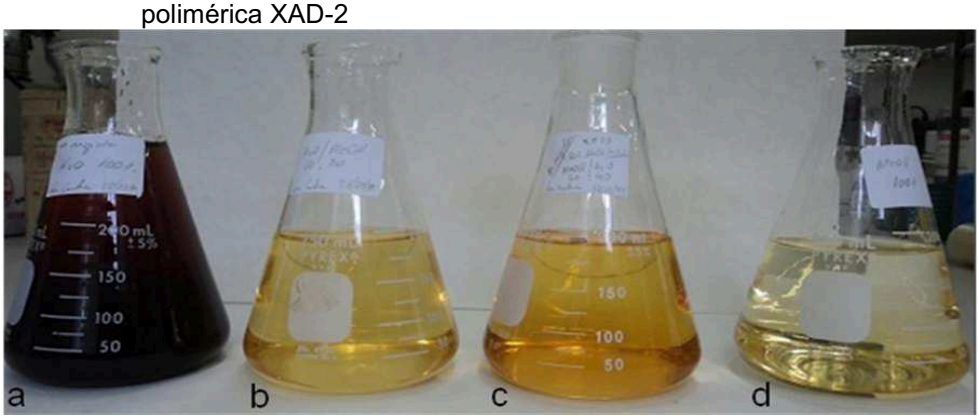
4.1.3 Experimento 3: Pré-purificação do extrato hidroalcoólico por cromatografia em coluna, na fase polimérica XAD-2

A pré-purificação do extrato hidroalcoólico (seção 3.7.1.3.1) foi realizada procedendo-se à cromatografia em coluna em fase polimérica Amberlite XAD-2 (seção 3.7.1), segundo procedimento preconizado por Pietrzyk (1989). As frações F1, F2, F3 e F4 eluídas, após secagem total foram ressuspensas em água e submetidas à cromotografia em camada delgada comparativa em celulose para detecção (qualitativa) da presença de monofluoroacetato de sódio.

4.1.3.1 Resultados

Das quatro fraçoes F1, F2, F3 e F4 eluídas da coluna cromatográfica preenchida com fase polimérica XAD-2, (Figura 11), apenas a fração F1 apresentou resultado positivo para a presença de monofluoroacetato de sódio (Tabela 3), substância que, nas condições escolhidas para este estudo cromatográfico em camada delgada, apresenta-se como mancha de coloração azul intensa, em R_f 0,18, após derivatização com o reagente azul do Nilo.

Figura 11 - Aspecto das frações eluídas da coluna cromatográfica, na fase polimérica XAD-2



Legenda: a) F1 (eluída com H_2O 100%); b) F2 (eluída com H_2O/MeOH 80:20, v/v); c) F3 (eluída com H_2O/MeOH 40:60, v/v); d) F4 (eluída com MeOH 100%

Tabela 3 – Monitoramento cromatográfico das frações eluídas de coluna cromatográfica preenchida com a fase polimérica XAD-2

Fração	MFA-Na
F_1	+
F_2	-
F_3	-
F_4	-

4.1.4 Experimento 4: Isolamento do princípio tóxico por Cromatografia em Camada Delgada Preparativa

A fração aquosa F1 (H_2O 100%) (seção 4.1.3.1) foi submetida à cromatografia em camada delgada preparativa, segundo o protocolo descrito na seção 3.5.2.2.

Após o desenvolvimento de cada cromatograma, uma tira estreita do papel cromatográfico foi recortada longitudinalmente e derivatizada com azul do Nilo.

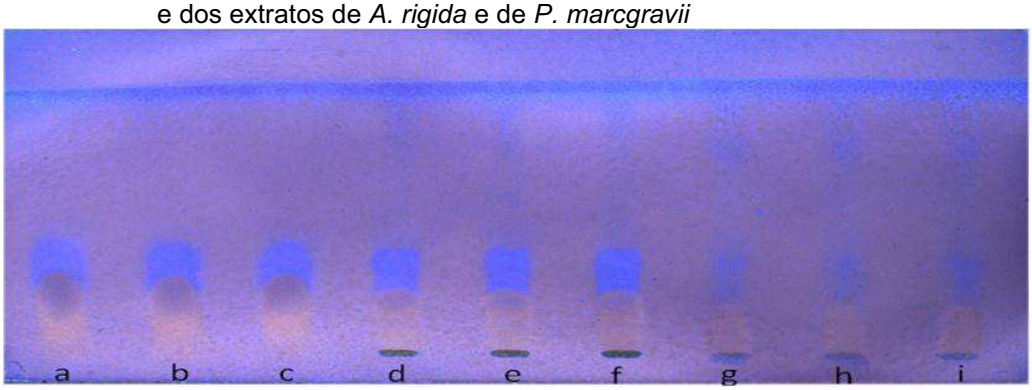
A faixa do cromatograma correspondente à mancha (na tira) com R_f e coloração coincidentes com as do padrão, foi recortada, repicada e extraída com H_2O deionizada, sendo o extrato liofilizado a seguir.

Este material liofilizado foi submetido à cromatografia em camada delgada comparativa, juntamente com extrato aquoso de *P. marcgravii* e com padrão de monofluoroacetato de sódio (aplicados em triplicata).

4.1.4.1 Resultados

No cromatograma comparativo, efetuado com amostras do padrão de monofluoroacetato de sódio, da substância isolada (seção 4.1.4) e do extrato aquoso de *P. marcgravii*, observou-se a presença, após a derivatização, de mancha azul com R_f 0,18, indicativa da presença de monofluroacetato de sódio, em todas as amostras (Figura 12).

Figura 12 – Cromatograma comparativo, em placa de celulose, do padrão do MFA-Na e dos extratos de *A. rigida* e de *P. marcgravii*



Legenda: a, b, c – padrão de monofluoracetato de sódio; d, e, f – substância isolada extrato de *A. rigida*; g, h, i – extrato aquoso de *P. marcgravii*. Fase móvel: etanol/hidróxido de amônio/piridina/água (95:3:1:1, v/v/v/v); agente derivatizante: azul do Nilo.

4.1.5 Experimento 5: Caracterização estrutural do princípio tóxico de *A. rigida,* por espectroscopia de infravermelho

Uma amostra da substância isolada por CCDP (seção 4.1.4) e uma amostra do padrão de MFA-Na foram submetidas a estudo por espectrometria de infravermelho. Os dados obtidos em ambos os espectros foram tabelados, juntamente com valores da literatura, resultantes de estudos espectrométricos em infravermelho dos ácidos mono, di e trifluoracético, do ácido acético e do acetato de sódio, para posterior comparação.

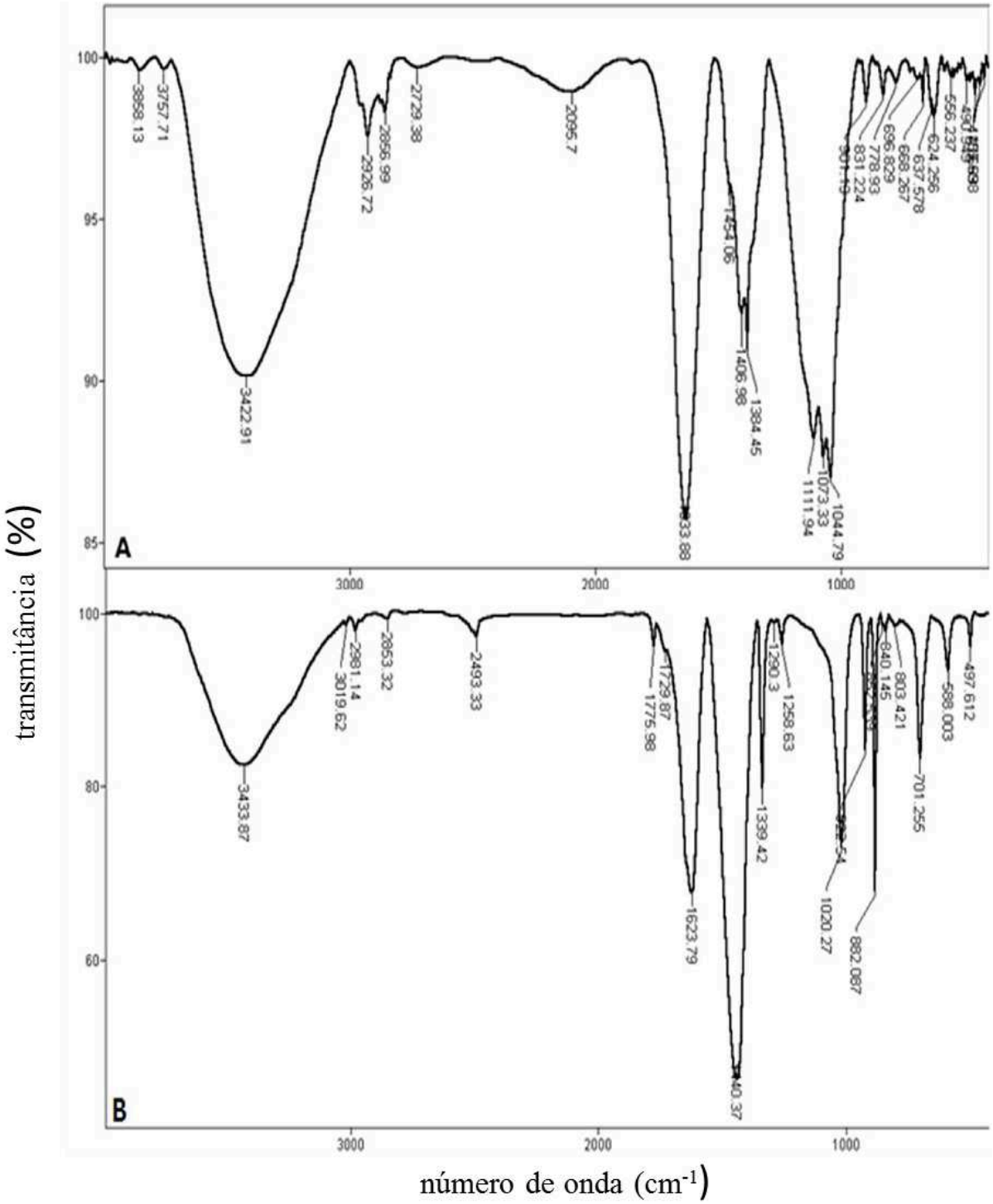
4.1.5.1 Resultados

Os espectros obtidos da substância isolada por CCDP e do padrão de MFA-Na estão mostrados na figura 13.

Os dados relativos às bandas de absorção neles observadas estão reunidos nas tabelas 4 e 5. Para posterior comparação, análise e discussão do posicionamento destas bandas, também estão compilados, nestas tabelas, os valores obtidos para as bandas de absorção, relativas aos estudos por infravermelho, dos ácidos mono, di e trifluoracéticos, do ácido acético e do monofluoracetato de sódio.

Na tabela 4 estão mostrados os valores das bandas relativas ao grupo C—F e na 5, às do grupo carbonila, nas substâncias em questão.

