LUCIANA CASTRO DA CUNHA

Avaliação dos efeitos tóxicos da *Mascagnia rigida* em ratos. Estudo anatomopatológico. Comparação entre metodologias cromatográficas para detecção do fluoroacetato de sódio

**São Paulo
2008**

LUCIANA CASTRO DA CUNHA

Avaliação dos efeitos tóxicos da *Mascagnia rigida* em ratos. Estudo anatomopatológico. Comparação entre metodologias cromatográficas para detecção do fluoroacetato de sódio

Dissertação 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 Mestre em Ciências

Departamento:

Patologia

Área de concentração:

Patologia Experimental e Comparada

Orientadora:

Profa. Dra. Silvana Lima Górnaiak

São Paulo
2008

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

BIBLIOTECA VIRGINIE BUFF D'ÁPICE
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA
E ZOOTECNIA DA USP

11.03.2008

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

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

T.1947
FMVZ

Cunha, Luciana Castro da

Avaliação dos efeitos tóxicos da *Mascagnia rigida* em ratos. Estudo anatomopatológico. Comparação entre metodologias cromatográficas para detecção do fluoroacetato de sódio / Luciana Castro da Cunha. – São Paulo: L. C. Cunha, 2008.

100 f. : il.

Dissertação (mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Patologia, 2008.

Programa de Pós-Graduação: Patologia Experimental e Comparada.
Área de concentração: Patologia Experimental e Comparada.

Orientadora: Profa. Dra. Silvana Lima Górnaiak.

1. Fluoroacetato de sódio. 2. Plantas tóxicas. 3. *Mascagnia rigida*. 4. CLAE. 5. CCD. I. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia

Comissão Bioética

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Intoxicação por fluoroacetato de sódio em animais: metodologia para diagnóstico toxicológico por meio da cromatografia líquida de alta eficiência em amostras biológicas", protocolado sob o nº924/2006, utilizando 50 (cinquenta) ratos, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Luciano Freitas Felício, 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 em reunião de 14/06/06".

(We certify that the Research "Intoxication of animals by sodium fluoroacetate methodology for toxicological diagnosis through high efficiency liquid chromatography from biological samples", protocol number 924/2006, utilizing 50 (fifty) rats, under the responsibility of Prof. Dr. Luciano Freitas Felício, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by Bioethic Commission of the Faculty of Veterinary Medicine and Zootechny of University of São Paulo and was approved in the meeting of the day 06/14/2006).

São Paulo, 19 de junho de 2006

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

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: CUNHA, Luciana Castro da

Título: Avaliação dos efeitos tóxicos da *Mascagnia rigida* em ratos. Estudo anatomopatológico. Comparação entre metodologias cromatográficas para detecção do fluoroacetato de sódio

Dissertação 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 Mestre em Ciências

Data: __/__/__

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____	Instituição: _____
Assinatura: _____	Julgamento: _____

Prof. Dr. _____	Instituição: _____
Assinatura: _____	Julgamento: _____

Prof. Dr. _____	Instituição: _____
Assinatura: _____	Julgamento: _____

“A Lenda Pessoal não é tão simples como parece. Pelo contrário, pode ser uma atividade perigosa. Quando queremos algo, colocamos em marcha energias poderosas, e já não podemos esconder de nós mesmos o verdadeiro sentido de nossa vida.

Quando queremos algo, fazemos uma escolha do preço a pagar. Seguir um sonho tem um preço. Pode exigir que abandonemos velhos hábitos, pode nos fazer passar dificuldades, ter decepções etc.

Mas, por mais alto que seja este preço, nunca é tão alto como o que é pago por quem não viveu sua Lenda Pessoal. Porque estes um dia vão olhar para trás, ver tudo o que fizeram, e escutar o próprio coração dizer: “Desperdicei minha vida”.

Acreditem, esta é uma das piores frases que alguém pode ouvir”.

(Paulo Coelho)

*Aos meus pais Joaquim e Sandra, aos meus irmãos Gabriela e
Guilherme, aos meus primos Adriano e Amanda, a minha avó
Diva e as minhas amigas inseparáveis Roberta e Rafaela, pela
paciência, carinho, amor e compreensão em todos os momentos da
realização deste trabalho. E por fazerem a cada dia minha vida
mais feliz e sempre apoiarem meus sonhos.*

Amo vocês !!!

A minha orientadora Profa. Dra. Silvana Lima Górnias, pelos conhecimentos transmitidos, pela amizade, confiança, apoio, paciência, exemplo de dedicação e pelo grande estímulo.

Agradeço especialmente a Fabiana Galtarossa Xavier, pelo apoio, paciência, confiança e amizade, que carinhosamente demonstrou para a realização deste trabalho.

Muito obrigada, pela sua valiosa colaboração.

Agradecimentos

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, Lílían Rose Marques de Sá, Paulo César Maiorka e Helenice de Souza Spinosa, pelas idéias, ensinamentos transmitidos e pelo auxílio quando necessário.

Ao Prof. Dr. Maurício Yonamine da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP, pela disponibilização de seu laboratório, pela amizade e ensinamentos transmitidos.

A Dra. Mitsue Haraguchi do Instituto Biológico de São Paulo, pelo auxílio e apoio no desenvolvimento desse trabalho.

Aos Prof. Dr. Manoel Lima de Menezes e Profa. Dra. Márcia Zeferino do Instituto de Química da Unesp, Bauru-SP, pela disponibilização de seu laboratório para etapas importantes do trabalho e pelos ensinamentos transmitidos.

Aos funcionários do biotério do VPT Cláudia, Herculano, Idalina, Luís, Nelson e Rosiris, 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 Magali, Priscila e Ricardo, pela paciência, auxílio nos experimentos e amizade.

Aos funcionários do Laboratório de Histologia do VPT Luciano e Cláudio, pela confecção das lâminas estudadas.

Às secretárias do VPT, da pós-graduação da FMVZ e da pós-graduação do VPT Cláudia, Cristina, Deise, Joana e Sílvia, pelo auxílio sempre que preciso.

Aos funcionários da informática Antônio e Miro, aos seguranças, e aos demais funcionários do VPT Cíntia, Lívia Lúcia, Luciana Torres, Marguiti, Romeika, Shirley e Tony, pela ótima convivência.

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

A todos os colegas do VPT que contribuíram com alguma etapa deste trabalho, tanto com ensinamentos para utilização de diversos aparelhos quanto na ajuda direta nos experimentos: Altamir, Andréia, Camila Lima, Camila Moreira e Fabiana.

A todos os colegas da pós-graduação do VPT: Alex, Alexandre, Aline, Alison, Altamir, Ana Carolina, Ana Paula, Andréa, Andréia, Antônio Carlos, Ausgusto, Beatriz, Beth, Bruno, Caio Rodrigues, Caio Silvestre, Camila Lima, Camila Moreira, Camila Simões, Carlos Portela, Daniel Cohn, Daniel Sanches, Daniel Stankevicius, Daniela, Dario, Denise, Domenica, Eduardo, Elaine, Fabiana, Felipe, Gisele, Glaucie, Heidge, Isis, João Paulo, Julia, Karin, Lucas, Luciana Lippi, Luciana Vismari, Marcos, Milena, Mirela, Mônica, Patrícia, Renato, Ricardo Akinaga, Ricardo Gare, Ricardo Lazzarini, Silmara, Soraya, Tereza, Thaís, Thiago, Viviane e Wanderley.

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

RESUMO

CUNHA, L. C. **Avaliação dos efeitos tóxicos da *Mascagnia rigida* em ratos. Estudo anatomopatológico. Comparação entre metodologias cromatográficas para detecção do fluoroacetato de sódio.** [Evaluation of *Mascagnia rigida* toxics effects, in rats. Pathological study. Comparison of chromatographics methods for sodium fluoracetate detection]. 2008. 100 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

O fluoroacetato de sódio (FAS), também conhecido como “composto 1080”, foi um raticida amplamente utilizado no combate de roedores a partir da década de 40, mas que teve seu uso proibido em diversos países, incluindo o Brasil, devido a sua alta toxicidade e ausência de tratamento efetivo nas intoxicações. Apesar deste fato, diversos casos de intoxicação ainda são registrados em seres humanos e animais, em virtude de seu uso ilícito como raticida doméstico ou adição em iscas nas intoxicações criminosas. O FAS, na natureza, pode ser encontrado, também, em algumas plantas tóxicas de grande importância no Brasil, como a *Palicourea marcgravii*, e possivelmente seja o princípio ativo tóxico de outras plantas de relevância, como a *Mascagnia rigida*. Neste sentido, este trabalho objetivou o estudo dos aspectos clínicos e anatomopatológicos encontrados nas intoxicações provocadas pelo FAS, em ratos, comparando estes com os encontrados nas intoxicações por extrato aquoso da *M. rigida*. Também foram comparadas metodologias analíticas para identificação deste agente tóxico utilizando cromatografia em camada delgada (CCD) e cromatografia de alta eficiência (CLAE) com dois tipos de detectores o de UV e o de Condutividade Iônica. Para tanto, quatro grupos contendo seis ratos Wistar, machos, receberam em dose única por via oral 7,0 mg/kg de FAS ou água destilada ou ainda 1,6 ou 3,2 g/kg de extrato aquoso de *M. rigida*, sendo avaliados os sinais clínicos apresentados por estes animais. Após eutanásia foram coletados fragmentos de cérebro, coração, fígado, rins, pulmão, intestino e baço para exame histopatológico. Tanto os animais que receberam FAS como os que receberam extrato aquoso de *M. rigida* apresentaram sintomatologia similar com presença de prostração, desconforto respiratório, tremores, pêlos arrepiados, cromodacriorreia, convulsão tônica e tônico-clônica. Na necropsia destes animais não foram observadas alterações macroscópicas, contudo alterações histopatológicas significativas foram encontradas no cérebro, miocárdio, fígado e rins. Os estudos das análises toxicológicas utilizando as três técnicas cromatográficas mostraram que os resultados obtidos na CCD foram adequados para detecção de FAS nas concentrações acima de 1,0 µg do padrão puro e as análises das duas plantas estudadas apresentaram resultados positivos para FAS. As técnicas utilizando CLAE, com dois diferentes detectores, mostraram que quando se utiliza detector de UV o limite de detecção é de 3,75 µg injetado ou de 75 µg/mL e foi possível, também, detectar a presença de FAS nas duas plantas estudadas, porém a técnica não se apresentou adequada para a detecção de intoxicação em tecido animal. O detector de condutividade iônica mostrou limite de detecção de 0,30 µg/mL, isto é, o mais sensível entre os três métodos estudados, e portanto o mais adequado para diagnóstico de intoxicação em tecido animal; no entanto, para identificação do FAS na *M. rigida* este método não se mostrou adequado devido a interferentes no extrato aquoso e no soro de animais intoxicados.

Palavras-chaves: Fluoroacetato de sódio. Plantas tóxicas. *Mascagnia rigida*. CLAE. CCD.

ABSTRACT

CUNHA, L. C. **Evaluation of *Mascagnia rigida* toxics effects, in rats. Pathological study. Comparison of chromatographics methods for sodium fluoracetate detection.** [Avaliação dos efeitos tóxicos da *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.

Sodium fluoroacetate (SFA), also known as "compound 1080," was a rodenticide widely used in the 1940s, but its use was banned in several countries, including Brazil, for its high toxicity and lack of an effective treatment in poisoning. Despite this fact, several cases of poisoning are still registered in humans and animals, because of their misuse as baits, in addition to criminal poisoning. SFA, in the form of natural molecules, can be found in some toxic plants of great importance in Brazil, such as *Palicourea marcgravii*, and possibly is the active principle of other plants of relevance, such as *Mascagnia rigid*. Therefore, this study aimed to evaluate the clinical and pathological findings in poisoning caused by the SFA in rats, and compare them with those found in poisoning by the aqueous extract of *M. rigid*. Moreover, we compared analytical methods for identifying this toxic agent using thin layer chromatography (TLC) and high performance liquid chromatography (HPLC) employing two types of detectors: ultraviolet (UV) and ionic conductivity. Therefore, four groups containing six male Wistar rats each, received a single oral dose of 7.0 mg / kg of SFA, an equal volume of distilled water, or 1.6 or 3.2 g / kg of an aqueous extract of *M. rigid*, and the clinical signs displayed by these animals were evaluated. After euthanasia fragments of brain, heart, liver, kidney, lung, intestine and spleen were collected for histological examination. Both the animals that received SFA and those who received the aqueous extract of *M. rigid* showed similar symptoms, including prostration, respiratory distress, tremors, shivering, and tonic or tonic-clonic seizures. At necropsy, these animals did not display macroscopic changes. Nevertheless, significant histopathological changes were found in the brain, heart, liver and kidneys. Toxicological analysis using the three chromatographic techniques described above showed that the results obtained in the TLC were suitable for detection of SFA at concentrations above 1.0 µg of pure standard, and analysis of the two plants mentioned showed positive results for SFA. The techniques using HPLC with two different detectors showed that when using the UV detector, the detection limit is of 3.75 µg (injected) or 75 µg / mL, and SFA could also be detected by these methods in the two plants studied, but the

technique does not seem suitable for the detection of intoxication in animal tissue samples. The ionic conductivity detector showed a detection limit of 0.30 $\mu\text{g} / \text{mL}$, therefore the most sensitive of the three methods studied, and hence is the most appropriate for diagnosis of poisoning in animal tissue; however, for the identification of SFA in the *M. rigid*, this method was not appropriate due to a putative interference in the aqueous extract.

