UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Programa de Pós-Graduação em Toxicologia

COMPROVAÇÃO QUÍMICA E BIOLÓGICA DA
PRESENÇA DE MONOFLUOROACETATO
NAS FOLHAS DE *Palicourea marcgravii* St. Hil.

REGINA LÚCIA FONSECA DE MORAES

Tese para obtenção do grau de
DOUTOR

Orientador:

Prof. Dr. JOÃO PALERMO NETO

São Paulo

1993

REGINA LÚCIA FONSECA DE MORAES

COMPROVAÇÃO QUÍMICA E BIOLÓGICA DA PRESENÇA DE
MONOFLUOROACETATO NAS FOLHAS DE *Palicourea marcgravii* St. Hil.

COMISSÃO JULGADORA

TESE PARA OBTENÇÃO DO GRAU DE DOUTOR

Prof. Dr. João Valério

Presidente e Orientador

Prof. Dr. Antonio Flávio Reisio

2º Examinador

Prof. Dr. Mario Nestorome

3º Examinador

Prof. Dr. Sclatius

4º Examinador

Dobereiner

5º Examinador

Foi aprovada com (10) distinção
e louvor.

São Paulo, 6 de 4 de 1993

"Ó, estamos tão cheios de conhecimento
que estamos vazios: vazios de compreensão".

e. e. Cummings.

Por todas as alegrias, expectativas,
colaborações, desentendimentos, ilusões e
desilusões.

VALEU A PENA!

Meu eterno agradecimento à minha
MÃE e Prof^a. Dr^a. Ester de Camargo
Fonseca Moraes.

"Não julgar é outra maneira de livrar-se do medo e de
vivenciar o Amor. Quando aprendemos a não julgar os
outros - e os aceitamos por inteiro, sem desejar mudá-los -,
podemos ao mesmo tempo aprender a aceitarmos a nós
mesmos".

Gerald G. Jampolsky

Ao Prof. Dr. João Palermo Neto, pelo incentivo, apoio e carinho na orientação deste trabalho, meu profundo agradecimento.

"O verdadeiro problema não está nas dificuldades materiais que o mundo externo nos impõe, mas nas limitações da nossa mente".

Peter Russel

À
Mitsue Haraguchi

pela inestimável ajuda,
meu especial agradecimento.

"Mais importante do que dar a martelada é saber onde
bater com o martelo".

Lair Ribeiro

AGRADECIMENTOS

À Silvana Górnaiak, pela paixão contagiante à *Palicourea* e constante estímulo à realização desta pesquisa.

Aos amigos do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da USP, em especial ao Jorge Flório, Ingrid Taricano e Maria Helena, pelas idéias e sugestões.

Ao Flávio Mídio, por confiar em minha capacidade.

À Elizabeth Nascimento, Myriam Salvadori e Fábio, do Instituto Butantã, pelas valiosas colaborações.

Ao Hiroshi Morita, do Tokyo College of Pharmacy, por proporcionar a análise por RMN¹⁹F.

À Maria Aparecida Nicoletti, pela moagem das folhas de *Palicourea*.

À Leila, Helena e Suely, pelo apoio técnico.

À Moema dos Santos e Marfisia Lancellotti, pela normalização das referências bibliográficas.

À Maria Luiza pela digitação das referências bibliográficas.

Ao Wilson, vai e vem, está bom, ainda não está, corrige, testa, imprime, converte, digita,... Ufa!
Parabéns!

Ao Caruso, pelo acerto da informática,
disposição e paciência
sem contar com a matemática
aplicada com notável ciência!

Ao Fábio Moreau, da primeira linha digitada ao acabamento final; sua presença foi constante !!!

Ao Arthur, pelos momentos de relaxamento proporcionados para que o "livro" saísse logo!

Esta Tese foi parcialmente realizada nos Laboratórios da Disciplina de Farmacologia Aplicada e Toxicologia do Departamento de Patologia, da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo.

Nosso agradecimento, mais uma vez, ao Prof.Dr. João Palermo Neto, Diretor desta Faculdade.

RESUMO

Palicourea marcgravii St. Hil. (Rubiaceae) vulgarmente conhecida como "erva de rato" é uma planta tóxica brasileira de grande interesse econômico na pecuária, por provocar, em bovinos, convulsões, arritmias cardíacas e "morte súbita" em elevado número de animais. No presente trabalho, as folhas dessecadas e moídas de *P.marcgravii* foram extraídas com etanol 95%, a temperatura ambiente, por percolação; o extrato resultante foi fracionado por partição com acetato de etila e butanol saturado com água. Os resíduos obtidos foram testados "per os" em ratos, buscando-se investigar nos mesmos, a presença do princípio ativo tóxico. O resíduo aquoso foi o único que produziu convulsões e morte dos animais. A existência do monofluoroacetato (MFA) no resíduo aquoso foi comprovada biologicamente através do paralelismo entre as retas refetentes às funções dose/porcentagem de letalidade e dose/latência para a 1ª convulsão que foram construídas para o resíduo aquoso e padrão de referência (monofluoroacetato de sódio). O MFA foi também identificado quimicamente através da RMN¹⁹F e da cromatografia em camada delgada. Os resultados obtidos comprovaram a presença de MFA nas folhas de *P.marcgravii*, responsabilizando-o pelos efeitos tóxicos produzidos. Também foram levantadas algumas hipóteses na tentativa de explicar a sintomatologia dos animais intoxicados.

ABSTRACT

Palicourea marcgravii St. Hil. (Rubiaceae) is one of the most economically important poisonous plants for Brazilian livestock, since it induces not only seizures, cardiac arrhythmias, but also "sudden death" of large number of the intoxicated animals. In the present paper, the dissected and grounded leaves of *P.marcgravii* were extracted with ethanol 95%, at room temperature, by percolation; the resultant extract was fractionized by partition in ethyl acetate and butanol saturated with water. The obtained residues were administered "per os" to rats, trying to look for the presence of the active toxic principle. The aqueous residue was the only that induced seizures and death to the animals. The presence of monofluoroacetate (MFA) in the aqueous residue was biologically confirmed by the correlation shown in the sodium monofluoroacetate and the aqueous residue dose-response and dose-effect curves. MFA was also identified through NMR¹⁹F and thin layer chromatography. The obtained results confirmed the presence of MFA in the *P.marcgravii* leaves; they also suggest that the toxic effects induced by this plant are a consequence of the presence of MFA in its leaves. Further, some hypothesis were also performed, in an attempt to better explain the symptoms induced by the plant leaves.

CONTEÚDO

1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	5
2.1. Plantas tóxicas de interesse pecuário	5
2.2. <i>Palicourea marcgravii</i> (P.m.)	13
2.3. Monofluoroacetato de sódio (MFAS)	16
3. OBJETIVOS	32
4. MATERIAL E MÉTODOS	33
4.1. Planta	33
4.2. Animais	33
4.3. Fármaco padrão	33
4.4. Procedimentos	33
4.4.1. Extração e fracionamento da planta	33
4.4.2. Efeitos tóxicos do extrato bruto das folhas de P.m. e suas frações	35
4.4.3. Verificação biológica da presença de MFA no extrato bruto de P.m. e no resíduo aquoso de P.m. pela comparação dos resultados obtidos com aqueles do padrão de MFA de sódio	35
4.4.3.1. Ensaio quantal: estabelecimento das curvas dose-resposta (% de letalidade)	35
4.4.3.2. Ensaio quantitativo: estabelecimento das curvas dose-efeito (latência para a 1ª convulsão)	36
4.4.4. Identificação química do monofluoroacetato no resíduo aquoso de P.m.	36
4.4.4.1. Por ressonância magnética nuclear utilizando-se ^{19}F (RMN ^{19}F)	36
4.4.4.2. Por cromatografia em camada delgada (CCD)	36
5. RESULTADOS	38
5.1. Efeitos tóxicos do extrato bruto das folhas de P.m. e de suas frações	38
5.2. Curvas dose-porcentagem de letalidade	38
5.3. Descrição dos sinais e sintomas dos ratos intoxicados	42
5.4. Curvas dose-latência para a 1ª convulsão	42
5.5. Identificação química do monofluoroacetato no resíduo aquoso de P.m.	46
5.5.1. Por RMN ^{19}F	46
5.5.2. Por CCD	46

6. DISCUSSÃO	49
7. CONCLUSÕES	61
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	62
APÊNDICE - Processo analítico para a obtenção da função "dose x resposta"	81

1. INTRODUÇÃO

O Brasil, dentre os países do mundo, caracteriza-se como o de maior potencial para o desenvolvimento da pecuária bovina. Possui as melhores condições para ser o primeiro produtor mundial de carne, principalmente por sua extensão territorial e clima favorável.

Sem dúvida, o efetivo bovino nacional não nega esta tendência, pois vem ocupando o 4^o lugar desde 1912, sendo inferior apenas ao da Índia, Estados Unidos e antiga União Soviética^{190,10}.

Entretanto, apesar de possuir uma comprovada potencialidade para produção de carne bovina e ser detentor de um dos maiores rebanhos, a produtividade da pecuária brasileira é muito baixa. Indicadores de desempenho, tais como taxa de abate (bovinos abatidos/efetivo bovino x 100), rendimento médio da carcaça e taxa de crescimento do plantel, têm-se mantido muito inferiores em relação aos de outros países de relevância.

Neste contexto, a taxa de abate no Brasil, ao longo dos anos (1940-1989) esteve em torno de 12%¹⁰. Este valor é cerca de 1/3 das taxas médias obtidas em países com alta produtividade de carne bovina que, muitas vezes, apresentam limitações para o desenvolvimento da pecuária¹⁹⁰. Por exemplo, no Canadá, a estação de pastoreio é de apenas 60 dias (no Brasil é realizada, praticamente, durante todo o ano)¹²⁰ e mesmo assim, sua taxa de abate é cerca de 36%¹⁹⁰. As pastagens do Texas, grande Estado criador dos Estados Unidos, recebem apenas 260 mm de precipitação pluviométrica por ano (no Brasil esta gira em torno de 1.000 mm)¹²⁰; a taxa de abate americana é aproximadamente 34%¹⁹⁰.

Quanto ao rendimento médio, em termos de quilos de carcaça por efetivo de rebanho, o valor brasileiro obtido no período de 1981 a 1983 foi 25,1, contrastando com valores como os de 124,6 da Itália, 91,2 dos Estados Unidos, 85,9 do Canadá e 48,7 da Argentina¹⁹⁰.

Enquanto o plantel nacional passou de 118 milhões de cabeças em 1980 para 139 milhões em 1988 (crescimento de 18%), a produção de carne bovina cresceu cerca de 10% neste período¹⁰. Estes números refletem uma queda no desfrute do rebanho brasileiro, cuja taxa está abaixo dos 10%, muito aquém das observadas entre os principais países produtores. A Argentina, com cerca de 50 milhões de bovinos, ainda consegue produzir uma quantidade de carne um pouco superior ao Brasil, com uma taxa de desfrute de 25%^{39,125}.

Os indicadores de desempenho desfavoráveis são conseqüências de vários fatores; dentre os mais importantes estão os fracos índices zootécnicos básicos: baixa natalidade (aproximadamente 55%), alta mortalidade (cerca de 10%) e elevada idade de abate (4 a 5 anos). Nos Estados Unidos, a porcentagem de parição é de aproximadamente 86%, o índice de mortalidade cerca de 4% e são suficientes de um ano e meio a dois para que um novilho alcance o peso de comercialização de 450 kg⁶.

Esta realidade se deve, como razão primordial, ao fato da pecuária bovina de corte no Brasil ser, em sua maior parte, desenvolvida em regime extensivo. Em 1985, o rebanho espalhava-se por 179 milhões de hectares de pastagens, com uma taxa de ocupação de 0,7

cabeça por hectare¹⁰, considerada baixa em termos internacionais. Este sistema desfavorece a atenção direta e o controle sobre os animais.

Para que a pecuária seja produtiva, deve-se investir basicamente em três aspectos: boa linhagem genética, alimentação apropriada e controle sanitário dos animais de criação⁵⁷. Com relação à linhagem genética do rebanho bovino brasileiro, houve um razoável progresso nos últimos 50 anos. Estes avanços devem-se, principalmente, ao aprimoramento das raças zebuínas originárias da Índia e de outras criadas no Brasil, a partir de seus cruzamentos⁵⁷.

As pastagens naturais normalmente são deficientes em proteínas e minerais, particularmente de fósforo. Entre 1960 e 1985, houve uma melhoria desta situação, pelo aumento das áreas plantadas com capim colômbio e braquiária³⁹. Mesmo assim, as forrageiras nativas ainda são predominantes, correspondendo a 65,3% da área total com pastos em 1980, contra 83,6% em 1960¹⁹⁰.

Estes incentivos contribuíram para que o rebanho bovino mais que dobrasse no período de 1960 a 1985¹⁰. Entretanto, isto não foi suficiente para melhorar os índices zootécnicos.

É o aspecto sanitário que representa o principal fator limitante para a melhoria efetiva da produtividade. Isto porque é muito difícil controlar o conjunto de atividades que envolve a prevenção, o diagnóstico e o tratamento de doenças infecto-contagiosas, parasitárias e as intoxicações por plantas. Como conseqüências, ocorrem muitas perdas de animais que acarretam um sério prejuízo econômico. Estima-se que em torno de 5% do valor dos animais seja perdido anualmente devido à morte causada por diversas doenças¹²⁴ e que cerca de 100 mil bovinos adultos morram por ano em decorrência da ingestão de plantas tóxicas¹⁶⁵.

Quando se trata da morte de um animal, é geralmente fácil estabelecer uma relação de causalidade, isto é, identificar sua etiologia. Todavia, muitos casos de intoxicação aguda por plantas são confundidos com carbúnculo hemático, picada de cobra, pasteurelose ou raiva^{165,109}. Por outro lado, perturbações digestivas como timpanismo e diarreia, costumam ser erroneamente atribuídas à ação de plantas tóxicas¹⁶⁵. No entanto, quando a perda é devida a abortos, defeitos de nascimento, efeitos patológicos sobre vários órgãos que resultam em alteração da reprodução, diminuição do desempenho, perda de peso, debilitação e fotossensibilização, torna-se muito difícil reconhecer se estes são causados por agentes infecciosos, nutricionais, parasitários ou por ingestão de plantas tóxicas.

O estudo das plantas tóxicas é complexo, justificando-se, assim, o grande prejuízo que traz à pecuária. Envolve a análise de aspectos relacionados com a toxicidade intrínseca da planta, com o acesso do animal a ela, com as características do organismo exposto e com os problemas advindos da intoxicação, isto é, resultante desta interação. Portanto, este estudo tem caráter interdisciplinar, abrangendo, principalmente, um conhecimento nas áreas de:

- Medicina Veterinária;
- Botânica;
- Fitoquímica;
- Farmacologia;

- Toxicologia;
- Economia e Administração pecuária.

Para que um médico veterinário diagnostique um quadro clínico-patológico como sendo causado por planta tóxica e descarte qualquer outra etiologia possível, é necessário que a intoxicação pela planta seja caracterizada. Para isto, a espécie animal atingida, normalmente bovinos, pode ser submetida a uma intoxicação experimental com as plantas suspeitas existentes na área de pastagem, devendo o quadro clínico-patológico experimental apresentado reproduzir aquele observado no animal doente¹⁷⁶.

Essa planta deverá ser, posteriormente, identificada pelo botânico, para servir de referência num próximo caso. Por outro lado, através de uma análise fitoquímica, é possível isolar e identificar o princípio ativo extraído da mesma.

Estudos complementares deverão ser realizados em animais de laboratório que se mostrem sensíveis à intoxicação pela mesma planta, para um conhecimento maior de sua toxicidade.

No entanto, no campo de atuação da Medicina Veterinária no Brasil, ainda não foi dada a devida importância ao estabelecimento da relação entre a estrutura química de um princípio ativo extraído de uma planta tóxica e sua atividade farmacológica observada em animais de laboratório. Neste contexto, a avaliação da toxicidade de uma substância quimicamente separada ou isolada de sua matriz botânica, pode ser feita com mais precisão científica se testada em um animal.

Nos grandes centros de pesquisa mundiais, ao lado de laboratórios de química e de toxicologia, funcionam laboratórios de farmacologia e fisiologia, para valorizar e orientar a descoberta de substâncias com importância terapêutica e baixa toxicidade. O ácido nicotínico, por exemplo, permaneceu 30 anos conhecido como simples curiosidade química até que experiências realizadas em animais demonstraram seu uso seguro no tratamento da pelagra¹³³.

A esse respeito, da mesma forma que é importante a interação química-farmacológica-toxicológica na descoberta de princípios ativos naturais com eficácia clínica e um mínimo de reações adversas, também é importante esta interação na descoberta do princípio ativo que provoca a intoxicação.

É fundamental que haja uma integração multiprofissional entre estas áreas, fato que permitirá:

- estabelecer o quadro clínico-patológico da intoxicação experimental em bovinos;
- identificar botanicamente a planta tóxica;
- selecionar o animal de laboratório sensível à intoxicação pela planta tóxica;
- comparar a ação tóxica relativa aos diferentes estágios evolutivos da planta e sua procedência;
- separar, isolar e identificar o agente tóxico;
- correlacionar o estado clínico-patológico com o constituinte químico que o desencadeia;

- avaliar a toxicidade do agente tóxico;
- elucidar o mecanismo de ação tóxica.

Somente com este conhecimento integrado será possível estabelecer condições seguras de diagnóstico, prevenção e tratamento de bovinos, minimizando, efetivamente, o risco do efeito nocivo causado ao gado por plantas tóxicas. Como conseqüências, o Brasil poderá usufruir melhor de sua potencialidade para produzir carne bovina de boa qualidade.

Este trabalho foi planejado dentro desta filosofia.

Foi escolhida a *Palicourea marcgravii* (P.m.) como matéria-prima para o desenvolvimento desta integração, por ser a planta tóxica brasileira responsável pelo maior número de mortes em bovinos¹⁷⁸, como decorrência de sua ingestão espontânea pelos animais em condição de pastoreio. Já foram realizados experimentos com esta planta tóxica em bovinos^{109,41,20,34,164}, ovinos¹⁸¹, caprinos, equinos¹⁰⁹ e roedores^{109,112,69,67}. Também já foram identificadas várias substâncias presentes nas folhas de P.m., como ácido salicílico, ácido o-metoxi-benzóico, N-metiltiramina²⁴, ácido monofluoroacético¹⁰⁴, cafeína⁷⁰ e um alcalóide indólico glicosilado, denominado "palicosídeo"⁹⁸. Porém, até agora, não se conseguiu relacionar de maneira inequívoca estes compostos identificados na planta com os efeitos tóxicos que produzem nos animais. Dentre estas substâncias encontradas nas folhas da P.m., o ácido monofluoroacético parece ser o mais provável princípio ativo responsável pela morte de bovinos intoxicados, uma vez que induz convulsões e "morte súbita", sinais esses, similares à intoxicação pela planta.

Assim, o objetivo do presente trabalho é fracionar o extrato bruto de folhas de P.m. para verificar, inicialmente, qual(is) fração(ões) deste induz(em) convulsões e morte em ratos e, a seguir, comprovar a existência do monofluoroacetato de sódio separado nessa(s) fração(ões), através de ensaios biológicos e identificação química. Pretende-se, desta forma, confirmar que o fluoroacetato é o princípio ativo responsável pelas convulsões e morte de bovinos intoxicados agudamente pela P.m.

Embora existam muitas diferenças na fisiologia de bovinos e ratos, as convulsões induzidas pela planta são semelhantes entre ambas as espécies. Além disso, o rato mostrou ser, dentre os animais de laboratório (cobaias, hamsters, camundongos e coelhos) a espécie mais sensível ao efeito tóxico (convulsão) produzido pelo extrato aquoso da P.m.^{69,67}. Estes dados justificaram a escolha de ratos como modelo experimental para esse estudo.

Para um maior conhecimento sobre as plantas tóxicas de interesse agropecuário para bovinos, em especial a *Palicourea marcgravii*, bem como das características do monofluoroacetato de sódio, uma vez que não existe qualquer referência na literatura brasileira sobre este agente tóxico, houve a necessidade de se fazer uma revisão bibliográfica sobre esses temas.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Plantas Tóxicas de Interesse Pecuário

De maneira geral, planta tóxica é aquela que produz um efeito nocivo ao interagir com um organismo vivo.

Planta tóxica sob o ponto de vista agropecuário, tem um significado bem mais restrito. Döbereiner (EMBRAPA) e Tokarnia (UFRRJ)^{178,165}, veterinários que vêm estudando o tema há mais de 30 anos conceituam: "planta tóxica de interesse agropecuário é aquela que, quando ingerida naturalmente (partes frescas, por via oral e em quantidades habituais) causa, por comprovação experimental, dano à saúde ou mesmo a morte da espécie animal em questão".

Para classificar uma planta como tóxica, segundo este conceito, é necessário empregar uma metodologia que tenha base científica¹⁷⁶. Esta segue, em linhas gerais, a mesma sequência semiológica utilizada no diagnóstico de outras afecções:

a) levantamento dos históricos sobre as doenças de etiologia obscura, provavelmente causadas por plantas tóxicas, para obter-se o maior número possível de informações. Este é feito por intermédio de um questionário com perguntas objetivas, que não induzam as respostas e que levem em consideração o fato de ser o informante, ou facilmente influenciável ou já possuir uma opinião formada sobre a doença.