Figura 13 - Espectros de Infravermelho da substância em estudo e do padrão de MFA-Na



Legenda: A) amostra da substância isolada de *A. rigida*; B) amostra do padrão MFA-Na

Tabela 4 – Bandas de absorção observadas no espectro de infravermelho, devidas ao grupo C—F, de ácidos halogenados, do MFA-Na e de amostra de *A. rigida*

Substâncias	C—F estiramento (cm^{-1})
Ácido trifluoracético	1165 – 1277
Ácido difluoracético	1092 – 1209
Ácido monofluoracético	~ 1095
Monofluoracetato de sódio	1020,27 (“ombro em frequência mais alta”)
Amostra do princípio tóxico de *A. rigida*	1044,79; 1073,33; 1111,94 (superposição de picos)

Tabela 5 - Bandas de absorção observadas no espectro de infravermelho, devidas ao grupo carbonila das moléculas dos ácidos mono, di e tri fluorácetico, do ácido acético, do acetato de sódio, do monofluoroacetato de sódio e do princípio tóxico de *A. rigida*

Substâncias	O — H Estiramento (largo) cm^{-1}	C = O Estiramento cm^{-1}	C — O Estiramento cm^{-1}	O — H Torção (no plano) cm^{-1}	O — H Torção (fora do plano) cm^{-1}	Deformação cm^{-1}
Ác. Trifluoracético Monômero	3498	1843	------	1115	------	------
ÁC. Trifluoracético Dímero	------	1781	1457	1217	------	664
Ác. difluoracético Monômero	3520	1815	------	------	------	------
Ác. difluoracético Dímero	------	1736	1456	1242	929	662
Ác. monofluoracético Monômero	3520	1790	------	------	------	------
Ác. monofluoracético Dímero	------	1737	1447	1245	988	664
Ác. Acético Monômero	3050	1758	1414	1294	1016	629
Ác. Acético Dímero	------	1714	------	------	------	------
Acetato de sódio	3412	1572	1412	1289 (pequeno)	1012	648
Monofluoracetato de sódio – Padrão	3433,87	1623,79 1729,87 1775,58	1440,37	1258,63 (pequeno)	922,54	701, 25
Amostra do princípio tóxico de *A. rigida*	3422,91	1633,79 (alargado)	1454,06-1406,68	------	111,94	696,829 (alargado)

Nota: o grupo carboxílico tem 6 frequências: (OH, C=O, C–O estiramento)+ OH (2 freq.torção) + O=C–O (deformação do grupo)

4.2 ESTUDO BIOLÓGICO

4.2.1 Experimento 6: Comparação entre os efeitos causados pela administração de monofluoroacetato de sódio e do extrato de *A. rigida*, em ratos. Avaliação bioquímica

Para a avaliação bioquímica séria, foram utilizados 40 ratos separados em quatro grupos iguais: um grupo controle (Co), um grupo padrão (P) e dois grupos experimentais (n=10/grupo).

Os animais dos grupos experimentais (A*r* 1 e A*r* 2) receberam respectivamente, por via oral (*gavage*), dose única de 3,2 ou 6 g/kg do extrato aquoso de *A. rigida*. Os animais do grupo padrão (P) receberam dose única de 7 mg/kg da solução padrão de monofluoroacetato de sódio pela mesma via e os animais do grupo controle receberam apenas água pelo mesmo período e via de administração, conforme descrito na seção 3.8.1. Todos os animais foram observados por um período de até 6 horas para a avaliação dos sinais clínicos e durante este período foram submetidos a exercícios físicos no *Rota rod*, conforme descrito na seção 3.8.2. Após este período, os animais foram anestesiados e amostras de sangue foram coletadas conforme descrito na seção 3.8.3. e os níveis séricos de uréia, creatinina, glicose, cálcio e citrato dos animais dos grupos experimentais e do grupo controle foram avaliados como descrito na seção 3.8.4.

4.2.1.1 Resultados

A tabela 6 mostra e a figura 14 ilustra o nível sérico de uréia de ratos intoxicados com as diferentes doses do extrato aquoso da *A. rigida* e de ratos pertencentes ao grupo padrão de fluoroacetato de sódio. A ANOVA revelou haver diferenças significantes entre os grupos ($F=11,61$; $df=3/37$; $p<0,05$). Quando aplicou-se o teste de Dunnett, este revelou aumento significante no nível sérico de uréia de ratos do grupo padrão, em relação ao grupo controle.

A tabela 6 mostra e gráfico 1 ilustra o nível sérico de creatinina de ratos intoxicados com as diferentes doses do extrato aquoso da *A. rigida,* bem como o de ratos pertencentes ao grupo padrão. A análise de variância indicou diferenças significantes entre os grupos (F=11,61; df=3/37; p<0,05). Ao aplicar-se o teste estatístico subsequente verificou-se aumento significante no nível sérico de creatinina dos ratos do grupo padrão, quando comparado com aquele obtido dos animais do grupo controle.

A tabela 6 mostra e o gráfico 1 ilustra o nível sérico de glicose de ratos intoxicados com as diferentes doses do extrato aquoso da planta e de ratos pertencentes ao grupo padrão. A aplicação da análise de variância indicou diferenças significantes entre os grupos (F=4,108; df=3/37; p<0,05) e a análise estatística utilizada a seguir detectou diminuição significante no nível sérico de glicose de ratos do grupo *Ar* 2, quando comparados com os animais do grupo controle.

A tabela 6 mostra e o gráfico 1 ilustra o nível sérico de cálcio de ratos intoxicados com as diferentes doses do extrato aquoso da *A. rigida*, bem como o de ratos pertencentes ao grupo padrão. A análise de variância mostrou diferenças significantes entre os grupos (F=50,74; df=3/37; p<0,05). A aplicação subsequente do teste de Dunnett mostrou diminuição significante no nível sérico de cálcio de ratos dos grupos *Ar* 1 e *Ar* 2, quando comparado com os animais do grupo controle.

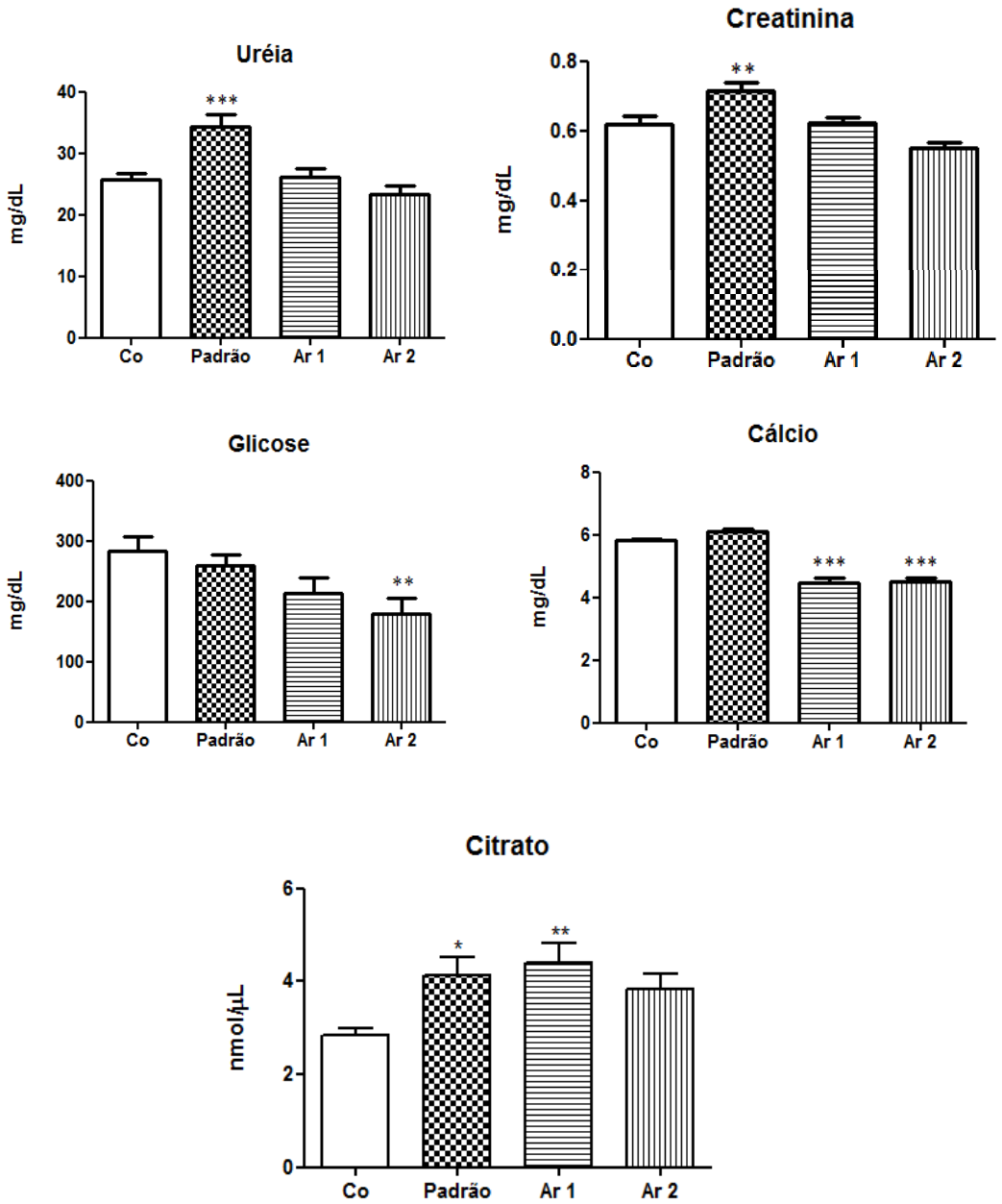
A tabela 6 mostra e gráfico 1 ilustra o nível sérico de citrato de ratos intoxicados com as diferentes doses do extrato aquoso da planta e de ratos pertencentes ao grupo padrão. A ANOVA revelou haver diferenças significantes entre os grupos (F=4,011; df=3/37; p<0,05). Ao aplicar-se o teste estatístico subsequente verificou-se aumento significante no nível sérico de citrato dos ratos dos grupos padrão e *Ar* 1, quando comparado com aquele obtido dos animais do grupo controle.

Tabela 6 – Parâmetros bioquímicos séricos de ratos intoxicados experimentalmente com 3,2 e 6 g/kg do extrato aquoso de *A. rigida* e de ratos intoxicados com 7 mg/kg do padrão de MFA-Na, por *gavage*, em dose única

	Controle (n=9)[a]	MFA-Na (n=10)[a]	*Ar* 1 (3,2 g/kg) (n=9)[a]	*Ar* 2 (6 g/kg) (n=10)[a]
Uréia (mg/dL)	25,78±0,88	34,30±1,95***	26,22±1,29	23,40±1,24
Creatinina (mg/dL)	0,62±0,02	0,72±0,02**	0,62±0,02	0,55±0,02
Glicose (mg/dL)	284,1±23,41	259,4±17,98	214,1±24,45	180,1±25,49**
Cálcio (mg/dL)	5,81±0,04	6,12±0,09	4,45±0,16***	4,49±0,15***
Citrato (nmol/µL)	2,84±0,16	4,13±0,38*	4,39±0,42**	3,84±0,31

Dados expressos como média ± epm, [a] número de animais; *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001 *versus* grupo controle; teste de Dunnett

Gráfico 1 – Parâmetros bioquímicos de ratos intoxicados experimentalmente com 3,2 e 6 g/kg do extrato aquoso de *A. rigida* e de ratos intoxicados com 7 mg/kg do padrão de MFA-Na, por *gavage*, em dose única



Legenda: Os dados são apresentados como média ± epm, *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001, ANOVA ou Dunnett

Discussão

5 DISCUSSÃO

5.1 ESTUDO QUÍMICO

A análise química do MFA-Na representa um desafio a todos os toxicologistas, pois esta substância química, diferente da maior parte dos agentes tóxicos, tem característica de hidrossolubilidade, apresentando também semelhança química com ácidos orgânicos de cadeia molecular pequena, como o ácido acético o ácido butírico e o propiônico, que são comumente encontrados em organismos vivos (MINNAAR et al., 2000).

O principal objetivo proposto no presente estudo foi o estabelecimento de uma metodologia capaz de purificar e caracterizar o MFA-Na em *A. rigida* por meio de procedimentos cromatográficos experimentais levando-se em consideração as particularidades desta molécula.

A avaliação bioguiada da influência de diferentes tratamentos sobre dois extratos de *A. rigida* (alcoólico e aquoso) mostrou que não houve perda total do princípio tóxico em nenhum dos procedimentos, pois todos os animais intoxicados apresentaram alterações, porém em diferentes proporções. Sendo assim, os sinais clínicos de intoxicação aqui observados foram semelhantes aos apresentados pelos animais intoxicados experimentalmente com solução de MFA-Na, em experimento desenvolvido durante nosso projeto de mestrado (CUNHA, 2008), o que sugere a presença de MFA-Na, em *A. rigida*.