Key words: Sodium fluoroacetate. Toxic plants. *Mascagnia rigida*. HPLC. TLC.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	20
2 OBJETIVOS E JUSTIFICATIVA.....	22
2.1 Objetivo geral.....	23
2.1.1 Comparar vantagens e desvantagens dos diferentes métodos de identificação analítica do fluoracetato de sódio propostos pela literatura como a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e a cromatografia em camada delgada (CCD)..	23
2.1.2 Comparar sinais clínicos e achados anatomo e histopatológicos observados entre os ratos intoxicados experimentalmente com fluoracetato de sódio ou com <i>Mascagnia rigida</i> objetivando avaliar a presença deste sal como o responsável pela toxicidade desta referida planta.....	23
2.2 Objetivos específicos.....	23
2.3 Justificativa.....	24
3 REVISÃO DE LITERATURA.....	25
3.1 Considerações gerais e toxicodinâmica (mecanismo de ação toxicológico) do monofluoroacetato de sódio.....	26
3.2 Toxicidade do fluoroacetato de sódio.....	31
3.3 Métodos diagnósticos e tratamentos.....	34
3.4 Cromatografia.....	36
3.4.1 Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).....	37
3.4.2 Cromatografia em camada delgada (CCD).....	38
3.4.3 Parâmetros cromatográficos.....	41
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	43

4.1 Local.....	44
4.2 Animais.....	44
4.3 Agente Tóxico.....	45
4.4 Planta Tóxica.....	46
4.5 Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) acoplada ao detector de UV..	48
4.5.1 Solventes, reagente e solução-padrão.....	48
4.5.2 Aparelhos e acessórios.....	48
4.5.3 Vidraria.....	49
4.5.4 Condições cromatográficas.....	49
4.5.5 Coluna cromatográfica.....	50
4.6 Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) acoplado ao detector de condutividade iônica.....	50
4.6.1 Solventes, reagentes e solução-padrão.....	50
4.6.2 Purificação da água.....	51
4.6.3 Condições cromatográficas.....	51
4.6.4 Coluna cromatográfica.....	52
4.7 Cromatografia em camada delgada (CCD).....	53
4.7.1 Solventes, reagentes e solução-padrão.....	53
4.7.2 Cromatoplaça.....	54
4.8 Extrações envolvidas nestas metodologias.....	55
4.8.1 Extração líquido-líquido do soro proveniente dos animais intoxicados.....	55
4.8.2 Extração do princípio ativo tóxico das plantas <i>Palicourea marcgravii</i> e <i>Mascagnia rigida</i>	57
5 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL E RESULTADOS.....	58

5.1 Experimento 1 - Intoxicação experimental em ratos; avaliação dos sinais clínicos e descrição dos achados necroscópicos e histopatológicos.....	59
5.1.1 Delineamento experimental.....	59
5.1.2 Resultados.....	61
<i>5.1.2.1 Características clínicas da intoxicação experimental por Mascagnia rigida em ratos.....</i>	<i>61</i>
<i>5.1.2.2 Análise anatomopatológica.....</i>	<i>63</i>
<i>5.1.2.2.1 Exame macroscópico.....</i>	<i>63</i>
<i>5.1.2.2.2 Exame microscópico.....</i>	<i>63</i>
5.2 Experimento 2 – Avaliação do comportamento cromatográfico do padrão de fluoroacetato de sódio e a sua identificação em plantas tóxicas utilizando a Cromatografia em Camada Delgada.....	69
5.2.1 Delineamento experimental.....	69
5.2.2 Resultados.....	70
5.3 Experimento 3 – Análise cromatográfica de soro proveniente de animais intoxicados experimentalmente utilizando Cromatografia líquida de alta eficiência com detector de condutividade iônica.....	72
5.3.1 Delineamento experimental.....	72
5.3.2 Resultados.....	73
5.4 Experimento 4 – Análise cromatográfica dos extratos aquosos das plantas tóxicas <i>Mascagnia rigida</i> e <i>Palicourea marcgravii</i>, utilizando CLAE com detector de UV.....	77
5.4.1 Delineamento experimental	77
5.4.2 Resultados.....	78
6 DISCUSSÃO.....	81

7 CONCLUSÕES.....	91
REFERÊNCIAS.....	93

Introdução

1 INTRODUÇÃO

O monofluoroacetato de sódio, também chamado de “composto 1080”, fluoroacetato ou ácido fluoroacético, foi sintetizado nos Estados Unidos, na década de 40, tendo como principal objetivo proteger o exército contra o ataque de roedores (BURGER; FLECKNELL, 1994). Por ser uma substância de difícil detecção química, alta toxicidade para outras espécies animais e pela ausência de tratamento eficiente para os casos de intoxicação, passou a ter seu uso proibido em diversos países a partir de 1972 (HARRIS, 1975; COLLICCHIO, 2002).

Entretanto, mesmo após a sua proibição, seu uso ilícito como rodenticida doméstico ainda tem sido apontado como causa de intoxicação acidental em homens e animais e em propostas criminosas com a finalidade de exterminar animais silvestres e de companhia (COLLICCHIO, 2002), como ocorreu recentemente na Fundação Parque Zoológico de São Paulo, quando dezenas de animais foram intencionalmente intoxicados com este agente.

O fluoroacetato pode ser encontrado naturalmente também como o princípio ativo das plantas tóxicas *Palicourea marcgravii* (“vicky” ou “cafezinho”) e *Arrabidea bilabiata* (“trepadeira da várzea da Amazônia”) sendo a primeira a principal planta tóxica para bovinos no Brasil, responsável pelo maior número de mortes (EGEKEZE; OEHME, 1979; PALERMO-NETO; MORAES-MOREAU, 1995; COLLICCHIO, 2002). Em outros países, o mesmo princípio ativo está presente em diversas outras plantas, como a *Dichapetalum cymosum* (“gifblaar”), no sul da África (MARAIS, 1944) e, na Austrália, a *Acacia georginae*, *Oxylobium parviflorum* e *Gastrolobium grandiflorum*.

Existem outras plantas tóxicas que causam sintomatologia semelhante, pertencentes ao denominado grupo de “Plantas que causam morte súbita”, mas que ainda não possuem um

princípio ativo identificado. Entre estas, está a *Mascagnia rigida* (“tingui”, “timbó”), a mais difundida e importante da região Nordeste, capaz de promover intoxicação natural em bovinos e caprinos (BATATINHA; SPINOSA; BERNARDI, 1988; MEDEIROS et al., 2002; SILVA et al., 2006; RIET-CORREA et al., 2007).

A toxicidade do fluoroacetato é bastante variável nas diferentes espécies animais estudadas (MCILROY, 1981). Dependendo da dose de exposição e da espécie animal, os sinais clínicos podem ter início dentro de 30 minutos até 2,5 horas (HUMPHREYS; CLARKE, 1991; BURGER; FLECKNELL, 1994) e tem evolução geralmente rápida e fatal. Os principais sistemas acometidos nos casos de intoxicação são o cardiovascular (arritmias e fibrilação cardíaca) (CHI; LIN; CHEN, 1999) e o nervoso (ansiedade, hiperatividade, alucinações e convulsões do tipo tônico-clônica).

O diagnóstico da intoxicação por fluoroacetato de sódio em animais é feita, na maioria das vezes, apenas baseando-se nos dados do histórico, sinais clínicos e alterações anatomopatológicas. Entretanto, o diagnóstico definitivo da intoxicação requer a identificação do agente tóxico por meio da análise toxicológica, a qual pode ser feito a partir de amostras de solo, sangue, tecidos, iscas líquidas e plantas tóxicas suspeitas de conterem o ácido fluoroacético.

Neste sentido, o presente trabalho objetivou o desenvolvimento de métodos cromatográficos (Cromatografia em Camada Delgada e Cromatografia Líquida de Alta Eficiência) para a identificação do fluoroacetato de sódio em tecidos animais e também a possível presença deste agente tóxico na planta *Mascagnia rigida* e a avaliação da viabilidade para a implementação dos mesmos no Laboratório de Farmacologia e Toxicologia do Departamento de Patologia da FMVZ/USP.

Objetivos e justificativa

2 OBJETIVOS E JUSTIFICATIVA

2.1 Objetivo geral

O objetivo do presente estudo foi dividido em duas partes distintas:

2.1.1 Comparar vantagens e desvantagens dos diferentes métodos de identificação analítica do fluoracetato de sódio propostos pela literatura como a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e a cromatografia em camada delgada (CCD).

2.1.2 Comparar sinais clínicos e achados anatomo e histopatológicos observados entre os ratos intoxicados experimentalmente com fluoracetato de sódio ou com *Mascagnia rigida* objetivando avaliar a presença deste sal como o responsável pela toxicidade desta referida planta.

2.2 Objetivos específicos

- desenvolvimento da metodologia de extração do fluoroacetato de sódio da matriz biológica;

- avaliação da metodologia de extração e análise cromatográfica mais adequada para a utilização no Laboratório de Análise Toxicológica (Ladtox) do Departamento de Patologia da FMVZ/USP;

- pesquisa da possível presença de fluoroacetato de sódio através da CCD e CLAE a partir dos extratos aquosos das plantas tóxicas, *Palicourea marcgraii* e *Mascagnia rigida*.
- comparação das manifestações clínicas da intoxicação experimental por fluoroacetato de sódio e pelo extrato da *Mascagnia rigida* em ratos;
- descrição das alterações microscópicas dos animais intoxicados experimentalmente pela *Mascagnia rigida*.

2.3 Justificativa

Desde a introdução do uso do fluoroacetato de sódio como rodenticida e mesmo após a sua proibição, diversos casos de intoxicação em homens e animais têm sido registrados, estimulando a pesquisa sobre seu mecanismo de ação e a busca pelo tratamento mais eficiente. Além disso, poucas informações concernentes à intoxicação por fluoroacetato de sódio são disponíveis na literatura veterinária, bem como são escassos os dados sobre os métodos diagnósticos mais apropriados para os casos de intoxicação. Desta forma, o presente trabalho propõe a identificação de fluoroacetato de sódio em amostras biológicas provenientes de animais de experimentação e sua aplicabilidade para o diagnóstico dos casos de intoxicação por este agente em cães e gatos recebidos na rotina do Serviço de Necropsia da FMVZ/USP, já que este Serviço não dispõe de qualquer método para o diagnóstico conclusivo destes casos.

Revisão de Literatura

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Considerações gerais e toxicodinâmica (mecanismo de ação toxicológico) do monofluoroacetato de sódio

O monofluoroacetato de sódio ($\text{FCH}_2\text{-COO-Na}$) é uma substância química altamente solúvel em água, mas relativamente insolúvel em solventes orgânicos. Este sal é quimicamente estável devido a forte ligação entre átomos de carbono e o de flúor; porém, sua decomposição inicia-se à temperaturas superiores a 110°C e é completa acima de 200°C (EGEKEZE; OEHME, 1979).

Este composto químico é também chamado de “composto 1080”, por ser este o número de série no laboratório que o pesquisou (ZEFERINO, 2005). Foi sintetizado nos Estados Unidos na década de 40, tendo como principal objetivo proteger o exército contra o ataque dos roedores (BURGER; FLECKNELL, 1994). Por ser um sal hidrossolúvel, inodoro e insípido, podia ser adicionado a qualquer tipo de isca e, por isso, tinha uma grande vantagem em relação aos outros rodenticidas (OSWEILER et al., 1985; MINNAAR et al., 2000). No entanto, estas mesmas características, aliadas ao fato de ser um agente de difícil detecção química, com alta toxicidade para outras espécies animais e pela ausência de tratamento eficiente para os casos de intoxicação, passou a ter seu uso proibido em diversos países a partir de 1972 (HARRIS, 1975; COLLICCHIO, 2002).

No Brasil, o fluoroacetato de sódio foi introduzido como rodenticida em 1965, mas sua utilização tornou-se restrita apenas a campanhas públicas a partir de 1980 e, em 1982, sua produção, importação, formulação e a comercialização em todo território nacional foi totalmente proibida. Apesar desta medida, seu uso ilícito como rodenticida doméstico ainda

tem sido apontado como causa de intoxicação acidental em homens e animais e em propostas criminosas com a finalidade de exterminar animais silvestres e de companhia (COLLICCHIO, 2002), como ocorreu recentemente na Fundação Parque Zoológico de São Paulo, quando dezenas de animais foram intencionalmente intoxicados com este agente. O laudo divulgado pelo Centro de Pesquisas do laboratório de Toxicologia da UNESP, campus Botucatu, afirmou que, dos 130 animais que apareceram mortos, pelo menos 73 morreram intoxicados pelo fluoroacetato de sódio (ZEFERINO, 2005).

Em 1989, na empresa “Aços Vilares S.A”, três funcionários morreram e setenta e seis ficaram hospitalizados, vítimas da aplicação imprópria do monofluoroacetato de sódio. O diagnóstico laboratorial da intoxicação teve que ser realizado nos Estados Unidos, porque no Brasil não existia metodologia analítica validada para a determinação do composto (PALERMO-NETO; MORAES-MOREAU, 1995).

O fluoroacetato pode ser encontrado também como princípio ativo da planta tóxica *Palicourea marcgravii* (“vick” ou “cafezinho”), presente na flora brasileira (figura 1), e também na *Arrabidaea bilabiata* (“trepadeira da várzea da Amazônia”). Estas plantas são importantes causadoras de prejuízos nos rebanhos bovinos e ovinos por provocarem a “morte súbita” (principalmente em bovinos), sendo a *Palicourea marcgravii* a principal responsável pela ocorrência de “morte súbita” em bovinos intoxicados (EGEKEZE; OEHME, 1979; PALERMO-NETO; MORAES-MOREAU, 1995; COLLICCHIO, 2002). Neste sentido, calcula-se que considerando somente a região norte do país, aproximadamente 100 mil bovinos adultos morram devido à ingestão desta planta. Em outros países, o mesmo princípio ativo está presente em diversas outras plantas, como a *Dichapetalum cymosum* (“gifblaar”), no sul da África (MARAIS, 1944), conhecida por causar intoxicações em ovelhas (VICKERY; VICKERY, 1973) e, na Austrália, a *Acacia georginae*, *Oxylobium parviflorum* e *Gastrolobium grandiflorum*. (APLIN, 1968).