É muito importante ter o máximo de cuidado com os nomes populares das plantas. O mesmo nome popular, às vezes, é usado para diferentes plantas; por exemplo, o termo "erva-de-rato" é usado para *Palicourea marcgravii* e *Asclepias curassavica*. Por outro lado, uma mesma planta, às vezes tem diversos nomes populares. É o caso do *Cestrum laevigatum*, conhecida no sul do Estado do Rio de Janeiro como "coreana", no norte do mesmo Estado, por "canema" e no Estado do Espírito Santo, por "baúna". O nome "canema", no Espírito Santo, é usado para designar outra planta, *Solanum sp.*, planta que os bovinos não comem;

b) determinação do quadro clínico-patológico da doença espontânea, inclusive histopatológico, eventualmente complementado por outros exames de laboratório;

c) inspeção dos pastos para verificar a presença de plantas tóxicas já estudadas ou suspeitas;

d) experimentação de todas as plantas suspeitas de toxicidade. Para isso, deve-se tentar reproduzir ao máximo as condições naturais, considerando a:

d.1) espécie animal afetada

Nem sempre resultados experimentais obtidos numa espécie animal são válidos para outras. Por exemplo, a *Cestrum laevigatum* ("coreana"), a *Stryphnodendron coriaceum* ("barbatimão") e a *Mascagnia pubiflora* ("corona") são tóxicas para os bovinos, mas não o são, respectivamente, para os coelhos, ovinos e eqüinos. Por outro lado, a *Equisetum sp* ("cavalinha") só é tóxica para os eqüinos⁷.

d.2) planta fresca recém-colhida

Muitas plantas perdem sua toxicidade quando dessecadas. Esta toxicidade pode ser perdida totalmente, como é o caso das plantas cianogênicas, ou reduzida aproximadamente à metade, como a *Baccharis coridifolia* ("mio-mio"). Falsos resultados negativos também podem ser obtidos ao se administrar extratos de uma planta, pois o princípio tóxico pode ter ficado na "torta".

d.3) ingestão por via oral e na quantidade habitual

A *Asclepias curassavica* ("oficial de sala") não é planta tóxica de interesse pecuário, porque os bovinos não a ingerem de forma espontânea e mesmo se a ingerissem, não o fariam em quantidade suficiente para intoxicá-los; a dose letal por via oral nesta espécie é muito alta, 10 g/kg ou mais. No entanto, se fosse considerada a via subcutânea, a dose letal do extrato aquoso da mesma seria de 1 g/kg¹⁷⁶.

A *Holocalyx glaziovii* ("alecrim") é classificada como planta tóxica que causa uma doença crônica em bovinos, como decorrência da ingestão natural, pelos mesmos, de doses pequenas e continuadas^{133,131}. A intoxicação aguda e oral de bovinos por esta planta só ocorre após doses muito elevadas, acima daquelas habitualmente ingeridas pelos animais em condições de pastoreio.

e) estabelecimento do quadro clínico-patológico experimental provocado pelas plantas que revelem ação tóxica;

f) comparação dos quadros clínicos-patológicos experimentais com os de ocorrência espontânea para certificar-se de que a doença, ocorrida sob condições naturais, foi reproduzida experimentalmente de forma adequada.

Seguindo esta metodologia, já foram identificadas, até 1991, 52 espécies de plantas tóxicas para bovinos. Estas são apresentadas nas TABELA I, que é uma modificação da tabela proposta por TOKARNIA & DÖBEREINER¹⁶⁵, onde estão classificadas de acordo com a sintomatologia que desencadeiam. Por outro lado, existem aquelas que se revelaram tóxicas apenas experimentalmente, isto é, cuja toxicidade ainda não foi comprovada sob condições naturais (ver TABELA II).

Para avaliar a toxicidade de uma planta para o gado, não é suficiente saber se ela é tóxica. Deve-se conhecer as condições que poderão influenciar a intoxicação. Estas são dependentes de(das):

Erros de Manejo.

A maioria das plantas tóxicas não é palatável, razão pela qual o gado a evita. Neste fato baseia-se a crença de que os animais, protegidos pelo instinto, não as ingerem espontaneamente^{165,109}. No entanto, existem condições que favorecem o acesso do animal às plantas tóxicas, mesmo não sendo essas palatáveis. Quando os animais sentem fome (devido à escassez de alimentos decorrente das secas, geadas, queimadas, superlotação e deficiências minerais), quando são forçados a um jejum prolongado (ao serem transportados ou manipulados para fins de vacinação, descorna ou marcação), quando são trazidos de uma área para serem

introduzidos em outra, sem um período prévio de adaptação e quando são soltos em pastagens após confinamento ou estabulação por longos períodos, alimentam-se, indistintamente, de toda e qualquer planta disponível^{7,15}.

A falta de pastagem adequada no período da seca, por exemplo, leva alguns animais a se alimentarem dos frutos tóxicos da *Guarea trichilioides* ("camboatá"), uma árvore utilizada para sombreamento^{7,6}. Os animais, movendo-se de um pasto para outro, podem ingerir plantas tóxicas que os aclimatados não ingeririam, como é o caso da *Bacharis coridifolia* ("mio-mio")⁷. Fatores simultâneos, como a roçada dos pastos, queimadas ou derrubada de matas, aliados a outros como fome dos animais, período de seca e, ainda, ao fato de que certas plantas apresentam maior toxicidade na fase de brotação, explicam a grande incidência de intoxicação e morte de animais por ingestão de brotos pouco palatáveis. É o caso dos arbustos *Cestrum laevigatum* ("coreana")⁴⁷ e *Senecio brasiliensis* ("flor das almas")¹⁶⁰ e das árvores *Holocalyx glaziovii* ("alecrim")¹³¹ e *Sessea brasiliensis* ("peroba d'água")²³.

Outro fator que favorece as intoxicações por plantas tóxicas é a falta de limpeza periódica das áreas de pastagem, que podem contaminar o capim utilizado para pasto, corte, fenação ou ensilagem. Nestas condições, os animais não são capazes de evitar a ingestão destas plantas, mesmo sendo criados na região. É o caso do arbusto-cipó *Mascagnia pubiflora* ("corona") que cresce apoiando-se ao capim das pastagens⁷. Também é necessário evitar que o gado se alimente de plantas parasitadas por fungos, pois estes podem produzir micotoxinas. Assim, o *Pithomyces chartarum* produz a esporodesmina, que, ao ser ingerida junto com o capim que parasita (*Brachiaria decumbens*) provoca fotossensibilização¹⁵.

Características do Organismo do Animal Exposto.

A toxicidade também varia de acordo com o organismo que interage com a planta tóxica. Neste contexto, além da espécie animal, deve-se considerar o sexo, a idade, a raça, o estado de saúde, a dieta, a capacidade de desenvolver tolerância e o exercício físico.

Diferenças relativas ao sexo dos animais podem alterar a susceptibilidade dos mesmos aos efeitos tóxicos das plantas. Por exemplo, vacas em lactação são mais susceptíveis que machos à intoxicação por plantas contendo oxalatos, uma vez que apresentam balanço negativo de cálcio¹⁵.

Com relação à idade, de um modo geral, os animais muito jovens ou muito velhos, assim como aqueles doentes e de raça pura, são mais susceptíveis à intoxicação¹⁵.

As dietas ricas em amido ou carboidratos têm efeito protetor nos casos de intoxicação por ácido cianídrico, pois retardam a sua liberação. Já dietas ricas em cálcio impedem a absorção de oxalato devido à formação do oxalato de cálcio, que é insolúvel. Substâncias tóxicas ionizáveis em meio ácido presentes em dietas cujo pH é ácido, são absorvidas mais facilmente. O mesmo raciocínio aplica-se para as substâncias ionizáveis em meio alcalino. Também a ingestão de água após o consumo de determinadas plantas tóxicas, favorece a absorção de princípios hidrossolúveis¹⁵.

Animais submetidos à ingestão contínua de pequenas quantidades de determinadas plantas tóxicas, são capazes de desenvolver tolerância aos efeitos das mesmas. A flora ruminal desempenha um papel importante neste fenômeno. Os ruminantes são capazes de tolerar a ingestão de plantas contendo altos níveis de nitratos, quando condicionados a consumí-las em quantidades pequenas e crescentes. Este fato é decorrência de uma adaptação da flora ruminal no relativo ao desdobramento do nitrato a nitrito e deste a amônia. Nestes casos, essa tolerância é temporária e desaparece em questão de dias com a retirada da planta que contém o nitrato. O mesmo se aplica no caso da ingestão de pequenas quantidades de ácido cianídrico existente em determinadas plantas¹⁵.

Os exercícios físicos podem precipitar o aparecimento dos sintomas e a morte dos animais devido ao aumento do metabolismo e à distribuição mais rápida do princípio tóxico. Plantas como *Mascagnia pubiflora* e *Arrabidaea bilabiata* são exemplos desta condição. O exercício tem maior efeito quando o animal permanece exposto ao sol¹⁵.

No entanto, mesmo levando-se em consideração todos estes fatores, a resposta a uma substância tóxica ainda variará de organismo a organismo obedecendo à susceptibilidade individual.

Característica da Planta.

Existem plantas que em qualquer momento de seu ciclo vegetativo possuem o princípio ativo tóxico. Outras, como a *Bacharis coridifolia* ("mio-mio") são mais tóxicas (cerca de 4 vezes) na fase de floração (março) que na fase de brotação (outubro) sendo todas as partes da planta tóxicas, na seguinte ordem decrescente: flores, sementes, folhas, talos e raiz¹⁵⁴. Certas variedades de mandioca e sorgo possuem quantidades ínfimas de ácido cianídrico, podendo ser utilizadas como alimento para os animais; em outras, o teor é tão elevado que pode causar a morte dos mesmos²².

Características do Meio, Solo, Adubação e Clima.

Tanto o uso excessivo de adubos químicos nitrogenados ou orgânicos como as alterações climáticas (seca ou frio) podem propiciar o acúmulo de nitratos em um grande número de plantas forrageiras, tornando-as tóxicas. Quantidades elevadas de nitrato nas plantas, levam à redução excessiva a nitritos no rúmen que, ao ser absorvido, oxida a hemoglobina em metahemoglobina; uma oxidação deste tipo, acima de 50% induz à morte por anóxia tissular. Outros minerais absorvidos do solo como selênio, bário e oxalatos, também podem ser responsáveis por intoxicações¹⁵. Em solos carentes de potássio, as "mandiocas mansas" podem tornar-se "bravas", porque aumentam os níveis de alcalóides e glicosídeos presentes nas raízes²².

TABELA I - PLANTAS TÓXICAS DE INTERESSE AGROPECUÁRIO PARA BOVINOS DESCRITAS NO BRASIL, ATÉ 1991^(a)

PLANTAS QUE CAUSAM MORTE SÚBITA		
NOME BOTÂNICO	NOME POPULAR	REFERÊNCIA
<i>Arrabidaea bilabiata</i>	gibata, chibata	52
<i>Arrabidaea japurensis</i>	n/d	162
<i>Mascagnia rigida</i>	tingui, timbó	151
<i>Mascagnia pubiflora</i>	corona, cipó prata	163
<i>Mascagnia elegans</i>	rabo de tatu	35
<i>Mascagnia aff. rigida</i>	n/d	175
<i>Palicourea marcgravii</i>	erva de rato, cafezinho	41,164
<i>Palicourea grandiflora</i>	n/d	177
<i>Palicourea juruana</i>	roxa, roxinha	158
<i>Palicourea aeneofusca</i>	erva de rato	172
<i>Pseudocalymma elegans</i>	ipê bravo	171

PLANTAS NEUROTÓXICAS		
NOME BOTÂNICO	NOME POPULAR	REFERÊNCIA
<i>Claviceps paspali</i> (fungo) em sementes de <i>Paspalum</i> spp.	n/d	129
<i>Ipomoea fistulosa</i>	canudo, algodão bravo	166
<i>Ipomoea asarifolia</i>	salsa	46
<i>Polygala klotzchii</i>	limãozinho, laranjinha	21,168
<i>Ricinus communis</i> (folhas)	mamona, carrapateira	167
<i>Solanum fastigiatum</i>	jurubeba	192,14

PLANTAS QUE AFETAM O TRATO GASTRINTESTINAL		
NOME BOTÂNICO	NOME POPULAR	REFERÊNCIA
<i>Baccharis coridifolia</i>	mio-mio, vassourinha	154
<i>Enterolobium contortisiliquum</i>	timbaúba, tamboril da mata	150

^(a) modificada de TOKARNIA & DÖBEREINER¹⁶⁵.

PLANTAS NEFROTÓXICAS

NOME BOTÂNICO	NOME POPULAR	REFERÊNCIA
<i>Dimorphandra mollis</i>	faveira	155
<i>Thiloa glaucocarpa</i>	sipaúba	170

PLANTAS HEPATOTÓXICAS

NOME BOTÂNICO	NOME POPULAR	REFERÊNCIA
<i>Cestrum laevigatum</i>	coerana, canema, baúna	47
<i>Cestrum parqui</i>	n/d	128
<i>Echium plantagineum</i>	flor roxa, língua de vaca	94
<i>Senecio brasiliensis</i>	flor das almas, maria mole	160,95,12
<i>Senecio cisplatinus</i>	n/d	95,92
<i>Senecio heterotrichius</i>	n/d	95,92
<i>Senecio selloi</i>	n/d	95,12,92
<i>Sessea brasiliensis</i>	canela de veado, queluz, peroba d'água, pau de osso	4,23,27
<i>Vernonia mollissima</i>	n/d	51,64
<i>Vernonia rubricaulis</i>	n/d	153

PLANTAS CARDIOTÓXICAS

NOME BOTÂNICO	NOME POPULAR	REFERÊNCIA
<i>Tetrapteryx acutifolia</i>	cipó ruão	183
<i>Tetrapteryx multiglandulosa</i>	cipó preto	183

PLANTAS CALCINOGÊNICAS

NOME BOTÂNICO	NOME POPULAR	REFERÊNCIA
<i>Nierembergia veitchii</i>	n/d	126
<i>Solanum malacoxylon</i>	espichadeira	48,152

PLANTAS CIANOGENICAS		
NOME BOTÂNICO	NOME POPULAR	REFERÊNCIA
<i>Manihot</i> spp.	maniçobas, mandiocas bravas	22
<i>Prunus sphaerocarpa</i>	pessegueiro bravo	135

PLANTAS FOTOSSENSIBILIZANTES (fotosensibilização primária)		
NOME BOTÂNICO	NOME POPULAR	REFERÊNCIA
<i>Ammi majus</i>	n/d	93

PLANTAS FOTOSSENSIBILIZANTES (fotosensibilização secundária ou hepatogênica)		
NOME BOTÂNICO	NOME POPULAR	REFERÊNCIA
<i>Enterolobium gummiferum</i>	tamboril do campo	38
<i>Holocalyx glaziovii</i>	alecrim, alecrim de campinas	131
<i>Lantana camara</i> var. <i>nivea</i>	camara, chumbinho	173
<i>Lantana glutinosa</i>	n/d	127
<i>Lantana tiliaefolia</i>	n/d	173
<i>Pithomyces chartarum</i> (fungo) em <i>Brachiaria decumbens</i>	n/d	50
<i>Stryphnodendron coriaceum</i>	barbatimão	40,184
<i>Stryphnodendron obovatum</i>	barbatimão	19

PLANTAS COM OUTRAS AÇÕES		
NOME BOTÂNICO	NOME POPULAR	REFERÊNCIA
<i>Brachiaria radicans</i>	tannergrass	8,9
<i>Cassia occidentalis</i>	fedegoso	13
<i>Guarea trichilioides</i>	camboatá	6
<i>Pteridium aquilinum</i>	samambaia do campo	169
<i>Ramaria flavobrunnescens</i> (cogumelo) em eucaliptos	n/d	136
<i>Riedeliella graciliflora</i>	n/d	113,100

**TABELA II - PLANTAS EXPERIMENTALMENTE TÓXICAS
(TOXICIDADE NÃO COMPROVADA SOB CONDIÇÕES NATURAIS)**

NOME BOTÂNICO	NOME POPULAR	AÇÃO TÓXICA	REF.
<i>Aspidosperma pyricollum</i>	piquiá-branco	neuromuscular	42
<i>Brunfelsia pauciflora</i>	n/d	neurotóxica	180
<i>Conium maculatum</i>	cicuta	neurotóxica	174
<i>Crotalaria anagyroides</i>	chique-chique guizo de cascavel	gástrica e/ou neurotóxica	157
<i>Coutoubea ramosa</i>	tingui	gástrica	156
<i>Dimorphandra gardneriana</i>	fava d'anta	nefrotóxica	49
<i>Humirianthera ampla</i>	mairá	gastrointestinal	43
<i>Humirianthera rupestris</i>	mairá	gastrointestinal	43
<i>Plumbago scandens</i>	louco	gástrica	159
<i>Ricinus communis</i> (pericarpo do fruto)	mamona	neuromuscular	45
<i>Senecio desiderabilis</i>	n/d	hepatotóxico	179
<i>Vernonia nudiflora</i>	alecrim	gástrica	44
<i>Vernonia squarrosa</i>	alecrim	hepatotóxica e nefrotóxica	161

n/d - não disponível

2.2. *Palicourea marcgravii*

Da relação de plantas tóxicas brasileiras atualmente conhecidas, a *Palicourea marcgravii* St. Hil. (P.m.), popularmente conhecida como cafezinho, café bravo, erva café, erva de rato, roxa, roxinha, roxona e vick¹⁷⁸, é considerada a de maior interesse agropecuário. Foi a primeira a ser estudada, em 1932¹⁰⁹ e até hoje, 60 anos mais tarde, ainda é responsável por grande parcela de morte de bovinos, principalmente na região amazônica¹⁷⁸.

Pertence ao mais numeroso e importante grupo de plantas tóxicas existente no Brasil, que causam a chamada síndrome da "morte súbita"^{178,164,182} (TABELA I). Estas plantas são estimativamente responsáveis por cerca de 60% das perdas de bovinos¹⁸², animais particularmente afetados sob condições naturais. Os sintomas - queda repentina, respiração ofegante, tremores musculares, movimentos de pedalagem, cabeça em opistótomo - iniciam-se poucas horas após a ingestão de uma quantidade letal da mesma. A evolução é geralmente superaguda, culminando com a morte do animal dentro de poucos minutos. O exercício físico, como o andar ou o correr, precipita os sintomas e a morte. No entanto, a maioria dos bovinos usados experimentalmente morrem sem ser exercitados¹⁶⁴, aparentemente de uma insuficiência cardíaca aguda¹⁸².

A *Palicourea juruana* Krause^{158,178,165}, *Palicourea grandiflora* (HBK) Standl.^{177,178,165} e a *Palicourea aeneofusca*^{172,178,165} são de distribuição limitada (Pará, Rondônia e Zona da Mata de Pernambuco, respectivamente) e despertam menor interesse pecuário. É citada, ainda, a toxicidade da *Palicourea barbiflora* (D.C.), mas sua localização é restrita ao vale do Paraíba^{20,5}.

A grande importância nacional da P.m. como causa de intoxicação a bovinos, deve-se a uma série de fatores interrelacionados, que podem ser descritos como:

Ampla Distribuição Por Todo o País.

A P.m. é a planta tóxica de distribuição geográfica mais ampla no Brasil. É nativa em todas as regiões, com exceção do extremo sul e do sertão do nordeste¹⁷⁸. Precisa de sombra e terra firme para desenvolver-se, crescendo em mata, especialmente em suas margens e em capoeiras. Também nasce em pastos recém formados em lugares antes ocupados por mata ou capoeira¹⁷⁸.

Palatabilidade para Bovinos.

A P.m. é uma das poucas plantas tóxicas palatáveis aos bovinos; estes a ingerem espontaneamente em qualquer época do ano, sem a necessidade do fator fome^{178,109}. Entretanto, não é palatável aos caprinos e aos eqüinos, já que estes se recusam a consumí-la mesmo misturada à forragem¹⁰⁹.

Elevada Toxicidade Intrínseca e Grande Variação Inter-espécies.

Há uma grande variação na resposta à intoxicação experimental induzida pela P.m. entre as diferentes espécies animais. Os bovinos estão entre as mais sensíveis, pois já morrem com doses tão pequenas quanto 0,6 g/kg de folhas frescas, administradas de uma única vez, por via oral^{109,164}. Coelhos e caprinos apresentam sensibilidade semelhante aos bovinos, situando-se a dose letal mínima da planta(DLM), por via oral, na faixa de 0,5 a 1,0 g/kg¹⁰⁹. As cobaias parecem ser mais resistentes; a DLM por via subcutânea é pelo menos 2 vezes maior que a observada nos bovinos, variando de 1,20 a 2,10 g/kg¹⁰⁹. Apresentam, também, maior latência para o aparecimento da convulsão quando comparadas com hamsters e ratos⁶⁷. Os eqüinos são ainda mais resistentes. Nesse sentido, foi necessário uma dose de 5 g/kg fracionada em 10 vezes, durante 2 meses, para matar um cavalo¹⁰⁹. Finalmente, as galinhas parecem insensíveis, pois resistem a uma dose superior a 7g/kg¹⁰⁹, sendo os camundongos, também, muito pouco sensíveis⁶⁷.