A sobrevivência dos animais à administração dos extratos de *A. rigida* pode indicar baixa concentração de MFA-Na, na planta em estudo, ou ainda, perda do princípio ativo durante o procedimento de extração, uma vez que a administração de dose única de fluoroacetato de sódio em doses baixas, de até 0,2 mg/kg, por via oral, é capaz de levar ratos a óbito, em pouco tempo (HUMPHREJS, 1988).

Com base nas evidências anteriormente referidas, foi selecionado o solvente a ser utilizado na extração do princípio ativo de *A. rigida*, e seu subsequente fracionamento. Os fatores que determinaram esta escolha foi, além da eficiência, o tempo necessário para a concentração do volume total de extrato, que é diretamente

proporcional ao tempo de exposição da amostra a outras variáveis, tais como temperatura e pressão reduzida, que podem determinar a perda de parte do princípio ativo.

Apoiam a conjectura apresentada anteriormente, aqueles ensaios previamente realizados com as amostras da biomassa da planta e de extratos de *A. rigida*, os quais comprovaram que o princípio ativo é uma substância polar, solúvel em água e em soluções hidroalcoólicas e ácidas.

Para a pré-purificação do extrato, etapa comum no isolamento de princípios ativos polares presentes em matrizes orgânicas complexas, são utilizadas várias fases estacionárias tais como as compostas por sílica hidrofóbica quimicamente modificada (C18 = sílica octadecilsilanizada) e por resinas poliméricas orgânicas (Oasis e XAD-2). Neste processo, os analitos são adsorvidos no material hidrofóbico por meio de interações de Van der Waals e, em determinada proporção, por ligações hidrofóbicas ou interações dipolo-dipolo (PIETRZYK, 1989; LINGEMAN; JANDEM, 1990).

Segundo o catálogo Waters®, a fase reversa polimérica Oasis® HLB para a extração em fase sólida (SPE) apresenta equilíbrio hidrofílico-lipofílico para compostos ácidos, básicos e neutros além de estabilidade em pH de 0 a 14, mostrando-se bastante adequada para a pré-purificação do extrato de *A. rigida*.

O copolímero estireno-divinilbenzeno XAD-2 é uma resina hidrofóbica bastante aplicada para a extração em fase sólida (*clean-up*) de matrizes orgânicas complexas, além de ser estável em ampla faixa de pH (LINGEMAN; JANDEM, 1990).

Tanto a fase reversa polimérica Oasis® HLB quanto o copolímero estireno-divinilbenzeno XAD-2, por apresentarem características compatíveis com o procedimento o qual se pretendia realizar, foram utilizados neste estudo e como esperado, os resultados obtidos foram semelhantes.

Assim, em ambos, a fração eluída em H_2O 100% mostrou conter substância com comportamento idêntico ao do padrão do MFA-Na. Sendo assim, em nosso estudo foi utilizada a fase estacionária formada pelo copolímero XAD-2, por sua maior disponibilidade e também, em virtude de terem apresentado resultados semelhantes ao Oasis®

Entretanto, devido a grande quantidade de pigmentos presentes no extrato optou-se primeiramente, por removê-los em Celite (terra de diatomáceas) para obtenção de melhores resultados, este procedimento foi acompanhado por CCDC, mostrando-se eficiente.

Após a filtração em Celite seguiu-se o protocolo para pré-purificação por XAD-2; para tal, as frações foram eluídas nas seguintes fases móveis: H_2O 100% (F1); H_2O/MeOH (80:20, v/v)(F2); H_2O/MeOH (40:60, v/v) (F3) e MeOH 100% (F4), as quais, após terem sido concentradas a pressão reduzida, foram liofilizadas e analisadas por CCDC. A fração F1, eluída em H_2O, mostrou a presença de substância com R_f e coloração característica do padrão de MFA-Na, e as demais frações não continham substâncias capazes de reagir com o derivatizante azul do Nilo.

Levando-se em consideração que o estudo cromatográfico em camada delgada comparativa realizado neste estudo como monitoramento da presença do MFA-Na durante todas as etapas de seu isolamento mostrou-se uma alternativa viável para a purificação do princípio ativo de *A. rigida* e ainda, as limitações impostas pelas características dessa(s) molécula(s) que impedem o uso dos detectores usuais de aparelhos de cromatografia de alta eficiência, optou-se pelo emprego da CCDP, para refinar a separação do princípio ativo, pré-purificado por cromatografia em coluna, utilizando-se a fase estacionária XAD-2.

Com este procedimento, logrou-se isolar substância(s) com características idênticas ao do padrão do MFA-Na, que foi encaminhada para caracterização estrutural.

A primeira tentativa para conhecer a identidade do principio tóxico existente em *A. rigida* consistiu no estudo espectrométrico por ressonância de flúor, o qual, por dificuldades técnicas, foi inconclusivo, porém indicou a presença de mais de um átomo de flúor, na amostra analisada. O maior empecilho para a continuidade deste estudo foi a ausência de dados teóricos ou práticos para consulta, na literatura.

Para contornar as limitações impostas pela sensibilidade específica das técnicas disponíveis para a determinação da estrutura da amostra em questão, optou-se por caracterizar o princípio ativo, por comparação de seu espectro de infravermelho com o do padrão de monofluoracetato de sódio. O MFA-Na, diferentemente das moléculas diatômicas homonucleares, que não têm momento

dipolar permanente e não apresentam bandas de absorção no espectro de infravermelho, devido à presença do oxigênio e do flúor, apresenta momento dipolar permanente, que oscila periodicamente ao vibrar a molécula, podendo, portanto absorver radiação eletromagnética e apresentar espectro característico (MURADIAN, 1980; PAVIA et al., 2010).

Apesar da extensa pesquisa bibliográfica realizada, não foram encontrados dados espectrais relativos ao monofluoracetato de sódio. Por isso, a atribuição às bandas do espectro experimental de infravermelho do MFA-Na (padrão) foi feita comparando-se suas posições, no espectro, com os dados fornecidos pela literatura, para o acetato de sódio, o ácido acético e os ácidos: mono, di e fluoracéticos. Para tanto, foram reunidos nas tabelas 4 e 5, os valores discutidos por Childers; Struthers (1955); Kagarise (1957); Barceló; Otero (1962); Redington; Lin (1971);Nieminen et al. (1993) e os que constam na Bibioteca virtual de espectros *KnowItAll® AnyWare*, nos espectros do ácido acético e do MFA-Na.

Neste grupo selecionado de moléculas, a localização das bandas do grupo carbonila (de carboxila) e do átomo de flúor podem fornecer muitas informações.

O grupo carbonila absorve intensamente radiação infravermelha entre 1850 e 1650 cm^{-1}, devido à grande mudança que sofre seu dipolo, em relação ao tempo. Além de ocuparem posição característica, as bandas devidas às carbonilas também apresentam forma e intensidade próprias. Além disso, a frequência de absorção da carbonila depende da característica eletrônica dos grupos substituintes vizinhos. Nos ácidos carboxílicos, o grupo hidroxila influencia diretamente a carbonila, porque, nas fases sólida e líquida, há formação de um dímero estável, resultante de ligação de hidrogênio (H – O), entre as carboxilas de duas moléculas de ácido: o grupo carbonila de uma das moléculas liga-se à hidroxila da outra molécula, através da ligação de hidrogênio

$$C^{\delta+} — O^{\delta-} \ldots H^{\delta+} — O^{\delta-}$$

que diminui o caráter sp^2 da dupla e enfraquece a ligação entre os átomos de carbono e de oxigênio, deslocando a absorção da vibração de estiramento da carbonila para frequência mais baixa (MURADIAN, 1980; PAVIA et al., 2010).

Nos sais de ácidos carboxílicos, o ânion carboxilato é estabilizado por ressonância e as ligações entre o carbono e o oxigênio adquirem caráter de ligação simples, o que resulta na diminuição da frequência do grupo carbonila; são

observados um estiramento assimétrico forte em região próxima de 1600 cm^{-1}, e um estiramento simétrico (forte), próximo de 1400 cm^{-1} (MURADIAN, 1980; PAVIA et al., 2010).

A banda relativa ao grupo carbonila também pode sofrer deslocamentos devido a influências de grupos vizinhos: efeitos indutivos (retirada de elétrons) aumentam a força da ligação C-O, resultando em bandas de frequência mais alta; efeitos de ressonância aumentam o caráter de ligação simples na ligação C-O e diminuem a frequência, fenômeno que ocorre também quando se formam ligações de hidrogênio, como visto acima (MURADIAN, 1980; PAVIA et al., 2010).

No caso particular dos halogênios, o efeito indutivo é muito importante, pois o impacto da eletronegatividade desse(s) átomo(s) sobre as frequências dos grupos vizinhos ocasiona mudanças significativas nas frequências de suas bandas, cuja direção de deslocamento depende de o halogênio aumentar ou diminuir a densidade eletrônica destes grupos. No caso de aumentar a densidade eletrônica, a banda correspondente aparecerá em frequência mais alta e se diminuir, a banda aparecerá em frequência mais baixa (MURADIAN, 1980; PAVIA et al., 2010).

A influência da eletronegatividade dos halogênios é também exercida sobre o grupo carbonila de ácidos α-substituídos: a força da ligação do grupo carbonila aumenta e a banda será deslocada para frequências maiores (MURADIAN, 1980; PAVIA et al., 2010). As tabelas 4 e 5 mostram o efeito indutivo dos halogênios e o efeito da ligação de hidrogênio sobre a carbonila, nos ácidos tri, di e monofluoracéticos, no acetato e no monofluoracetato de sódio, em comparação com as frequências observadas para o ácido acético.

A frequência (estiramento) da carbonila, observada para o ácido acético, em forma de monômero, é de 1758 cm^{-1}: já na forma associada (dímero), por estar estabilizada por ponte de hidrogênio, mostra a frequência de 1714 cm^{-1}. Na tabela 5, a frequência deste estiramento mostra valores crescentes da molécula de ácido monohalogenada para a trihalogenada, nas formas de monômero ou de dímero; porém, os dímeros apresentam valores menores do que os monômeros.

O mesmo efeito indutivo pode ser observado no sal do ácido acético: há um aumento do valor da frequência do estiramento C = O, quando um dos hidrogênios do grupo metílico do acetato de sódio é substituído por um halogênio. Este estiramento, que no acetato de sódio aparece na frequência de 1572 cm^{-1}, tem o

valor de 1623,79 cm^{-1}, no espectro do monofluoracetato de sódio. No espectro do padrão de monofluoracetato de sódio, aparecem dois pequenos picos, com valores crescentes de 1729,87 e 1775,58 cm^{-1}: estes picos, levando-se em consideração o grau de pureza do padrão (de 95%) poderiam ser atribuídos à contaminação com difluoracetato e trifluoracetato de sódio.

Efeito semelhante pode ser observado também, no estiramento da ligação C—O, porém em menor proporção, comparando-se os ácidos halogenados com o ácido não halogenado e o sal halogenado com o não halogenado, e também na deformação do grupo carboxílico.

O efeito inverso pode ser visto na comparação, entre todas as substâncias, nos valores das frequências relativas às torções do grupo O — H.

A banda resultante do estiramento do C—H (~2.600 cm^{-1}) está possivelmente sobreposta à banda larga característica da ligação O—H, que aparece entre 3.320-2.500 cm^{-1}(larga), região que pode não fornecer muitas informações.

As outras bandas devidas às ligações C-O e O-H (Tabela 5) são menos pronunciadas e estão localizadas entre os valores de frequência 1.320-1.210 cm^{-1} (devidas ao estiramento C-O) e 960-850 cm^{-1} (devidas à ligação de hidrogênio O-H, torção fora do plano).

Com relação às bandas devidas à ligação flúor – carbono, nas substâncias alifáticas, a presença de um halogênio resulta no aparecimento de banda característica da ligação C-X (estiramento) entre os comprimentos de onda 1.150-1.000 cm^{-1}. Se existirem mais de um átomo de halogênio, é necessário considerar se estão ligados, ou não, ao mesmo carbono.