Na década de 80, na região norte do Estado do Espírito Santo, houve ocorrência de “morte súbita” em bovinos, especialmente quando movimentados. Em estudos realizados na época, constataram que estas mortes foram causadas pela *Mascagnia rigida* (TOKARNIA et al., 1985).

A *Mascagnia rigida* (“tingui”, “timbó”) (Figura 1), é a planta tóxica mais difundida e importante da região Nordeste, capaz de promover intoxicação natural em bovinos e caprinos (BATATINHA; SPINOSA; BERNARDI, 1988; MEDEIROS et al., 2002; SILVA et al., 2006; RIET-CORREA et al., 2007). Esta planta afeta principalmente bovinos, no entanto intoxicações em ovinos e caprinos também têm sido diagnosticadas. A intoxicação por *Mascagnia rigida* ocorre, principalmente, no início do período chuvoso, após as primeiras chuvas (RIET-CORREA et al., 2007).

Tokarnia e colaboradores (1998) estudaram a intoxicação experimental em coelhos por *Mascagnia* sp procedente do Estado de Santa Catarina e verificaram que esta planta também é tóxica para esta espécie estudada. Observaram também que a toxicidade destas folhas variou muito.

Até hoje o princípio ativo desta planta é desconhecido, levando a desconfiar da presença de fluoroacetato de sódio, já que os animais intoxicados manifestam os mesmos sinais clínicos daqueles intoxicados pela *Palicourea marcgravii*.

Além disso, o fluoroacetato pode ser encontrado como contaminante de forragens e cereais em áreas com altos níveis de fluoretos na atmosfera (OSWEILER et al., 1985), embora o significado toxicológico deste achado não tenha sido esclarecido.

Em veterinária, os cães e gatos são as principais espécies envolvidas nos casos de intoxicação pelo fluoroacetato de sódio, principalmente de caráter criminoso (APTEKMAN et al., 2003).

Figura 1 – *Palicourea marcgravii* à esquerda e *Mascagnia rigida* à direita

A toxicodinâmica do fluoroacetato de sódio envolve o bloqueio da cadeia respiratória. Ao adentrar a célula, reage com a coenzima A (CoA), na presença de adenosina-5'-trifosfato, formando o fluoroacetilCoA, 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, 2002).

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 cardiotoxícos e neurotóxicos, também pode combinar-se com o cálcio, levando à hipocalcemia e ao agravamento dos sinais clínicos da intoxicação (GAL; PETERS; WAKELIN, 1956; OMARA; SISODIA, 1990; BURGER; FLECKNELL, 1994) (figura 2).

O bloqueio do ciclo de Krebs na intoxicação pelo fluoroacetato de sódio provoca uma importante redução do metabolismo da energia oxidativa e também na oxidação do acetato e da síntese hepática de acetoacetato. A utilização de acetoacetato nos tecidos é inibida e há um acúmulo de ceto-substâncias no sangue, que são excretadas pela urina. A diminuição de

piruvato na incorporação de CO_2 nos ácidos orgânicos também é verificada (NOVÁK; MISUSTOVÁ; HOSEK, 1972).

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

3.2 Toxicidade do fluoroacetato de sódio

A toxicidade do fluoroacetato é bastante variável nas diferentes espécies animais estudadas e, segundo Mcilroy (1981), os mamíferos jovens e fêmeas mamíferas aquáticas no cio são mais sensíveis quando comparadas a outros animais da mesma espécie; além disso, as aves parecem ser mais resistentes. Espécies de sangue frio, os répteis, geralmente são mais resistentes do que as de sangue quente, como os mamíferos. Os sítios de ação também variam entre as espécies.

Os cães são mais sensíveis à intoxicação do que os gatos, mas ambos podem ser intoxicados após a ingestão de pássaros ou roedores mortos pelo fluoroacetato de sódio (EGEKEZE; OEHME, 1979; OSWEILER et al., 1985), nas chamadas intoxicações secundárias.

O fluoroacetato de sódio é rapidamente absorvido pelo trato gastrointestinal, pele e mucosas lesadas, mas, por outro lado, é pouco absorvido através da pele íntegra. Dependendo da dose de exposição e da espécie animal, os sinais clínicos podem ter início dentro de 30 minutos até 2,5 horas (HUMPHREYS; CLARKE, 1991; BURGER; FLECKNELL, 1994) e têm evolução geralmente rápida e fatal.

A tabela 1 mostra os valores da DL_{50} - dose letal 50% - em diversas espécies animais, incluindo o homem (HUMPHREYS, 1988; ZEFERINO 2005).

Tabela 1 - Dose letal 50% (DL₅₀) do fluoroacetato de sódio em vertebrados (adaptado de ZEFERINO, 2005)

ESPÉCIES	DL₅₀ mg/kg
Cão	0,05 - 0,11
Gato	0,30 - 0,45
Vaca	0,40 – 0,45
Coelho	0,45 – 0,50
Cavalo	0,45 – 0,50
Carneiro	0,50 – 0,60
Porco	0,90 – 1,10
Homem	~2,0
Galinha	~7,0
Rosella (papagaio)	~7,0
Avestruz	~96,0
Lagarto (Oeste da Austrália)	~800
Lagarto (Sul da Austrália)	~201
Marsupial (Oeste da Austrália)	~117
Marsupial (Sul da Austrália)	0,64 – 0,84
Rato	0,1 – 7,0
Camundongo	0,5 – 20,0
Macaco	4,0 – 15,0

De maneira geral, os herbívoros e humanos intoxicados pelo fluoroacetato de sódio apresentam alterações nos sistemas respiratório, gastrointestinal (CHI et al., 1996) e cardiovascular. Neste último, são comuns as arritmias, incluindo a fibrilação e a parada ventricular, resultantes da ação direta do fluorocitrato nas células do miocárdio, causando acúmulo de citrato e conseqüente hipóxia celular (NOGUCHI; OHNUKI; OKIGAKI, 1966). Nos carnívoros, predominam as alterações neurológicas (ansiedade, hiperatividade, alucinações e convulsões do tipo tônico-clônica) e gastrintestinais (vômitos, salivação, diarreia e dor abdominal) (HARRIS, 1975).

A intoxicação em ruminantes ocorre principalmente pela ingestão de plantas tóxicas contendo o princípio ativo fluoroacetato de sódio e a manifestação clínica é a morte súbita (KEMMERLING, 1996; TOKARNIA; DOBEREINER; PEIXOTO, 2002).

3.3 Métodos diagnósticos e tratamentos

No Brasil, o diagnóstico da intoxicação por fluoroacetato de sódio em animais é feita, na maioria das vezes, apenas baseando-se nos dados do histórico, nos sinais clínicos e achados anatomopatológicos. Os sinais clínicos da intoxicação são inespecíficos e há poucos métodos laboratoriais para o diagnóstico conclusivo e, por isso, muitas vezes, pairam dúvidas sobre a real causa do óbito (CHI; LIN; CHEN, 1999; O'HAGAN, 2004).

O diagnóstico definitivo da intoxicação pelo fluoroacetato de sódio pode ser realizado por meio da análise toxicológica e identificação do agente tóxico. A utilização de metodologia qualitativa é a forma mais comum, sendo desenvolvidos principalmente métodos para a detecção em iscas líquidas, amostras de solo, sangue, urina, tecidos e plantas tóxicas contendo ácido fluoroacético (SAKAI; MIYAHARA, 1981).

A técnica de cromatografia em camada delgada pode ser utilizada em placas de celulose com a utilização do revelador Azul do Nilo a 0,4%. (SAKAI; MIYAHARA, 1981; MCGARY; MELOAN, 1982).

A análise quantitativa do fluoroacetato pode ser realizada com técnicas de cromatografia gasosa (CG) e cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) (KRAMER, 1984; OZAWA; TSUKIOKA, 1989; ALLENDER, 1990; MINNAAR et al., 2000; DEMARCHI et al., 2001; SPORKERT et al., 2002). A cromatografia gasosa para a identificação do fluoroacetato de sódio foi desenvolvida a partir da sua determinação como ácido livre em solventes aquosos (KIMBALL; MISHALANIE, 1993). Estudos anteriores descreveram um método bastante sensível por eletroforese de zona capilar, para detecção deste agente tóxico em iscas (FUYU; HUIFANG; YI, 1996).

Zeferino et al., (2005) desenvolveram um procedimento analítico rápido, simples, econômico, preciso e exato de quantificação do fluoroacetato de sódio em amostras de soro sanguíneo de gatos. O método consiste em HPLC com detector de condutividade, onde é realizada a extração líquido-líquido. Observaram, neste método, uma redução significativa no consumo de solventes e no tempo das análises quando comparado aos métodos morosos e dispendiosos relatados em literatura (COLLICCHIO, 2006).

Os principais diagnósticos diferenciais da intoxicação por este agente tóxico são feitos para as intoxicações por anticolinesterásicos, estricnina, organoclorados praguicidas e chumbo (O'HAGAN, 2004). A toxicidade e manifestações clínicas destes diferem quando comparadas às do fluoroacetato de sódio, mas os sinais neurológicos agudos, principalmente no estágio convulsivo, são bastante similares. O exame toxicológico e o aumento dos níveis de citrato nos tecidos podem diferenciar a intoxicação pelo fluoroacetato de sódio das demais descritas (EGYED et al., 1977).

A identificação analítica deste agente tóxico é realizada por poucos laboratórios, principalmente quando o substrato em questão é tecido de origem animal, como fígado ou sangue, sendo que a principal característica que direciona esta análise de forma diferente das utilizadas nas rotinas toxicológicas é a alta hidrossolubilidade que o fluoroacetato de sódio apresenta.

Até o momento, não há nenhum agente capaz de impedir ou reverter de maneira eficaz os efeitos do fluoroacetato ou do fluorocitrato sobre a cadeia respiratória e, por isso, a evolução é quase sempre fatal (BURGER; FLECKNELL, 1994).

Considerando-se o mecanismo de ação do fluoroacetato, era de se esperar que os compostos precursores de acetato fossem capazes de reduzir a inibição competitiva de fluoroacetato, pela acetil coenzima A, exercendo, assim, um efeito protetor. Muitas

substâncias já foram pesquisadas com esta finalidade, entretanto os resultados foram negativos (PALERMO-NETO; MORAES-MOREAU, 1995).

3.4 Cromatografia

A técnica cromatográfica foi introduzida por Tswett, em 1903, mas sua utilização e desenvolvimento se deram apenas a partir de 1931, quando Kuhn e Leaderer separaram o alfa do beta caroteno (CIOLA, 1973). A cromatografia pode ser definida como método de separação que requer uma fase estacionária ou fixa, na qual um líquido ou sólido é aplicado sobre um suporte inerte de ampla superfície e uma fase móvel, composta por um gás ou um líquido. Os analitos são movidos pela fase móvel, havendo diferentes tipos de interação de cada analito com a fase estacionária, resultando em separação destes componentes, que podem, então, ser identificados por vários métodos, incluindo a colorimetria e a espectrofotometria (CONSDEN, 1960; BAKER; POKLIS, 1999).

Na cromatografia, pequenas diferenças em certas propriedades físico-químicas das substâncias são utilizadas para promover a separação. A fase estacionária pode ser um sólido de grande superfície (carvão ativo, sílica-gel) ou de pequena superfície (carbonato de cálcio), suportada em colunas de diferentes tipos de materiais, e a fase móvel pode ser representada por um líquido (como o pentano, hexano, misturas de álcool e água) ou por um gás (hidrogênio, nitrogênio, dióxido de carbono, hélio e outros) (CIOLA, 1973). Assim, de acordo com as características da fase estacionária e da fase móvel, a cromatografia pode ser

classificada como cromatografia em papel, cromatografia em camada delgada (CCD), cromatografia gasosa e cromatografia líquida (LIMA DE MENEZES, 2001; PERES, 2002).

3.4.1 Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

A cromatografia líquida de alta eficiência emprega pequenas colunas fechadas preenchidas por materiais especialmente preparados para receber uma fase móvel que será eluída em alta pressão, possuindo uma válvula onde a amostra pode ser introduzida no sistema. Existem vários tipos de detectores, entre eles, o UV-visível (UV-vis) e o fluorescência (CISCATO, 2000). A figura 3 ilustra o esquema básico de um cromatógrafo líquido de alta eficiência.

Figura 3 – Esquema básico de um cromatógrafo de alta eficiência (CLAE)

3.4.2 Cromatografia em camada delgada (CCD)

A cromatografia em camada delgada (CCD) consiste na separação dos componentes de uma mistura através da migração diferencial sobre uma camada delgada de adsorvente retido sobre uma superfície plana. O processo de separação está fundamentado, principalmente no fenômeno de adsorção (WADA, 1987; PERES, 2002).

O grande desenvolvimento desta técnica é consequência natural das múltiplas vantagens que ela oferece, tais como: fácil compreensão e execução, separações em breve espaço de tempo, versatilidade, grande reprodutibilidade e baixo custo.

Na CCD uma fina camada de adsorvente é espalhada sobre uma placa (em geral de vidro, mas outros materiais podem ser usados). Na extremidade desta placa recoberta pelo adsorvente e seca, chamada cromatoplaca, a amostra é aplicada repetidas vezes com o auxílio de um capilar, obtendo-se pequenas manchas (PERES, 2002), como ilustra a figura 4.