Capacidade de Acumulação.

A P.m. tem um efeito cumulativo, como já observado quando 1/5 e 1/10 da DL da mesma, foi administrada diariamente a bovinos^{109,34,164}. Estes dados também estão de acordo com experiências realizadas com a *Palicourea grandiflora*^{177,178}. Entretanto, observou-se que doses semanais de 1/5 e 1/10 da DL ou doses diárias menores que 1/10 da DL não provocaram qualquer efeito tóxico¹⁶⁴.

Toxicidade em Todas as suas Partes Aéreas e Durante Todo o seu Estágio Vegetativo.

A toxicidade das flores e das folhas no estado de pré-floração, florescência e frutificação é similar, sendo máxima nos frutos¹⁰⁹. A semente fresca também apresenta toxicidade⁴¹, enquanto que a raiz parece ser inócua¹⁰⁹.

Resistência ao Ressecamento.

A planta mantém-se ativa mesmo quando seca sob a ação direta da luz durante 3 dias e após ser conservada por 5 meses¹⁰⁹. Portanto, se a P.m. estiver presente em capoeiras, ao se praticar a roçada para a introdução de animais, deve-se tomar o cuidado para queimá-la ou removê-la e não simplesmente cortá-la. Neste sentido, a planta verde é cerca de três vezes mais pesada que a seca^{109,164}.

Quando se suspeita de uma intoxicação por P.m. em bovinos, a "morte súbita" é o dado mais significativo da sintomatologia clínica. Como a intoxicação é de evolução rápida e as vezes fulminante, as constatações de necropsopia não mostram qualquer tipo de dano que possa ser tomado como absolutamente característico ou patognomônico. Mas, de um modo geral, notam-se nos animais mortos: lesões congestivas e hemorrágicas da mucosa gastro-intestinal

(abomaso e duodeno)¹⁰⁹ e equimoses (focos hemorrágicos) no pericárdio^{109,34}. Também se observam congestões e hemorragias em vários órgãos, especialmente nos pulmões, no fígado e nos rins^{109,34,41,164}. A planta provoca uma atonia do rúmen e este encontra-se enormemente distendido devido aos gases produzidos no processo de fermentação¹⁰⁹; neste sentido, seu conteúdo deve ser inspecionado cuidadosamente, com a finalidade de buscar fragmentos de folhas ou talos suspeitos. A presença destes pode orientar o diagnóstico.

Os exames histopatológicos de tecidos de animais intoxicados por P.m. revelam a presença de alterações hidrópicas-vacuolares no parênquima hepático e, principalmente, degeneração hidrópica-vacuolar dos túbulos contornados distais e da parte ascendente da alça de Henle^{41,164}. Esta lesão microscópica dos rins é bastante característica, não sendo, no entanto, um achado de responsabilidade exclusiva da P.m.. É encontrada na intoxicação por praticamente todas as plantas tóxicas do grupo das que causam "morte súbita" no Brasil¹⁸².

O diagnóstico diferencial deve ser feito, principalmente em relação às outras plantas que causam "morte súbita" e à outras patologias que podem ter evolução superaguda como o carbúnculo hemático e as picadas de cobra.

A identificação botânica da P.m. é, neste aspecto, muito importante para que seja distinguida de três outras rubiáceas não tóxicas que são a *Palicourea crocea*¹⁷⁸, a *Palicourea cujabensis*¹⁸² e a *Palicourea rigida*⁵. No entanto, como estas plantas são muito semelhantes (a ponto de botânicos terem dificuldade em diferenciá-las), pode-se lançar mão de experimentos conduzidos em coelhos¹¹² como recurso auxiliar seguro no reconhecimento da planta tóxica.

A intoxicação experimental por P.m. em coelhos¹¹² assim como em ovinos¹⁸¹ induz a um quadro clínico-patológico semelhante ao descrito para os bovinos, com forte indicação de que a morte desses animais esteja relacionada a uma falha cardíaca^{112,181}. Em experimentos realizados com folhas dessecadas de P.m., em coelhos, os sintomas geralmente aparecem entre 1 e 7 horas após a administração da mesma (dependendo da dose) e a evolução clínica entre 1 e 5 minutos; nessa espécie, os sintomas da intoxicação caracterizam-se por terem aparecimento súbito. Na maior parte dos casos, os animais começam a debater-se, geralmente de forma violenta, "pulando" ou fazendo movimentos desordenados (quadro convulsivo) caindo, finalmente, em decúbito lateral. Emitem sons, fazem movimentos de pedalagem, apresentam respiração "espaçada" e "forçada" e morrem¹¹².

A intoxicação experimental por P.m. em ratos, hamsters e cobaias também apresenta um período de latência para a manifestação dos sintomas. Em ratos este tempo é menor, seguido dos hamsters e cobaias. Camundongos são mais resistentes, pois após ingestão de idêntica quantidade de P.m., não manifestam efeito tóxico^{67,69}. No entanto, a sintomatologia é diferente quando comparada àquela de bovinos, ovinos e coelhos. Os animais apresentam, inicialmente, prurido generalizado seguido de um longo período de depressão, nos quais tendem a permanecer no mesmo lugar dentro da gaiola, quase completamente estáticos. De repente, podem apresentar tremores musculares que gradualmente aumentam em intensidade, sendo substituídos por manifestações convulsivas clônicas. A fase tônica começa, algum tempo após, com uma abrupta

flexão seguida de uma forte extensão das patas traseiras, que poderá ser mantida por até 30 segundos. Alguns animais morrem nesta fase devido à depressão respiratória, secundária à contração espasmódica do diafragma e dos músculos intercostais e/ou por exaustão do centro respiratório bulbar; a parada respiratória é, assim, a causa mais comum de todas as mortes. Os ratos que sobrevivem a esta fase de convulsão tônica, passam por um período de depressão, podendo entrar, alguns minutos mais tarde, em outra crise convulsiva^{67,69}.

A via de administração parece não interferir com a sintomatologia nem com a dose letal mínima da P.m., como observado em animais de laboratório^{109,69}.

Com relação às substâncias presentes nas folhas de P.m., já foram identificados o ácido salicílico, o ácido o-metoxi-benzóico, a N--metiltiramina²⁴, o ácido monofluoroacético¹⁰⁴, a cafeína⁷⁰ e um alcalóide indólico glicosilado, denominado "palicosídeo"⁹⁸. Porém, até agora, não se conseguiu relacionar de maneira inequívoca estes compostos identificados na planta com os efeitos tóxicos que produzem nos animais.

2.3. Monofluoroacetato de Sódio (Composto 1080, "ten-eighty")

Histórico

O ácido monofluoroacético, geralmente referido como fluoroacetato, é uma das substâncias mais tóxicas que existem. Seu sal sódico, Composto 1080 (monofluoroacetato de sódio), é o agente de escolha no controle de predadores vertebrados, devido ao seu baixo custo, facilidade de uso e eficácia, sendo largamente utilizado em muitos países, principalmente na Austrália¹⁸⁶. Em outros países, como a Grã-Bretanha, o emprego do 1080 é restrito a áreas tais como adegas de navios e esgotos^{55,107}. Como apresenta extrema toxicidade para todos os vertebrados, incluindo-se o homem e os animais domésticos, sua utilização nos Estados Unidos é limitada por lei para exterminadores licenciados¹⁰⁷, que são obrigados a seguir normas técnicas, como a ASTM E-590³. Normalmente, o corante negro de nigrosina é adicionado na sua composição, sendo o produto resultante usado na forma de iscas, misturado ao pão, farelos, cereais e grãos⁵⁵.

No Brasil, não existe controle na utilização deste produto. Resulta deste fato a ocorrência de acidentes; assim, no período de início de setembro a fins de outubro de 1989, três funcionários morreram e dezenas de outros foram hospitalizados, vítimas da aplicação imprópria de 1080 na empresa "Aços Anhanguera (Villares) S/A".

O fluoroacetato foi sintetizado pela 1ª vez por Swarts¹⁴⁶, em Gent (Bélgica), no ano de 1896; nenhuma menção foi feita naquela ocasião acerca de sua toxicidade. Seu efeito nocivo a insetos foi identificado em 1930, quando foi patenteado como agente anti-traça¹¹¹; em 1950, comprovou-se sua atividade como inseticida de contato e sistêmico³⁶. Entretanto, nunca foi comercializado para esta finalidade. Foi introduzido em 1945 como potente rodenticida e como agente de escolha no controle da população de vertebrados selvagens, depois de uma investigação em larga escala realizada pela "U.S. Fish and Wildlife Service"⁸¹, onde milhares

de compostos foram testados. O termo 1080 tornou-se um nome comercial registrado para o monofluoroacetato de sódio (MFAS), pelo fato de ter sido este o número serial de laboratório que recebeu e com o qual ficou sendo referido e conhecido^{81,111}.

Síntese

A manufatura industrial do composto 1080 envolve 2 etapas:

a) formação do fluoroacetato de etila através da reação, em autoclave rotativa, de cloroacetato de etila com fluoreto de potássio anidro a 220°C por 4 horas¹³⁷ ou a 220°C por 11 horas¹¹¹ :

b) conversão do fluoroacetato de etila a MFAS a frio, por adição de uma solução de NaOH metanólica, seguido de evaporação em banho-maria até início da cristalização, resfriamento e filtragem do sólido^{137,111}:

O ácido monofluoroacético é formado pela destilação do MFAS em ácido sulfúrico¹³⁷.

A síntese original do MFAS, realizada em 1896¹⁴⁶, utilizou basicamente o mesmo processo, com a diferença da substituição do cloroacetato de etila pelo iodoacetato de metila e do fluoreto de potássio pelo fluoreto mercurioso ou fluoreto de prata.

Propriedades Físicas e Químicas

O ácido monofluoroacético (F-CH₂-COOH) é um cristal que apresenta ponto de fusão entre 33°C - 35°C e ponto de ebulição entre 165°C - 168°C. Seu sal sódico, monofluoroacetato de sódio (F-CH₂-COONa) é um pó branco, cristalino, inodoro, higroscópico. Ambos são altamente solúveis em água e praticamente insolúveis em solventes orgânicos^{111,137,3}.

A TABELA III mostra algumas das propriedades do ácido fluoroacético, relativas à ligação ao átomo de flúor, comparadas com as do ácido acético e de outros ácidos acéticos halogenados.

Excluindo-se o ácido acético, os dados desta tabela permitem concluir que quanto menor a distância internuclear de X-C, mais forte é a energia desta ligação, mais eletronegativo e menos reativo é o halógeno. Como consequência, os fluoroacetatos são pouco reativos, devido à ligação C-F ser muito estável, quando comparada àquela dos compostos correspondentes de Cl, Br e I. Resiste, assim, a uma variedade de reagentes. Por exemplo, o ácido fluoroacético pode ser seguramente destilado de uma solução de ácido sulfúrico concentrado¹³⁷. Quando é fervido em uma solução de NaOH a 10% por 1 hora, não se produz o íon fluoreto⁹⁷ e em uma solução de KOH a 20% por 20 horas, somente 50% do flúor é liberado como fluoreto de potássio¹³⁷.

Para que a ligação C-F se rompa é necessário que o composto seja fundido com o sódio a 500 °C¹¹⁶ ou que seja fervido com excesso de uma solução de NaOH a 30% por 1 hora⁹⁷.

Embora soluções aquosas de vários fluoroacetatos (incluindo-se fluoroacetato de sódio e metil fluoroacetato) deterioresem-se marcadamente com o tempo, mesmo se conservadas sob refrigeração, este fato não é devido à desfluorinação. Tem sido sugerida a possibilidade de ocorrência de uma descarboxilação espontânea acelerada pelos efeitos de ressonância do átomo de flúor, com liberação do fluoreto de metila, altamente volátil e relativamente não tóxico. Embora não haja fluoreto que possa acumular-se na solução, o conteúdo de fluoroacetato diminui continuamente. Este tipo de reação é geralmente catalisada por traços de íons halogenados²⁸.

Nas plantas, o ácido fluoroacético é aparentemente estável por um período indefinido de tempo¹¹¹.

TABELA III - COMPARAÇÃO ENTRE ALGUMAS PROPRIEDADES DO ÁCIDO ACÉTICO E ÁCIDOS ACÉTICOS MONO-HALOGENADOS^(a)

X-CH ₂ COOH	Raio Atômico de X (Å)	Distância Inter-nuclear de X-C (Å)	Energia de ligação de X-C (kcal/mol)	Eletro-negati-vidade de X	Velocidade de reação c/ cisteína (min)
H-CH ₂ COOH	0,29	1,14	87,3	-	-
F-CH ₂ COOH	0,64	1,45	107	4,0	não reage
Cl-CH ₂ COOH	0,99	1,74	66,5	3,0	125
Br-CH ₂ COOH	1,14	1,90	54	2,8	6,2
I-CH ₂ COOH	1,33	2,12	45,5	2,5	4,0

Toxicidade

O fluoroacetato é tóxico para uma ampla gama de organismos vivos (vertebrados, invertebrados, fungos, bactérias e vírus¹¹¹), com valores de DL₅₀ que variam extraordinariamente entre os mais diversos animais (TABELA IV). Mesmo dentro de uma mesma espécie, pode haver muita variação entre as diferentes linhagens; além do mais, a natureza da ação farmacodinâmica nem sempre é a mesma²⁸.

Neste caso, Outro dado relevante é o fato da via de administração ser incapaz de influenciar a toxicidade; esta é aproximadamente a mesma seja o agente químico introduzido por via oral, subcutânea, intramuscular, intraperitoneal ou intravenosa^{28,30,191}. Como o fluoroacetato é

^(a) retirada de Chenoweth²⁸

hidrossolúvel, relativamente estável e apresenta um longo período de latência para o aparecimento dos sintomas, ocorre uma absorção similar entre essas vias de introdução no organismo²⁸.

Muito importante a considerar-se, também, é a intoxicação secundária de outros elos da cadeia alimentar. Tanto cães como coiotes, porcos e até moscas morrem ao ingerir roedores intoxicados pelo 1080^{107,26}. O risco desta intoxicação secundária dependerá, em parte, da quantidade de isca consumida pela espécie primária, das partes ingeridas do animal morto e da susceptibilidade da espécie consumidora¹⁰⁷.

A diferença de toxicidade entre os sexos parece não ser muito significativa, embora já tenha sido relatada em alguns patos selvagens¹⁹¹. A temperatura ambiente elevada aumenta a toxicidade do fluoroacetato para camundongos e sapos são mais sensíveis ao mesmo no verão, que no inverno²⁸.

Todos estes fatores revelam a originalidade da intoxicação pelo fluoroacetato.

TABELA IV - TOXICIDADE DO FLUOROACETATO

ESPÉCIE	DL ₅₀ (mg/kg)	VIA	Referência
CÃO	0,06 0,1-0,2	IV ORAL, SC	30,29 60
COIOTE (<i>Canis latrans nebracensis</i>)	0,1	IP	191
RATO (<i>Sigmodon hispidus littoralis</i>) (<i>Rattus rattus</i>)	0,1 0,1	ORAL ORAL	191 3
COELHO	0,20-0,25 0,22 0,28	IV qualquer via SC	30 29 78
GATO	0,20 0,30 (a)	IV IV	107 30
BEZERRO	0,22	ORAL	130
BOI	0,39	ORAL	130
OVELHA	0,25-0,50	ORAL	79
COBAIA	0,35	IP	30,29
CAVALO	0,35-0,55 0,50-1,75	ORAL IM	107 30,29
PORCO DOMÉSTICO	0,40 0,40-1,00	IP ORAL	30,29 107

ESPÉCIE	DL ₅₀ (mg/kg)	VIA	Referência
ESQUILO (<i>Citellus spilosoma canescens</i>)	0,4	IP	191
URSO	0,5-1,0	ORAL	107
CABRA	0,6	IM	30,29
HOMEM	0,7-2,1 (b)	ORAL	3
RATO ALBINO sem especificação da linhagem	2,2	SC	54
Sprague-Dawley	3,5	ORAL	54
Sprague-Dawley	5,0	SC	75
HAMSTER	2,5-5,0	IP	30,29
RATO (Flórida- <i>Ratus r. novergicus</i>)	3,0	ORAL	3
CAMUNDONGO (<i>Peromyscus</i> sp)	4,0	ORAL	191
MACACO RHESUS (<i>Macaca mulatta</i>)	4,0	IV	30,29
POMBA DOMÉSTICA	4,24	ORAL	107
ÁGUIA REAL (<i>Aquila chrysaetos</i>)	5,0	ORAL	191
GALINHA (<i>White Leghorns</i>)	7,5	ORAL	28
CAMUNDONGO (<i>Mus musculus</i>)	8,0	ORAL	107
PATO SELVAGEM (<i>Dafila acuta</i>) fêmea	8,0	ORAL	191,107
macho	10,0	ORAL	191,107
MACACO ARANHA (<i>Ateles geoffroyi</i>)	14,0	IV	30,29
CAMUNDONGO ALBINO Carworth	17,0	ORAL	185
Maple Grove	19,3	SC	78
SAPO LEOPARDO (<i>Rana pipiens</i>)	150,0	SC	3
SAPO AFRICANO (<i>Xenopis laevis</i>)	> 500,0	IP-SC	121

(a) - valor aproximado
(b) - valor estimado

IV - intravenoso
IP - intraperitoneal
SC - subcutâneo

Desenvolvimento de Tolerância

Outro aspecto relevante da toxicidade do fluoroacetato é a capacidade de pequenas doses deste composto protegerem contra doses maiores administradas subsequenteemente. Este fato já foi demonstrado experimentalmente em camundongos, ratos e possivelmente em macacos Rhesus; não foi produzido em cães ou coelhos²⁸.

Por outro lado, animais australianos nativos, particularmente os do extremo sudoeste da Austrália Ocidental, que convivem com uma vegetação produtora de fluoroacetato (atualmente são conhecidas 33 espécies dessas plantas nessa região) há pelo menos milhares de anos, desenvolveram vários graus de tolerância a essa vegetação tóxica. Conforme TWIGG & KING¹⁸⁶, grandes pesquisadores sobre o tema, essa tolerância obedece à seguinte ordem: herbívoros > omnívoros > carnívoros. Esses autores também mostraram que essas espécies são cerca de 150 vezes mais tolerantes ao 1080 quando comparadas às mesmas espécies que habitam na Austrália Oriental, onde não existem plantas que contêm fluoroacetato. Uma vez desenvolvida a tolerância, esta é retida pela população animal mesmo quando isolada da vegetação tóxica por muito anos.

A capacidade de desenvolver tolerância às plantas produtoras de fluoroacetato, não deve ser exclusiva dos animais australianos. Deve envolver a fauna de todos os três continentes, onde algumas plantas nativas contêm quantidades significantes do composto tóxico.

Acúmulo

Quando doses de fluoroacetato abaixo do limiar de toxicidade são administradas diariamente a cães, cobaias e coelhos, observa-se um efeito cumulativo deste composto. O mesmo não é verificado em ratos e camundongos¹¹¹. Neste contexto, FOSS⁶⁰ relatou que cães morrem no quinto dia após uma administração diária de 1/4 da DL de 1080; no entanto os animais sobrevivem a doses sub-letais maiores que essas se forem dadas em dias alternados, ou num espaçamento maior. Nessas condições, não são protegidos quando é alcançada uma dose letal, o que sugere serem os cães incapazes de desenvolver uma tolerância significativa a doses repetidas e crescentes de fluoroacetato.

Toxicocinética

O monofluoroacetato de sódio é rapidamente absorvido pela via pulmonar (poeiras contendo MFAS), parenteral (SC,IP,IM,IV) e oral. Praticamente não é absorvido pela via dérmica^{111,28}. Após a absorção, distribui-se rapidamente por todos os tecidos, de maneira relativamente uniforme, conforme resultados obtidos 4 horas após a administração por via IP do fluoroacetato-2-¹⁴C em ratos⁶³, ou de [¹⁸F]-fluoroacetato, por via IV em camundongos¹⁴⁷. Após ingestão, as mais altas concentrações de MFAS são encontradas no conteúdo estomacal⁵⁴.

Devido à estabilidade da ligação C-F do fluoroacetato, era assumido ser o mesmo resistente ao ataque biológico; nesse sentido a literatura tratava dos efeitos do 1080 como sendo sempre provocados pela molécula intacta. Entretanto, com o decorrer do tempo, as pesquisas evidenciaram a capacidade do sistema biológico em desfluorinar este composto, ou seja, de romper a ligação C-F, liberando o fluoreto inorgânico.

GAL e col. (1961)⁶³ foram os primeiros autores a demonstrar de maneira convincente a desfluorinação do MFAS, através da observação da ocorrência de cerca de 2% de $^{14}\text{CO}_2$ no ar exalado de ratos, 4 horas após a administração IP de 10,53 mg/kg de fluoroacetato-2- ^{14}C . Também constataram que 32% da radioatividade administrada (1,77 mg/kg de fluoroacetato-2- ^{14}C via IP) aparecia na urina, durante um período de 4 dias; desta, somente 3% aparecia na forma de fluorocitrato.