Nos estudos dos espectros de infravermelho dos ácidos tri, di e monofluoracéticos (KAGARISE, 1957; BARCELÓ; OTERO, 1962), os valores obtidos para as bandas de absorção relativas à ligação C—F, situam-se entre 1.092 e 1.277 cm^{-1} (Tabela 4) e no espectro do monofluoracetato de sódio, a banda apareceu em 1.020,27 cm^{-1}, porém pode ser visto um “ombro”, voltado para região de frequência mais alta. No espectro da amostra contendo o princípio ativo de *A. rigida*, estão documentados três picos superpostos, com máximos em 1.044,79; 1.073,33 e 1.111,94 cm^{-1}.

Entre 700 e 400 cm^{-1}, nos espectros dos ácidos mono, di e trifluorados aparecem bandas relativas à deformação da ligação C—F; no monofluoracetato de

sódio, vemos uma banda em 701,25 cm^{-1}, enquanto na amostra da planta, vemos entre 660 e 710 cm^{-1}, picos superpostos (KAGARISE, 1957; BARCELÓ; OTERO, 1962).

A observação dos espectros do monofluoracetato de sódio (padrão) e do material isolado da planta em estudo, mostra que são superponíveis.

Entretanto, outras considerações devem ser feitas: no espectro do padrão (pureza de 95%) foram documentadas, além de banda em 1.623,79 cm^{-1}, relativa à carbonila deslocada pela presença de um átomo de flúor, outras duas pequenas bandas, que podem ser atribuídas à presença de contaminação por di e trifluoracetato de sódio. Essas bandas em 1.729,87 e 1.775,58 cm^{-1}, respectivamente, são compatíveis com bandas relativas a carbonilas deslocadas respectivamente, por 2 e 3 átomos de flúor, situados em carbono vizinho a este grupo (carbonilas α-halogenadas); há correspondência entre as bandas devidas ao estiramento destas carbonilas e as bandas resultantes dos ácidos di e trifluoracéticos (Tabela 5).

No material isolado da amostra da planta, o pico relativo à carbonila aparece em 1633,88 cm^{-1}, porém é um pico largo, sugerindo a superposição de picos com frequência mais alta: as bases deste pico abrangem a região entre 1.620 e 1.780 cm^{-1}, que coincide com a região em que aparecem os picos relativos ao mono, di e trifluoracetatos, no padrão.

A indicação da presença de mistura de mono, di e triacetatofluoracetato de sódio no isolado da planta torna-se mais consistente pela existência de três picos distintos, resultados de vibração de estiramento de ligação C—F, em 1044,79; 1073,33 e 1111,94 cm^{-1}, embasando a conclusão de que estamos em presença de espectro do monofluoracetato de sódio, em mistura com o di e o trifluoracetato de sódio.

Dando peso a este resultado, a literatura mostra a constatação da existência destas três substâncias halogenadas, simultaneamente, na *Dichapetalum toxicarium* (VICKERY; VICKERY, 1975).

Portanto, os dados obtidos por meio dos espectros de infravermelho analisados, em conjunto com os resultados fornecidos pelo estudo por cromatografia em camada delgada e pelas evidências mostradas nos estudos biológicos realizados

neste e em trabalhos anteriores, corroboram que o princípio ativo de *A. rigida*, é o monofluoracetato de sódio, em mistura com o di e o trifluoracetato de sódio.

5.2 ESTUDO BIOLÓGICO

O diagnóstico da intoxicação, tanto pelos praguicidas que contém o MFA-Na, como por plantas que encerram este principio ativo é ainda um grande problema na clínica. De fato, Collicchio-Zuanaze et al. em 2006, relatam a ausência de dados científicos suficientes para um diagnóstico rápido e eficaz da intoxicação em gatos e cães. Também, são vários os casos de intoxicação nos quais se suspeitou de ser o MFA-Na o causador da intoxicação, mas que no entanto, não foi possível a conclusão definitiva. Um exemplo que pode perfeitamente exemplificar tal dificuldade, refere-se à grande mortalidade de animais no Zoológico de São Paulo, ocorrida em 2004. Estudos técnicos apontaram para a suspeita de intoxicação por MFA-Na, no entanto, até hoje não foi possível concluir definitivamente sobre a causa da mortalidade (ORTIS, 2005).

Deve-se ressaltar que devido à característica de evolução aguda, a intoxicação pelo MFA-Na, pode ser confundida com outras afecções, tais como, deficiência de vitamina E/selênio, ingestão de plantas cianogênicas ou de *Ricinus comunis* (neste caso as folhas) - (NOGUEIRA et al., 2010) e até mesmo com doenças infecciosas, como o carbúnculo hemático (PACHECO; CARNEIRO, 1932; TOKARNIA et al., 1979).

Embora a intoxicação pelo MFA-Na seja, provavelmente, muito frequente, são muito poucos os estudos relacionados ao diagnóstico da intoxicação por este composto com auxílio laboratorial (CHI et al., 1996, 1999; O'HAGAN, 2004). Assim, embora a intoxicação com plantas que causam morte súbita ou com o próprio MFA-Na, empregado como praguicida, possa ser confundido com outras tantas afecções, atualmente, o diagnóstico da intoxicação por este composto é realizado considerando-se basicamente o histórico de ingestão do agente tóxico e pelos achados clínicos.

Isto posto, parece evidente que estudos que visem auxiliar no diagnóstico da intoxicação por este composto irão contribuir significantemente com a toxicologia clínica. Assim, foi objetivo, nesta primeira parte deste estudo, procurar desenvolver método seguro e eficaz para a detecção de MFA-Na; já que se sabe que atualmente não há nenhum laboratório no Brasil que tenha implementado e esteja realizando, como rotina, a detecção desta substância para auxílio diagnóstico. Portanto, o estabelecimento desta metodologia neste laboratório permitirá que se possa não somente realizar estudos no sentido de se determinar a presença do MFA-Na em outras plantas que causam morte súbita em nosso país, mas também possibilitará que se desenvolvam futuramente técnicas que permitirão a detecção desta substância em materiais biológicos, como sangue e vísceras; além de desenvolvimento de métodos que detectem esta substância, haja vista que atualmente não existe nenhum protocolo analítico capaz de quantificar o MFA-Na em matrizes biológicas (CASPER et al., 1985; MINNAAR et al., 2000).

Um importante subsídio para o diagnóstico das mais variadas enfermidades é a avaliação anátomo-histopatológica. No entanto, considerando-se a intoxicação pelo MFA-Na, este auxílio pode ter pouco valor; de fato, tomando-se como exemplo aquelas plantas que produzem a intoxicação e morte por encerrar este princípio ativo, Döbereiner e Tokarnia (1959), relatam que, em relação à necropsia, não há nenhum achado que seja digno de nota, que auxiliaria o diagnóstico. No que se refere à histopatologia, estes mesmos autores verificam que alguns bovinos (em 60% dos achados) intoxicados podem apresentam degeneração hidrópico vacuolar nas células dos túbulos contornados distais do rim.

Outro subsídio de grande valor para o diagnóstico de uma determinada enfermidade é a avaliação bioquímica. De fato, deve-se considerar que muitas vezes uma injúria poderá não causar alterações morfológicas, no entanto, esta promove mudanças bastante significantes em enzimas e componentes sanguíneos, que seriam indicativos de lesão. Portanto, foi também escopo desta pesquisa avaliar alguns parâmetros bioquímicos de ratos intoxicados, tanto com a *A. rigida*, como com o MFA-Na, no sentido de contribuir com os dados de literatura já existentes.

Assim, considerando-se que o MFA-Na produz alterações consistentes no epitélio renal, isto é, degeneração hidrópico-vacuolar, particularmente nas células dos túbulos contornados distais do rim (NOGUEIRA et al., 2010), pode-se supor que

tal injúria promoverá variáveis graus de azotemia e uremia levando à insuficiência renal. No entanto, no presente estudo, os animais intoxicados pelo extrato aquoso de *A. rigida* não apresentaram alterações significantes nos valores de uréia e creatinina séricas, sendo estes parâmetros alterados apenas nos animais intoxicados com o padrão de MFA-Na. De fato, Annison et al. (1960) e Peixoto et al. (2010) encontraram aumento dos níveis destas substâncias em ovinos e bovinos intoxicados pelo MFA-Na.

Por outro lado, os resultados aqui obtidos corroboram os achados descritos por Collicchio-Zuanaze et al (2006), que estudando os efeitos do MFA-Na em gatos, também não observaram alterações significantes nos níveis séricos destas substâncias empregadas para a avaliação da função renal. Entretanto, deve-se levar em consideração que o período de tempo entre a intoxicação e a morte dos animais, tanto naquele trabalho realizado por Collicchio-Zuanaze (2006) quanto neste foi relativamente curto, ao redor de seis horas; sendo assim,é possível inferir que não houve tempo hábil para que houvesse a alteração nos níveis sanguíneos destes metabólitos renais.

Além disso, considerando-se que os animais que receberam o padrão de MFA-Na, apresentaram aumento dos níveis de uréia e creatinina, mas não aqueles ratos tratados com as duas amostras de planta, uma outra possível explicação para este inesperado resultado, poderia estar relacionado à baixa concentração de fluoroacetato na planta em estudo. Entretanto, para confirmação desta hipótese é necessário um estudo quantitativo do MFA-Na em *A. rigida*.

O mecanismo de ação do fluoroacetato de sódio envolve o bloqueio da cadeia respiratória. Assim, esta substância ao adentrar a célula, reage com a coenzima A (CoA), na presença de adenosina-5'-trifosfato, formando o fluoroacetil-CoA, o qual, por sua vez, reage com o oxaloacetato e a água formando o fluorocitrato, o principal responsável pelos efeitos tóxicos (BURGER; FLECKNELL, 1994; COLLICCHIO, 2006). Na sequência de eventos celulares, o fluorocitrato inibe a enzima aconitase, responsável pela transformação do citrato em isocitrato no ciclo de Krebs. Sua inibição, portanto, bloqueia este ciclo, causando depleção de energia, acúmulo de citrato e de lactato, com queda do pH sanguíneo. O citrato acumulado no organismo, além de promover efeitos cardiotóxicos e neurotóxicos, também pode combinar-se com o cálcio, levando à hipocalcemia e ao agravamento dos sinais clínicos da

intoxicação. Desta forma, os níveis de cálcio sérico total são inversamente proporcionais aos níveis de citrato sérico, explicando assim, o efeito quelante do citrato sobre o cálcio (GAL et al., 1956; BOSAKOWSKI; LEVIN, 1986; OMARA; SISODIA, 1990; BURGER; FLECKNELL, 1994).

De fato, no presente estudo, foi possível observar aumento significante dos níveis de citrato, com consequente diminuição do cálcio, tanto nos animais do grupo que receberam o padrão, quanto naqueles que receberam o extrato da planta. Portanto, estes dados reiteram os achados encontrados na literatura, descritos para outras espécies animais (SPENCER; LOWENSTEIN, 1967; HUANG et al., 1980), permitindo indicar a realização da dosagem destas duas substâncias, como importantes subsídios para o diagnóstico em casos de suspeita de intoxicação pelo MFA-Na.

Ainda, em relação aos efeitos do MFA-Na sobre o metabolismo energético, sabe-se que o MFA-Na afeta diretamente o metabolismo de carboidratos por inibição da glicólise e diminuição do suprimento energético (WILLIAMSON, 1967). Consequentemente, verifica-se o aumento nos níveis de glicose e glicogênio séricos. Portanto, a hiperglicemia pode ser um achado significante na intoxicação por este composto (MARRAZZI; HOLLIDAY, 1981). Corrobora tal suposição aqueles estudos realizados em cães (BOSAKOWSKI; LEVIN, 1986), gatos (COLLICCHIO-ZUANAZE 2006) e ratos (BOSAKOWSKI; LEVIN, 1986), intoxicados com o MFA-Na, os quais mostraram aumento significante nos níveis de glicose nestes animais.