A placa é transferida para uma cuba cromatográfica contendo o solvente, que ascende pela cromatoplaca. Durante este processo, chamado desenvolvimento do cromatograma, os vários componentes da mistura são separados (figura 5). A separação é baseada em muitos equilíbrios dos solutos entre as fases móvel e estacionária e resulta das diferenças de velocidade, nas quais os componentes individuais da mistura migram pela placa (BRASIL, 2003).

Desenvolvido o cromatograma, a placa é removida da cuba e deixada para secar, até que esteja livre do solvente (PERES, 2002). Se os componentes da amostra forem coloridos, manchas dispostas verticalmente na placa serão visíveis (LEITE, 1996).

Se os componentes da amostra não forem coloridos, deve-se empregar um método de visualização como por exemplo: luz ultravioleta e vapor de iodo.

As condições experimentais da CCD incluem: sistema de solvente, adsorvente, espessura da camada do adsorvente e quantidade relativa do material aplicado (BRASIL, 2003).

Segundo Wada (1987), sob condições bem estabelecidas, um dado composto percorre sempre uma distância fixa em relação à distância percorrida pelo solvente. Esta relação é chamada valor do Rf, sendo definida pela seguinte razão:

$$R_f = \frac{\text{distância percorrida pela substância}}{\text{distância percorrida pelo solvente}}$$

Quando os parâmetros experimentais de um dado composto são especificados, o valor do Rf é uma constante (BRASIL, 2003). Sendo assim, este valor pode ser utilizado como auxiliar na identificação desta substância.

Figura 4 – A) mostra modelo de placa de celulose utilizada em CCD. B) mostra aplicação das amostras com auxílio de um capilar

Figura 5 – Processo de desenvolvimento do cromatograma, no qual os vários componentes da mistura são separados (cuba com cromatoplaça)

3.4.3 Parâmetros cromatográficos

Independentemente do processo analítico escolhido, a determinação de certos parâmetros, tais como curva de calibração, linearidade, precisão, exatidão, seletividade, limite de quantificação (LQ), limite de detecção (LD) e recuperação, são fundamentais para assegurar a confiabilidade das medidas. (CHASIN; CHASIN; SALVADORI, 1994; CHASIN et al., 1998).

A determinação da curva de calibração deve ser realizada através de amostras extraídas da matriz apropriada. O intervalo da curva de calibração deriva do estudo de linearidade do método e depende do objetivo de sua aplicação (BRASIL, 2003).

A linearidade é a faixa de concentração onde é obtida a proporcionalidade de resposta do detector. A técnica deve adequar uma reta aos dados e verificar o quanto esta reta descreve tais dados, o que é chamado de regressão e correlação. A regressão deve ser representada graficamente através de transformações matemáticas bem definidas (equação da reta), enquanto que a correlação pode ser expressa através do coeficiente de correlação (r) ou do coeficiente de determinação (r^2) (SHAH et al., 1992).

A precisão reflete a variação dos resultados quando análises repetidas são feitas na mesma amostra. Pode ser expressa através do desvio padrão relativo ou coeficiente de variação (CV%), obtidos em condições de repetibilidade e/ou reprodutibilidade. A repetibilidade é obtida utilizando-se o mesmo método, para a mesma amostra, no mesmo laboratório, realizado pelo mesmo analista, em um mesmo equipamento, num curto período de tempo. A reprodutibilidade é obtida através da variação das condições de obtenção da

amostra por um método, podendo também ser avaliada parcialmente através da variação de uma ou mais variáveis (CHASIN et al., 1998; NETO, 1999).

A exatidão é determinada após o estabelecimento da linearidade, limite de variação e especificidade do método. Expressa a concordância entre o valor real do analito na amostra e o estimado pelo processo analítico. É avaliada através da inexatidão (CHASIN et al., 1998; NETO, 1999).

A seletividade refere-se a um método que permite a análise de várias substâncias químicas que podem ou não ser distinguíveis. É medida através do tempo de retenção, um parâmetro utilizado nas técnicas cromatográficas (NETO, 1999).

O limite de determinação ou de quantificação (LQ) corresponde a menor concentração que pode ser identificada e quantificada em uma determinada amostra, com certo grau de certeza para o método de análise empregado (CISCATO, 2000), havendo repetibilidade nos valores quando considerado o menor valor (LEITE, 1996). O LQ deve ser estabelecido através da análise de soluções de concentrações conhecidas e decrescentes de uma substância química, até o menor nível determinável, com precisão e exatidão aceitáveis (BRASIL, 2003).

O limite de detecção (LD) corresponde a menor concentração de um analito que, após ser injetado, apresenta pelo menos um valor três vezes acima do ruído do equipamento (CISCATO, 2000; LEITE, 1996). Deve ser estabelecido através da análise de soluções de concentrações conhecidas e decrescentes de uma substância química, até o menor nível detectável (BRASIL, 2003).

A recuperação avalia a eficiência do método de tratamento da amostra. Pode-se fazer uma diferenciação entre a chamada recuperação absoluta e a relativa. A recuperação absoluta expressa a variação entre a quantidade obtida após a extração e aquela decorrente da adição após o processo de extração. A recuperação relativa mostra a mesma variação no caso de amostras submetidas a outros tratamentos que não a extração (NETO, 1999).

Materiais e métodos

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Local

A metodologia analítica foi desenvolvida no Laboratório de Farmacologia e Toxicologia Aplicada do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e parcialmente desenvolvida no Departamento de Química da Universidade Estadual de São Paulo, campus de Bauru, São Paulo e também no Laboratório de Química e Farmacologia de Produtos Naturais do Centro de Pesquisa e Desenvolvimento de Sanidade Animal do Instituto Biológico de São Paulo.

4.2 Animais

Para a intoxicação experimental, foram utilizados aproximadamente 50 ratos Wistar, machos, adultos com 60 dias de idade, pesando entre 270 a 320g, provenientes do biotério do Departamento de Patologia da FMVZ/USP. Os animais foram alojados em caixas plásticas com tampas metálicas, medindo 30 x 38 x 16 cm, as quais foram mantidas em sala com temperatura e umidade ambiente aproximadamente constante (temperatura entre 22-25°C e

umidade relativa de 65–70%) através de aeração, exaustão e ventilação. Água e comida foram oferecidas *ad libitum* durante este período e antes do início do experimento foram submetidos a jejum alimentar de oito horas. Os animais foram utilizados de acordo com as normas e procedimentos éticos relativos ao uso de animais de laboratório da FMVZ/USP, protocolo nº 924/2006.

4.3 Agente Tóxico

Para a intoxicação experimental, o padrão de fluoroacetato de sódio foi diluído em água destilada imediatamente antes de ser administrado por via oral (gavage). A intoxicação foi aguda na dose de 7,0 mg/kg de peso vivo. A dose oral tóxica utilizada neste estudo baseou-se inicialmente nos valores encontrados na literatura da DL₅₀ oral para roedores, que variam de 0,2 a 7,0 mg/kg (HUMPHREYS, 1988). Os animais foram pesados antes da intoxicação para o ajuste das doses.

Para análise toxicológica utilizando cromatografia, a solução-padrão foi preparada efetuando-se a solubilização de 0,010g do fluoroacetato de sódio em 10,0 mL de água pura para obter uma concentração de 1000 µg/mL. Por diluição da solução estoque, foram preparadas soluções intermediárias e a partir destas, as soluções de trabalho.

4.4 Planta Tóxica

Para o preparo do extrato aquoso foram utilizadas folhas verdes secas da planta tóxica *Mascagnia rigida*. Foi pesado 200g da planta e adicionado aproximadamente 1500 mL de água e aquecido à 90 °C, por uma hora. Após, foi deixado esfriar à temperatura ambiente e filtrado. O extrato resultante também foi pesado para realização do cálculo do equivalente em planta total, que permitiu o cálculo das doses administradas; para isso, foram utilizadas três alíquotas de 1 mL cada uma, para efetuar o cálculo do peso seco, como mostra a figura 6. O extrato foi concentrado por meio de rota-evaporador com aquecimento de 50°C e rotatividade de 80 rpm, sob vácuo. Este extrato final foi mantido congelado a -20°C até o momento do uso. Foi concentrado para chegar ao volume adequado a ser administrado e também para ser utilizado na análise química, por meio da cromatografia.

As intoxicações foram agudas em todos os experimentos, nas doses de 1,6 e 3,2 g/kg de peso vivo, sendo que estas foram preparadas a partir do extrato da planta. A administração do extrato da planta foi realizada por via oral (gavage). Os animais foram pesados antes da intoxicação para ajuste das doses.

A planta tóxica *Mascagnia rigida* foi fornecida pelo Laboratório de Química e Farmacologia de Produtos Naturais do Centro de Pesquisa e Desenvolvimento de Sanidade Animal do Instituto Biológico de São Paulo, e esta extração também foi realizada neste mesmo local.

	1 mL		tara	
<i>Mascagnia rigida 1</i>	3,9904	-	3,9608	= 0,0296 g
<i>Mascagnia rigida 2</i>	5,4655	-	5,4343	= 0,0312 g
<i>Mascagnia rigida 3</i>	5,6882	-	5,6581	= 0,0301 g
			média	= 0,0303 g
Portanto, cada 1 mL contém 0,0303 g de resíduo seco da planta				

Figura 6 – Cálculo da média de resíduo seco da planta tóxica *Mascagnia rigida*.

4.5 Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) acoplada ao detector de UV

Esta metodologia foi desenvolvida no Laboratório de Farmacologia e Toxicologia do Departamento de Patologia da FMVZ/USP.

4.5.1 Solventes, reagente e solução-padrão

- Água tipo I: destilada, deionizada e purificada pelo sistema Milli-Q Plus.
- Fase móvel: Solução tampão 0,02 M, H_3PO_4 com pH 2,0.
- Ácido acético, fosfórico, propiônico e fórmico (Sigma).
- Fluoroacetato de sódio (99,7% pureza - Pestanal[®] Riedel-de-Haën).

4.5.2 Aparelhos e acessórios

- Aparelho para purificação de água Milli-Q Plus com módulo de purificação QPAQ₂ e filtro (0,22 μm) Millipak 40 da Millipore.
- Filtro de seringa para amostra 0,5 μm millipore.

- Pipeta automática (20, 200 e 1000 μ L) Pipetmann[®].
- Agitador tipo vórtex.
- Balança analítica.
- Caneta potter.
- Agitador de mesa Kline “Nova Ética”.
- Pipeta volumétrica de vidro 2,5 mL, 5 mL, 10 mL e 20 mL.
- Pipetas Pasteur.
- Seringas BD de 10 mL.
- Frascos âmbar de 100 mL.

4.5.3 Vidraria

A vidraria utilizada, quando necessário, foi volumétrica.

4.5.4 Condições cromatográficas

A análise cromatográfica foi realizada em condições isocráticas, em um sistema de cromatografia líquida de alta eficiência, Shimadzu, Modelo SPD- 10AV vp, SCL – 10A vp System Controller, LC-10AD vp Liquid Chromatograph, um detector ultra-violeta, uma válvula de injeção com alça de amostragem de 50 μ L.

4.5.5 Coluna cromatográfica

A coluna cromatográfica C-610H para análise de ácido orgânico da Supelcogel, de 300 mm de comprimento e 7,8 mm de diâmetro interno, foi adquirida da Supelcogel, Supelco, Bellefonte, PA.

4.6 Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) acoplado com detector de condutividade iônica

Esta metodologia foi desenvolvida no Departamento de Química da Universidade Estadual de São Paulo, campus de Bauru, São Paulo em conjunto com o Laboratório de Farmacologia e Toxicologia do Departamento de Patologia da FMVZ/USP (Metodologia adaptada de Zeferino, 2005).

4.6.1 Solventes, reagentes e solução-padrão

- Ácido acético - grau P.A. Merck.
- Ácido perclórico – grau P.A. Merck.
- Ácido sulfúrico – grau P.A. Merck.

- Ácido metanossulfônico – grau P.A. Aldrich.
- Permanganato de potássio – grau P.A. Merck.
- Acetona – grau P.A. Merck.
- Acetato de etila – grau P.A. Merck.
- Fluoroacetato de sódio (99,7% pureza - Pestanal[®] Riedel-de-Haën).

4.6.2 Purificação da água

A água foi obtida a partir de um sistema de purificação Milli-Q, adquirido da Milipore.

4.6.3 Condições cromatográficas

A análise cromatográfica foi realizada em condições isocráticas, em um sistema de cromatografia líquida de alta eficiência, Shimadzu, Modelo ClassVp, LC-10 A, equipado com duas bombas recíprocas, um detector de condutividade iônica, CDD-6 A, um detector eletroquímico, uma válvula FCV-12AH, para desvio do fluxo da fase móvel, uma válvula de injeção com alça de amostragem de 100 µL, um sistema controlador eletrônico interfaciado a um sistema de computação. Os dados foram obtidos com auxílio de um computador Pentium e impressora HP-690.

4.6.4 Coluna cromatográfica

A coluna cromatográfica de troca aniônica, sax, da Phenomenex, de 250mm de comprimento e 4,6 mm de diâmetro interno, foi adquirida da Labtron Comércio e Representações Ltda, Brasil.

Figura 7 - Modelo de um cromatógrafo líquido de alta eficiência Shimadzu.

4.7 Cromatografia em camada delgada (CCD)

Esta metodologia foi desenvolvida no Laboratório de Farmacologia e Toxicologia do Departamento de Patologia da FMVZ/USP em conjunto com o Laboratório de Química e farmacologia de produtos naturais do Centro de Pesquisa e Desenvolvimento de Sanidade Animal do Instituto Biológico de São Paulo.

4.7.1 Solventes, reagentes e solução-padrão

- Álcool etílico.
- Hidróxido de amônio.
- Piridina.
- Água ultra-pura Milli-Q.
- Trietanolamina.
- Ácido clorídrico.
- Hidróxido de sódio.
- Revelador: Azul do Nilo.
- Fluoroacetato de sódio (99,7% pureza - Pestanal[®] Riedel-de-Haën).