Outras pesquisas vieram a corroborar com a capacidade de desfluorinação do fluoroacetato "in vivo". Assim, já se constatou através de medidas realizadas com eletrodo específico^{139,54}, contagem de ^{18}F ¹⁴⁷ ou por ^{19}F -RMN¹⁴⁹ que, após a administração de fluoroacetato tanto em ratos como em camundongos, há um aumento da concentração de fluoreto inorgânico no plasma⁵⁴, fígado⁵⁴, rins⁵⁴, urina^{139,147,149}, com posterior depósito nos ossos^{139,147}. No fígado este aumento foi o mais pronunciado, indicando a maior atividade de desfluorinação deste órgão⁵⁴.

Uma vez confirmada a capacidade de desfluorinação do fluoroacetato no organismo, surgiram pesquisas no sentido de buscar o agente responsável por esta transformação. Neste contexto, KOSTYNIK e col.(1978)⁸³ identificaram "in vitro", no citossol do fígado de ratos, um sistema capaz de desfluorinar o fluoroacetato, cuja atividade era completamente inibida pelo maleato e estimulada pela glutathione, evidenciando-se, assim, o envolvimento de grupos sulfidríla. KOSTYNIK (1979)⁸² também confirmou "in vivo" o papel protetor da glutathione, pois quando o nível da mesma era reduzido no organismo de ratos, através do emprego da dietil-maleato (736 mg/kg), observava-se uma diminuição significativa da DL_{50} do fluoroacetato(35%).

Dando continuidade a essas pesquisas, SOIEFER & KOSTYNIK (1983)¹⁴¹, (1984)¹⁴⁰ caracterizaram na fração citossólica de fígado e rins de camundongo, uma enzima aniônica, que catalisava a desfluorinação do fluoroacetato, com liberação de fluoreto livre. Esta reação tem uma necessidade específica de glutathione, que age como um co-substrato ou como um ativador. A maior atividade desta enzima foi encontrada no fígado, seguida pelos rins, pulmões, coração e testículos; esta atividade não foi detectada no cérebro. Estes autores a purificaram constatando que ela representa uma nova e única enzima desalogenadora que está presente na fração citossólica do fígado de camundongos. Apesar de compartilhar com algumas propriedades, é distinta das conhecidas isoenzimas múltiplas catiônicas e aniônicas da glutathione-S-transferase, que também são encontradas no citossol hepático de muitos mamíferos e estão associadas com uma variedade de reações de destoxificação, incluindo a desalogenação.

Já em gambás, a glutathiona-S-transferase é a enzima responsável pela desfluorinação, com liberação de fluoreto inorgânico e S-carboxi-metil-cisteína⁹¹.

Recentemente¹⁴⁹, foram feitas pesquisas utilizando-se de [2-¹³C] e [1,2-¹⁴C]fluoroacetato em ratos e camundongos. Encontrou-se uma mistura complexa de metabólitos urinários, incluindo-se conjugados S-carboxi-metil. Na bile, foi mostrada a presença tanto de S-carboxi-metil-glutathiona ou de um conjugado relacionado, como de um O-conjugado do fluoroacetato. A incubação de ¹³C-fluoroacetato em citossol hepático destes animais, resultou na formação de S-[¹³C]carboxi-metil-glutathiona, fluoreto inorgânico e fluorocitrato¹⁴⁹.

Mecanismo de Ação

O grau de toxicidade dos ácidos acéticos halogenados deveria aumentar paralelamente à sua reatividade (TABELA III). No entanto, isto somente é válido para a seqüência: $\text{ICH}_2\text{COOH} > \text{BrCH}_2\text{COOH} > \text{ClCH}_2\text{COOH}$. Ao contrário do esperado, o ácido fluoroacético é o mais tóxico dentre eles. Este fato está associado à semelhança dos raios atômicos do flúor e do hidrogênio (TABELA III).

A similaridade espacial dos radicais $\text{FCH}_2\cdot$ e $\text{CH}_3\cdot$ é tão notável, que até o organismo se engana com a mesma. O ácido fluoroacético mimetiza o ácido acético e se incorpora no ciclo de Krebs, sendo transformado em ácido fluorocítrico, um inibidor metabólico, que priva o organismo de energia, levando-o à morte; a FIGURA 1 ilustra este fato. Este processo pelo qual o fluoroacetato simula o acetato no metabolismo intermediário, sendo posteriormente transformado em um produto tóxico foi denominado de "síntese letal" por Peters¹¹⁵, o primeiro autor a descrevê-lo em 1952.

Inicialmente, o fluoroacetato é ativado, através da reação com a coenzima A (CoA), na presença de ATP, para formar a fluoroacetil-CoA^{17,87}. Esta reação é catalisada pela acetil-CoA-sintetase (ACS). Recentemente, Patel & Walt¹¹⁰ demonstraram claramente, ser o fluoroacetato um substrato da ACS "in vitro" e, muito provavelmente, também "in vivo". A fluoroacetil-CoA condensa-se a seguir, com o oxaloacetato, numa reação catalisada pela enzima citrato-sintase, para sintetizar o fluorocitrato^{115,117}. Todo este processo é similar ao metabolismo natural, onde a ACS catalisa a formação de acetil-CoA pela reação do ácido acético com CoA e ATP. A acetil-CoA condensa-se com o oxaloacetato através da citrato-sintase, originando o citrato. Entretanto, enquanto o citrato continua seu metabolismo através do ciclo de Krebs, o mesmo não acontece com o fluorocitrato (FIGURA 1).

O fluorocitrato inibe competitivamente a enzima aconitase mitocondrial^{80,99,118}, resultando este fato em relevantes alterações na fisiologia celular, como citadas a seguir:

bloqueio do ciclo de Krebs, no estágio de conversão do citrato a cis-aconitato

O ciclo de Krebs é bloqueado porque o fluorocitrato inibe a aconitase mitocondrial, enzima que catalisa a reação citrato-cis-aconitato, localizada no compartimento interno da mitocôndria. Somente um dos quatro isômeros do fluorocitrato inibe a aconitase, este é o DL-erythro⁵⁸. Muito recentemente, Tecle e col.¹⁴⁹ sugeriram que este isômero, além de inibir esta enzima (aconitase), age como um substrato para a mesma.

acúmulo de citrato na mitocôndria e nas células, especialmente em tecidos metabolicamente ativos

O citrato acumula-se na mitocôndria porque continua a ser formado numa velocidade reduzida pela citrato-sintase, através do mecanismo de retro-alimentação. Este acúmulo é proporcional à atividade respiratória do tecido; portanto, as maiores concentrações do citrato são encontradas no coração e nos rins. No fígado, esse nível vai depender do estado nutricional do animal. Assim, em ratos alimentados de maneira normal, esses teores são altos por ser a concentração de glicogênio considerável e a respiração realizada principalmente às custas do piruvato. Em animais mantidos em jejum, o nível de citrato aumenta levemente porque o glicogênio hepático está bem diminuído e os substratos respiratórios são principalmente os ácidos graxos¹⁸. Portanto, animais em jejum são mais resistentes à intoxicação pelo fluoroacetato que aqueles alimentados de maneira normal.

diminuição da produção de energia, conseqüentemente, diminuição na concentração celular de ATP

Há um decréscimo dos teores de fosfato de alta energia e uma marcada diminuição de ATP, no fígado, músculo esquelético e coração, fato que não é causado pelo desacoplamento da fosforilação oxidativa. No fígado e no coração de ratos, o decréscimo de ATP foi da ordem de 50% após a administração de uma dose letal de fluoroacetato, tendo sido constatado também, um aumento paralelo de ADP, AMP e de fosfato inorgânico¹⁸.

aumento da produção de corpos cetônicos

Dois mecanismos podem ser responsabilizados pelo acúmulo de corpos cetônicos na intoxicação por fluoroacetato. A atividade da citrato-sintase poderia ser inibida tanto pela fluoroacetil-CoA, como demonstrado "in vitro" por Brady¹⁷, quanto pelo acúmulo de citrato, resultante da reação da citrato-sintase. Em conseqüência desta inibição, a acetil-CoA tenderia a acumular-se, aumentando os níveis de corpos cetônicos. Posteriormente, a formação de corpos cetônicos poderia ser estimulada pelo aumento da oxidação de ácidos graxos nos tecidos com baixos valores de glicogênio, especialmente o fígado¹⁸.

rápida hidrólise do glicogênio no fígado, músculo esquelético e miocárdio

Este fato pode ser devido a um efeito direto do fluoroacetato em algum mecanismo celular capaz de ativar a glicogenólise, ou a um efeito indireto decorrente do aumento da secreção de adrenalina e/ou da intensa estimulação no sistema nervoso autônomo simpático com conseqüente ativação do sistema fosforilase, mediada pelo AMP cíclico¹⁸.

hiperglicemia e aumento dos níveis sanguíneos e teciduais de lactato

Parece ser decorrência da intensa glicogenólise que se observa na intoxicação pelo fluoroacetato¹⁸.

diminuição dos níveis plasmáticos de cálcio ionizado

Roy(Shapira) e col.(1980)¹³⁴ mostraram que os níveis plasmáticos de cálcio ionizado diminuem significativamente (27,2%) em gatos intoxicados por fluoroacetato, fato relevante na patogênese da intoxicação aguda. As principais manifestações da intoxicação aguda por fluoroacetato, convulsões e o largo espectro de arritmias cardíacas, podem ser causadas pela hipocalcemia.

redução significativa da síntese e também da liberação de glutamina nas células da glia

Foi somente em 1992 que Hassel e col.⁷⁴ demonstraram ser o fluoroacetato (por mimetizar o acetato) transportado preferencialmente às células da glia (astrócitos), onde após converter-se em fluorocitrato, inibe o ciclo de Krebs. Portanto, o fluorocitrato é um inibidor seletivo do ciclo de Krebs glial⁷⁴. A conseqüência deste fato, como já havia sido confirmado "in vitro" por Szerb & Issekutz(1987)¹⁴⁸, utilizando hipocampo de cérebro de ratos machos Sprague-Dawley, é que o fluoroacetato reduz significativamente a síntese e também a liberação de glutamina nas células da glia. Neste particular, Hassel e col.⁷⁴, também verificaram que 1 mol de fluorocitrato administrado intraestriatalmente em ratos, causava 95% de redução da síntese da glutamina a partir do acetato. Se a síntese de glutamina está inibida "in vivo" pelo fluoroacetato, seria de se esperar que a síntese de glutamato também estivesse diminuída. Porém, tal não acontece porque, em primeiro lugar, a concentração da glutamina no compartimento extracelular do cérebro e no plasma é a mesma (estes compartimentos estão em comunicação) e, em segundo lugar, porque a glutamina é capaz de atravessar a barreira hematoencefálica¹⁴⁸.

elevação prolongada da concentração extracelular de glutamato devido à inibição da sua captura pelas células da glia

Szerb & Issekutz¹⁴⁸ mostraram que o fluoroacetato inibe a captura do glutamato pelas células da glia. Este efeito é, provavelmente, conseqüência de um decréscimo da atividade da bomba de sódio, resultante de uma insuficiente produção de ATP, visto que o ciclo de Krebs

foi inibido. Como decorrência o transporte de glutamato para a glia está deficiente. Sob estas condições, uma reduzida captura do glutamato pelas células da glia resulta numa prolongada elevação da concentração extracelular do glutamato liberado sinapticamente. Este mecanismo provavelmente contribui para a ação convulsivante do fluoroacetato.

alterações sub-estruturais e funcionais na mitocôndria

Já foram mostradas uma variedade de anormalidades bioquímicas em mitocôndrias isoladas de vários tecidos de ratos intoxicados por fluoroacetato; estas anormalidades estão ligadas a modificações na capacidade que apresentam de oxidar diferentes substratos adicionados "in vitro"¹⁸.

Afora estas alterações funcionais, a intoxicação por fluoroacetato causa, também, dano estrutural nas mitocôndrias de vários tecidos conforme revelado por microscopia eletrônica¹⁸.

As plantas parecem evitar sua auto-intoxicação pela incapacidade que apresentam de converter fluoroacetato a fluorocitrato e, em menor grau, pela relativa insensibilidade de sua aconitase ao fluorocitrato¹⁸⁶.

Sinais e Sintomas da Intoxicação

A intoxicação por fluoroacetato é caracterizada por um período de latência após a administração do composto por via oral, subcutânea, intraperitoneal, intramuscular, intravenosa ou intracerebroventricular^{28,77}. Este período varia de aproximadamente 30 minutos a 2,5 horas e é observado em qualquer espécie animal. Mesmo doses massivas não provocam uma resposta imediata. Por exemplo, o aumento de 50 ou até mesmo de 500 vezes a DL₅₀ de 1080, injetada IV em coelhos albinos, diminui o período de latência de 30 para apenas 20 minutos²⁸. De acordo com Pattison¹¹¹, o período de latência é resultado do tempo necessário para que o fluoroacetato seja absorvido, penetre na célula, e sintetize bioquimicamente uma quantidade de fluorocitrato tal, que seja efetiva em romper os processos intracelulares em escala suficiente para induzir os sinais clínicos.

A natureza da ação farmacológica do 1080 nem sempre é a mesma nas diferentes espécies animais. No entanto, em todas elas, os principais órgãos afetados são o SNC e o coração²⁸. Quando os sinais começam, o início é agudo e o curso é rápido e geralmente violento. A morte pode resultar de²⁸:

- a) parada respiratória em consequência de convulsões intensas;
- b) falha cardíaca gradual ou fibrilação ventricular;
- c) depressão progressiva do SNC, com falha respiratória ou cardíaca como evento terminal.

Chenoweth²⁸ concluiu que o cão, o coelho, o macaco Rhesus e o rato são as espécies protótipas que abrangem as principais variações nos tipos de resposta. A intoxicação no homem adulto parece ser muito similar àquela do macaco Rhesus. A seguir, a descrição destes casos.

Sistema Nervoso Central - Cão

O início dos efeitos tóxicos induzidos pelo fluoroacetato nos cães (geralmente 4 a 5 horas após uma dose de 0,1mg/kg) é indicado por alguns minutos de latidos e/ou ganidos, pelo não reconhecimento da presença humana, por ações sugestivas de alucinações, por hiperatividade motora e, finalmente, por espasmos musculares tônicos e movimentos de corrida. Estes últimos podem alternar-se ou cessar completamente, nestes momentos estes em que os animais têm aparência normal; no entanto, os repetidos ataques anóxicos sobre o centro respiratório durante as crises convulsivas, resultam numa progressiva paralisia respiratória. O coração ainda bate vagarosamente alguns minutos após a parada da respiração. A morte é, pois, tipicamente o resultado dos efeitos de repetidas e prolongadas convulsões sobre o centro respiratório, nunca tendo origem cardíaca primária.

Efeito cardíaco - Coelho

Em coelhos albinos nenhuma alteração significativa é observada por cerca de meia hora após a injeção intravenosa de fluoroacetato de sódio (0,5 mg/kg). O primeiro sintoma notado é, geralmente, uma "fraqueza" da musculatura do pescoço e das patas dianteiras, fato que se correlaciona positivamente com o decréscimo da atividade motora. Este estado pode aprofundar-se mas, normalmente, permanece assim até a ocorrência de uma convulsão súbita e violenta, de natureza clônica, tipicamente associada a uma vocalização. Opistótono, midríase e branqueamento da retina desenvolvem-se rapidamente, seguidos de um progressivo relaxamento, respiração ofegante e morte. Se o tórax for imediatamente aberto, encontram-se as aurículas batendo e os ventrículos fibrilando. A morte tem, pois, origem cardíaca, uma vez que registros eletrofisiológicos mostraram que o coração fibrila e pára antes da respiração.

Os efeitos cardíacos primários ocorrem não somente nos coelhos mas, de maneira geral, também nos herbívoros.

Com relação aos bovinos, Robinson¹³⁰ administrou por via oral, cápsulas de gelatina com doses de fluoroacetato variando de 0,312 a 0,624mg/kg misturada com açúcar, em 20 bezerros e 9 bois. Os sintomas manifestados foram extremamente consistentes. Exceto por uma possível leve letargia observada em poucos animais, os demais pareciam normais. Nos animais que morreram, esta aparência normal continuou até o início dos sintomas terminais que manifestaram-se 1,5 a 29 horas após o tratamento, demoraram de 20 minutos a 3 horas e apareceram na seguinte seqüência: micção, "tontura", queda, espasmos leves seguidos por movimentos de "pedalagem" e morte.

Reação mista - Macaco Rhesus

Uma a duas horas após a administração de fluoroacetato, o animal pode vomitar e tornar-se apreensivo e arredio. Poucos minutos mais tarde, as ações sugerem alucinações auditivas seguidas pela presença de nistagmo. Tremores nos músculos faciais, geralmente unilaterais, indicam o início de um ataque convulsivo, que notavelmente é do tipo epileptiforme. Assim, rapidamente espalha-se esta atividade contrátil anormal dos músculos da face para os demais do corpo, terminando o animal por apresentar "sacudidelas" e convulsões simétricas nas quais podem observar-se episódios espasmódicos violentos, na velocidade de três por segundo. Componentes tônicos são vistos, mas não dominam, como acontece no quadro de cães intoxicados. O animal fica aparentemente inconsciente neste período mas, assim que as convulsões cessam, tenta gradualmente recuperar-se, o que ocorre geralmente ao redor de 30 minutos após o início da crise. O macaco aparenta estar deprimido por algum tempo, e normalmente recobra-se inteiramente da convulsão. Um segundo episódio completo raramente é visto. Geralmente, o animal fica fraco pelas próximas horas, mas permanece de pé, mantendo-se por si; repentinamente, é acometido por fibrilação e fasciculação ventricular e morre. É incomum a recuperação espontânea da fibrilação ventricular no macaco.

Depressão respiratória - Rato

Embora convulsões de natureza tônica precedidas por um período de uma a duas horas de atividade diminuída associadas com hipersensibilidade à estimulação externa, sejam os sintomas normalmente observados após uma injeção de 5mg/kg de monofluoroacetato de sódio em ratos, a morte é, nestes animais, o resultado de uma depressão respiratória, fato que ocorre gradualmente após ter sido a atividade convulsiva diminuída ou inteiramente interrompida. Ratos muito pesados (acima de 400g) desenvolvem, ocasionalmente, fibrilação ventricular.

Diagnóstico da Intoxicação

O diagnóstico da intoxicação por fluoroacetato é feito geralmente com base no histórico, nos sinais clínicos, nos achados de necropsopia e nas análises químicas.

As altas concentrações de MFAS no estômago, e o fato de ser desprezível a desfluorinação do MFAS pela flora intestinal, fazem do conteúdo estomacal a amostra de escolha para análise em casos suspeitos de intoxicação. Outras amostras de escolha são a isca e o conteúdo de vômito. O fígado e os rins são amostras de menor valor devido à capacidade de desfluorinação destes órgãos⁵⁴.

A necropsia não mostra lesões características; observa-se, geralmente, uma cianose generalizada nas membranas mucosas e o fígado e os rins apresentam-se escuros e com acentuada congestão venosa. Os animais afetados exibem, ainda, uma hiperglicemia e níveis elevados de citrato nos rins. O diagnóstico diferencial deve incluir compostos como estricnina,

organoclorados, alcalóides de planta (por exemplo, nicotina, cicutoxina) e chumbo. Também deve ser considerada a intoxicação por toxinas bacterianas presentes em restos alimentares⁵⁵.

Tratamento da Intoxicação

Considerando-se o mecanismo de ação do 1080, é de se esperar que compostos precursores de acetato (referidos como "doadores de acetato") sejam capazes de reduzir a inibição competitiva do fluoroacetato pelo mesmo sítio ativo (Coenzima A)¹¹¹. Como consequência, estes compostos exerceriam um efeito protetor na intoxicação por fluoroacetato, através da diminuição da síntese de fluorocitrato.

Muitas substâncias já foram pesquisados para esta finalidade; no entanto, somente em um número bem reduzido destas, encontrou-se algum êxito terapêutico. De fato, para serem efetivas devem, também, ser solúveis e penetrar rapidamente nas estruturas celulares¹¹¹. São exemplos destes compostos, o etanol, o acetato de sódio, a acetamida e o monoacetato de glicerol (monoacetin). Existem diferenças entre a eficácia desses agentes, tendo estas sido relacionadas à espécie animal que protegem e à potência de seus efeitos. Assim, quando o etanol é administrado dentro de 30 minutos após a intoxicação por 1080 reduz, significativamente, a mortalidade de camundongos, coelhos e cobaias; em cães, este efeito não é observado⁷⁸. Já o acetato de sódio tem efeito protetor somente em camundongos³¹. Ainda nestes animais e, imediatamente após a intoxicação por 1080, a administração simultânea de etanol e acetato de sódio, produz um efeito sinérgico¹⁸⁵. A acetamida protege ratos albinos contra a intoxicação por 1080 somente quando administrada simultaneamente ou até 24 horas antes da dose de fluoroacetato. A acetamida protege, também, cobaias e ovelhas da intoxicação letal produzida pelas folhas de *Dichapetalum cymosum* ("gifblaar"), uma planta sul-africana que contém fluoroacetato; esta proteção, no entanto, só é observada quando é administrada por via oral e simultaneamente às folhas tóxicas⁵⁶. Dentre os muitos precursores de acetato pesquisados²⁸, o monoacetin é o agente protetor mais efetivo contra a intoxicação por fluoroacetato em ratos, coelhos, cães e macaco Rhesus^{31,122}. Com relação ao macaco Rhesus, cuja resposta é similar ao homem, o monoacetin é capaz de reduzir tanto a mortalidade como os sintomas da intoxicação, mesmo quando administrado 30 minutos após a injeção iv do 1080, isto é, quando as convulsões já se iniciaram³¹.