No entanto, ao contrário do que se supunha, os dados aqui obtidos mostraram que ratos que receberam tanto o padrão, como aqueles animais tratados com a planta (Ar1), não apresentaram diferenças significantes em relação àqueles níveis obtidos dos animais do grupo controle; além disto, os animais do grupo Ar2 mostraram níveis de glicose significantemente menores que aqueles que não receberam tratamento. Neste momento, pouco pode ser especulado a respeito deste resultado obtido; no entanto, uma possível explicação poderia estar relacionada ao tempo no qual se coletou o sangue para a avaliação bioquímica. No presente estudo, os níveis plasmáticos de glicose foram dosados após seis horas da administração dos extratos e do MFA-Na. Por outro lado, na pesquisa conduzida por Bosakowski e Levin, (1986) empregando a mesma espécie animal, realizaram tal coleta num período de tempo maior, aproximadamente 8 horas após a intoxicação

com a substância; ainda, assim, é possível supor que no presente estudo, não houve tempo para que a alteração bioquímica ocorresse. Este resultado aqui obtido indica que a avaliação da glicose não seja um bom subsídio para o auxílio no diagnóstico da intoxicação pelo MFA-Na, principalmente se a ingestão ocorreu num curto período de tempo.

Finalizando, o presente trabalho foi o primeiro a identificar a presença do ácido monofluoroacético nas folhas de *A. rígida* (APÊNDICE A). Outra contribuição para a toxicologia se refere à metodologia aqui estabelecida. Assim, este estudo fitoquímico inicial aqui estabelecido, permitirá o desenvolvimento de técnicas visando a identificação deste composto em outras plantas e até mesmo em material biológico. Também permitirá desenvolver metodologias nas quais a identificação seja realizada de forma rápida e relativamente simples. Tal implementação tem grande importância, pois implica diretamente tanto no que se refere ao diagnóstico de intoxicação por plantas que causam morte súbita em nosso país e também pelo diagnóstico de intoxicação acidental com o MFA-Na, empregado como rodenticida, tanto nos animais como no ser humano, haja vista que embora o uso deste composto seja proibido no Brasil, os dados do CEATOX (2012) revelam que há um crescimento significante de casos de intoxicação por este composto.

Conclusões

6 CONCLUSÕES

- Não houve perda total do princípio tóxico de *A. rigida*, em nenhum dos procedimentos empregados na avaliação bioguiada da influência de diferentes tratamentos sobre os extratos hidroalcoólico e aquoso.

- Tanto a fase reversa polimérica Oasis® HLB quanto o copolímero estireno-divinilbenzeno XAD-2 mostraram-se efetivos na pré-purificação do extrato hidroalcoólico de *A. rigida*.

- A técnica de CCDP promoveu, a contento, a purificação do princípio tóxico de *A. rigida*, uma molécula com pequena massa molecular e muito polar.

- A caracterização química do princípio ativo de *A. rigida*, por comparação de seu espectro de infravermelho com o do padrão de MFA-Na, mostrou-se plenamente viável.

- *A. rigida* produz três sais halogenados: o mono (majoritário), o di e o trifluoracetatos.

- A administração dos extratos de *A. rigida* e do padrão de MFA-Na causou alterações nos níveis de cálcio, citrato e glicose sendo estes parâmetros considerados bioindicadores de efeito ao MFA-Na.

Referências

REFERÊNCIAS

ALLENDER, W. J. Determination of sodium fluoroacetate (compound 1080) in biological tisues. **Journal. of Analytical Toxicolgy**, v. 14, p. 45-49, 1990.

ALLENDER, W. J. The determination of sodium monofluoroacetate (compound 1080) in formulation and technical samples by high pressure liquid chromatography. **Journal of Liquid Chromatography**, v. 13, n. 17, p. 3465-3471, 1990.

ALVES, P. L. de C. A.; PAVANI, M. C. M. D. **Instruções básicas para coleta e preparo de material botânico a ser herborizado**. Jaboticabal: FUNEP, 1991.

ANDERSON, W. R. Eight segregates from the neotropical genus *Mascagnia* (Malpighiaceae). **Novon: A Journal for Botanical Nomenclature**, v. 16, n. 2, p. 168-204, 2006.

APLIN, T. E. H. Poison plants of Western Australia. Toxic species of genera *Gastrolobium* and *Oxylobium*. **Journal of Agriculture, Western Australia**, v. 8, p. 42-52, 1968.

APLIN, T. E. H.; KING, D. R.; OLIVER, A. J. The distribution and ecology of the toxic species of *Gastrolobium* and *Oxylobium* in South-western Australia in relation to the tolerance of native mammals to fluoroacetate. **Toxicon**, v. 21, n. 3, p. 21-24, 1983.

ANNISON, E. F.; HILL, K. J.; LINDSAY, D. B.; PETERS, R.A. Fluoroacetate poisoning in sheep. **Journal of Compared Pathology,** Liverpool, v. 70, p. 145-155, 1960.

AUSTRÁLIA. Australian Pesticides and Veterinary Medicine Authority. **Sodium fluoroacetate final review report and regulatory decision**, Kingston: APVMA, 2008. 83 p.

BARBOSA, L. C. A. **Espectroscopia no Infravermelho na caracterização de compostos orgânicos.** Minas Gerais: UFV (N/D), 2007

BARCELÓ, J. R.; OTERO, C. Infrared spectra of the fluorinated acetic acids in condensed and vapour phase. **Spectrochimica Acta**, v. 18, p. 1231-1247, 1962.

BAUER, K.; GROS, L.; SAUER, W. **Thin Layer Chromatografhy – an introduction**. Heidelberg: Merck, 1991. 66 p.

BERTINATO, A. E. Plantas tóxicas no planalto mineiro. **O. Ruralista**, Belo Horizonte, v. 17, p. 284-289, 1979.

Bibioteca virtual de espectros *KnowItAll® AnyWare.* Disponível em: https://www.knowitallanyware.com. Acesso em: 03 fev. 2012

BOSAKOWSKI, T.; LEVIN, A. A. Serum citrate as a peripheral indicator of fluoroacetate and fluorocitrate toxicity in rats and dogs. **Toxicology and Applied Pharmacol**ogy, v. 85, p. 428-436, 1986.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária –ANVISA. Portaria 326, de 9 de novembro de 2005. Aprova o regulamento técnico para produtos desinfectantes domissanitários harmonizado no âmbito do Mercosul através da Resolução n. 49/99 **Diário Oficial da União**, Poder Executivo, de 14 de novembro de 2005. Disponível em: http://e-legis.bvs.br/leisref/public/showAct.php?id=19641#. Acesso em: 01 jul. 2012.

BURGER, I. H.; FLECKNELL, P. A. Poisoning. In: CHANDLER, E. A.; GASKELL, C. J.; GASKELL, R. M. **Feline medicine and therapeutics**. New York: Blackwell Science, 1994. p. 656–677.

CASPER, H. H.; McMAHON, T. L.; PAULSON, G. D. Capillary gas chromatographic-mass spectrometric determination of fluoroacetate in animal tissues. **Journal of the Assocication of Official Analytical Chemistry**., v. 68, n. 4, p. 722-725, 1985.

CEATOX-SP, Centro de assistência toxicológica do ICR – HCFMUSP. Disponível em: www.ceatox.org.br. Acesso em: 25 jun. 2012

CHI, C. H.; CHEN, K. W.; CHAN, S. H.; WU, M. H.; HUANG, J. J. Clinical presentation and prognostic factors in sodium monofluoroacetate intoxication. **Clinical Toxicology**, v. 34, n. 6, p. 707-712, 1996.

CHI, C. H.; LIN, T. K.; CHEN, K. W. Hemodynamic abnormalities in sodium monofluoroacetate intoxication. **Human and Experimental Toxicology**, v. 18, p. 351-353, 1999.

CHILDERS, E.; STRUTHERS, G. W. infrared evaluation of sodium salts of organic acids. Analytical Chemistry, v. 27, n. 5, p. 737-741, 1955.

COLLICCHIO-ZUANAZE, R. C. **Perfil hematológico, bioquímico, histopatológico e toxicológico de gatos induzidos experimentalmente com monofluoroacetato de sódio**. 2006. 168 f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2006.

COLLICCHIO-ZUANAZE, R. C.; SAKATE, M.; CROCCI, A. J. Variabilidade clínica na determinação da dose tóxica oral em intoxicação experimental por fluoroacetato de sódio em gatos. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 43, n. 1, p. 117-124, 2006.

COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L.; BONATO, P. S. **Fundamentos de cromatografia**. Campinas: UNICAMP, 2006. 456 p.

COUCEIRO, J. E. M.; SILVA, A. C. C.; SILVA, J. A. Observações e ensaios sobre a alegada intoxicação de bovinos por plantas, no Estado de Pernambuco. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA, 15., 1976, Rio de Janeiro. **Anais...**, Rio de Janeiro: SBMV, 1976. p. 45-46.

CUNHA, L. C. **Avaliação dos efeitos tóxicos de *Mascagnia rigida* em ratos. Estudo anatomopatológico. Comparação entre metodologias cromatográficas para detecção do fluoroacetato de sódio**. 2008. 100 f.Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

DAVIS, C. C.; ANDERSON, W. R. A complete generic phylogeny of Malpighiaceae inferred from nucleotide sequence data and morphology. **American Journal of Botany**, v. 97, n. 12, p. 2031–2048, 2010.

DEMARCHI, A. C. C.; MENEZES, M. L.; MERCADANTE, A.; VASSILLIEF, I. Determination of the sodium monofluoroacetate in serum by gas chromatography. **Chromatographia**, v. 54, p. 402-404, 2001.

DÖBEREINER, J.; TOKARNIA, C. H. Intoxicação de bovinos pela "erva de rato" *(Palicourea macgravii)* no Vale do Itapicuru, Maranhão. **Arquivos do Instituto Biológico Animal**, v. 2, p. 83-91, 1959.

DÖBEREINER, J.; TOKARNIA, C. H.; SILVA, M. F. Intoxicação por *Arrabidaea bilabiata* (Bignoniaceae) em bovinos na região Amazônica do Brasil**. Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 3, p. 17-24, 1983.

EASON, C. Sodium monofluoroacetate (1080) risk assessment and risk communication. **Toxicology**, v. 27, p. 181-182, 2002.

EASON, C.; MILLERI, A.; OGILVIE, S.; FAIRWEATHER, A. An updated review of the toxicology and ecotoxicology of sodium fluoroacetate (1080) in relation to its use as a pest control tool in New Zealand. **New Zealand Journal of Ecology**, v. 35, n. 1, p. 1-20, 2011.

FERNANDES, N. S.; MACRUZ, R. Toxicidade da "corona", *Mascagnia pubiflora* (Juss.) Griseb. (Malpighiaceae). **Arquivos do Instituto Biológico Animal**, v. 31, p. 1-4, 1964.

GAL, E. M.; PETERS, R. A.; WAKELIN, R. A. Some effects of synthetic fluorocompounds on the metabolism of acetate and citrate. **The Biochemical Journal**, v. 64, p. 161-168, 1956.

GARRIERO, B.; HUGHES, P.E.; LARDY, H. Effect of fluoroacetate on hepatic gluconeogenesis. **Fluoride**, v. 17, p. 94-104, 1984.

GAVA, R.; CRISTANI, J.; BRANCO, J. V.; NEVE, D. S.; MONDADORI, A. J.; SOUZA, R. S. Mortes súbitas em bovinos causadas pela ingestão de *Mascagnia* sp (Malpighiaceae) no estado de Santa Catarina. **Pesquisa Veterinária Brasileira,** v. 18, p. 16-20, 1997.

GODOY, H. M.; CARMEN, V. M. Myocardial adenine nucleotides, hexose phosphates and inorganic phosphate, and the regulation of phophofructokinase activity during fluoroacetate poisoning in the rat. **Biochemistry Pharmacology**, Oxford, v. 23, p. 3179-3189, 1974.

GOH, C. S. S.; HODGSON, D. R.; FEARNSIDE, S. M.; HELLER, J.; MALIKIDES, N. Sodium monofluoroacetate (Compound 1080) poisoning in dogs. **Australian. Veterinary Journal**, v. 83, p. 474-479, 2005.