4.7.2 Cromatoplaça

Para o emprego da cromatografia em camada delgada, foram utilizadas placas de cromatofolhas de alumínio, revestidas com celulose microcristalina (Merck®) 20x20 cm, espessura de 0,1 mm, sem ativação. Estas foram desenvolvidas até 10 cm no sistema de solventes: etanol, hidróxido de amônio, piridina e água, na proporção de 95:3:1:1, respectivamente. Após a evaporação do solvente, as placas foram reveladas com Azul do Nilo. A coloração e o valor de Rf foram anotados.

O agente cromogênico foi preparado segundo a fórmula:

Azul do Nilo: 20 mg

Etanol: 5 mL

Adicionar trietanolamina até coloração púrpura

Acrescentar mais 5 mL de etanol

4.8 Extrações envolvidas nestas metodologias

Para este estudo, foram realizadas algumas extrações como: extração líquido-líquido do soro proveniente dos animais intoxicados e extração do princípio ativo tóxico das plantas *Palicourea marcgravii* e *Mascagnia rigida*

4.8.1 Extração líquido-líquido do soro proveniente dos animais intoxicados

Um volume fixo de 1,0 mL da solução-padrão do fluoroacetato de sódio, na concentração desejada e recentemente obtido pela diluição da solução estoque, foi transferido para um tubo de 25 mL, com tampa, juntamente com 1,0 mL do soro, 1,0 mL de água deionizada, 1,0 mL de permanganato de potássio 0,05 mol/ L e 1,0 mL de solução aquosa de ácido acético 5% (v/v). Após leve aquecimento a 60°C, por 5 minutos, em banho-maria, foram adicionados 12,0 mL de acetona, homogeneizando-se em agitador de tubos, por 10 minutos. Após centrifugação, a 3000 rpm, por 5 minutos, o sobrenadante foi transferido para um béquer de 100 mL e evaporado em um sistema de exaustão, sobre uma mesa de agitação. O extrato obtido foi transferido para um tubo de vidro com 12,0 mL de acetato de etila e 0,5 mL de ácido perclórico 0,20 mol/ L, homogeneizando-se lentamente, por 10 minutos, em um agitador de tubos. O extrato orgânico foi transferido para um béquer e evaporado até a secura;

no resíduo obtido, foi adicionado 1,0 mL de água pura e injetado diretamente no sistema de cromatografia líquida. Este procedimento de extração está ilustrado na figura 8.

Figura 8 - Fluxograma do procedimento para extração do fluoroacetato de sódio em amostra biológica (soro). Adaptado de Zeferino, 2005

4.8.2 Extração do princípio ativo tóxico das plantas *Palicourea marcgravii* e *Mascagnia rigida*.

Para obtenção dos extratos aquosos tanto da planta *Palicourea marcgravii*, quanto da *Mascagnia rigida*, foi utilizado método descrito no item 4.4, para posterior análise cromatográfica.

Delineamento Experimental e Resultados

5 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL E RESULTADOS

5.1 Experimento 1 - Intoxicação experimental em ratos; avaliação dos sinais clínicos e descrição dos achados necroscópicos e histopatológicos.

5.1.1 Delineamento experimental

Foram utilizados 24 ratos, separados em quatro grupos iguais, sendo: um grupo controle (Co) e três grupos experimentais; grupo padrão de fluoroacetato de sódio (Pa), grupo *Mascagnia rigida* um (Mr1) e grupo *Mascagnia rigida* dois (Mr2). Os animais do grupo Pa, receberam, por gavagem, solução de fluoroacetato de sódio, em dose única, na concentração de 7 mg/kg. A opção da dose oral tóxica utilizada neste estudo baseou-se inicialmente nos valores encontrados na literatura da DL₅₀ oral para roedores, que variam de 0,2 a 7 mg/kg. Os animais dos grupos Mr1 e Mr2 receberam, por gavagem, extrato da planta tóxica *Mascagnia rigida*, em dose única, nas concentrações de 1,6 e 3,2 g/kg, respectivamente, conforme item 4.4. Os animais do grupo controle, receberam apenas água, também em dose única e mesma via de administração.

Após a administração do agente tóxico e do extrato da planta, os animais foram observados por um período de até 6 horas, em seguida estes foram submetidos à eutanásia por decapitação e coleta das amostras de sangue e também de diferentes órgãos para a realização

da análise toxicológica e histopatológica. Os animais que apresentaram quadro clínico severo após a intoxicação, demonstrando sofrimento, foram submetidos à eutanásia antes do período de 6 horas.

O exame necroscópico foi realizado segundo técnica padrão de pequenos mamíferos não ruminantes (RUEHL-FEHLERT et al., 2003).

Os fragmentos de cérebro, cerebelo, coração, fígado, rim, pulmão, adrenal, intestino e pâncreas, colhidos para exame histopatológico no decorrer da necropsia, foram fixados em formol 10% e processados no Laboratório de Histologia do Departamento de Patologia, FMVZ-USP. Os mesmos foram incluídos em parafina e, posteriormente, seccionados em cortes de aproximadamente 5 µm de espessura e corados por hematoxilina e eosina (HE). Os segmentos de cérebro e cerebelo foram processados isolados dos demais órgãos e cortados no eixo maior. O fragmento de coração foi seccionado transversalmente no terço médio.

O exame histológico das lâminas foi realizada em microscopia de luz com aumento de 40, 100, 200 e 400x.

O padrão histológico de normalidade dos órgãos foi definido segundo os critérios descritos para ratos (RUEHL-FEHLERT et al., 2003).

As alterações teciduais foram avaliadas qualitativamente quanto à presença de distúrbios circulatórios, degenerativos e inflamatórios e foram realizadas por um patologista colaborador.

Fragmentos desses órgãos foram também acondicionados em frascos plásticos, identificados e mantidos à – 20 °C até o momento da análise toxicológica.

5.1.2 Resultados

5.1.2.1 Características clínicas da intoxicação experimental por *Mascagnia rigida* em ratos

A tabela 2 mostra os sinais clínicos apresentados após a intoxicação aguda pelo agente tóxico fluoroacetato de sódio e pelo extrato aquoso da planta tóxica *Mascagnia rigida* e a tabela 3 mostra o período para o início dos sinais clínicos.

Os animais do grupo que recebeu o fluoroacetato de sódio, na dose de 7 mg/kg (Pa), apresentaram prostração, dispnéia, tremores de cabeça, pêlos arrepiados, sangramento ocular, convulsões do tipo tônica e também tonico-clônica, caracterizadas por decúbito lateral e movimentos de pedalagem dos membros anteriores. O intervalo de tempo para o início dos sinais clínicos gerais foi de 40 à 50 minutos e para o início dos sinais clínicos neurológicos foi de 40 à 60 minutos.

Os animais do grupo que recebeu o extrato aquoso de *Mascagnia rigida* na dose de 1,6 g/kg (Mr1) apresentaram prostração, dispnéia, mioclonia facial, tremores de cabeça, pêlos arrepiados e sangramento ocular, convulsões do tipo tônica e também tônico-clônica, caracterizadas por decúbito lateral e movimentos de pedalagem dos membros anteriores. O intervalo de tempo para o início dos sinais clínicos gerais foi de 40 minutos à 3 horas e para o início dos sinais clínicos neurológicos foi de 2,5 à 6 horas.

Os animais do grupo que recebeu *Mascagnia rigida*, na dose de 3,2 g/kg (Mr2), apresentaram os mesmo sinais clínicos do grupo Mr1. O intervalo de tempo para o início dos sinais clínicos gerais foi de 40 minutos à 2 horas e para o início dos sinais clínicos neurológicos foi de 3,5 à 5,5 horas.

Tabela 2 – Frequência dos sinais clínicos observados em ratos intoxicados experimentalmente, via gavagem, por fluoroacetato de sódio (dose 7mg/kg) e pelo extrato de *Mascagnia rigida* em diferentes doses (Mr1 e Mr2)

SINAIS CLÍNICOS	Fluoroacetato	Mr 1	Mr 2
	7 mg/kg	1,6 g/kg	3,2 g/kg
Prostração	(6/6)	(2/6)	(5/6)
Dispneia	(3/6)	(2/6)	(2/6)
Mioclonia facial	(0/6)	(2/6)	(0/6)
Tremores de cabeça	(2/6)	(2/6)	(0/6)
Pelos arrepiados	(1/6)	(2/6)	(0/6)
Sangramento ocular	(3/6)	(1/6)	(4/6)
Convulsão	(6/6)	(4/6)	(5/6)

Tabela 3 – Intervalo de tempo para o início do aparecimento dos sinais clínicos nos ratos intoxicados experimentalmente, via gavagem, por fluoroacetato de sódio (dose 7mg/kg) e pelo extrato de *Mascagnia rigida* em diferentes doses (Mr1, Mr2)

SINAIS CLÍNICOS	Fluoroacetato	Mr 1	Mr 2
	7 mg/kg	1,6 g/kg	3,2 g/kg
Gerais	40 à 50 minutos	40 minutos à 3 horas	40 minutos à 2 horas
Neurológicos	40 à 60 minutos	2,5 à 6 horas	3,5 à 5,5 horas

5.1.2.2 Análise anatomopatológica

Foram realizados exames macrascópico e microscópico descritos a seguir.

5.1.2.2.1 Exame macroscópico

O exame necroscópico mostrou evidente congestão cerebral e hepática no grupo de fluoroacetato de sódio.

No grupo Mr2 que recebeu 3,2 g/kg do extrato de *Mascagnia rigida*, mostrou evidente congestão cerebral e apenas dois casos de congestão hepática. E no grupo Mr1 que recebeu 1,6 g/kg do extrato de *Mascagnia rigida*, não foi observado alteração.

5.1.2.2.2 Exame microscópico

O grupo controle apresentou histologia dos órgãos examinados dentro do padrão de normalidade (figura 9 itens A, B, C, D, E e F).

No exame microscópico dos órgãos dos ratos intoxicados experimentalmente por fluoroacetato, os principais achados foram congestão, edema e hemorragia cerebral nas seguintes regiões: cerebelo, córtex motor, terceiro e quarto ventrículos, núcleos da base,

tronco encefálico; múltiplos focos de hemorragia no miocárdio e congestão moderada hepática associada a degeneração vacuolar microgoticular ao redor da veia hepática central e nefrose na região cortical do rim (figura 10 itens A, B, C, D, E e F).

Na avaliação histológica do pulmão, pâncreas, intestino, baço e adrenal, as alterações observadas não foram diferentes das do grupo controle.

Os grupos intoxicados por extrato de *Mascagnia rigida* apresentaram congestão, edema e focos de hemorragia cerebral associados a morte neuronal nas seguintes regiões tronco encefálico, cerebelo, bulbo olfatório, plexo coróide, córtex motor e núcleos da base. No miocárdio havia focos de hemorragia e degeneração de miocardiócitos. O fígado exibia congestão moderada. A avaliação microscópica do rim revelou nefrose em região cortical (figura 11 itens A, B, C, D, E e F).

A análise dos fragmentos de pulmão, adrenal, intestino, baço e pâncreas dos grupos da *Mascagnia rigida* revelou lesões semelhantes as verificadas no grupo controle.

Os resultados da avaliação histopatológica qualitativa do grupo de fluoroacetato de sódio e do extrato de *Mascagnia rigida* estão apresentados na Tabela 4.

Tabela 4 – Frequência das alterações histopatológica observadas em ratos intoxicados experimentalmente, via gavagem, por fluoroacetato de sódio (dose 7mg/kg) e pelo extrato de *Mascagnia rigida* em diferentes doses (Mr1 e Mr2)

ALTERAÇÕES HISTOPATOLÓGICAS	Fluoroacetato 7 mg/kg	Mr1 1,6 g/kg	Mr2 3,2 g/kg
Cérebro			
- congestão, hemorragia e edema	(6/6)	(6/6)	(6/6)
- morte neuronal	(4/6)	(2/6)	(6/6)
Coração			
- hemorragia	(5/6)	(6/6)	(4/6)
- degeneração de fibras miocárdicas	(6/6)	(6/6)	(5/6)
Fígado			
- congestão	(6/6)	(6/6)	(6/6)
- degeneração vacuolar microgoticular	(3/6)	(3/6)	(3/6)
Rim			
- congestão	(6/6)	(6/6)	(6/6)
- degeneração tubular	(6/6)	(5/6)	(6/6)

Figura 9 – Fotomicrografias de cérebro, miocárdio, fígado e rim de ratos do grupo controle. **A)** córtex cerebral, HE, 100x; **B)** cérebro, HE, 100x; **C)** cerebelo, HE, 40x; **D)** miocárdio, HE, 200x; **E)** fígado, HE, 100x e **F)** rim, HE, 200x. Todos apresentaram histologia dentro do padrão de normalidade

Figura 10 – Fotomicrografias de cérebro, miocárdio, fígado e rim de ratos intoxicados experimentalmente por fluoroacetato de sódio (7 mg/kg). **A)** região de ponte. Observar foco de hemorragia na substância branca. HE, 100x; **B)** cérebro. Notar morte neuronal caracterizado por neurônios retraídos e basofílicos. HE, 200x; **C)** miocárdio. Notar foco de hemorragia. HE, 200x; **D)** miocárdio. Notar foco de degeneração das fibras miocárdicas. HE, 200x; **E)** fígado. Notar degeneração vacuolar microgoticular ao redor da veia hepática central. HE, 200x e **F)** rim. Notar células do epitélio tubular em degeneração (nefroze) HE, 200x

Figura 11 – Fotomicrografias de cérebro, miocárdio, fígado e rim de ratos intoxicados experimentalmente pelo extrato de *Mascagnia rigida*. **A)** cérebro. Notar foco de hemorragia na meninge e morte neuronal no parênquima cerebral. HE, 200x; **B)** cérebro. Notar área de morte neuronal no parênquima cerebral. HE, 200x; **C)** miocárdio. Notar congestão e focos de hemorragia. HE, 100x; **D)** miocárdio. Notar foco de degeneração das fibras miocárdicas. HE, 200x; **E)** fígado. Notar degeneração vacuolar microgoticular ao redor da veia hepática central. HE, 200x e **F)** rim. Notar degeneração do epitélio tubular renal (nefrose). HE, 200x

5.2 Experimento 2 – Avaliação do comportamento cromatográfico do padrão de fluoroacetato de sódio e a sua identificação em plantas tóxicas utilizando a Cromatografia em Camada Delgada.