Na realidade, não existe antídoto específico para a intoxicação por fluoroacetato porque não há substância que seja capaz ou de reverter o fluorocitrato à fluoroacetato ou de remover e inativar o fluorocitrato, uma vez que este já tenha sido formado. Como o fluorocitrato altera funções bioquímicas básicas, a intoxicação por fluoroacetato é multifatorial e, para que tenha sucesso o tratamento, requer uma terapia múltipla. Com base neste fundamento, em 1990, Omara e col.¹⁰⁵ mostraram que a associação de 130mg/kg de gluconato de cálcio (para corrigir a hipocalcemia) com 240mg/kg de succinato de sódio (para suplementar o bloqueio do ciclo de Krebs) produz um efeito antidotal significativo na intoxicação de

camundongos machos CD-1 pelo fluoroacetato; este efeito, no entanto, só é observado quando estes compostos são administrados dentro de 15 minutos após a exposição ao fluoroacetato.

Os barbitúricos devem ser usados com precaução para controlar as convulsões, uma vez que, posteriormente, podem potencializar os efeitos depressores no centro respiratório⁶⁰. Neste sentido, o emprego de benzodiazepínicos seria uma terapêutica mais racional para as crises convulsivas.

Métodos Analíticos

Desde que a "Fish and Wildlife Service" adotou o 1080 para o controle de predadores vertebrados, surgiu a necessidade de se desenvolver métodos analíticos capazes de determinar o fluoroacetato em iscas contaminadas ou em produtos de vômito, conteúdo gástrico, fígado e rins de animais que se intoxicaram acidentalmente.

Os métodos mais utilizados empregam a cromatografia em fase gasosa. Para tal, o fluoroacetato deve estar na forma de derivados metílicos^{142,143,144}, etílicos¹¹⁹, n-propílicos¹¹⁹, benzílicos⁷⁶ ou pentafluorobenzílicos^{102,103,1,25}, que diminuem sua polaridade e, conseqüentemente, melhoram a sensibilidade; a detecção pode ser feita por ionização de chama^{142,76,143}, captura eletrônica^{142,102,103,1,143} ou espectrometria de massa^{1,143,25,144}.

As propriedades físicas e químicas do 1080 também dificultam sua determinação por cromatografia a líquido de alta pressão (CLAP). Deve, assim, ser derivado com brometo de p-bromo-fenacil⁸⁴ ou 4 bromo-metil-7-metoxicumarina³³ ou convertido a éster p-nitrobenzílico¹²³ e analisado com detector ultravioleta ou fluorescente. Recentemente, ALLENDER² conseguiu analisar o 1080 por CLAP, sem derivação, utilizando uma coluna de fase reversa associada com NH₂.

Outros métodos para a detecção de fluoroacetato utilizam a cromatografia em camada delgada¹¹⁴, o eletrodo específico de fluoreto⁵⁴ e a ressonância magnética nuclear do ¹⁹F. (RMN¹⁹F)⁶¹

A análise de fluoroacetato em plantas foi feita pela obtenção de seus derivados em 1944⁸⁶, por cromatografia a gás e espectroscopia no infravermelho em 1961¹⁰¹ e 1964⁹⁰ e por cromatografia em papel em 1963¹⁰⁴ e 1973¹⁸⁹. Somente em 1987 aparece uma referência de método usando RMN¹⁹F para identificação e quantificação do fluoroacetato em extratos de planta.

3.OBJETIVOS

Objetivo geral: confirmar a presença de monofluoroacetato nas folhas de *Palicourea marcgravii* através de testes biológicos em ratos e de sua identificação química.

Objetivos específicos:

obter - extrair as folhas de *Palicourea marcgravii* e fracionar em diversos solventes.

- administrar o extrato bruto de P.m. e suas diferentes frações em ratos, para verificar seus efeitos tóxicos.
- verificar biologicamente a presença de monofluoroacetato na(s) fração(ões) biologicamente ativa(s) de P.m., por comparação com o padrão de monofluoroacetato de sódio, através do estabelecimento das respectivas curvas dose-porcentagem de letalidade e dose-latência para a 1ª convulsão (determinação da DL₅₀, testes de paralelismo e de potências relativas).
- identificar quimicamente por ressonância magnética nuclear utilizando-se ¹⁹F e por cromatografia em camada delgada a fração de P.m. que se mostrar biologicamente ativa.

4-MATERIAL E MÉTODO

4.1.Planta

A planta *Palicourea marcgravii* foi coletada em Miracema (Tocantins), Fazenda Morro Perdido, rodovia Br 153, km 360, em abril de 1989, no período de sua frutificação. Foram preparadas exsicatas, que estão catalogadas no Herbário do Instituto Botânico de São Paulo, sob nº SP-251.813.

4.2.Animais

Foram utilizados 120 ratos Wistar machos e de mesma linhagem, pesando entre 200-250g, provenientes do biotério do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo. Esses animais foram alojados, em número de três, em gaiolas metálicas medindo 16 x 30 x 18 cm, por um período não inferior a sete dias antes de serem colocados nas diferentes situações experimentais. Todas as gaiolas foram mantidas em salas com temperatura ambiente (20-25°C) controlada por meio de aparelhos de ar condicionado em um ciclo não revertido de 12 horas de claro e escuro, com luz ligada às 7:00 horas. Água e comida foram fornecidas aos animais "ad libitum", durante toda a fase experimental, exceto 15 horas antes das observações comportamentais, quando a comida era retirada.

Cada animal foi utilizado uma só vez.

4.3.Fármaco padrão

Monofluoroacetato de sódio, aprox. 95 % (SigmaChemical Company).

4.4.Procedimentos

4.4.1.Extração e fracionamento da planta

As folhas de *Palicourea marcgravii* foram secas à sombra durante 7 dias, sendo após finamente moídas (passadas por um tamis de 100 mesh), extraídas (por percolação com etanol 95%) e fracionadas em diversos solventes como apresenta a FIGURA 2. O percolado etanólico obtido de 450 g de folhas foi evaporado através de rotaevaporador rotativo sob pressão reduzida, em temperatura não superior a 40°C. Uma pequena porção do extrato etanólico seco resultante - o extrato bruto - foi separado para testes posteriores sendo o restante dissolvido em água e filtrado; obtinha-se, assim, uma fração aquosa e um resíduo ceroso insolúvel. A fração aquosa foi submetida a um fracionamento por partição, sendo extraída em sequência com acetato de etila e butanol saturado com água, obtendo-se, após evaporação dos solventes, seus respectivos resíduos. O extrato bruto e cada um dos resíduos foram submetidos a testes biológicos para verificação de seus efeitos tóxicos. Este material foi conservado em dessecador à vácuo e ao abrigo da luz.

4.4.2.Efeitos tóxicos do extrato bruto das folhas de *Palicourea marcgravii* e de suas frações

O extrato bruto de *Palicourea marcgravii* e os resíduos ceroso, 7 de acetato de etila, butanólico e aquoso (obtidos em 4.4.1.) foram dissolvidos em salina 0,9% ; para essa finalidade, o extrato bruto e os resíduos ceroso e de acetato de etila foram adicionados de algumas gotas de Tween 80 formando-se, assim, uma fina suspensão aquosa. Por via oral (sonda gástrica) foram administradas diferentes doses dessas preparações, de 0,1 a 3,0 mg/kg, em um volume 1mL/80g; foram utilizados grupos de 5 ratos por dose. Os animais do grupo controle receberam pela mesma via, idêntico volume de salina 0,9%.

Após as administrações, os animais foram mantidos em ambiente de laboratório, sendo observados continuamente por 6 horas e também às 24 horas; as intoxicações foram feitas sempre no mesmo período do ciclo de claro-escuro, isto é, entre 8:30 e 9:00 horas.

4.4.3.Verificação biológica da presença de monofluoroacetato no extrato bruto de P.m. (EB) e no resíduo aquoso de P.m. (RA) pela comparação dos resultados obtidos com aqueles do padrão de monofluoroacetato de sódio (MFAS)

4.4.3.1.Ensaio quantal: estabelecimento das curvas dose-resposta (% de letalidade) do EB, RA e MFAS para a determinação das respectivas DL₅₀ e das inclinações das retas obtidas; comparações de paralelismo e de potências relativas

Foram utilizados 60 ratos divididos ao acaso em grupos de 5 animais, que receberam por via oral (sonda gástrica), doses crescentes de extrato bruto de P.m. (100-110-150-200 mg/kg), de resíduo aquoso de P.m. (30-60-80-100mg/kg), como também do padrão de monofluoroacetato de sódio (0,6-1,0-1,4-2,0mg/kg). A preparação do extrato e dos resíduos para administração oral está descrita em 4.4.2; o monofluoroacetato de sódio foi dissolvido em NaCl 0,9%. Todas as preparações foram usadas em um volume de 1ml/80 g peso corporal. Após as administrações, os animais foram observados continuamente por 6 horas e também 24 horas após. Além de se registrar o número de animais mortos para cada dose, também foram observados todos os possíveis sinais indicativos da intoxicação até a recuperação total ou morte dos mesmos.

As curvas dose X porcentagem de letalidade foram traçadas analiticamente, isto é, utilizou-se uma regressão linear logarítmica/normal, onde a variável independente (eixo x) é o log da dose e a variável dependente (eixo y) é um valor da normal padrão, obtido através da conversão da % de mortes em quantis, lido numa tabela estatística (Apêndice).

Os valores de DL₅₀ foram calculados analiticamente através das equações de reta obtidas pela regressão linear.

As inclinações da reta, as potências relativas, os limites de confiabilidade de 95% para o intervalo encontrado (tanto das DL₅₀ como das inclinações da reta e das potências

relativas), bem como o teste de paralelismo entre as retas obtidas, foram calculadas de acordo com o método proposto por LITCHFIELD & WILCOXON⁸⁵.

As inclinações da reta também foram calculadas a partir do coeficiente angular.

4.4.3.2. Ensaio quantitativo: estabelecimento das curvas dose-efeito (latência para a 1ª convulsão) do EB, RA e MFAS para a determinação das inclinações das retas obtidas; comparações de paralelismo e de potências relativas

Grupos de 5 a 10 ratos formados ao acaso foram tratados por via oral com o extrato bruto de P.m. (100-110-150-200-300-600 mg/kg), com o resíduo aquoso de P.m. (40-60-80-100 mg/kg) ou com o padrão de monofluoroacetato de sódio (1,0-1,4-2,0-3,0 mg/kg). As preparações e os volumes usados foram descritas em 4.4.2 e 4.4.3.1. Cronometrou-se, para cada rato, a latência para o aparecimento da 1ª convulsão por até 6 horas de observação.

As curvas dose X latência para a 1ª convulsão foram traçadas analiticamente, através de uma regressão linear, onde a variável independente (eixo x) é o log da dose e a variável dependente (eixo y) é a latência para a convulsão.

As inclinações da reta foram calculadas a partir do coeficiente angular. A avaliação do paralelismo entre as retas obtidas foi feita a partir destes resultados. As potências relativas foram calculadas de acordo com o método proposto por ROCHA e SILVA¹³².

4.4.4. Identificação química do monofluoroacetato no resíduo aquoso de *Palicourea marcgravii*

4.4.4.1. Por ressonância magnética nuclear utilizando-se ¹⁹F (RMN¹⁹F)

O resíduo aquoso da P.m. e o padrão de monofluoroacetato de sódio foram solubilizados em água deuterada contendo trifluorometilbenzeno como referência interna, sendo analisados em um espectrômetro de ressonância magnética nuclear, modelo Bruker AM 400, operando na faixa de 376,5 MHz. Cada espectro foi registrado a uma temperatura de 303K, equivalente a 30°C.

4.4.4.2. Por cromatografia em camada delgada (CCD)

Foi feita uma adaptação do trabalho de Vickery e col. de 1973¹⁸⁹, que utilizaram cromatografia em papel. Foram aplicadas 37,5 µg, 75 µg, 150 µg e 300 µg de resíduo aquoso de P.m. e 5 µg, 10 µg, 20 µg e 50 µg do padrão de monofluoroacetato de sódio numa cromatofolha de alumínio, revestida com celulose microcristalina (Merck®) 20x20 cm, 100 µm de espessura, sem ativação. Esta foi desenvolvida até 10 cm no sistema-solvente etanol-NH₄OH-piridina-água (95:3:1:1). Após a evaporação do solvente, a placa foi nebulizada com Azul Nilo (GURR'S®); a coloração e o valor de hRf foram anotados.

O agente cromogênico foi preparado segundo a fórmula:

Azul Nilo: 20 mg

Etanol: 5 ml

Adicionar trietanolamina até coloração púrpura.

Acrescentar 5 ml de etanol.

5.RESULTADOS

5.1.Efeitos tóxicos do extrato bruto das folhas de *Palicourea marcgravii* e de suas frações

A TABELA V mostra os resultados obtidos; ela indica que, dentre as frações testadas, o resíduo aquoso foi o único que produziu tanto convulsões como a morte dos 5 ratos analisados (efeitos tóxicos), e o fez até com a dose de 0,1g/kg. Doses de 1,0g/kg dos resíduos ceroso, de acetato de etila e butanólico de P.m., não provocaram quaisquer efeitos nos ratos. O resíduo ceroso de P.m. não se mostrou ativo mesmo após doses tão elevadas como 3g/kg.

TABELA V - Efeitos tóxicos (convulsão seguida de letalidade) do extrato bruto das folhas de *Palicourea marcgravii* e de suas frações, após administração oral, em ratos.

Tratamento	Doses (g/kg)			
	0,1	0,2	1,0	3,0
NaCl 0,9%	0/5 ^(a)	0/5	0/5	0/5
Extrato bruto	0/5	5/5	5/5	-
Resíduo ceroso	-	-	0/5	0/5
Resíduo de acetato de etila	-	-	0/5	-
Resíduo butanólico	-	-	0/5	-
Resíduo aquoso	5/5	5/5	5/5	-

^(a) animais com efeitos tóxicos/animais testados.

5.2.Curvas dose-porcentagem de letalidade do extrato bruto da P.m. (EB), do resíduo aquoso da P.m. (RA) e do padrão de monofluoroacetato de sódio (MFAS) para a determinação das respectivas DL₅₀ e das inclinações das retas obtidas; comparações de paralelismo e de potências relativas

As porcentagens de letalidade encontradas com os valores dos quantis correspondentes em relação à dose administrada do EB, RA e MFAS em ratos, por via oral, são mostradas nas TABELAS VI, VII e VIII; as respectivas curvas dose-resposta estão traçadas na FIGURA 3.

As equações de reta com os respectivos coeficientes de correlação (r) para cada curva obtida foram:

$$\begin{array}{lll}
 \text{EB} & - & y = 34,2004 \log(\text{dose}) - 72,8341 \quad (r = 94,56\%) \\
 \text{RA} & - & y = 20,8485 \log(\text{dose}) - 37,0366 \quad (r = 96,39\%) \\
 \text{MFAS} & - & y = 21,5395 \log(\text{dose}) - 0,9395 \quad (r = 97,50\%)
 \end{array}$$

As DL₅₀ obtidas com os respectivos intervalos de confiança foram:

$$\text{EB} \quad - \quad 134,78 \quad (127,11-142,92)$$

RA - 59,77 (54,23 - 65,80)

MFAS - 1,11 (1,01 - 1,21)

As retas obtidas são estatisticamente paralelas ($p < 0,05$). Seguem as **inclinações das retas** com os respectivos intervalos de confiança:

EB - 1,07 (1,05 - 1,09)

RA - 1,12 (1,09 - 1,15)

MFAS - 1,11 (1,09 - 1,13)

As **inclinações das retas** obtidas pelo coeficiente angular foram as seguintes:

EB - $88^{\circ} 19' 31''$

RA - $87^{\circ} 15' 14''$

MFAS - $87^{\circ} 20' 31''$

As **potências relativas** encontradas com os respectivos intervalos de confiança foram:

MFAS/EB - 122

MFAS/RA - 54

RA/EB - 2,3

TABELA VI - Porcentagem de letalidade em relação à dose do extrato bruto de P.m. administrada por via oral, em ratos

dose (mg/kg)	nº morte/nº testados	%	quantis
100	0/5	0	- 6
110	1/5	20	- 0,8416
150	4/5	80	+ 0,8416
200	5/5	100	+ 6

TABELA VII - Porcentagem de letalidade em relação à dose do resíduo aquoso de P.m. administrada por via oral, em ratos

dose (mg/kg)	nºmorte/nºtestados	%	quantis
30	0/5	0	- 6
60	3/5	60	+ 0,2533
80	4/5	80	+ 0,8416
100	5/5	100	+ 6

TABELA VIII - Porcentagem de letalidade em relação à dose do padrão de monofluoroacetato de sódio administrada por via oral, em ratos

dose (mg/kg)	nºmorte/nºtestados	%	quantis
0,6	0/5	0	- 6
1,0	3/5	60	+ 0,2533
1,4	4/5	80	+ 0,8416
2,0	5/5	100	+ 6

Figura 3 - Curvas dose-resposta para letalidade de ratos intoxicados oral e agudamente com:

- extrato bruto de P.m. (EB)
- Δ resíduo aquoso de P.m. (RA)
- padrão de monofluoroacetato de sódio(MFAS).

5.3. Descrição dos sinais e sintomas de ratos intoxicados oral e agudamente com extrato bruto de P.m., com resíduo aquoso de P.m. ou ainda com padrão de monofluoroacetato de sódio.

Um comportamento comum foi observado nos ratos após as administrações de extrato bruto ou resíduo aquoso de P.m. ou, ainda do padrão de monofluoroacetato de sódio. Dentro de 30 a 60 minutos após as administrações, os animais pareciam estar deprimidos, com aumento da frequência respiratória. Em muitos casos, os ratos aparentavam sentir dor, deitando-se ou movendo-se por sobre o seu abdome. A seguir, a respiração tornava-se mais profunda e apareciam espasmos musculares. O início das convulsões era rápido, sendo estas, na maioria das vezes, de natureza clônico-tônica e muito violentas. Geralmente os ratos ficavam cianóticos, com respiração ofegante, visivelmente prostrados e frios. Em alguns casos de intoxicação mais intensa, emitiam um som quando estavam sob o episódio convulsivo; gotas de sangue nos olhos também foram observadas. Muitos ratos morriam durante esta fase convulsiva provavelmente por depressão respiratória; outros tinham múltiplas convulsões, tremores finos, fasciculações e movimentos de corrida. Aqueles animais que sobreviviam às convulsões continuavam com a frequência respiratória aumentada por vários minutos e regeneravam-se.

5.4. Curvas dose-latência para a 1ª convulsão do extrato bruto de P.m. (EB), do resíduo aquoso de P.m. (RA) e do padrão de monofluoroacetato de sódio (MFAS); comparações de paralelismo e de potências relativas

Os resultados confirmaram a existência de uma relação linear entre o log da dose do EB, do RA e do MFAS administrada por via oral em ratos e a latência para a 1ª convulsão. Estes resultados estão contidos nas TABELAS IX, X e XI e as curvas respectivas são mostradas na FIGURA 4.

As equações de reta com os respectivos coeficientes de correlação (r) para cada curva obtida foram:

EB -	$y = -196,5552 \log(\text{dose}) + 622,6850$	(r = 99,63%)
RA -	$y = -210,8497 \log(\text{dose}) + 583,5205$	(r = 97,84%)
MFAS -	$y = -208,8464 \log(\text{dose}) + 202,9581$	(r = 97,65%)

As inclinações das retas obtidas pelo coeficiente angular são:

EB -	89° 42' 31"
RA -	89° 43' 42"
MFAS -	89° 33' 32"

Estes resultados indicam que as retas são paralelas.