GÓRNIAK, S. L.; PALERMO-NETO, J.; SPINOSA, H. S. Plantas tóxicas de interesse agropecuário: *Palicourea marcgravii*. **A Hora Veterinária**, v. 39, p. 40-44, 1987.

GÓRNIAK, S. L.; SPINOSA, H. S. Interação entre plantas e herbívoros: características da intoxicação por *Palicourea Marcgravii* em bovinos. **Comunicações Científicas da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da USP**, v. 14, n. 2, p. 175-180, 1990.

GÓRNIAK, S. L. Plantas tóxicas de interesse agropecuário. In: SPINOSA, H . S.; GÓRNIAK, S. L.; PALERMO-NETO, J. **Toxicologia aplicada à medicina veterinária**. São Paulo: Manole, 2008. p. 415-458.

HARAGUCHI, M. Plantas tóxicas de interesse na agropecuária. **Biológico**, São Paulo, v.65, n.1/2, p.37-39, 2003.

HARRIS, W. F. Clinical toxicities of dogs. **Veterinary Clinics of North America**, v. 5, p. 605–622, 1975

HELAYEL, M. A.; CALDAS, S. A.; PEIXOTO, T. C.; FRANÇA, T. N.; TOKARNIA, C. H.; DÖBEREINER, J.; NOGUEIRA, V. A.; PEIXOTO, P. V. O antagonismo com acetamida em experimentos com ovinos, caprinos e coelhos indica monofluoroacetato como princípio tóxico de *Pseudocalymma elegans* Bignoniaceae. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 31, n. 10, p. 867-874, 2011.

HOEHNE, F. C. Plantas e substâncias vegetais tóxicas e medicinais. **O Estado de São Paulo**, São Paulo, 1939. p. 32.

HUANG, T. Y.; PANG, X. Q.; CH'ANG, H. L. Prophylactic effect of reserpine in cardiac failure caused by monofluoroacetic acid derivatives. **Acta of Pharmacology and Toxicology**, v. 47, p. 78-80, 1980.

HUMPHREYS, D. J. **Veterinary Toxicology**. London: Bailliere Tindall, 1988. 356 p.

JAMES, L. F. Solving poisonous plant problems by a team approach. In: COLEGATE S. M.; DORLING P. R. (Ed.). **Plant associated toxins**. Wallingford: CAB International, 1994. p.1-6.

JAMES, L. F.; PANTER, K. E.; MOLYNEUX, R. J.; STEGELMEIER, B. L.; WAGSTAFF, D. J. Plant toxicants in milk. In: COLEGATE, S. M.; DORLING P. R. (Ed.). **Plant associated toxins.** Wallingford CAB International, 1994. p.83-88.

JONES, D. A. Why are so many foods Plants cyanogenic. **Phytochemistry**, v. 47, n. 2, p 155-162, 1998

KAGARISE, R.E. Infrared spectrum of trifluoracetic acid vapor. **The Journal of Chemical Physics**, v. 27, n. 2, p. 519-522, 1957.

KALMBACH, E. R. "Ten-eighty," A war-produced rodenticide. **Science**, v. 102, p. 232-233, 1945.

KREBS, H. C.; KEMMERLING, W.; HABERMEHL, G. Qualitative and quantitative determination of fluoroacetic acid in *Arrabidaea bilabiata* and *Palicourea marcgravii* by F-19-NMR Spectroscopy. **Toxicon**, v. 32, n. 6, p. 909-913, 1994.

LINGEMAN, H. T.; JANDEM, U. R. Sample pretreatment procedures. In: Detection-oriented derivatization techniques in liquid chromatography. New York: Marcel Denker, 1990. p.85-151.

MARAIS, J. S. C. Monofluoroacetic acid, the toxic principle of Gifblaar, *Dichapetalum cymosun* **. Onderstepoort Journal of Veterinary Science and Animal Industry**, v. 20, n. 1, p.67-73, 1944.

MARRAZZI, M. A.; HOLLIDAY, J. F. Comparison of insulin hypoglycemia-induced and fluoroacetate-induced convulsions in gold thioglucose lesioned mice. Biochemistry and Pharmacology, v. 30, p. 3231-3237, 1981.

MAX, J. J.; CHAPADOS, C. Infrared spectroscopy of aqueous carboxylic acids: comparison between different acids and their salts. **The Journal of Physical Chemistry**, v, 108, p. 3324-3337, 2004.

McGARY, E. D.; MELOAN, C. E. A rapid qualitative method for the detection of monofluoroacetate acid (1080) in the presence of sodium fluoride in liquid baits. **Analytical Letters**, v. 15, p. 1051-1056, 1982.

MEDEIROS, R. M. T.; NETO, S. A. G.; BARBOSA, R. C.; LIMA, F.; RIET-CORREA, F. Sudden bovine death from *Mascagnia rigida* in Northeastern Brazil. **Veterinary and Human Toxicology**, v. 44, n. 5, p. 286-288, 2002.

MEHLMAN, M. A. Inhibition of pyruvate carboxylation by fluorocitrate in rat kidney mitochondria. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v.243, n. 8, p. 1919-1925, 1967.

MELLO, E. M. M.; FERNANDES, J. S. Contribuição ao estudo de plantas tóxicas brasileiras. Rio de Janeiro: Serviço de Informação Agrícola- Ministério da Agricultura. RJ. 1941. 106 p.

MINNAAR, P. P.; SWAN, G. E.; McCRINDLE, R. I.; BEER, W. H. J.; NAUDÉ, T. W. A. High-Performance Liquid Chromatographic Method for the Determination of Monofluoroacetate. **Journal of Chromatographic Science**, v. 38, p. 16-20, 2000.

MURADIAN, J. **"Espectroscopia no infravermelho"**, Universidade de São Paulo, Instituto de Química – Departamento de Química Fundamental. Distribuição interna, Brasil, 1980.

NIEMINEN, J., PETTERSSON, M.; RASANEN, M. Matrix Isolation Infrared and Ab Initio Studies on Conformers of Fluoroacetic and Chloroacetic Aci. **Journal of Physical Chemistry, v.** 97, p. 10925-10936, 1993.

NOGUEIRA, V. A.; FRANÇA, T. N.; PEIXOTO, T. C.; CALDAS, S. A.; ARMIÉN, A. G.; PEIXOTO, P. V. Intoxicação experimental por monofluoroacetato de sódio em bovinos: aspectos clínicos e patológicos. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 30, n. 7, p. 533-540, 2010.

O'HAGAN, B. J. Fluoroacetate poisoning in seven domestic dogs. **Australian Veterinary Journal**, v. 82, p. 756-758, 2004.

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

OMARA, F.; SISODIA, C. S. Evaluation of potential antidotes for sodium fluoroacetate in mice. **Veterinary and Human Toxicology**, v. 32, p. 427-429, 1990.

ORTIS, M. **Comissão externa destinada a acompanhar as investigações sobre o envenenamento de animais ocorrido na Fundação Zoológico de São Paulo** (Envenenamento no Zoológico de São Paulo). [2005]. Disponível em:<www.camara.gov.br/sileg/integras/292702.pdf>. Acesso em: 01 jan. 2012.

OSWEILER, G. D.; CARSON, T. L.; BUCK, W. B.; VAN GELDER, G. A. **Clinical and diagnostic veterinary toxicology**. 3. ed. Dubuque, Iowa: Kendall/Hunt Publishing Company, 1985. 494 p.

PACHECO, G.; CARNEIRO, V. Estudos experimentais sobre plantas tóxicas. Intoxicação dos animais pela "erva de rato da mata" *Palicourea marcgravii* st. Hil. **Revista Sociedade Paulista Medicina Veterinária**, v. 2, p. 23-46, 1932.

PACÍFICO DA SILVA, I.; LIRA, R. A.; BARBOSA, R. R.; BATISTA, J. S.; SOTO-BLANCO, B. Intoxicação natural pelas folhas de *Mascagnia rigida* (Malpighiaceae) em ovinos. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 75, n. 2, p. 229-233, 2008.

PALERMO-NETO, J.; MORAES-MOREAU, R. L. Monofluoroacetato de sódio (Composto 1080). **Folha Médica**, v. 110, p. 59–65, 1995.

PAVIA, D. L.; LAMPMAN, G. M.; KRIZ, G. S.; VYVYAN, J. R. **Introdução à espectroscopia**. (Tradução da 4ª edição norte-americana) Cengage Learning, São Paulo, 2010. 699 p.

PEIXOTO, T. C.; NOGUEIRA, V. A.; COELHO, C. D.; VEIGA, C. C. P.; PEIXOTO, P. V.; BRITO, M. F. Avaliações clínico-patológicas e laboratoriais da intoxicação experimental por monofluoroacetato de sódio em ovinos. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 30, n. 12, p. 1021-1030, 2010.

PETERS, R. A. **Biochemical lesions and lethal synthesis**. Macmillan: New York, 1963.

PIETRZYK, D. J. Organic Polymeric Stationary Phases. **High Performance Liquid Chromatography**, v. 98, p. 223-276, 1989.

REDINGTON, R. L.; LIN, K. C. **Journal of Chemical Physics**, v. 54, p. 4111, 1971.

RIET-CORREA, F.; MEDEIROS, R. M. Intoxicações por plantas em ruminantes no Brasil e no Uruguai: importância econômica, controle e riscos para a saúde pública. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 21, n. 1, p. 38-42, 2001.

RIET-CORREA, F.; MEDEIROS, R. M. T.; TOKARNIA, C. H.; DÖBEREINER, J. Toxic plants for livestock in Brazil: Economic impact, toxic species, control measures and public health implications. In: PANTER, K.E.; WIERENGA T. L.; PFISTER J. A. (Ed.). **Poisonous plants**: global research and solutions. Wallingford: CAB International, 2007. p. 2-14.

ROKITA, S. E.; WALSH, C. Turnover and inactivation of bacterial citrate lyase with 2-fluorocitrate and 2-hydroxycitrate stereoisomers. **Biochemistry**, Washington, v. 22, n. 12, p. 2821-2828, 1983.

ROSSETTI, A. C. P. A.; CORSI, M. Plantas tóxicas de interesse pecuário. Projeto CAPIM- Pesquisa e Extensão. 2009. Disponível em: http://www.projetocapim.com.br;. Acesso em: 4 abr. 2012

SPENCER, A. F.; LOWENSTEIN, J. M. Citrate content of liver and kidney or rat in various metabolic states and in fluoroacetate poisoning. **Biochemistry Journal**, v. 103, p. 342-348, 1967.

SWARTS, F. Sur l'acide fluoroacétique. **Bulletin de la Societe Chimique de France**, Sér.3, Paris, v. 15, p. 1134, 1896.

STEYN, D. G. **The Toxicology of Plants in South Africa together with a Consideration of Poisonous Foodstuffs and Fungi.** CAB Direct: Steyn, D. G., 1934. 681 p.

TOKARNIA, C. H.; CANELLA, C. F. C.; DÖBEREINER, J. Intoxicação por um "tingui" (*Mascagnia rigida*) em bovinos no Nordeste do Brasil. **Arquivos do Instituto Biológico Animal**, v. 4, p. 203-215, 1961.

TOKARNIA, C. H.; DÖBEREINER, J. Intoxicação por *Arrabidaea japurensis* em bovinos em Roraima. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 1, p. 7-17, 1981.

TOKARNIA, C. H.; DÖBEREINER, J. Intoxicação por *Palicourea juruana* (Rubiaceae) em bovinos e coelhos. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 2, p.17-26, 1982.

TOKARNIA, C. H.; DÖBEREINER, J. Intoxicação por *Palicourea marcgravii* (Rubiaceae) em bovinos no Brasil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 6, n. 3, p. 73-92, 1986.

TOKARNIA, C. H.; DÖBEREINER, J.; CANELLA, C. F. C.; GUIMARÃES, J. D. Intoxicação experimental por *Pseudocalymma elegans* (Vell.) Kuhlm. em bovinos. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 4, p. 195-204, 1969.