5.2.1 Delineamento experimental

Para este estudo foi utilizado o padrão de fluoroacetato de sódio preparado conforme o item 4.3, sendo a água ultra pura Milli Q usada como o branco.

Com o auxílio de um capilar, a água (controle negativo) e o padrão de fluoroacetato de sódio (controle positivo), em várias concentrações, foram aplicados em cromatoplasas de celulose. Após alguns minutos para a secagem em temperatura ambiente, a cromatoplasa foi transferida para uma cuba previamente saturada, sendo desenvolvida no sistema de solventes composto por: etanol, hidróxido de amônio, piridina e água, na proporção de 95:3:1:1, respectivamente, até atingir o limite desejado, isto é, que a fase móvel por capilaridade subisse 10 cm da placa. Em seguida, esta cromatoplasa foi colocada para secar até a evaporação de todo o solvente, sendo, então, revelada com o azul de Nilo para a visualização de manchas (figura 12).

Em outra placa, também impregnada com celulose, foram aplicados os extratos aquosos (20µL e 25µL) obtidos das folhas verdes secas das plantas *Palicourea marcgravii* e *Mascagnia rigida* (5g planta/50mL água) e soluções 20µL e 50µL do padrão de fluoroacetato de sódio, sendo eluídas e reveladas conforme descrito para o padrão do fluoroacetato (figura 13 A e B).

5.2.2 Resultados

Os resultados deste estudo estão representados nas figuras 12 e 13, nas quais mostram o comportamento cromatográfico do padrão de fluoroacetato de sódio em várias concentrações (figura 12) e também o comportamento cromatográfico dos extratos aquosos diluído e também concentrados das plantas tóxicas *Palicourea marcgravii* e *Mascagnia rigida* (figura 13 A) e os extratos diluídos das mesmas plantas (figura 13 B).

Figura 12 - Cromatoplaça de celulose contendo o padrão de fluoroacetato de sódio, em diversas concentrações: A. branco (água), B. 50 µg, C. 25 µg, D. 10 µg, E. 5 µg e F. 0,5 µg

Figura 13 - Cromatoplasas impregnadas com celulose. **A)** A. 50 μ L padrão; B. 25 μ L *P. marcgravii* concentrada; C. 25 μ L *M. rigida* concentrada; D. 25 μ L *P. marcgravii*; E. 25 μ L *M. rigida*; **B)** A. 20 μ L padrão; B. 20 μ L *P. marcgravii*; C. 20 μ L *M. rigida*

Como pode ser observado na figura 12, ilustra uma cromatoplasa contendo controle negativo, isto é, somente água e várias concentrações da solução padrão de fluoroacetato de sódio. Após a revelação com o corante azul do Nilo pode-se visualizar manchas de coloração azul intenso com Rf. semelhante de aproximadamente 0,18. Pode-se constatar também que, o tamanho das respectivas manchas é diretamente proporcional à concentração do agente tóxico, isto é, quanto menor a concentração do sal colocado na placa menor é o tamanho da mancha revelada.

Com relação as figura 13 A e B pode-se observar que tanto as amostras do extrato aquoso das duas plantas estudadas quanto da solução padrão de fluoracetato de sódio na cromatoplasa se apresentaram com Rf semelhantes, isto é 0,18 aproximadamente e de coloração azul intensa em fundo lilás.

5.3 Experimento 3 – Análise cromatográfica de soro proveniente de animais intoxicados experimentalmente utilizando Cromatografia líquida de alta eficiência com detector de condutividade iônica.

5.3.1 Delineamento experimental

Para isso, um volume fixo de 1.0 mL da solução-padrão de fluoroacetato de sódio na concentração desejada e recentemente obtido pela diluição da solução estoque foi transferido para um tubo de 25 mL, com tampa, juntamente com 1,0 mL do soro preparado conforme o item 4.8.1, 1,0 mL de permanganato de potássio $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ e 1,0 mL de solução aquosa de ácido acético 5% (v/v). Após leve aquecimento, por 30 segundos em banho-maria, foi adicionado 10,0 mL de acetona, homogeneizando-se em agitador de tubos, por 5 minutos. Após centrifugação, a 3000 rpm por 5 minutos, o sobrenadante foi transferido para um béquer de 100ml e evaporado em um sistema de exaustão, sobre uma mesa de agitação. O extrato obtido foi transferido para um tubo de vidro com 12,0 ml de acetato de etila e 0,5 mL de ácido perclórico $0,20 \text{ mol L}^{-1}$, homogeneizando-se lentamente por cinco minutos em um agitador de tubos.

O extrato orgânico foi transferido para um béquer e evaporado até a secura; no resíduo obtido, foi adicionado 1,0 mL de água pura, e injetado diretamente no sistema de cromatografia líquida.

5.3.2 Resultados

Esta metodologia utilizada apresentou para as soluções contendo somente o fluoroacetato de sódio, linearidade entre 1,25 e 5 µg/mL e coeficiente de correlação de 0,999 (figuras 14 e 15) e para as amostras de soro fortificadas o método também apresentou linearidade com coeficiente de correlação de 0,972 (figuras 16 e 17).

A figura 18 representa o cromatograma de um animal intoxicado experimentalmente com 7,0 mg/kg de fluoracetato de sódio, onde pode ser observada deflexão aos 9,2 minutos, similar a encontrada para o fluoracetato no cromatograma do padrão (figura 14).

A figura 19 representa o cromatograma de um animal intoxicado experimentalmente com 3,2 g/kg de extrato aquoso de *Mascagnia. rigida*, neste cromatograma a partir dos 7 minutos a linha cromatográfica ultrapassa os valores da escala não retornando mais aos valores da linha de base, portanto fica impossível a constatação de fluoracetato na amostra.

Figura 14 - Cromatograma obtido após injeção de 100 μ L do extrato do padrão de fluoroacetato de sódio na proporção de 5 ppm

Figura 15 - Curva analítica com o padrão de fluoroacetato de sódio

Figura 16 - Cromatograma obtido após a injeção de 100 μ L do extrato final da recuperação do fluoroacetato de sódio de soro sanguíneo de rato enriquecido com 5 ppm do analito.

Figura 17 - Curva analítica com soro de rato enriquecido com o padrão de fluoroacetato de sódio.

Figura 18 - Cromatograma obtido após a injeção de 100 μ L do extrato final de soro sanguíneo de rato intoxicado com 7,0 mg/kg de fluoracetato de sódio.

Figura 19 - Cromatograma obtido após a injeção de 100 μ L do extrato final de soro sanguíneo de rato intoxicado com 3,2 g/kg de extrato aquoso de *Mascagnia. rigida*

5.4 Experimento 4 – Análise cromatográfica dos extratos aquosos das plantas tóxicas *Mascagnia rigida* e *Palicourea marcgravii*, utilizando CLAE com detector de UV

A análise cromatográfica foi realizada em condições isocráticas, em um sistema de cromatografia líquida de alta eficiência, Shimadzu, Modelo SPD- 10AV vp, SCL – 10A vp System Controller, LC-10AD vp Liquid Chromatograph, um detector ultra-violeta, uma válvula de injeção com alça de amostragem de 50 µL.

As condições cromatográficas utilizadas foram: fluxo 1,0 ml/mimuto; comprimento de onda UV 225 nm; fase móvel utilizada: solução de ácido ortofosfórico (H₃PO₄) a 0,02 M, pH 1,8 e temperatura do forno: 40°C.

5.4.1 Delineamento experiemental

Os procedimentos de extração utilizados para determinação da presença de fluoracetato de sódio nas plantas *Mascagnia. rigida* e *Palicourea marcgravii* seguiram o proposto por Minnaar et al (2000). Em amostras de plantas contendo 1,0 g foram adicionados 20 mL de solução aquosa contendo ácido ortofosfórico (H₃PO₄) pH 1; esta mistura foi homogeneizada, em seguida o volume foi ajustado para 50 mL com a mesma solução inicial esta suspensão foi agitada por um minuto. Em seguida aproximadamente 3,0 mL deste volume final foram separados e centrifugados por 30 minutos a 8.500 g.

Um volume de 50 μL do sobrenadante límpido, após filtração, foi injetado no cromatógrafo.

Para padronização da metodologia foi realizada curva de calibração com solução aquosa de fluoracetato de sódio dissolvida em água ultra-pura MilliQ em concentrações entre 25 $\mu\text{g/mL}$ e 10.000 $\mu\text{g/mL}$.

5.4.2 Resultados

Esta metodologia utilizada apresentou para as soluções contendo somente o fluoroacetato de sódio, linearidade entre 75 e 5.000 $\mu\text{g/mL}$ e coeficiente de correlação (r) = 0,9936 e coeficiente de determinação $r^2 = 0,9872$ (figura 23).

As figuras 20, 21 e 22 representam os cromatogramas do fluoracetato de sódio em solução aquosa, de extrato aquoso de *Mascagnia rigida* e de *Palicourea marcgravii* respectivamente. Como pode ser observado na figura 20, contendo o cromatograma do fluoracetato em água, o tempo de retenção nestas condições cromatográficas foi de 16,92 minutos. Nas figuras 21 e 22 os cromatogramas apresentam também picos na região entre 16 e 18 minutos, zona esta, onde provavelmente deve estar o fluoracetato de sódio. Pode ser observado também, grande quantidade de interferentes nos cromatogramas demonstrados pela inconstância da linha de base.

Figura 20 – Cromatograma obtido após injeção de 5,0 mg/mL do padrão de fluoroacetato de sódio

Figura 21 – Cromatograma obtido após a injeção de 50 µL do extrato aquoso de *Mascagnia rigida*

Figura 22 – Cromatograma obtido após injeção de 50 µL do extrato aquoso de *Palicourea marcgravii*

Figura 23 – Mostra a melhor reta de regressão com respectivos limites de confiança superior e inferior utilizando padrão de fluoracetato de sódio em água ultra-pura MilliQ. As concentrações variaram entre 75 $\mu\text{g/mL}$ e 10 mg/mL . Foi realizada regressão linear utilizando o software Instat pad. CLAE acoplado a detector de UV (225 nm, fluxo 1,0 mL, pH 1,86) Número de pontos = 6; coeficiente de correlação (r) = 0,9936 e coeficiente de determinação (r^2) = 0,9872

Discussão

6 DISCUSSÃO

Os sintomas presentes nas intoxicações por fluoracetato de sódio (FAS), em diferentes espécies animais, foram classificados inicialmente por Chenoweth e Gilman, em 1946 e estão presentes em excelente trabalho de revisão escrito em 2004 por Miranda Sherley, estes autores a partir de diferentes estudos com diferentes espécies animais classificaram as intoxicações por FAS em quatro categorias assim distribuídas: **classe I** onde a maior parte dos efeitos são cardíacos; **classe II** onde os efeitos ocorrem tanto no Sistema Nervoso Central (SNC), quanto no coração; **classe III** onde a maior parte dos efeitos ocorrem no SNC; e finalmente **classe IV**, onde ocorrem, nos animais, respostas atípicas, com diminuição da frequência respiratória e cardíaca (SHERLEY, 2004).

Diferentes autores comentam também que, em geral, herbívoros exibem predominantemente envolvimento cardíaco nos quadros de intoxicação, isto é classe I, carnívoros apresentam marcadamente sinais de alteração no SNC, tendo o que acarreta morte por depressão respiratória (classe III) e finalmente, onívoros que exibem, nas intoxicações, sinais envolvendo tanto o sistema cardíaco quanto o SNC (EGEKEZE; OEHME, 1979).

Nos ratos intoxicados, no presente experimento, com 7,0 mg/kg de FAS os sinais encontrados foram: prostração dispnéia, tremores, presença de pêlos arrepiados, sangramento ocular (cromodacriorréia), convulsões tônica e tônico-clônica. De acordo com alguns autores, entre eles Chenoweth e Gilman (1946), os ratos podem ser classificados na

categoria IV, por apresentarem respostas atípicas como fraqueza e extrema bradicardia, estes mesmos autores descreveram que os sinais de intoxicação, em ratos, iniciam com aparecimento de tremores, hiperexcitabilidade e convulsões tônicas, outros autores, no entanto, como Hayes em 1973 e Egekeze e Oehme em 1979, descreveram também a presença de comportamento apreensivo, depressão, posturas anormais sugestivas de dor abdominal, vocalizações anormais, dificuldade respiratória, espasmos de músculos abdominais, aumento da frequência de defecação e micção urinária, dilatação de pupila, convulsões tônicas seguida de períodos de flacidez muscular.

Os resultados apresentados no presente estudo repetiram, nas intoxicações por FAS em ratos, os sinais relatados para roedores pelos diferentes autores, sendo que estes sinais tão característicos foram utilizados em posterior comparação, com os sinais encontrados nas intoxicações por *Mascagnia rigida*.