As potências relativas encontradas foram:

MFAS/EB	-	141
MFAS/RA	-	64
RA/EB	-	2,2

TABELA IX - Relação entre dose e a latência para a 1ª convulsão em ratos intoxicados oral e agudamente com extrato bruto da P.m.

dose (mg/kg)	latência para a 1ª convulsão (minutos)	nº animais que convulsionaram/ nº testados
100	233,20 ± 42,46	5/10
110	222,40 ± 30,48	5/5
150	197,40 ± 62,04	5/5
200	162,20 ± 61,38	5/5
300	132,20 ± 47,04	5/5
600	81,40 ± 22,23	5/5

TABELA X - Relação entre dose e a latência para a 1ª convulsão em ratos intoxicados oral e agudamente com resíduo aquoso da P.m.

dose (mg/kg)	latência para a 1ª convulsão (minutos)	nº animais que convulsionaram/ nº testados
40	242,00 ± 48,46	8/10
60	211,40 ± 52,83	5/5
80	191,60 ± 32,32	5/5
100	153,60 ± 31,13	5/5

TABELA XI - Relação entre dose e a latência para a 1ª convulsão em ratos intoxicados oral e agudamente com padrão de monofluoroacetato de sódio

dose (mg/kg)	latência para a 1ª convulsão (minutos)	nº animais que convulsionaram/ nº testados
1,0	211,40 ± 56,11	5/10
1,4	165,00 ± 43,77	5/5
2,0	131,20 ± 27,27	5/5
3,0	111,20 ± 30,29	5/5

FIGURA 4 - Curvas dose-latência para a 1ª convulsão em ratos intoxicados oral e agudamente com:

- extrato bruto de P.m. (EB)
- Δ resíduo aquoso de P.m. (RB)
- padrão de monofluoroacetato de sódio (MFAS).

5.5. Identificação química do monofluoroacetato de sódio no resíduo aquoso de *Palicourea marcgravii*

5.5.1. Por ressonância magnética nuclear utilizando-se ^{19}F

Os deslocamentos por ^{19}F são expressos como valores negativos em campo alto a partir do trifluorometilbenzeno (0,0 ppm) como referência interna. Desta forma, registrou-se no resíduo aquoso da P.m., um sinal de tripleto de ^{19}F , na região de -151,69 ppm, sendo esse sinal comparável ao do composto padrão de monofluoroacetato de sódio, em -151,67 ppm (FIGURA 5).

5.5.2. Por cromatografia em camada delgada

A FIGURA 6 evidencia a presença de monofluoroacetato na amostra; as manchas observadas tanto para o resíduo aquoso de P.m. como para o padrão foram de igual coloração azul e de semelhante valor de R_f : 20. Pelo observado, a mancha de MFAS correspondente à concentração de 50 μg foi excessiva enquanto que a queda obtida para 5 μg foi bem visível. Como o padrão usado é um sal sódico, apareceram manchas róseas na origem de aplicação, uma vez que o Azul Nilo é um indicador de pH.

É digno de nota, no cromatograma, a semelhança observada entre as concentrações 37,5 μg de amostra e 5 μg de padrão.

Cabe acrescentar que foram gastas 2 horas para que o desenvolvimento do sistema-solvente atingisse 10 cm de altura da origem de aplicação.

FIGURA 5 - Espectro de RMN¹⁹F do padrão de monofluoroacetato de sódio e da amostra de resíduo aquoso de *P. marCGravii*, empregando como referência o BTF (trifluorotolueno) (0,0 ppm).

1 2 3 4 5 6 7 8

FIGURA 6 - Cromatograma CD do padrão de monofluoroacetato de sódio e da amostra de resíduo aquoso de P.m.

1. 5 μg	} padrão de MFAS	2. 37,5 μg	} resíduo aquoso de P.m.
3. 10 μg		6. 75 μg	
4. 20 μg		7. 150 μg	
5. 50 μg		8. 300 μg	

Sistema solvente: etanol-NH₄OH-piridina-água (95:3:1:1)

Agente cromogênico: Azul Nilo $hR_f = 20$

Adsorvente: celulose microcristalina

6. DISCUSSÃO

Os resultados obtidos neste trabalho - através de testes biológicos em ratos e identificação química - confirmaram a presença de monofluoroacetato nas folhas de *Palicourea marcgravii*, responsabilizando-o pela indução das convulsões e pela morte dos animais intoxicados.

Quando OLIVEIRA(1963)¹⁰⁴ encontrou, pela primeira vez, o monofluoroacetato nas folhas de P.m., agente químico cuja toxicidade já era comprovada, não se dedicou, na época, maior atenção à continuidade do tema. Somente após cerca de 20 anos, uma linha de pesquisa introduzida na Disciplina de Farmacologia Aplicada e Toxicologia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (FMVZ/USP) retornou ao assunto, quando GÓRNIK(1986)⁶⁷,(1988)⁶⁶ realizou estudos em animais de laboratório, visando um conhecimento maior da toxicidade da P.m.. Paralelamente, TOKARNIA & DÖBEREINER, em 1986¹⁶⁴, caracterizaram a intoxicação de bovinos por P.m., através de estudos experimentais, utilizando-se de folhas frescas ou dessecadas, administradas tanto em dose única como repetida.

É notável que durante tanto tempo os pesquisadores não tivessem se interessado em aprofundar seus estudos ^{química - toxicológicos} para estabelecer condições seguras de diagnóstico, prevenção e tratamento da intoxicação causada por esta planta. O fato dela possuir várias características que facilitam a intoxicação de bovinos, acarretando sérias perdas à pecuária dificulta, ainda mais, a compreensão do desinteresse pelo assunto.

Em contraste, na África do Sul, em 1944, quando MARAIS⁸⁶ mostrou ser o fluoroacetato também um princípio tóxico da planta nativa *Dichapetalum cymosum* ("Gifblaar"), a importância de compostos orgânicos fluorados em plantas tornou-se grandemente reconhecida. Este foi o ponto de partida para que PETERS, em 1952, na Inglaterra, elucidasse o mecanismo de ação do fluoroacetato e, a partir daí, inúmeras outras pesquisas surgissem com esse agente. Posteriormente, foram identificadas muitas outras espécies de *Dichapetalum* (todas originárias da África do Sul) que contém fluoroacetato^{187,189,188}. Também, na Austrália, o fluoroacetato foi identificado como princípio tóxico de 35 espécies de plantas, das quais 33 estão confinadas somente no extremo sudoeste da Austrália Ocidental¹⁸⁶, pertencendo aos gêneros *Gastrolobium* e *Oxylobium*. As outras duas espécies, *Gastrolobium grandiflorum* ("heart leaf poison bush")⁹⁰ e *Acacia georginae* ("Gidyea")¹⁰¹ são encontradas ao norte da Austrália, sendo que a primeira, em distritos isolados e a outra, apenas na bacia do rio Georgina.

As plantas australianas e africanas que contêm fluoroacetato são palatáveis aos bovinos e lá também causam grandes prejuízos à pecuária. No entanto, em relação a outros países, no Brasil este problema é mais grave porque:

a) comparada com outras espécies de plantas, a P.m. acumula maior quantidade de flúor orgânico em suas folhas (61%), conforme os resultados de HALL & CAIN⁷² e HALL⁷¹, que analisaram a relação entre flúor total no solo onde estas plantas crescem e flúor total e orgânico presente nas folhas;

b) a P.m. é amplamente distribuída por quase todo o Brasil, enquanto que as espécies australianas e africanas têm distribuição limitada;

c) todas as plantas contendo fluoroacetato crescem na faixa da região tropical, parecendo, pois, pouco provável que no Brasil só exista a P.m. como espécie representativa deste grupo. É bem possível que o fluoroacetato seja também o responsável pela sintomatologia de outras plantas integrantes do grupo daquelas que causam "morte súbita" ou, quem sabe, até mesmo de outras ainda desconhecidas.

Portanto, justamente no Brasil, onde estudos mais profundos deveriam ser feitos, pouca tecnologia tem sido desenvolvida neste particular. Torna-se grandemente necessário um conhecimento e aproximação dos resultados obtidos em outros países com os daqui. Muito poderia ser realizado, através de intercâmbios internacionais, no planejamento de futuras pesquisas, principalmente devido à riqueza de nossa flora e à vastidão de nosso território.

O projeto do presente trabalho está integrado à uma das linhas de pesquisa em Farmacologia e Toxicologia Comportamental da FMVZ/USP. Seu objetivo foi demonstrar a relação entre o princípio ativo da fração extraída das folhas de P.m. com o efeito produzido pela mesma, em ratos. No caso, o interesse da pesquisa foi dirigido prioritariamente para a confirmação da presença do monofluoroacetato sem, contudo, excluir outros eventuais princípios ativos que poderiam ser também responsáveis pela intoxicação dos animais.

De início, de acordo com a metodologia preconizada pela fitoquímica^{73,88}, depois de selecionada a planta a ser estudada, foi a mesma identificada botanicamente. Coube ao Instituto Botânico de São Paulo, a identificação e catalogação da amostra de *Palicourea marcgravii*, usada neste trabalho, para a garantia da inexistência de dúvidas acerca da origem correta da(s) substância(s) isolada(s) e identificada(s).

Caso fosse de interesse extrair somente o fluoroacetato das folhas da P.m., bastaria aquecê-las com água a 90°C por 1 a 2 horas^{189,187}. No entanto, empregou-se nesta pesquisa, uma metodologia compatível com o objetivo proposto. As folhas dessecadas e moídas de P.m. foram preliminarmente extraídas com etanol, solvente escolhido devido às suas características de solubilidade atingirem tanto as substâncias lipofílicas como as hidrofílicas. Nesse sentido, como o processo empregado na extração pode influenciar consideravelmente os resultados do estudo experimental, preferiu-se utilizar a extração a temperatura ambiente, por percolação. Não foi usado o clássico extrator modelo Soxhlet, como o fizeram CASCON²⁴ & OLIVEIRA¹⁰⁴ que também trabalharam com P.m., não só devido à maior quantidade de material disponível, como para diminuir o risco de reações provocadas pela ação combinada do calor, luz e solvente na formação de artefato e, também, para evitar possíveis perdas por aquecimento⁸⁸. A solução etanólica, pela mesma razão, foi evaporada através de um rotaevaporador rotativo, sob pressão reduzida, em temperatura entre 30° - 40°C^{73,88}. O extrato etanólico obtido (extrato bruto) foi solubilizado em água para separar as impurezas de caráter lipídico (resíduo de aspecto ceroso, esverdeado e insolúvel em água). A solução aquosa resultante foi separada em frações, em função da polaridade dos compostos nele contidos. Portanto, foi submetida a um fracionamento

por partição, sendo extraída, em sequência, com acetato de etila e butanol saturado com água (solventes com polaridades crescentes). Desta maneira seria verificado se além do fluoroacetato (que se separaria na fração aquosa) poderiam também ser encontradas outras substâncias que, de alguma forma, contribuíssem para a toxicidade aguda da P.m.. Estas, quando presentes, seriam separadas conforme sua polaridade nos solventes correspondentes ou, mesmo, já estariam no resíduo ceroso separado previamente.

GÓRNIAK^{68,66}, em seu experimento, não procedeu a uma extração inicial da amostra. Fez a separação de seis frações partindo de uma forte agitação de 30 g de folhas dessecadas e moídas da planta com 200 ml de clorofórmio-água 50%, em funil de separação. Após 15-20 minutos, esta mistura foi filtrada à vácuo em funil de Buchner. O remanescente da planta foi retornado ao funil e reextraído com mais 200ml de clorofórmio-água 50% e filtrado. As frações obtidas foram chamadas de "aquosa neutra" e de "clorofórmica neutra". O remanescente da planta foi de novo retornado ao funil de separação e extraído duas vezes com o mesmo solvente em meio alcalino (pH 9,5 - 10) fornecendo as chamadas frações "aquosa alcalina" e "clorofórmica alcalina". A seguir, a mesma operação foi feita em meio ácido (pH 3,5 - 5,3) chamando as frações obtidas de "aquosa ácida" e "clorofórmica ácida". Portanto, não foram extraídas frações significativas do conteúdo total da planta, tanto quanto à qualidade como à quantidade.

CASCON²⁴ utilizou uma metodologia mais apropriada. Extraiu as folhas de P.m. com etanol, por meio de Soxhlet e o extrato concentrado foi acidificado e filtrado. A solução aquosa ácida foi extraída com clorofórmio-etanol (2:1) e a fração aquosa remanescente reextraída em pH 7 e posteriormente em pH 11.

Apesar de ter empregado metodologia não compatível ao contexto, GÓRNIAK^{68,66} também observou nos animais, efeitos semelhantes aos obtidos neste trabalho, apenas quando usava as frações aquosas. Isto, possivelmente, é devido à forte atividade farmacológica do ácido monofluoroacético. Quanto aos demais efeitos que observou talvez sejam justificados pela introdução de base e ácido ao meio para obtenção das diferentes frações.

No presente trabalho não foram utilizadas frações com diferentes pH para que a administração ao animal fosse feita da forma a mais natural possível, com um mínimo de manipulação e operações subsidiárias.

Obtidas as frações e os respectivos resíduos, estes foram administrados, após dissolvidos em salina 0,9%, em diferentes concentrações e por via oral, a ratos. Desta forma, através de sua resposta biológica, tornou-se possível selecionar o(s) resíduo(s) responsável(eis) pela manifestação da toxicidade aguda da P.m. Esta fase inicial do experimento funcionou, assim, como uma triagem, onde os ratos serviram como indicadores biológicos na detecção do princípio tóxico.

Pelos resultados obtidos, confirmou-se que somente o resíduo aquoso (a partir da dose inicialmente testada de 0,1 g/kg) induziu convulsões e matou os animais. O extrato bruto, matéria prima de onde se originaram os outros resíduos, obviamente também induziu os efeitos

tóxicos, mas quando empregado em dose maior (0,2 g/kg). O resíduo ceroso, onde se encontram as substâncias de natureza lipofílica não provocou, aparentemente, qualquer reação nos ratos, até mesmo com doses tão elevadas quanto 3 g/kg. Os resíduos de acetato de etila e butanólico só foram testados nas doses de 1 g/kg; doses maiores não foram administradas por insuficiência de material obtido. Nesta concentração não provocaram quaisquer reações dignas de nota, parecendo improvável a existência de substâncias ativas nesses resíduos, isto é, que sejam diretamente responsáveis pelos sintomas característicos da toxicidade aguda da P.m. em ratos.

Assim, foi selecionado o resíduo aquoso, juntamente com o extrato bruto etanólico de onde se originou, para pesquisas mais aprofundadas no relativo à natureza de sua ação tóxica. Como, pelas evidências, este princípio poderia ser o monofluoroacetato, os experimentos subsequentes foram delineados utilizando-se este agente químico como padrão de referência, isto é, para comparação dos resultados a serem obtidos com os dos resíduos. Os demais resíduos - ceroso, de acetato de etila e butanólico - como não induzissem convulsões nos ratos, não foram mais utilizados.

Uma substância causa intoxicação oral e aguda quando os efeitos adversos decorrentes da administração de uma única dose ou de doses múltiplas administradas no intervalo máximo de 24 horas, manifestam-se dentro de um curto espaço de tempo^{106,138}.

A prova mais comum de toxicidade oral e aguda envolve a determinação da dose letal média (DL₅₀) do composto. De acordo com a OMS¹⁰⁶ e o MANUAL DE TESTES PARA AVALIAÇÃO DE ECOTOXICIDADE DE AGENTES QUÍMICOS¹³⁸, esta é definida como uma expressão estatisticamente derivada de uma única dose da substância, em mg por kg de peso do animal, capaz de matar 50% da população de animais dentro de até 14 dias, subsequentes à introdução da substância por via oral. O protocolo básico da determinação da DL₅₀ está bem estabelecido; consiste no tratamento de grupos de animais com doses matematicamente relacionadas da substância, para se determinar a dose que mata 50% dos mesmos dentro de uma função dose-resposta. As mortes ocorridas dentro das primeiras 24 horas após o tratamento são devidas, provavelmente, ao efeito tóxico direto ou indireto da substância.

Assim, as curvas dose-resposta construídas mostram a relação entre a dose e a proporção de uma amostra populacional que responde com um efeito quantal, isto é, de "tudo ou nada"; no caso específico, a letalidade. Em toxicologia, as curvas dose resposta quantal são muito utilizadas. Estas curvas exibem uma distribuição normal ou gaussiana.

Como a DL₅₀ é um número calculado, ele vem acompanhado de avaliações estatísticas de erro. Um dos métodos mais comumente aplicados para esta finalidade é aquele proposto por LITCHFIELD & WILCOXON⁸⁵, onde são utilizados nomogramas, estimativas gráficas de retas feitas em papel especial, sendo realizadas interpolações e leituras de escalas. Apesar dos recursos de cálculo atualmente disponíveis, este método e outros métodos gráficos, como o do probitos, são ainda largamente empregados. No presente trabalho, optou-se por traçar a curva dose-resposta por intermédio de um processo analítico. Desta forma, através de transformações

de variáveis, é obtida uma equação de reta, a partir da qual pode-se fazer uma melhor estimativa da DL₅₀ (Apêndice), evitando-se as imprecisões do método gráfico. Com isto, o erro devido ao método analítico resume-se na escolha do limite de confiabilidade e ao cálculo do intervalo de confiança correspondente.

Assim, a toxicidade oral e aguda do extrato bruto, do resíduo aquoso e do monofluoroacetato de sódio foram avaliadas através da determinação de suas respectivas DL₅₀ e dos perfis das curvas dose/resposta de letalidade. Os resultados obtidos mostraram um paralelismo quase perfeito entre as três retas, pois as inclinações das mesmas foram praticamente idênticas. Os extratos diferiram, apenas, em suas potências.

Quando existe paralelismo entre curvas dose-resposta, na grande maioria das vezes, pode-se afirmar serem os mecanismos de ação destas substâncias similares. No entanto, existem exceções, como aquela verificada por HAYES e col.(1973)⁷⁵. Estes autores determinaram o potencial de letalidade do monofluoroacetato(MFA), monocloroacetato(MCA) e monoiodoacetato(MIA) em ratos, por via subcutânea, de acordo com o método proposto por LITCHFIELD & WILCOXON⁸⁵. As curvas dose/letalidade encontradas foram estatisticamente paralelas, sendo o MFA o mais potente dentre eles, seguido pelo MIA e MCA. No entanto, quando determinaram o tempo médio para a morte de ratos (TL₅₀) após administração subcutânea das respectivas DL₉₀ encontradas, apesar das retas continuarem paralelas, o MCA mostrou-se o de menor latência. Ou seja, em relação ao MFA e o MIA, foi necessário empregar uma dose maior do MCA para matar os animais (menos potente), no entanto, este produziu a morte mais rapidamente. Para os autores este resultado indicou diferenças nos mecanismos que levavam à morte. Com efeito, após outros experimentos realizados, também verificaram que o MCA agiu por um mecanismo único que é em parte partilhado pelo MFA (produzem convulsões tônico-clônicas, depressão respiratória, inibição da oxidação do acetato "in vitro", não reagem com grupo SH "in vitro") e em parte pelo MIA (produzem dispepsia, reagem com SH "in vivo" e concentram-se no fígado e rins). O MFA inibe a aconitase, mas o MCA pode atuar em um sítio diferente ou adicional.

Apesar de não ser objetivo específico do presente trabalho, foi possível calcular a partir dos dados aqui obtidos, a TL₅₀ aproximada do extrato bruto e do padrão de fluoroacetato, selecionando-se a dose mais próxima da DL₉₀, dentre as doses que foram administradas na determinação da DL₅₀. Estes dados são apresentados a seguir:

I - Extrato bruto - dose de 150 mg/kg^a

latência para a morte (minutos)	nº morte/ nº testado	% morte	quantis
153	1/5	20	- 0,8416
156	2/5	40	- 0,2533
178	3/5	60	+ 0,2533
302	4/5	80	+ 0,8416

Equação da reta : $y = 4,5768 \log(\text{tempo}) - 10,4217$

Coefficiente de correlação : $r = 88,28\%$

inclinação da reta: $S = 1,65$

TL 50 = 189,3 minutos

II - Padrão de fluoroacetato - dose de 1,4 mg/kg^b

latência para a morte (minutos)	nº morte/ nº testado	% morte	quantis
123	1/5	20	- 0,8416
233	2/5	40	- 0,2533
298	3/5	60	+ 0,2533
327	4/5	80	+ 0,8416

Equação da reta: $y = 4,5080 \log(\text{tempo}) - 10,1996$

coeficiente de correlação: $r = 96,04\%$

inclinação da reta: $S = 1,66$

TL 50 = 183,0 minutos

Embora estes experimentos não tenham sido realizados exatamente com as DL90 do EB e do MFAS, nem com um número elevado de animais, o princípio tóxico do extrato bruto deve ser mesmo o fluoroacetato, pois as retas obtidas coincidiram estatisticamente (mesma inclinação e TL₅₀).

Não foi possível calcular a TL₅₀ para o resíduo aquoso; as doses administradas deste foram 60 e 80 mg/kg, que são muito diferentes da DL90 de 69 mg/kg. De qualquer maneira,

^a esta dose corresponde à DL94,4; a DL90 seria 146 mg/kg

^b esta dose corresponde à DL98,6; a DL90 seria 1,3 mg/kg

pode-se afirmar que, mesmo indiretamente, o fluoroacetato está presente no resíduo aquoso, pois este provém do extrato bruto.

Além do mais, os sinais tóxicos observados após a administração do EB, RA e MFAS foram similares. Esta sintomatologia também está de acordo com aquela encontrada em ratos Sprague-Dawley⁵⁴ e ratas Wistar⁵³ intoxicados com fluoracetato⁵⁴. No entanto, a DL₅₀ encontrada para os ratos Wistar analisados neste trabalho (1,1 mg/kg) foi o menor valor dentre os encontrados na literatura para outras linhagens de ratos albinos (TABELA IV).