TOKARNIA, C. H.; DÖBEREINER, J.; COUCEIRO, J. E. M.; SILVA, A. C. C. Intoxicação por *Palicourea aeneofusca* (Rubiaceae), a causa de "mortes súbitas" em bovinos na Zona da Mata de Pernambuco. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 3, p. 75-79, 1983.

TOKARNIA, C. H.; DÖBEREINER, J.; PEIXOTO, P. V. Intoxicação por *Mascagnia aff. rigida* (Malpighiaceae) em bovinos no Norte do Espírito

Santo. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 5, p. 77-91, 1985

TOKARNIA, C. H.; DÖBEREINER, J.; PEIXOTO, P. V. Plantas que causam “morte súbita” (intoxicação superaguda). In: TOKARNIA, C. H. **Plantas tóxicas do Brasil.** Rio de Janeiro: Helianthus, 2000. p. 19-48.

TOKARNIA, C. H.; DÖBEREINER, J.; PEIXOTO, P. V. Poisonous plant affecting livestock in Brazil. **Toxicon**, v. 40, n. 12, p. 1635-1660, 2002.

TOKARNIA, C. H.; DÖBEREINER, J.; SILVA, M. F. Intoxicação por *Palicourea grandiflora* (Rubiaceae) em bovinos no Território de Rondônia. **Pesquisa Veterinária Brasileira,** v. 1, p. 85-94, 1981.

TOKARNIA, C. H.; DÖBEREINER, J.; SILVA, M. F. **Plantas tóxicas da Amazônia a bovinos e outros herbívoros**. Manaus: INPA, 1979. 95 p.

TOKARNIA, C. H.; PEIXOTO, P. V.; DÖBEREINER, J. Poisonous plants affecting heart function of cattle in Brazil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 10, n. 1/2, p. 1-10, 1990.

TWIGG, L. E.; KING, D. R. The impact of fluoroacetate-bearing vegetation on native Australian fauna: a review. **Oikos**, Copenhagen, v. 61, p. 412-430, 1991.

TWIGG, L. E.; KING, D. R.; BOWEN, L. H.; WRIGHT, G. R.; EASON, C. T. Fluoroacetate found in *Nemcia spathulata*. **Australian Journal of Botany**, v. 44, p. 411–412, 1996a.

TWIGG, L. E.; KING, D. R.; BOWEN, L. H.; WRIGHT, G. R.; EASON, C. T. Fluoroacetate content of some species of the toxic Australian plant genus, *Gastrolobium* and its environmental persistence. **Natural Toxins**, v. 4, p. 122–127, 1996b.

VASCONCELOS, J. S.; RIET-CORREA, F.; DANTAS, A. F. M.; MEDEIROS, R. M. T.; DANTAS, A. J. Mortes súbitas em bovinos causadas por *Palicourea aeneofusca* (Rubiaceae) e *Mascagnia rigida* (Malpighiaceae) na Zona da Mata Paraibana. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 28, p. 457-460, 2008a.

VASCONCELOS, J. S.; RIET-CORREA, F.; DANTAS, A. F. M.; MEDEIROS, R. M. T.; GALIZA, G. J.; OLIVEIRA, D. M.; PESSOA, A. F. A. Intoxicação por *Mascagnia*

rigida (Malpighiaceae) em ovinos e caprinos. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 28, p. 521-526, 2008b.

VICKERY, B.; VICKERY, L. M. The synthesis and defluorination of monofluoroacetate in some *Dichapetalum* species. **Phytochemistry**, v. 14, n. 2, p. 423-427, 1975.

VON MARTIUS, C. F. P.; EICHLER, A. W., URBAN, I. ***Flora Brasiliensis***, v. XII, Part I, Fasc. 21, Col. 91-92, 1858.
WILLIAMSON, J. R. Glycolitic control mechanisms – III. Effects of iodoacetamide and fluoroacetate on flucose metabolism in the perfused rat heart. **Journal of Biological Chemistry**, v. 242, p. 4476-4485, 1967.

ZEFERINO, M. A.; COLLICCHIO-ZUANAZE, R. C.; MENEZES, M. L.; SAKATE, M. Validação de um método em cromatografia líquida para análise quantitativa do monofluoroacetato de sódio no soro de gatos intoxicados experimentalmente. **Revista Brasileira de Toxicologia**, v. 18, p. 172, 2005.

Apêndice

Toxicon 60 (2012) 329–332

Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Toxicon

journal homepage: www.elsevier.com/locate/toxicon

Isolation and characterization of sodium 2-fluoroacetate from *Mascagnia rigida* using chromatography and infrared spectroscopy

Luciana Castro da Cunha [a], Fernando Pípole [a], Luciana Retz de Carvalho [b], João Henrique Ghilardi Lago [c], Silvana Lima Górniak [a,*]

[a] *Department of Pathology, School of Veterinary Medicine and Animal Sciences, University of São Paulo, Av. Prof. Dr. Orlando Marques de Paiva 87, 05508-270 SP, Brazil*

[b] *Center of Phycological Research, Institute of Botany, Av. Miguel Estéfano, 3687, 04301-902 São Paulo, SP, Brazil*

[c] *Institute of Environmental Science, Chemistry and Pharmacy, Federal University of São Paulo (UNIFESP), Rua Prof. Artur Riedel 275, Diadema, 09972-270 SP, Brazil*

ARTICLE INFO

Article history:
Received 11 December 2011
Received in revised form 11 April 2012
Accepted 18 April 2012
Available online 26 April 2012

Keywords:
Poisonous plants
Sudden death
Monofluoroacetic acid
Mascagnia rigida

ABSTRACT

Sodium monofluoroacetate was first identified in *Dichapetalum cymosum*, a South African plant that can cause livestock poisoning and death. After, several other plants also showed to contain this toxin, which leads to the "sudden death". *Mascagnia rigida*, a well identified poisonous plant, commonly found in northeast of Brazil also cause sudden death in cattle, which shows clinical signs similar to those produced by the ingestion of plants that contain monofluoroacetate. Our aim was to identify the toxic compound present in the aqueous extract of *M. rigida*. For this purpose, the dried and milled plant was extracted; the extract was lyophilized and submitted to successive chromatographic process, until the desired purity of the active compound was achieved. The study of this material by planar chromatography and by infrared spectrometry indicated that the toxin can be a mixture of mono, di and trifluoroacetate.

© 2012 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Since 1961, naturally occurring cases of poisoning in cattle, sheep and goats, by *Mascagnia rigida*, (Malpighiaceae) were reported throughout the Brazilian northeastern and southeastern regions. This plant, also known as "tingui", was firstly found in the municipalities of the States of Pará and Ceará, (Tokarnia et al., 1961) and later in the north of the State of Espírito Santo (Tokarnia et al., 1985), northeast of Minas Gerais State (Tokarnia et al., 2000), State of Rio Grande do Norte (Pacífico da Silva et al., 2008), and in many different regions in the State of Paraíba (Medeiros et al., 2002; Vasconcelos et al., 2008a, b).

In spontaneous outbreaks caused by *M. rigida*, clinical signs were reluctance to move, respiratory distress, muscular tremors, and tachycardia and were observed only when the animals were exercised. The more affected animals, if forced to walk, stagger and fall into convulsions, with death occurring 1 min to 2 h after the first manifestation of poisoning, whereas the less severely affected ones, if not moved, can recover. Histological observation of kidney tissue showed hydropic-vacuolar degeneration (Gava et al., 1998). Therefore, considering the clinical and histopathological characteristics of *M. rigida*, it is classified as belonging to the group of "Plants that cause sudden death", which is responsible for about 60% of cattle losses due to toxic plants, in Brazil (Medeiros et al., 2002).

About 40 species of plants that produce sudden death are spread mainly over the tropical, sub-tropical, and temperate regions of the world like Australia, South Africa and South America (Twigg et al., 1996). It is well established that monofluoroacetic acid or sodium monofluoroacetate

* Corresponding author. Tel.: +55 11 30917693; fax: +55 11 30917829.
E-mail addresses: lucascu@usp.br (L. Castro da Cunha), fpipole@usp.br (F. Pípole), lretz@uol.com.br (L. Retz de Carvalho), joaohglago@gmail.com (J.H. Ghilardi Lago), gorniak@usp.br (S.L. Górniak).

0041-0101/$ – see front matter © 2012 Elsevier Ltd. All rights reserved.
doi:10.1016/j.toxicon.2012.04.346

Author's personal copy

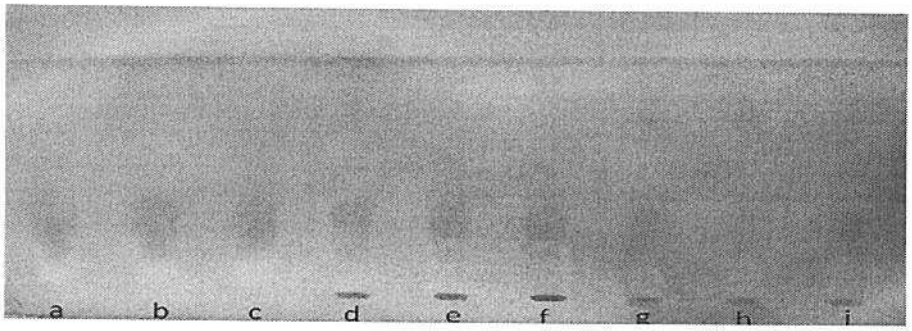


Fig. 1. Cellulose plate chromatogram of: a, b, c – SMFA standard; d, e, f –*Mascagnia rigida* aqueous extract; g, h, i –*Palicourea marcgravii* aqueous extract. Mobile phase: ethanol/ammonium hydroxide/pyridine/water (95:3:1:1, v/v/v/v); derivatization reagent: Nile Blue.

(SMFA) is the toxic principle of the *Dichapetalum cymosum* (Marais, 1944), and the Australian plants *Acacia georginae*, *Oxylobium parviflarum* and *Gastrolobium grandiflorum* (Aplin et al., 1983); on the other hand, considering plants from Brazil that cause sudden death, it was identified this substance as the toxic principle only in *Palicourea marcgravii* (Oliveira, 1963; de-Moraes-Moreau et al., 1995) and *Arrabidaea bilabiata* (Krebs et al., 1994).

SMFA is also a pesticide; thus, it has been used also as a rodenticide since 1940's in many countries such as United States, Australia and New Zealand (Beasley, 2002), leading to many cases of accidental poisoning in man and pets (Harris, 1975; Eason, 2002).

The mechanism of action of SMFA is well known, hence, this compound requires the transformation into fluorocitrate within cell mitochondria, which blocks the action of the enzyme aconitase, interrupting the Krebs cycle and ATP production in the intoxicated organism leading to the "lethal synthesis" (Peters, 1963). Thus, this interruption in ATP production results in strong toxic effect on the functioning of the heart and the central nervous system. A predominance of cardiac or nervous symptoms depends on the animal species affected, thus in cattle predominantly affects heart (Tokarnia et al., 2002), while in dogs the SNC is the main system affected (Goh et al., 2005).

Taking into account that animals intoxicated by *M. rigida* presents the same clinical symptoms described by plants that contain SMFA and previous studies conducted in our laboratory revealed positive results of a prior planar chromatographic study, comparing crude *M. rigida* samples with a SMFA standard, the aim of the current study was to confirm the identity of *M. rigida*'s toxic principle, by isolating, purifying and chemically characterizing this active compound.

2. Material and methods

2.1. Plant material

M. rigida was collected in Cabeceiras, Paraíba, Brazil and authenticated (voucher specimen # HCSTR 1294) and deposited in the Centro de Saúde e Tecnologia Rural Herbarium – CSTR.

SMFA standard was of analytical grade, Pestanal®, 99,7% and was obtained from Sigma. Microcrystalline cellulose plates 20 × 20 cm, analytical grade solvents, and reagents were from Merck®. XAD-2 was treated prior to use according to manufacture's instructions, and was dry-packed into a glass column (inner diameter 2.5 mm, height 30 cm).