A observação da tabela 2 mostra que as intoxicações por extrato aquoso de *Mascagnia rigida* acarreta nos ratos também: prostração, tremores, desconforto respiratório, convulsões tônico e tônico-clônica. O que parece sugestivo da presença deste agente tóxico, também nesta planta. A crítica a tal afirmação é que vários agentes convulsivantes também apresentam estes mesmos sinais clínicos, que não são característicos apenas para o FAS. Frente a tal dúvida, o passo seguinte foi a partir dos dados anatomopatológicos, tentar encontrar dados mais concisos para validar a presença deste agente tóxico no extrato da *Mascagnia rigida*.

A avaliação histopatológica de fragmentos de órgãos, provenientes de ratos intoxicados com 7,0mg/kg de FAS ou com diferentes concentrações de extrato aquoso de *Mascagnia rigida*, pode ser conferida na tabela 4 e estão ilustradas nas figuras 9, 10 e 11. A observação desta tabela mostra que os animais que receberam FAS apresentaram com

maior frequência, lesões basicamente em três locais: nas estruturas cerebrais, no miocárdio nos rins e também no fígado. A literatura científica é rica em relatos clínicos descrevendo as intoxicações por este agente tóxico, em diferentes espécies animais, porém é extremamente pobre na descrição de achados histopatológicos encontrados nestas mesmas intoxicações.

Eason (2002) relata que o coração, o fígado e os rins são os locais onde provavelmente ocorrem o aparecimento de lesões encontradas nas intoxicações por FAS. Também Collicchio et al. (2006), estudando gatos intoxicados com FAS, descrevem lesões em diferentes órgãos após a necropsia, destacando nestes animais a presença de degeneração e congestão hepática, degeneração córtico-medular renal, congestão e edema cerebral.

O mecanismo de ação proposto para este agente tóxico, que bloqueia o ciclo de Krebs, por ação do seu metabólito tóxico, o fluorocitrato, que por sua vez, bloqueia competitivamente a aconitase, impedindo a conversão do citrato em isocitrato e tendo como consequência o acúmulo de citrato no organismo, com consequente diminuição da produção de ATP em até 50%. Parece lógico, a partir do entendimento da toxicodinâmica deste agente tóxico, que órgãos que necessitem de maior aporte energético serão aqueles onde as lesões aparecerão de forma marcante, isto é o cérebro, o coração e os rins. O que foi confirmado, em achados histopatológicos presentes nos animais intoxicados experimentalmente com 7,0 mg/kg de FAS.

A presença de congestão, hemorragia e edema acompanhada de morte neuronal, na maioria dos animais intoxicados, confirma as lesões no SNC. A degeneração das fibras

miocárdicas indicam lesão cardíaca; a congestão e degeneração tubular confirma as lesões renais e a presença de degeneração vacuolar microgoticular confirma a lesão hepática.

A partir destes dados histopatológicos, cabe neste momento, a comparação destes achados com FAS aos encontrados nas intoxicações com diferentes concentrações de extrato aquoso da *Mascagnia rigida*. Mais uma vez os dados se apresentaram coerentes na constatação da existência deste agente tóxico no extrato desta referida planta, pois todos os achados histopatológicos, já descritos anteriormente, também estão presentes nos órgãos provenientes dos animais intoxicados pela *Mascagnia rigida*, variando somente na frequência entre as duas doses utilizadas.

Para confirmação da presença ou não do FAS no extrato da *Mascagnia rigida* foi realizada, a seguir, a análise química deste agente, para tanto, após revisão de literatura comparou-se diferentes métodos cromatográficos, utilizando CCD em base de celulose e CLAE acoplada a detectores de UV e de condutividade iônica.

A análise química do FAS representa um desafio a todos os toxicologistas, pois esta substância química, diferente da maior parte dos agentes tóxicos, tem característica hidrossolúvel, apresentando também semelhança química aos ácidos orgânicos de cadeia molecular pequena, como o ácido acético o ácido butírico e o propiônico, que são comumente encontrados em organismos vivos.

Um dos objetivos propostos, no presente estudo, foi padronização de metodologia analítica, entre as várias publicadas pela literatura científica, que se ajustasse às características da maioria dos laboratórios de toxicologia existentes no país, isto é, optou-se pelo estudo das técnicas cromatográficas como a CCD e a CLAE. Cabe lembrar que métodos cromatográficos utilizando cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de

massas, apesar de excelentes, não foram estudados no presente trabalho por necessitarem de aparelhagem ainda não disponível na maioria dos laboratórios de toxicologia existentes no Brasil.

O primeiro método de identificação do FAS, em substrato biológico, utilizando CCD foi o proposto por Vickery e Vickery em 1973, estes autores utilizaram como fase estacionária cromatoplas de celulose, e como fase móvel uma mistura de etanol, hidróxido de amônio, piridina e água, para posterior revelação com o corante azul do Nilo. Esta metodologia tem como vantagem baixo custo para implantação, quando comparadas com as metodologias mais recentes e foi utilizada por estes autores para detecção de FAS em extratos de várias plantas da família *Dichapetalum*.

Um estudo crítico sobre a esta metodologia em CCD mostrou que apesar de bastante factível, este método analítico qualitativo apresenta várias limitações. A primeira a ser relatada é a inespecificidade do revelador utilizado, soma-se a isto, o baixo Rf (0,18) encontrado para o FAS, após o desenvolvimento da cromatoplasa com a fase móvel proposta. O formato das manchas de FAS, reveladas com Azul do Nilo, também não se apresenta totalmente adequado para determinação de valor exato do Rf, sendo que a coloração azul vivo em fundo azul púrpura também constitui fator limitante para observação de FAS em baixas concentrações.

A cromatoplasa ilustrada na figura 12, onde foram utilizadas várias concentrações de FAS, mostra que é possível a observação de mancha visível até 0,5 µg deste agente tóxico, porém, quando este sal está dissolvido em substrato biológico a visualização se torna mais difícil. Como podem ser observados nos “spots”, revelados na cromatoplasa, que diminuem de tamanho com a diminuição da quantidade de amostra colocada. Porém

quando se observa as manchas da placa contendo *Mascagnia rigida* e *Palicourea marcgraviis* (figura 13 A e B) os “spots” revelados pelo corante tem uma aparência mais disforme, apresentando presença de caudas que se prolongam ascendendo pela cromatoplaça. Cabe lembrar que o extrato da *Palicourea macgravii* foi colocado junto à placa, a título de comparação entre estas duas plantas, uma vez que a literatura científica já constatou a presença do FAS na *Palicourea macgravii* (OLIVEIRA, 1963). Porém a crítica a esta metodologia é a ausência de estudos mais extensos sobre o comportamento cromatográfico de extratos de diferentes plantas que comprovadamente não possuam fluoracetato de sódio em sua composição, e a real constatação da inexistência de falsos positivos.

A título de informação cabe ressaltar que os diagnósticos toxicológicos realizados sobre as intoxicações de animais, ocorridas na Fundação Parque Zoológico de São Paulo, utilizaram esta metodologia em CCD e os resultados foram aceitos pelos peritos policiais do Estado de São Paulo que acataram como válidos os resultados obtidos.

A seguir foram avaliadas técnicas utilizando CLAE acoplada a dois tipos de detectores, o de UV e o de condutividade iônica.

O método utilizando CLAE/UV baseou-se na metodologia proposta por Minnaar et al. (2000), com algumas modificações, que, a primeira vista, se apresentou facilmente reproduzível em nossas condições experimentais. Estes pesquisadores utilizaram coluna especial para este fim (“C-610H Supelco” para análises de ácidos orgânicos, com valor aproximado de R\$ 5.000,00) que também é freqüentemente utilizada por indústrias para quantificação de ácido acético e tartárico na análise de vinhos. Basicamente esta coluna combina exclusão por tamanho com cromatografia de fase reversa.

Diferente do trabalho realizado por Minnaar et al. (2000) a linearidade em nossas condições experimentais ocorreu a partir de 75 µg/mL ou 3,5 µg injetado até 10.000 µg/mL, isto é, um pouco acima dos valores conseguidos pelos autores (25,0 µg/mL ou 1,25 µg injetado). Os autores utilizaram 210 nm para leitura, porém, no presente estudo foi utilizado 225 nm, já que o FAS apresenta absorção a partir de 210 nm até 240 nm, cabe ressaltar que, a absorção nesta faixa de comprimento de onda se apresenta desvantajoso, pois a maioria das substâncias absorvem luz entre 210 e 240 nm, o que dificulta a análise do agente tóxico em questão, a escolha de 225 nm ocorreu na tentativa de diminuir a influência da absorção de UV ocorrida pela fase móvel e melhorar a seletividade da metodologia.

Os resultados desta técnica cromatográfica podem ser observados nos cromatogramas ilustrados nas figuras 20, 21 e 22, e a linearidade e a equação da reta na figura 23. Como pode ser observado na figura 20 o tempo de retenção obtido para o FAS foi de 16,92 minutos. Nesta metodologia cromatográfica foi definida uma janela de 5% para o tempo de retenção, isto é, substâncias que apresentam absorção de luz em 225 nm e que tenham tempo de retenção entre 16,07 e 17,77 minutos, são consideradas analiticamente como FAS.

Como pode ser observado na figura 21, conseguida a partir do extrato de *Mascagnia rigida* a presença de um pico com ponto máximo de absorção em 16,1 minutos e declínio até 18 minutos, intervalo de tempo de retenção que o método determina para o FAS, e portanto, sendo de conhecimento que todos os ácidos orgânicos podem ser identificados neste sistema cromatográfico, para a dúvida se realmente o pico observado confirma, de forma definitiva, a presença de FAS no extrato da planta.

A observação da figura 22 obtida com extrato de *Palicourea marcgravii* mostra um pico cromatográfico de absorção que tem início em 17,0 minutos e finda aos 18 minutos, isto é, bem no tempo definido pelo método para identificação do FAS.

Nos dois cromatogramas das plantas estudadas, observam-se as linhas de base pouco adequadas, indicando a presença de vários interferentes, concluindo que os dados obtidos somente por esta técnica analítica podem acarretar dúvidas sobre a presença ou não do FAS. A avaliação crítica desta metodologia indica que para um resultado mais confiável seria mais adequada associação de metodologias para purificação, utilizando fase sólida.

Outra crítica à utilização de detector de UV para diagnóstico de intoxicação em animais é o limite de detecção, uma vez que as concentrações de FAS, nestas condições analíticas, estão, na maior parte das vezes, abaixo dos valores detectados com segurança por esta metodologia.

Outra técnica utilizada, no presente trabalho, baseou-se em estudos realizados por Zeferino et al. (2005) que estudaram a determinação do FAS em soro sanguíneo por CLAE com detector de condutividade iônica e coluna de troca aniônica. Esta metodologia baseou-se na limpeza da amostra biológica seguida de extração “líquido-líquido”.

Os valores obtidos na curva analítica com as soluções padrão de fluoroacetato de sódio em solução aquosa (figuras 15 e 17), evidenciaram linearidade satisfatória na determinação do fluoroacetato, sendo que o método apresentou um coeficiente de correlação maior que 0,99, e limite de detecção em amostras de soro sanguíneos de 0,30 µg/mL, portanto o mais sensível dos três métodos analíticos aqui estudados. Um cromatograma fortificado com 5,0 µg/mL de FAS esta ilustrado na figura 16 e outro de animal intoxicado com 7,0 mg/kg de FAS esta ilustrado na figura 18.

A mesma metodologia analítica foi utilizada para detecção do FAS em animais intoxicados com *Mascagnia rigida*, porém os resultados obtidos, conforme pode ser visto na figura 19, não permite afirmar com segurança a presença deste agente tóxico nos animais intoxicados e também no extrato aquoso purificado da planta, em decorrência da presença de interferentes na mesma região do cromatograma.

A partir do conjunto de dados obtidos neste presente estudo, parece bem provável ser o FAS ou algum derivado fluorado com mecanismo de ação tóxica similar, o responsável pelos sinais presentes nos animais intoxicados pelo extrato da *Mascagnia rigida*.

Conclusões

7 CONCLUSÕES

- As manifestações clínicas e anatomopatológicas encontradas na intoxicação experimental de ratos por 7,0 mg/kg de fluoracetato de sódio são semelhantes as descritas na literatura científica.
- As manifestações clínicas e anatomopatológicas encontradas nas intoxicações por 1,6 e 3,2 g/kg de extrato aquoso de *Mascagnia rigida*, em ratos, assemelham-se às obtidas dos animais que receberam 7,0 mg/kg de fluoracetato de sódio.
- A utilização de metodologia em CCD apresentou resultados positivos para fluoracetato de sódio em extratos de *Mascagnia rigida* e de *Palicourea marcgravii*.
- A utilização de metodologia em CLAE com detector de UV detectou a presença de pico cromatográfico com tempo similar ao observado para fluoracetato de sódio nos extratos da *Mascagnia rigida* e da *Palicourea marcgravii*, porém por esta técnica não pode ser descartada a presença de interferentes com tempo de retenção similar neste sistema cromatográfico.
- Utilizando metodologia em CLAE com detector de condutividade iônica foi detectada a presença de pico cromatográfico com tempo similar ao observado para fluoracetato de sódio nos animais intoxicados com 7,0 mg/kg deste agente tóxico, porém, possivelmente pela presença de interferentes, o método não se mostrou adequado para identificação de fluoracetato de sódio em animais que receberam extrato de *Mascagnia rigida*.
- A partir do conjunto de dados obtidos neste presente estudo, parece provável, ser o fluoracetato de sódio, ou algum derivado fluorado com mecanismo de ação tóxica similar, o responsável pelos sinais clínicos e anatomopatológicos presentes nos animais intoxicados pelo extrato da *Mascagnia rigida*.

Referências

REFERÊNCIAS

ALLENDER, W. J. Determination of sodium fluoroacetate (compound 1080) in biological tissues. **Journal of Analytical Toxicology**, 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.