A dramática queda na temperatura corporal dos ratos intoxicados pelo fluoroacetato foi, provavelmente, consequência de uma diminuição na produção de energia metabólica pelos tecidos; entretanto, não é improvável que tenha ocorrido, também, um efeito direto do toxicante sobre as células dos centros nervosos envolvidas com a regulação da temperatura¹⁸.

Apesar de relatos na literatura indicarem que ratos morram por depressão respiratória e bovinos por fibrilação, arritmias cardíacas e parada cardíaca, os sintomas observados nestas espécies animais após a administração do toxicante, são bem parecidos. Vale ressaltar, no entanto, que os bovinos são mais sensíveis que os ratos. ROBISON (1970)¹³⁰ calculou a DL₅₀ do fluoroacetato em bois (0,39 mg/kg) e bezerros (0,22 mg/kg) da raça Hereford, por via oral. Comparando-se os valores que encontrou com os obtidos neste trabalho para ratos Wistar, (1,1 mg/kg), pode-se dizer que o fluoroacetato é 2,8 vezes mais potente em bois e 5 vezes mais potente em bezerros. Também, através dos dados fornecidos por esse mesmo autor e utilizando-se o método analítico proposto neste trabalho (Apêndice), foi possível calcular as equações de reta, juntamente com os coeficientes de correlação e inclinações que definem as funções dose-resposta correspondentes, para o boi ($y = 19,9316 \log(\text{dose}) + 10,2262$; $r = 99,91\%$; $S = 1,12$) e para o bezerro ($y = 12,5181 \log(\text{dose}) + 8,2169$; $r = 98,34\%$; $S = 1,20$). Comparando-se esses resultados com os obtidos neste trabalho, após a intoxicação de ratos Wistar com o padrão de fluoroacetato ($y = 21,5395 \log(\text{dose}) - 0,9395$; $r = 97,50\%$; $S = 1,11$) pode-se concluir que as três retas são paralelas visto que as inclinações das mesmas são quase idênticas, o que estaria indicando um mecanismo de ação letal similar nas duas espécies (bovinos e ratos).

No entanto, é necessário lembrar que a fisiologia de bovinos e ratos é distinta. Ratos são monogástricos e bovinos são ruminantes. É de conhecimento que a intoxicação pelas folhas de P.m. em bovinos, provoca atonia do rúmen¹⁰⁹. QUIN & CLARK(1947)¹²¹ ao estudarem a ação do monofluoroacetato de potássio presente nas folhas de *Dichapetalum cymosum* mostraram que a presença deste agente não influenciava o processo de fermentação normal do rúmen e, tampouco, tinha sua toxicidade reduzida pela passagem nestes órgãos. Estudos "in vitro" necessitam ser realizados no sentido de investigar a possível capacidade do fluoroacetato, ou quicá de outras substâncias presentes nas folhas de P.m., de provocar alterações na contratilidade da musculatura lisa ruminal e intestinal.

No ensaio biológico quantitativo, mede-se um efeito representado por uma grandeza contínua (não quantal). Na grande maioria dos casos, este efeito é linearmente relacionado com

o logaritmo da dose administrada. As três retas da função dose-latência para a 1ª convulsão obtidas no presente trabalho confirmaram esta relação. Estas retas também apresentaram paralelismo entre si. Cabe aqui explicar que considerou-se o arco tangente do coeficiente angular das equações de reta obtidas como valor das inclinações das mesmas porque aqueles utilizados pelo método de LITCHFIELD & WILCOXON⁸⁵ foram estabelecidos para a função dose-letalidade. Como a diferença dos valores encontrados destas inclinações foi mínima, da ordem de 1 minuto de grau, as retas podem ser consideradas paralelas, dispensando-se cálculos estatísticos. Vale lembrar que a diferença das inclinações das retas relativas à função dose-letalidade foi da ordem de 1 grau e que pelos critérios propostos pelo método de LITCHFIELD & WILCOXON⁸⁵, estas retas foram consideradas paralelas. Além do mais, as potências relativas das retas da função dose-efeito foram da mesma ordem de grandeza que aquelas observadas quando da análise das retas da função dose-letalidade. Isto mostra que o mecanismo que leva à morte é o mesmo que induz convulsões e reforça a presença de fluoroacetato no extrato bruto e no resíduo aquoso da P.m..

Este resultado corrobora os encontrados por ECKSCHMIDT e col.(1989)⁵³; estes autores administraram doses de 500 a 1300 mg/kg de extrato aquoso de folhas de P.m. e doses de 0,66 a 1,20 mg/kg de ácido monofluoroacético em ratas Wistar, pesando entre 180 a 220 g e observaram o aparecimento de convulsões. As curvas dose/resposta obtidas pelos autores e traçadas pelo método de LITCHFIELD & WILCOXON⁸⁵, foram paralelas, sugerindo-se mecanismos convulsivantes qualitativamente similares. Encontraram um valor de DC50 (dose que induz convulsões em 50% dos animais) de 630 mg/kg para o extrato aquoso de P.m. e 0,9 mg/kg para o ácido monofluoroacético, existindo, pois, uma diferença de potência de 700 vezes.

Outros pesquisadores, EGEKESE & OEHME(1979)⁵⁴ administraram doses de 2,2 a 7,0 mg/kg de padrão de fluoroacetato, em grupos de 3 ratos Sprague-Dawley e mediram a latência para o aparecimento da 1ª convulsão. Através dos dados fornecidos pelos autores, foi possível calcular a equação da reta e o coeficiente de correlação correspondentes a esta função, utilizando-se uma regressão linear ($y = -186,0382 \log(\text{dose}) + 205,1199$; $r = 86,9\%$). A inclinação desta reta ($\arctg 186,0382$) é $89^{\circ}41'31''$. Estes dados coincidem com os encontrados neste trabalho ($y = 208,8464 \log(\text{dose}) + 202,9581$; $r = 97,7\%$; inclinação da reta = $89^{\circ}43'32''$). Estes autores usaram como DL₅₀ oral do fluoroacetato em seus experimentos, o valor de 3,5 mg/kg, enquanto os obtidos neste trabalho para ratos Wistar, via oral, foi de 1,1 mg/kg. Tomando-se estes dados em conjunto, conclui-se que embora a latência para a 1ª convulsão tenha sido a mesma em todos os ratos, a sensibilidade dos mesmos à morte foi diferente, sendo que os utilizados neste trabalho foram 3,2 vezes mais sensíveis quando comparados aos utilizados por EGEKESE & OEHME⁵⁴. Vale, no entanto, lembrar que os fatores que poderiam ter influído na diferença desta sensibilidade seriam a linhagem (Sprague-Dawley e Wistar) e/ou o peso dos animais (ratos Sprague-Dawley pesavam entre 425 e 590 g e os ratos Wistar, deste experimento, entre 200 e 250 g).

Resumindo, os resultados obtido neste trabalho através dos testes biológicos, evidenciaram a presença do fluoroacetato tanto no extrato bruto como no resíduo aquoso das folhas de P.m. porque houve um(a):

- paralelismo estatístico entre as 3 retas obtidas para o EB, RA e MFAS relativas Às funções dose-porcentagem de letalidade e dose-latência para a 1ª convulsão;
- semelhança entre as relações de potência das retas obtidas para o EB, RA e MFAS relativas à função dose-porcentagem de letalidade e as relativas à função dose-latência para a 1ª convulsão;
- coincidência estatística entre as retas obtidas para o EB e MFAS relativas à função latência para a morte-porcentagem de letalidade; portanto, mesmo TL_{50} ;
- similaridade entre os sinais tóxicos observados após a administração do EB, RA e MFAS.

Deve-se acrescentar, também, como é surpreendente serem os valores dos coeficientes de correlação encontrados tanto para as retas da função dose-resposta como para as da dose-efeito, tão altos (95%), uma vez que se trata de um ensaio biológico.

No entanto, mesmo levando-se em consideração todos estes fatores, não é possível afirmar categoricamente que o fluoroacetato está presente nas folhas de P.m.. Isto porque, em experimento biológico, utiliza-se um tratamento estatístico dos resultados, que nunca são 100% conclusivos, mesmo com tantas evidências a favor. Além do mais, do ponto de vista farmacológico, poderia existir outro composto, que não o fluoroacetato, que se comportasse de maneira idêntica a ele, mascarando, assim, o resultado. Daí a importância da determinação da estrutura molecular de uma substância no sentido de assegurar sua identidade química.

Nesse sentido, apenas a aproximação dos resultados obtidos nos ensaios biológicos com o conhecimento químico de um composto permite concluir ser de sua responsabilidade o efeito farmacológico observado.

No presente trabalho houve a oportunidade de enviar uma amostra do resíduo aquoso ao Japão, para a identificação do princípio ativo. A análise foi feita por Hiroshi Morita, do "Tokyo College of Pharmacy", empregando a $RMN^{19}F$ e comprovando a presença de monofluoroacetato. Este método, além de conclusivo, é simples e rápido, não exigindo a derivação da molécula e permitindo a quantificação do composto organofluorado. Além disso, é um ensaio não destrutivo, possibilitando a reutilização da amostra. Assim, BARON e col.(1987)¹¹ determinaram a presença de fluoroacetato em extratos de sementes e folhas de várias espécies de plantas (gêneros *Acacia*, *Dichapetalum*, *Gastrolobium* e *Oxylobium*) através da $RMN^{19}F$ e obtiveram 4 ppm como limite de detecção. Este valor é pequeno quando comparado com a sensibilidade de 0,1 ppm encontrada tanto para as técnicas de cromatografia a gás (CG)^{103,143} como para as de cromatografia a líquido de alto desempenho (CLAP)¹²³ ou, ainda, com os 10 ppb que se obtêm empregando-se a CG/Espectrometria de massa²⁵. No entanto,

como este trabalho não teve por finalidade a quantificação do monofluoroacetato nas folhas de P.m., esta não foi realizada, mas sim a sua caracterização.

A amostra também foi identificada por cromatografia em camada delgada (CCD) porque, ao contrário do equipamento de RMN¹⁹F, é usada com grande frequência nos laboratórios, podendo ser de grande utilidade para a rotina analítica. É uma técnica que pode oferecer um bom grau de especificidade quanto ao composto, pois está fundamentada na polaridade e natureza química da substância. Ela não é conclusiva, mas oferece grande segurança quando bem padronizada.

OLIVEIRA(1963)¹⁰⁴ utilizou a cromatografia em papel para identificar, pela primeira vez, o monofluoroacetato nas folhas de P.m.. Porém, não é esclarecedora em relação à técnica que usou. Em 1973, VICKERY e col.¹⁸⁹ após muita pesquisa e estudo crítico, sugeriram um método para a análise de plantas contendo ácidos fluoroacéticos empregando a cromatografia em papel desenvolvida no sistema-solvente etanol-NH₄OH-piridina-água (95:3:1:1) e Azul Nilo como cromogênico. Esta metodologia permite que o monofluoroacetato seja identificado na concentração de 20 µg e separado do difluoroacetato e do trifluoroacetato. Além do mais, possui boa especificidade, pois sais de ácido fórmico ou acético não podem ser detectados.

Recentemente, em 1990, ALLENDER^{1,2} adaptou o método de VICKERY e col.¹⁸⁹ substituindo o uso do papel cromatográfico, por celulose microcristalina como adsorvente; utilizou-se, assim, a cromatografia em camada delgada.

O presente trabalho empregou a CCD, conforme sugerido por ALLENDER^{1,2}. Os valores de hRf que este autor obteve (hRf = 70) foi diferente dos obtidos nesta análise (hRf = 20) muito provavelmente porque ele usou placas Whatman K2, cujo revestimento de celulose é mais espesso (250 µm), permitindo, desta forma, maior desenvolvimento do sistema-solvente.

Portanto, a técnica CCD propiciou o reconhecimento de, no mínimo, 5 µg de monofluoroacetato, podendo ser utilizada como recurso adequado para comparação deste princípio ativo em extratos de plantas.

A caracterização do monofluoroacetato como princípio tóxico da P.m. permite levantar algumas hipóteses na tentativa de explicar a sintomatologia observada nos animais intoxicados. Embora esta explicação não faça parte dos objetivos pretendidos, optou-se por fazê-la, tomando-se como base, os resultados encontrados em recentes pesquisas.

A hipocalcemia resultante da capacidade do citrato (que se encontra acumulado devido à inibição do ciclo de Krebs) em quelar Ca²⁺ poderia explicar as convulsões e o largo espectro das arritmias cardíacas observadas na intoxicação pelo fluoroacetato^{134,77}. Neste contexto, a determinação dos níveis de citrato sérico serviria como um indicador periférico da toxicidade do fluoroacetato porque correlaciona-se com a dose administrada, com a sintomatologia clínica que desencadeia (incluindo-se aqui a morte) e com as alterações bioquímicas detectadas no soro e nos tecidos (acúmulo de citrato cardíaco, depleção de ATP cardíaco e hiperglicemia^{186,16}).

DAVIES & PETERSON(1989)³⁷ também verificaram a importância do cálcio extracelular em induzir convulsões em ratos, utilizando-se do modelo experimental de

abrasamento ("kindling")*. Perfundiram o sítio de estimulação por abrasamento com um fluido cérebro-espinal (FCE) artificial contendo níveis normais de cálcio, através de uma sonda de diálise implantada em ratos. Verificaram que através deste procedimento - que normaliza os baixos níveis extracelulares de cálcio - havia um completo bloqueio das convulsões por abrasamento. Ao contrário, quando perfundiram o mesmo local, porém com FCE artificial sem cálcio, observaram o retorno dos episódios convulsivos dos animais aos níveis detectados no início do experimento. Frente a estes resultados, concluíram que os níveis extracelulares de cálcio estão cronicamente reduzidos no sítio de estimulação de ratos abrasados, sendo esta alteração necessária para a expressão da convulsão.

Além da hipocalcemia, a intoxicação pelo fluoroacetato é agravada pelo fato deste toxicante também ser capaz de induzir uma elevação constante da concentração extracelular de glutamato, devido à inibição de sua captura pelas células da glia¹⁴⁸.

O glutamato é o mais abundante aminoácido encontrado no cérebro, onde está presente em concentrações maiores do que aquelas detectadas em qualquer outro ponto do organismo. Não há neurônios específicos que usem glutamato como neurotransmissor, nem tampouco pode-se mapear vias ou sistemas que o utilizem porque a ocorrência deste aminoácido é generalizada¹⁰⁸. Tem potente ação excitatória, haja visto que injeções intracerebrais de glutamato causam convulsões e dano cerebral que se assemelham àsquelas observadas em pacientes epiléticos⁵⁹.

O aumento da concentração extracelular de glutamato promove uma estimulação constante de receptores para aminoácidos excitatórios. Todos os três principais subtipos de receptores para o glutamato [quisqualato, kainato e N-metil-D-aspartato(NMDA)] podem mediar a excitotoxicidade em populações sensíveis de neurônios; entretanto, aquela mediada pelo receptor NMDA é a melhor caracterizada^{59,32}. O metabolismo da glicose, a produção de ATP e o funcionamento das Na^+, K^+ -ATPases são necessários para gerar um potencial de repouso suficiente para manter o bloqueio voltagem-dependente do canal ligado ao receptor de NMDA. A liberação deste bloqueio capacita o glutamato a agir persistentemente no receptor NMDA, resultando este fato na abertura dos canais iônicos, com aumento constante nos níveis intracelulares de cálcio livre, condição esta, necessária e suficiente para que o glutamato induza neurodegeneração⁸⁹.

Além do mais, quando há privação de energia no organismo, os neurônios e as fibras cardíacas são as principais e primeiras células a serem afetadas. Como na intoxicação pelo fluoroacetato há marcada diminuição de ATP, este fato leva à uma redução da atividade da bomba Na^+/K^+ e subseqüentemente a um colapso de gradientes iônicos. Os altos níveis

---

* A tradução de "kindling" por "efeito de abrasamento" foi proposta pelo prof. Dr. Esper Abrão Cavalheiro, neurologista da Escola Paulista de Medicina e uma autoridade neste tema. O abrasamento refere-se ao fenômeno no qual a aplicação periódica de um estímulo (elétrico ou químico), inicialmente subconvulsivante, resulta numa progressiva intensificação da atividade epilética, culminando com uma crise motora generalizada⁶⁵. Quando o animal apresenta crises generalizadas, ele é considerado abrasado.

intracelulares de íons Na^+ reverterem a função trocadora $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$, promovendo a entrada de íons cálcio. Portanto, um significativo decréscimo da atividade da bomba Na^+/K^+ pode contribuir para uma incontável entrada de íons cálcio^{62,145}. Assim, além deste mecanismo potencializar a neurotoxicidade induzida pelo glutamato, também está relacionado com a ocorrência de fibrilação e parada cardíaca. É de conhecimento que a inibição da Na^+/K^+ -ATPase sarcolemal está diretamente relacionada a uma ação arritmogênica, semelhante àquela responsável pela ação dos glicosídeos cardíacos. Este mecanismo poderia explicar a diferença de sensibilidade das diversas espécies de animais é intoxicação pelo fluoroacetato. Pode ser que uma diferença nos mecanismos que promovam a homeostase interna do cálcio no neurônio e na fibra cardíaca determinem a maior ou menor susceptibilidade do órgão afetado ao fluoroacetato.

Do exposto e por raciocínio lógico, parece possível inferir que o acúmulo de glutamato e a privação de energia causadas pelas folhas de *Palicourea marcgravii*, assim como pelo monofluoroacetato, produzam, além de convulsões e problemas cardíacos, dano neuronal tardio. O elo comum destas alterações é o aumento dos níveis intracelulares de Ca^{2+} que reconhecidamente está associado ao processo de neurodegeneração^{32,59}. De fato, vários quadros neuropatológicos, agudos e crônicos, tais como epilepsia, acidente vascular cerebral, mal de Alzheimer e de Huntington, estão envolvidos com o aumento da concentração extracelular de glutamato e, como decorrência, com um aumento persistente dos níveis intracelulares de Ca^{2+} . Este acúmulo intracelular de Ca^{2+} pode afetar as atividades de várias enzimas, incluindo-se aqui a ativação das enzimas lipolíticas (lipases e fosfolipases) e proteolíticas (Calpaina I e outras proteases cálcio dependentes). Tanto as lipases e fosfolipases estimuladas (que degeneram a membrana fosfolipídica neuronal, com formação de ácidos graxos, radicais livres e lipoperóxidos) como as proteases (que causam a destruição do citoesqueleto) podem ser responsáveis pelo dano neuronal irreversível e morte celular⁵⁹.

Talvez pela abrangência dos mecanismos envolvidos na intoxicação pelo fluoroacetato, tenham sido tão frustrantes, até o momento, as tentativas de tratamento de animais intoxicados. A prevenção assume, assim, posição de destaque; esta seria realizada através da profilaxia da planta no pasto. O tratamento curativo deveria restringir-se à pesquisas de caráter experimental ou à tentativa heróica de salvar um animal de grande valor.

Frente a estas considerações, fica evidente a importância do desenvolvimento de futuras pesquisas sobre este tema, envolvendo a toxicidade da *Palicourea marcgravii* e do monofluoroacetato, assim como de outras plantas em que este princípio ativo possa estar presente.

7.CONCLUSÕES

Os resultados do presente trabalho permitiram concluir que:

- A fração aquosa do extrato etanólico das folhas de *Palicourea marcgravii* foi a única que produziu convulsões seguida de morte em ratos, após administração oral.
- A curva dose-porcentagem de letalidade traçada para a fração aquosa de P.m. é estatisticamente paralela àquela encontrada para o padrão de monofluoroacetato de sódio.
- A curva dose-latência para a 1ª convulsão traçada para a fração aquosa de P.m. é estatisticamente paralela àquela encontrada para o padrão de monofluoroacetato de sódio.
- Os sinais tóxicos observados em ratos, após a administração oral da fração aquosa de P.m. são similares àqueles desencadeados pelo do padrão de monofluoroacetato de sódio.
- O monofluoroacetato foi caracterizado quimicamente na fração aquosa de P.m. por RMN¹⁹F.
- A técnica de CCD foi adequada para a comprovação da presença de monofluoroacetato na fração aquosa de P.m..
- O monofluoroacetato presente nas folhas de *Palicourea marcgravii* é o princípio ativo responsável pela indução das convulsões e morte dos animais intoxicados.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS(*)

1. ALLENDER, W.J. - Determination of sodium fluoroacetate (Compound 1080) in biological tissues. **J. Anal. Toxicol.**, Niles, **14**: 45-9, 1990.
2. ALLENDER, W.J. - The determination of sodium monofluoroacetate (Compound 1080) in formulation and technical samples by high pressure liquid chromatography. **J. Liq. Chromatogr.**, New York, **13**(17): 3465-71, 1990.
3. AMERICAN SOCIETY FOR TESTING AND MATERIALS (ASTM) - **Standard guide for the use and development of sodium monofluoroacetate (Compound 1080) as a predacide**. Philadelphia, 1989. [Designation E 590-76 (Reapproved 1989)], p.251-61.
4. ANDRADE, S.O. - Estudos sobre a toxicidade da *Sessea brasiliensis* Toledo. **Arq. Inst. Biol.**, São Paulo, **27**: 191-6, 1960.
5. ANDRADE, S.O.; CAMARGO, W.V.A.; FERNANDES, N. - II - Investigações sobre plantas tóxicas no Estado de São Paulo, **Arq. Inst. Biol.**, São Paulo, **30**: 189-203, 1963.
6. ANDRADE, S.O. & HOLZHACKER, E.L. - Investigações sobre plantas tóxicas no Estado de São Paulo. **Arq. Inst. Biol.**, São Paulo, **26**: 55-87, 1959.
7. ANDRADE, S.O. & MATTOS, J.R. - **Contribuição ao estudo de plantas tóxicas no Estado de São Paulo**. São Paulo, Instituto Biológico, 1968. 101 p. [Publicação nº 122].
8. ANDRADE, S.O.; PEREGRINO, C.J.B.; AGUIAR, A.A. - Estudo sobre *Brachiaria* sp (Tanner grass) I. Efeito nocivo para bovinos. **Arq. Inst. Biol.**, São Paulo, **38**: 135-50, 1971.
9. ANDRADE, S.O.; RETZ, L.; MARMO, O. - Estudo sobre *Brachiaria* sp (Tanner grass) III. Ocorrência de intoxicação de bovinos durante um ano (1970-1) e níveis de nitrato em amostras de gramínea. **Arq. Inst. Biol.**, São Paulo, **38**: 238-52, 1971.
10. ANUÁRIO ESTATÍSTICO DO BRASIL, Rio de Janeiro, 1917, 1959-1991.