2.2. Plant extraction and characterization of toxic compound by planar chromatographic

The air-dried plant (200 g) was ground in a Marconi MA 048 mill and extracted with deionized water (4x). The extract was filtered, frozen and lyophilized; the lyophilized powder was suspended in milli-Q water (w/v 1:1) before submitting to comparative planar chromatography in cellulose plates for investigating the presence of SMFA. Ethanol/ammonium hydroxide/pyridine/water (95:3:1:1, v/v/v/v) were employed as the mobile phase and Nile Blue as a post-derivatization agent (Vickery et al., 1973). All planar chromatographic posterior analyses were developed under the conditions described here. As a chemical proof, it was used *P. marcgravii* aqueous extract, obtained in the same way as the *M. rigida* extract.

2.3. Isolation of toxic principle

In sequence, this extract (13 g) was loaded into a XAD-2 column and then subjected to gradient elution with solvents of decreasing polarity: H_2O (**F1**); H_2O/MeOH (80:20, v:v) (**F2**); H_2O/MeOH (40:60, v:v) (**F3**); and MeOH 100% (**F4**). **F1** was lyophilized and the others fractions (**F2** – **F4**) were concentrated under vacuum until complete elimination of the organic solvent and subsequently lyophilized. All dried-fractions plus an authentic sodium 2-fluoroacetate sample were analyzed by planar chromatography. The band at the same R_f as the standard SMFA was extracted with deionized water, lyophilized, and chromatographically compared to the standard SMFA.

2.4. Infrared spectroscopy

Powder infrared spectra of the lyophilized extracted band and of the SMFA standard were recorded at temperature room, over the 50- to 4000 cm^{-1} range, on a Perkin Elmer FT-IR Spectrum™ Spectrophotometer, equipped with a KBr beam splitter and a standard DTGS detector. Both simplex were prepared as KBr pellets.

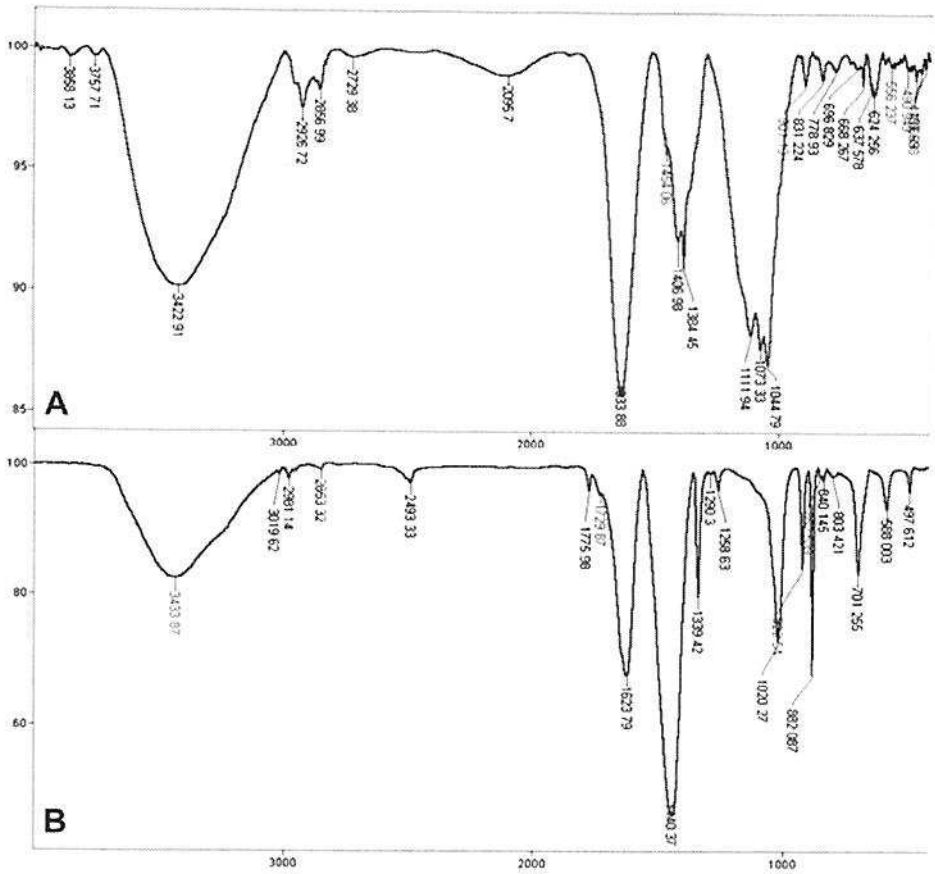


Fig. 2. Infrared spectra from: A) *Mascagnia rigida* purified sample; B) SMFA standard.

3. Results and discussion

3.1. Characterization of toxic compound by planar chromatographic

M. rigida is known to be toxic to livestock since 1961, as outlined in the literature, and the description of the signs of intoxication and the anatomical and histopathological findings observed in "sudden death" caused by its toxic component fits perfectly among the ones provoked by SMFA (Tokarnia et al., 1961). In order to corroborate the presence of toxin and, if possible, to obtain information about their chemical nature, in a previous study, we had performed toxicological tests in rats with different extracts of this plant, with *P. marcgravii* extract, a SMFA producer plant, and with SMFA standard solution. The comparative study on signs and macro and microscopic lesions produced by these different toxic agents showed a similar pattern of poisoning, suggesting that is the same toxic compound (unpublished data).

Based on this information, planar chromatography was used to determine the presence of SMFA in the aqueous extract of *M. rigida*. The result of this study is shown in Fig. 1, where blue-spots at R_f 0.18 are visible in the SMFA standard and in *M. rigida* and *P. marcgravii* aqueous extracts, indicating the existence of the same compound in the three samples.

3.2. Isolation of toxic principle

The analyses by planar chromatography of the fractions (**F1** – **F4**) obtained from XAD-2 column showed that the SMFA eluted in **F1**, so this fraction were submitted to preparative paper chromatography with ethanol/ammonium hydroxide/pyridine/water (95:3:1:1), as mobile phase, and the band at the same R_f as the standard SMFA was extracted with deionized water, lyophilized, and chromatographically compared to the standard SMFA.

The infrared spectra of this purified band and of the SMFA standard were shown in Fig. 2.

Table 1 shows the main vibration bands due to carboxylic groups observed for standard and purified sample; the presence of several bands in *M. rigida* sample indicates that there is a mixture of halogenated substances.

Table 1
Carboxilic vibration bands for SMFA standard and for *Mascagnia rigida* purified sample.

SMFA – standard	3433	1623	1440	882	
M. rigida purified sample	3422	1633	1454, 1406, 1384	1111, 831, 1073, 901	669, 696

Author's personal copy

In conclusion, we verified here that as previous described for *P. marcgravii* (Oliveira, 1963) and *Arrabidae bilabiata* (Krebs et al., 1994), Brazilian's toxic plants which also belong to the group that cause "sudden death", *M. rigida* also contains monofluoroacetic acid.

Acknowledgements

This work was supported by CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior).

Conflict of interest

The authors declare that there are no conflicts of interest.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at doi:10.1016/j.toxicon.2012.04.346.

References

Aplin, T.E.H., King, D.R., Oliver, A.J., 1983. The distribution and ecology of the toxic species of *Gastrolobium* and *Oxylobium* in South-western Australia in relation to the tolerance of native mammals to fluoroacetate. Toxicon 21 (3), 21–24.

Beasley, M., 2002. Guidelines for the Safe Use of Sodium Fluoroacetate (1080). Occupational Safety & Health Service, New Zealand. http://www.osh.govt.nz/order/catalogue/pdf/1080guidelines.pdf (accessed 26.06.11).

de-Moraes-Moreau, R.L., Haraguchi, M., Morita, H., Palermo-Neto, J., 1995. Chemical and biological demonstration of the presence of monofluoroacetate in the leaves of *Palicourea marcgravii* St. Hil. Braz. J. Med. Biol. Res. 28 (6), 685–692.

Eason, C., 2002. Sodium monofluoroacetate (1080) risk assessment and risk communication. Toxicology 181–182, 523–530.

Gava, A., Cristani, J., Branco, J.V., Neves, D.S., Mondadori, A.J., Sousa, R.S., 1998. Sudden death in cattle by *Mascagnia* sp (Malpighiaceae) in the State of Santa Catarina. Pesq. Vet. Bras 18 (1), 16–20.

Goh, C.S.S., Hodgson, D.R., Fearnside, S.M., Heller, J., Malikides, N., 2005. Sodium monofluoroacetate (Compound 1080) poisoning in dogs. Aust. Vet. J. 83, 474–479.

Harris, W.F., 1975. Clinical toxicities of dogs. Vet. Clin. North. Am. 5, 605–622.

Krebs, H.C., Kemmerling, W., Habermehl, G., 1994. Qualitative and quantitative determination of fluoroacetic acid in *Arrabidaea bilabiata* and *Palicourea marcgravii* by F-19-NMR Spectroscopy. Toxicon 32 (6), 909–913.

Marais, J.S.C., 1944. Monofluoroacetic acid, the toxic principle of Gifblaar, *Dichapetalum cymosun*. Onderstepoort J. Vet. Sci. Anim. Ind. 20 (1), 67–73.

Medeiros, R.M.T., Neto, S.A.G., Barbosa, R.C., Lima, F., Riet-Correa, F., 2002. Sudden bovine death from *Mascagnia rigida* in Northeastern Brazil. Vet. Hum. Toxicol. 44 (5), 286–288.

Oliveira, M.M., 1963. Chromatographic isolation of monofluoracetic acid from *Palicourea marcgravii* St. Hil. Experientia 19, 586.

Pacífico da Silva, I., Lira, R.A., Barbosa, R.R., Batista, J.S., Soto-Blanco, B., 2008. Intoxicação natural pelas folhas de *Mascagnia rigida* (Malpighiaceae) em ovinos. Arq. Inst. Biol. 75 (2), 229–233.

Peters, R.A., 1963. Biochemical Lesions and Lethal Synthesis. Macmillan, New York.

Tokarnia, C.H., Canella, C.F.C., Döbereiner, J., 1961. Intoxicação por um tingui (*Mascagnia rigida* Griseb.) em bovinos no Nordeste do Brasil. Arqs. Inst. Biol. Animal 4, 203–215.

Tokarnia, C.H., Döbereiner, J., Peixoto, P.V., 1985. Intoxicação por *Mascagnia aff. rigida* (Malpighiaceae) em bovinos no Norte do Espirito Santo. Pesq. Vet. Bras 5 (3), 77–91.

Tokarnia, C.H., Döbereiner, J., Peixoto, P.V., 2000. Plantas Tóxicas do Brasil. Helianthus, Rio de Janeiro.

Tokarnia, C.H., Döbereiner, J., Peixoto, P.V., 2002. Poisonous plant affecting livestock in Brazil. Toxicon 40 (12), 1635–1660.

Twigg, L.E., King, D.R., Bowen, L.H., Wright, G.R., Eason, C.T., 1996. Fluoroacetate found in *Nemcia spathulat*. Aust. J. Bot. 44, 411–412.

Vasconcelos, J.S., Riet-Correa, F., Dantas, A.F.M., Medeiros, R.M.T., Dantas, A.J., 2008a. Mortes súbitas em bovinos causadas por *Palicourea aeneofusca* (Rubiaceae) e *Mascagnia rigida* (Malpighiaceae) na Zona da Mata Paraibana. Pesq. Vet. Bras 28, 457–460.

Vasconcelos, J.S., Riet-Correa, F., Dantas, A.F.M., Medeiros, R.M.T., Galiza, G.J., Oliveira, D.M., Pessoa, A.F.A., 2008b. Intoxicação por *Mascagnia rigida* (Malpighiaceae) em ovinos e caprinos. Pesq. Vet. Bras 28, 521–526.

Vickery, B., Vickery, M.L., Ashu, J.T., 1973. Analysis of plant for fluoroacetic acids. Phytochemistry 12, 145–147.