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, 200-206, 241-243, 408, 414, 1968.

APTEKMAN, K. P.; ALTWEGG, D.; KITAMURA, E. A.; VICENTE, P. C.; SAKATE, M. Estudo retrospectivo de felinos intoxicados por monofluoroacetato de sódio. In: MOSTRA CIENTÍFICA DA FMVZ-UNESP, 7., 2003, Botucatu. **Anais da 7ª Mostra Científica da FMVZ-UNESP, Botucatu**. Botucatu: FMVZ-UNESP, 2003. v. 7, p. 58.

BAKER, R. C.; POKLIS, A. Forensic toxicology: a broad overview of general principles. In: BALLANTYNE, B.; MARRS, T.; SYVERSEN, T. **General and applied toxicology**. 2. ed. London: Macmillan, 1999. v. 3, p. 1489-1507.

BATATINHA, M. J. M.; SPINOSA, H. S.; BERNARDI, M. M. Toxic effects of *Mascagnia rigida* in laboratory animals. **Veterinary and Human Toxicology**, v. 30, n. 3, p. 259, 1988.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Medicamentos. Inspeção. Resolução n.899, de 29 de maio de 2003. “**Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos**”. 2003. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br>>. Acesso em: 03 jul. 2007.

BURGER, I. H.; FLECKNELL, P. A. Poisoning. In: CHANDLER, E. A.; GASKELL, C. J.; GASKELL, R. M. **Feline Medicine and Therapeutics**. 2 ed. New York: Blackwell Science, 1994, p. 656-677.

CHASIN, A. A. M.; CHASIN, M.; SALVADORI, M. C. Validação de Métodos Cromatográficos em Análises Toxicológicas. **Revista de Farmácia e Bioquímica**, v. 30, n. 2, p. 49-53, 1994.

CHASIN, A. A. M.; NASCIMENTO, E. S.; RIBEIRO-NETO, L. M.; SIQUEIRA, M. P. B.; ANDRAUS, M. H.; SALVADORI, M. C.; FERNÍCOLA, N. A. G.; GORNI, R.; SALCEDO,

S. Validação de métodos em análises toxicológicas: uma abordagem geral. **Revista Brasileira de Toxicologia**, v. 11, n. 1, p. 1-6, 1998.

CHENOWETH, M. B.; GILMAN, A. Studies on the pharmacology of fluoroacetate. I. Species responses to fluoroacetate. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 87, p. 90-103, 1946.

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.

CIOLA, R. Introdução. In: _____. **Introdução a cromatografia em fase gasosa**. São Paulo: Edgard Blucher, 1973. p. 1-2.

CISCATO, C. H. P. **Resíduos de praguicidas em leite consumido na cidade de São Paulo, de 1996 a 1998**. 2000. 121 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2000.

COLLICCHIO, R. C. **Toxicologia do fluoroacetato de sódio: revisão de literatura no estudo clínico e terapêutico da intoxicação em gatos**. 2002. 35 f. Monografia. Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2002.

COLLICCHIO-ZUANAZE, R. C. **Perfil hematológico, bioquímico, histopatológico e toxicológico de gatos induzidos experimentalmente com monofluoroacetato de sódio**. 2006. 167 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.

COLLICCHIO-ZUANAZE, R. C.; SAKATE, M.; SCHWARTZ, D. S.; TREZZA, E.; CROCCI, A. J. Calcium gluconate and sodium succinate for therapy of sodium fluoroacetate experimental intoxication in cats: clinical and electrocardiographic evaluation. **Human & Experimental Toxicology**, v. 25, p. 175-182, 2006.

CONSDEN, R. Chromatographic methods. In: STOLMAN, A. **Toxicology. mechanisms and analytical methods**. Nova York: Academic Press, 1960. v. 1, p. 303-307.

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

EASON, C. Sodium monofluoroacetate (1080) risk assessment and risk communication. **Toxicology**, v. 27, p. 523-530, 2002.

EGEKEZE, J. O.; OEHME, F. W. Determination of sodium monofluoroacetate (compound 1080) in biological tissues using oxygen combustion and a fluoride selective membrane electrode. **Toxicology Letters**, v. 4, p. 461-467, 1979.

EGEKEZE, J. O.; OEHME, F. W. Sodium monofluoroacetate (SMFA, COMPOUND 1080): a literature review. Comparative toxicology laboratory, Kansas State university, Manhattan, Kansas 66506. **Veterinary and Human Toxicology**, v. 21, p. 411-416, 1979.

EGYED, M. N.; NOBE, T. A.; KLOPPER, U.; SHLOSBERG, A. The differential diagnosis of sodium fluoroacetate and strychnine poisoning in dogs. **Refuah Veterinarith**, v. 34, p. 125-130, 1977.

ESTEBAN, C. **Comparação entre as concentrações de tetraciclina no plasma, líquido sinovial e leite de vacas com doença do casco, submetidas às administrações intravenosa e intravenosa regional e sua implicação na presença de resíduos no leite.** 2003. 76 f. Dissertação (Mestrado em Análises Clínicas e Toxicológicas) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2003.

FUYU, G.; HUIFANG, W.; YI, L. Sensitive and selective method for the determination of sodium monofluoroacetate by capillary zone electrophoresis. **Journal of Chromatography**, v. 719, p. 421-426, 1996.

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.

GONCHAROV, N. V.; JENKINS, R. O.; RADILOV, A. S. Toxicology of fluoroacetate: a review, with possible directions for therapy research. **Journal of Applied Toxicology**, v. 26, p. 148-161, 2006.

HARRIS, W. F. Clinical toxicities of dogs. **The Veterinary Clinics of North America**, v. 5, n. 4, p. 605-622, 1975.

- HAYES, F. D., SHORT, R. D., GIBSON, J. E. Differential toxicity of monochloroacetate, monofluoroacetate and monoiodoacetate in rats. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 26, p. 93-102, 1973.
- HUMPHREYS, D. J. **Veterinary toxicology**. 3 ed. London: Bailliere Tindall, 1988. p. 179–181.
- HUMPHREYS, D. J.; CLARKE, M. L. Poisoning. In: CHANDLER, E. A.; THOMPSON, D. J.; SUTTON, J. B.; PRICE, C. J. **Canine medicine and therapeutics**. 3. ed. New York: Blackwell Science, 1991. p. 723-739.
- KEMMERLING, W. Toxicity of *Palicourea marcgravii*: combined effects of fluoroacetate, N-methyltyramine and 2-methyltetrahydro-beta-carboline. **Journal of Biosciences**, v. 51, p. 59-64, 1996.
- KIMBALL, B. A.; MISHALANIE, E. A. Gas chromatography determination of sodium monofluoroacetate as the free acid in an aqueous solvent. **Journal of Chromatography**, v. 634, p. 289-296, 1993.
- KRAMER, H. L. Liquid chromatography determination of sodium fluoroacetate (compound 1080) in meat baits and formulations. **Journal Association of Official Analytical Chemists**, v. 67, n. 6, p. 1058-1061, 1984.
- LEITE, F. **Validação em análise química**. São Paulo: Ed. Átomo, 1996. 124 p.
- LIMA DE MENEZES, M. **Introdução a toxicologia analítica**. Botucatu: UNESP. Instituto de Biociências, 2001. 38 p. (Apostila do Curso de Especialização em Toxicologia).
- MARAI, J. S. C. Monofluoroacetic acid, the toxic principle of *Gifblaar*, *Dichapetalum cymosum*. **Onderstepoort Journal of Veterinary Science and Animal Industry**, v. 20, n. 1, p. 67-73, 1944.
- 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.
- MCILROY, J. C. The sensitivity of Australian animals to 1080 poison. I. Intraspecific variation and factors affecting acute toxicity. II. Marsupial and eutherian carnivores. **Australian Wildlife Research**, v. 8, p. 369-383, 385-399, 1981.

- MEDEIROS, R. M. T.; NETO, S. A. G.; BARBOSA, R. C.; LIMA, E. F.; RIETE-CORREA, F. Sudden bovine death from *Mascagnia rígida* in Northeastern Brazil. **Veterinary and Human Toxicology**, v. 44, n. 5, p. 286-288, 2002.
- MELITO, A. L. **Metodologia para identificação cromatográfica de aldicarb em sangue de cães e gatos intoxicados**. 2004. 63 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2004.
- 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.
- MORI, M.; NAKAJIMA, H.; SETO, Y. Determination of fluoroacetate in aqueous samples by headspace gás chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 736, p. 229-234, 1996.
- NETO, L. M. R. **Avaliação dos níveis urinários de hidrocortisona em cavalos de corrida visando o controle antidopagem**. 1999. 81 f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1999.
- NOGUCHI, T. T.; OHNUKI, Y.; OKIGAKI, T. Effect of sodium fluoroacetate on myocardial cells in vitro. **Nature**, v. 209, p. 1197-1198, 1966.
- NOVÁK, L.; MISUSTOVÁ, J.; HOSEK, B. Course of respiratory exchange and body temperature in mice after repeated administration of fluoroacetate: a indicator of aconitase activity in vivo. **Physiologia Bohemoslovaca**, v. 21, p. 53-61, 1972.
- 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 monofluoroacetic acid from *Palicourea marcgravii* St. Hil. **Experientia**, v. 19, p. 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.
- 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.

- OZAWA, H.; TSUKIOKA, T. Determination of sodium monofluoroacetate in soil and biological samples as the dichloroanilide derivative. **Journal of. Chromatography**, v. 473, p. 251-259, 1989.
- PALERMO-NETO, J.; MORAES-MOREAU, R. L. Monofluoroacetato de sódio (Composto 1080). **Folha Médica**, v. 110, p. 59–65, 1995.
- PERES, T. B. Noções básicas de cromatografia. **Biológico, São Paulo**, v. 64, n. 2, p. 227-229, 2002.
- RIET-CORREA, F.; SCHILD, A. L.; LEMOS, R. A. A.; BORGES, J. R. J. Plantas que produzem morte súbita. In:_____. **Doenças de Ruminantes e Equídeos**. 3. ed. Rio Grande do Sul: Editora Palloti, 2007. v. 2. p.191-194.
- RUEHL-FEHLERT, C.; KITTEL, B.; MORAWIETZ, G.; DESLEX, P.; KEENAN, C.; MAHRT, C. R.; NOLTE, T.; ROBINSON, M.; STUART, B. P.; DESCHL, U. Revised guides for organ sampling and trimming in rats and mice – Part 1. **Experimental and Toxicologic Pathology**, v. 55, p. 91-106, 2003.
- SAKAI, T. F.; MIYAHARA, T. Fluorometric determination of monofluoroacetate acid. **Eisei Kagaku**, v. 27, p. 45-49, 1981.
- SHAH, V. P.; MIDHA, K. K.; DIGHE, S.; MCGILVERAY, I. J.; SHELLY, J.; YACOBI, A.; LAYLOFF, T.; VISWANATHAN, C. T.; COOK, C. E.; MCDOWALL, R. D.; PITTMAN, K. A.; SPECTOR, S. Analytical methods validation: bioavailability, bioequivalence and pharmacokinetics studies. **Pharmacology Research**, v. 9, n. 4, p. 588-592, 1992.
- SHERLEY, M. The traditional categories of fluoroacetate poisoning signs and symptoms belie substantial underlying similarities. **Toxicology Letters**, v. 151, p. 399-406, 2004.
- SILVA, D. M.; RIET-CORREA, F.; MEDEIROS, R. M. T.; OLIVEIRA, O. F. Plantas tóxicas para ruminantes e equídeos no Seridó Ocidental e Oriental do Rio Grande do Norte. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 26, n. 4, p. 223-236, 2006.
- SOTO-BLANCO, B.; HARAGUCHI, M.; SILVA, J. A.; GÓRNIK, S. L. Intoxicação natural de caprinos e ovinos por *Palicourea marcgravii* St. Hil. (Rubiaceae). **CAATINGA, Mossoró-RN**, v. 17, n.1, p. 52-56, 2004.

SPORKERT, F.; PRAGST, R.; HÜBNER, S.; MILLS, G. Headspace solid-phase microextraction with 1-prenyldiazomethane on-fibre derivatisation for analysis of fluoroacetic acid in biological samples. **Journal of Chromatography B**, v. 772, p. 45-51, 2002.

TAYLOR, J. K. Quality assurance of chemical measurements. **Analytical Chemistry**. Chelsea: Lewis Publishers, 1987. 328 p.

TOKARNIA, C. H.; GAVA, A.; BRITO, M. F.; BEZERRA, P. S.; OLIVEIRA, K. D. Intoxicação experimental em coelhos por *Mascagnia* sp (Malpighiaceae) procedente do Estado de Santa Catarina. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 18, n. 2, p. 61-64, 1998.

TOKARNIA, C. H.; DOBEREINER, J.; PEIXOTO, P. V. Poisonous plant affecting livestock in Brazil. **Toxicon: official journal of the International Society on Toxinology**, v. 40, n. 12, p. 1635-1660, 2002.

VICKERY, B.; VICKERY, M. L.; ASHU, J. T. Analysis of plant for fluoroacetic acids. **Phytochemistry**, v. 12, p. 145-147, 1973.

VICKERY, B.; VICKERY, M. L. Toxicity for livestock of organofluorine compounds present in Dichapetalum plant species. **The Veterinary bulletin**, v. 43, p. 537-542, 1973.

WADA, C. S. **Técnicas de laboratório**. 3. ed. São Paulo: Livraria Atheneu, 1987. 551p.

ZEFERINO, M. A. **Determinação do monofluoroacetato de sódio em soro sanguíneo por cromatografia líquida de alta eficiência**. 2005. 113 f. Tese (Doutorado em Química Analítica) – Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2005.

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.