(*) De acordo com a norma NB 66/78 preconizada pela Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT). As abreviaturas dos títulos de periódicos seguem o CHEMICAL ABSTRACT SERVICE SOURCE INDEX (CASSI) 1990.

11. BARON, M.L.; BOTHROYD, C.M.; ROGERS, G.I.; STAFFA, A.; RAE, I.D. - Detection and measurement of fluoroacetate in plant extracts by ^{19}F NMR. **Phytochemistry**, Oxford, **26**: 2293-5, 1987.
12. BARROS, C.S.L.; METZDORF, L.L.; PEIXOTO, P.V. - Ocorrência de surtos de intoxicação por *Senecio* spp (Compositae) em bovinos no Rio Grande do Sul. **Pesqui.Vet.Bras.**, Rio de Janeiro, **7**(4): 101-7, 1987.
13. BARROS, C.S.L.; PILATI, C.; ANDUJAR, M.B.; GRAÇA, D.L.; IRIGOYEN, L.F.; LOPES, S.T.; SANTOS, C.F. - Intoxicação por *Cassia occidentalis* (Leg. Caes.) em bovinos. **Pesqui.Vet.Bras.**, Rio de Janeiro, **10**(3/4): 47-58, 1990.
14. BARROS, S.S.; RIET-CORREA, F.; ANDUJAR, M.B.; BARROS, C.S.L.; MENDEZ, M.C.; SCHILD, A.L. - *Solanum fastigiatum* var. *fastigiatum* and *Solanum* sp poisoning in cattle: ultrastructural changes in the cerebellum. **Pesqui.Vet.Bras.**, Rio de Janeiro, **7**(1): 1-5, 1987.
15. BICUDO, P.L. - Principais plantas tóxicas de interesse veterinário. In: CURSO de Toxicologia animal. Viçosa, MEC/ABEAS, 1987. p.1-17.
16. BOSAKOWSKI, T. & LEVIN, A.A. - Serum citrate as a peripheral indicator of fluoroacetate and fluorocitrate toxicity in rats and dogs. **Toxicol.Appl.Pharmacol.**, New York, **85**: 428-36, 1986.
17. BRADY, R.O. - Fluoroacetyl coenzyme A. **J.Biol.Chem.**, Baltimore, **217**: 213-24, 1955.
18. BUFFA, P.; GUARRIERO-BOBYLEVA, V.; COSTA-TIOZZO, R. - Metabolic effects of fluoroacetate poisoning in animals. **Fluoride**, Detroit, **6**: 224-47, 1973.
19. CAMARGO, W.A. - Fotossensibilização em bovinos por "barbatimão" (*Stryphnodendron obovatum* Benth.) fam. Leguminosae. **Biológico**, São Paulo, **13**: 7-11, 1965.
20. CAMARGO, W.A. - Uma nova "erva de-rato" tóxica para bovinos *Palicourea barbiflora* (?), Rubiaceae; comparação com a *Palicourea marcgravii* var. *pubescens* e com a *Psychotria officinalis*, Rubiaceae. **Arq.Inst.Biol.**, São Paulo, **29**: 1-11, 1962.

21. CAMARGO, W.V.A.; MENGATO, W.; PLATZSCH, F.; MORITA, T. - Intoxicação de bovinos pela *Polygala klotzchii* Chodat, na região do pontal (Estado de São Paulo). **Biológico**, São Paulo, **34**: 221-3, 1968.
22. CANELLA, C.F.C.; DÖBEREINER, J.; TOKARNIA, C.H. - Intoxicação experimental pela "manicoba" (*Manihot glaziovii* Muell. Arg.) em bovinos. **Pesqui. Agropec. Bras.**, Ser. Vet., Rio de Janeiro, **3**: 3347-50, 1968.
23. CANELLA, C.F.C.; TOKARNIA, C.H.; DÖBEREINER, J. - Intoxicação por *Sessea brasiliensis* Toledo em bovinos. **Pesqui. Agropec. Bras.**, Brasília, **3**: 333-40, 1968.
24. CASCON, S.C. & MORES, W.B. - Substâncias isoladas da *Palicourea marcgravii* St.Hil. Uma nova síntese de N-metil-tiramina. **An.Assoc.Bras.Quim.**, Rio de Janeiro, **21**: 53-60, 1962.
25. CASPER, H.H.; McMAHON, T.L.; PAULSON, G.D. - Capillary gas chromatographic-mass spectrometric determination of fluoroacetate residues in animal tissues. **J.Assoc.Off.Anal. Chem.**, Washington, **68**(4): 722-5, 1985.
26. CASPER, H.H.; MOUNT, M.E.; MARSH, R.E.; SCHMIDT, R.H. - Fluoroacetate residues in ground squirrel and coyote tissues due to primary or secondary 1080 poisoning. **J.Assoc.Off.Anal.Chem.**, Washington, **69**(3): 441-2, 1986.
27. CHAULET, J.H.F.; PEIXOTO, P.V.; TOKARNIA, C.H. - Intoxicação experimental por *Sessea brasiliensis* (Solanaceae) em bovinos, ovinos, caprinos. **Pesqui. Vet. Bras.**, Rio de Janeiro, **10**(3/4): 71-84, 1990.
28. CHENOWETH, M.B. - Monofluoroacetic acid and related compounds. **Pharmacol.Rev.**, Baltimore, **1**:383-424, 1949.
29. CHENOWETH, M.B. & GILMAN, A. - Pharmacology of fluoroacetate. **Fed.Proc.**, Washington, **5**: 171, 1946.
30. CHENOWETH, M.B. & GILMAN, A. - Studies on the pharmacology of fluoroacetate. I. Species response to fluoroacetate. **J.Pharmacol.Exp.Ther.**, Baltimore, **87**: 90-103, 1946.

31. CHENOWETH, M.B.; KANDEL, A.; JOHNSON, L.B.; BENNETT, D.R.- Factors influencing fluoroacetate poisoning. Practical treatment with glycerol monoacetate. **J.Pharmacol.Exp.Ther.**, Baltimore, **102**: 31-49, 1951.
32. CHOI, D.W. - Excitotoxicity. In: MELDRUM, B.S., ed. - **Excitatory aminoacid antagonists**. Oxford, Blackwell Scientific, 1991. p.216-36.
33. COLLINS, D.M.; FAWCETT, J.P.; RAMMELL, C.G. - Determination of sodium fluoroacetate (Compound 1080) in poison baits by HPLC. **Bull.Environ.Contam.Toxicol.**, New York, **26**: 669-73, 1981.
34. COSTA, M.V.; NASCIMENTO, E.F.; PESSOA, J.M.; COSTA, W.R.- Lesões em bovinos intoxicados pela *Palicourea marcgravii* St.Hill. **Arq.Bras.Med.Vet.Zoot.**, Belo Horizonte, **36**(5): 571-80, 1984.
35. COUCEIRO, J.E.M.; SILVA, A.C.C.; SILVA, J.A. - Observações e ensaios sobre a alegada intoxicação de bovinos por plantas, no Estado de Pernambuco. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA, 15. Rio de Janeiro, 1976. **Anais**. Rio de Janeiro, Sociedade Brasileira de Medicina Veterinária, 1978. p.45-6.
36. DAVID, W.A.L. - Sodium fluoroacetate as a systemic and contact insecticide. **Nature**, London, **165**(4195): 493-4, 1950.
37. DAVIES, G. & PETERSON, D.W. - Normal extracellular calcium levels block kindled seizures. **Exp.Neurol.**, New York, **106**:99-101, 1989.
38. DEUTSCH,J.; DÖBEREINER, J.; TOKARNIA, C.H. - Fotossensibilidade hepatogênica em bovinos na intoxicação pela fava de *Enterolobium gummiferum* (Mart.) Marcbr. In: CONGRESSO INTERNACIONAL DE PASTAGENS, 9. **Anais**. São Paulo, Secretaria de Agricultura. Departamento da Produção Animal, 1965, v.2, p.1279-82.
39. DIRIGENTE RURAL, São Paulo, **26**(12):10-9, 1987.
40. DÖBEREINER, J. & CANELLA, C.F.C. - Intoxicação de bovinos pela fava do "barbatimão" (*Stryphnodendron coriaceum* Benth). **Bol.Soc.Bras.Med.Vet.**, Rio de Janeiro, **24**:49-68, 1956.

41. DÖBEREINER, J. & TOKARNIA, C.H. - Intoxicação de bovinos pela "erva de rato" (*Palicourea marcgravii* St.Hil.) no vale do Itapicuru, Maranhão. **Arq.Biol.Anim.**, Rio de Janeiro, 2: 83-91, 1959.
42. DÖBEREINER, J.& TOKARNIA,C.H. Intoxicação experimental por *Aspidosperma pyricollum* (Apocinaceae) em bovinos. **Pesqui.Vet.Bras.**, Rio de Janeiro, 2(1):31-6, 1982.
43. DÖBEREINER, J.& TOKARNIA, C.H. - Intoxicação experimental por *Humirianthera ampla* e *H. rupestris* (Icacinaceae) em bovinos. **Pesqui.Vet.Bras.**, Rio de Janeiro, 2(2):61-7, 1982.
44. DÖBEREINER, J. & TOKARNIA,C.H. - Intoxicação experimental por *Vernonia nudiflora* (Compositae) em bovinos e ovinos. **Pesqui.Vet.Bras.**, Rio de Janeiro, 4(1):5-10, 1984.
45. DÖBEREINER, J.; TOKARNIA, C.H.; CANELLA, C.F.C. - Experimental poisoning of cattle by the pericarp of the fruit of *Ricinus communis*. **Pesqui.Vet.Bras.**, Rio de Janeiro, 1(3):95-7, 1981.
46. DÖBEREINER, J.; TOKARNIA, C.H.; CANELLA, C.F.C.- Intoxicação experimental pela "salsa" (*Ipomoea asarifolia* R. et Schult.) em ruminantes. **Arq.Inst.Biol.Anim.**, Rio de Janeiro, 3:39-57, 1960.
47. DÖBEREINER, J. & TOKARNIA, C.H. - Intoxicação por *Cestrum laevigatum* Schlecht, causa de mortandades em bovinos no Estado do Rio de Janeiro. **Pesqui.Agropec.Bras.**, Brasília, 4:165-93, 1969.
48. DÖBEREINER, J.; TOKARNIA, C.H.; COSTA, J.B.D.; CAMPOS, J.L.E.; DAYREEL, M.S. - "Espichamento", intoxicação de bovinos por *Solanum malacoxylon*, no pantanal de Mato Grosso. **Pesqui.Agropec.Bras.**, Ser. Vet., Rio de Janeiro, 6:91-117, 1971.
49. DÖBEREINER, J.; TOKARNIA, C.H.; GAVA, A.; CONSORTE, L.B. - Intoxicação experimental em bovinos pela fava de *Dimorphandra gardneriana* (Leg.Caesalpinoideae). **Pesqui.Vet. Bras.**, Rio de Janeiro, 5(2):47-51, 1985.

50. DÖBEREINER, J.; TOKARNIA, C.H.; MONTEIRO, M.C.C.; CRUZ, L.C.H.; CARVALHO, E.G.; PRIMO, A. T. - Intoxicação de bovinos e ovinos em pastos de *Brachiara decumbens* contaminados por *Pithomyces chartarum*. **Pesqui.Agropec.Bras.**, Ser.Vet., Rio de Janeiro, 11:87-94, 1967.
51. DÖBEREINER, J.; TOKARNIA, C.H.; PURISCO, E. - *Vernonia mollissima*, planta tóxica responsável por mortandades de bovinos no sul no Mato Grosso. **Pesqui.Agropec.Bras.**, Ser.Vet., Rio de Janeiro, 11: 49-58, 1976.
52. DÖBEREINER, J.; TOKARNIA, C.H.; SILVA, M.F. - Intoxicação por *Arrabidaea bilabiata* (Bignoniaceae) em bovinos na região amazônica do Brasil. **Pesqui.Vet.Bras.**, Rio de Janeiro, 3(1):17-24, 1983.
53. ECKCHMIDT, M.; BRIZOLLA, M.; TARRAGÔ, D.P.; PALERMO NETO, J. - Is monofluoroacetic acid the active neurotoxic principle in *Palicourea marcgravii* (St.Hill.), leaves? **Braz.J.Med.Biol. Res.**, Ribeirão Preto, 22:975-7, 1989.
54. EGEKEZE, J.O. & OEHME, F. W. - Inorganic and organic fluoride concentrations in tissues after the oral administration of sodium monofluoroacetate (Compound 1080) to rats. **Toxicology**, Ireland, 15:43-53, 1979.
55. EGEKEZE, J.O. & OEHME, F.W. - Sodium monofluoroacetate (SMFA, Compound 1080): a literature review. **Vet.Hum.Toxicol.**, Manhattan, 21(6):411-6, 1979.
56. EGYED, M.N. & SCHULTZ, R.A. - The efficacy of acetamide for the treatment of experimental *Dichapetalum cymosum* (Gifblaar) poisoning in sheep. **Onderstepoort J.Vet.Res.**, Pretoria, 53:231-4, 1986.
57. EXAME, São Paulo, (306):36-42, 1984.
58. FANSHIER, D.W.; GOTTWALD, L.K.; KUN, E. - Studies on specific enzyme inhibitors. VI. Characterization and mechanism of action of the enzyme-inhibitory isomer of monofluorocitrate. **J.Biol.Chem.**, Baltimore, 239:425-34, 1964.
59. FAROOQUI, A.A. & HORROCKS, L.A. - Excitatory amino acid receptors, neural membrane phospholipid metabolism and neurological disorders. **Brain Res.Rev.**, Amsterdam, 16:171-91, 1991.

60. FOSS, G.L. - The toxicology and pharmacology of methyl fluoroacetate (MFA) in animals, with some notes on experimental therapy. **Br.J.Pharmacol.**, London, 3:118-27, 1948.
61. FROST, R.L.; PARKER, R.W.; HANNA, J.V. - Detection of the pesticide compound 1080 (sodium monofluoroacetate) using fluorine-19 nuclear magnetic resonance spectroscopy. **Analyst**, London, 114:1245-8, 1989.
62. FUKUDA, A. & PRINCE, D.A. - Excessive intracellular Ca^{2+} inhibits glutamate-induced $\text{Na}^{+}\text{-K}^{+}$ pump activation in rat hippocampal neurons. **J.Neurophysiol.**, Bethesda, 68(1):28-35, 1992.
63. GAL, E.M.; DREWES, P.A.; TAYLOR, N.F. - Metabolism of fluoroacetic acid-2- C^{14} in the intact rat. **Arch.Biochem. Biophys.**, New York, 93:1-14, 1961.
64. GAVA, A.; PEIXOTO, P.V.; TOKARNIA, C.H. - Intoxicação experimental por *Vernonia mollissima* (Compositae) em ovinos e bovinos. **Pesqui.Vet.Bras.**, Rio de Janeiro, 7(2):33-41, 1987.
65. GODDARD, G.V.; McINTYRE, D.C.; LEECH, C.K. - A permanent change in the brain function resulting from daily electrical stimulation. **Exp.Neurol.**, New York, 25:295-330, 1969.
66. GÓRNIK, S.L. - Intoxicação por *Palicourea marcgravii*: uma abordagem experimental. São Paulo, 1988. 99p. [Tese de Doutorado - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo].
67. GÓRNIK, S.L. - *Palicourea marcgravii*: estudos em animais de laboratório São Paulo, 1986. 160p. [Dissertação de Mestrado, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo].
68. GÓRNIK, S.L.; PALERMO NETO, J.; OLIVEIRA, G.H.; SPINOSA, H.S. - *Palicourea marcgravii* intoxication in rats: effects of different fractions. **Vet.Hum.Toxicol.**, Manhattan, 34(3):216-8, 1992.
69. GÓRNIK, S.L.; PALERMO NETO, J.; SPINOSA, H.S. - Effects of *Palicourea marcgravii* on laboratory rodents. **J.Ethnopharmacol.**, Lausanne, 25:221-6, 1989.

70. GÓRNIAK, S.L.; SPINOSA, H.S.; PALERMO NETO, J.; FERRO, V.O.; OLIVEIRA, F. - Chromatographic isolation of caffeine from *Palicourea marcgravii*. **Vet.Hum.Toxicol.**, Manhattan, **28**(6):542, 1986.
71. HALL, R.J. - The distribution of organic fluorine in some toxic tropical plants. **New Phytol.**, London, **71**:855-71, 1972.
72. HALL, R.J. & CAIN, R.B. - Organic fluorine in tropical soils. **New.Phytol.**, London, **71**:839-53, 1972.
73. HARBONE, J.B. - **Phytochemical methods**: a guide to modern techniques of plant analysis. London, Chapman & Hall, 1973.278 p.
74. HASSEL, B.; PAULSEN, R.E.; JOHNSEN, A.; FONNUM, F. - Selective inhibition of glial cell metabolism *in vivo* by fluorocitrate. **Brain Res.**, Amsterdam, **576**: 120-4, 1992.
75. HAYES, F.D.; SHORT, R.; GIBSON, J.E. - Differential toxicity of monochloroacetate, monofluoroacetate and monoiodoacetate in rats. **Toxicol.Appl.Pharmacol.**, New York, **26**:93-102, 1973.
76. HOOGENBOOM, J.J.L. & RAMMELL, C.G. - Determination of sodium monofluoroacetate (Compound 1080) in tissues and baits as its benzyl ester by reaction-capillary gas chromatography. **J.Anal.Toxicol.**, Niles, **11**:140-3, 1987.
77. HORNFELDT, C.S. & LARSON, A.A. - Seizures induced fluoroacetic acid and fluorocitric acid may involve chelation of divalent cations in the spinal cord. **Eur.J.Pharmacol.**, Amsterdam, **179**:307-13, 1990.
78. HUTCHENS, J.O.; WAGNER, H.; PODOLSKY, B.; McMAHON, T.M. - The effect of ethanol and various metabolites on fluoroacetate poisoning. **J.Pharmacol.Exp.Ther.**, Baltimore, **95**:62-70, 1949.
79. JENSEN, R.; TOBISKA, J.W.; WARD, J.C. - Sodium fluoroacetate (Compound 1080) poisoning in sheep. **Am.J.Vet.Res.**, Chicago, **9**:370-2, 1948.
80. JUDAH, J.D. & REES, K.R. - A note on the action of fluoroacetate. **Biochem.J.**, London, **57**:374-6, 1954.

81. KALMBACH, E.R. - "Ten-eighty", a war-produced rodenticide. **Science**, Washington, **102**:232-3, 1945.
82. KOSTYNIK, P.J. - Defluorination: a possible mechanism of detoxification in rats exposed to fluoroacetate. **Toxicol.Lett.**, **3**: 225-8, 1979. Apud: **Chem.Abstr.**, Columbus, **90**: 198851c, 1979.
83. KOSTYNIK, P.J.; BOSMANN, H.B.; SMITH, F.A. - Defluorination of fluoroacetate *in vitro* by rat liver subcellular fractions. **Toxicol.Appl.Pharmacol.** New York, **44**:89-97, 1978.
84. KRAMER, H.L. - Liquid chromatographic determination of sodium fluoroacetate (Compound 1080) in meat baits and formulations. **J.Assoc.Off.Anal.Chem.**, Washington, **67**(6): 1058-61, 1984.
85. LITCHFIELD Jr., J.T. & WILCOXON - A simplified method of evaluating dose-effect experiments. **J.Pharmacol. Exp.Ther.**, Baltimore, **96**:99-113, 1949.
86. MARAIS, J.S.C. - Monofluoroacetic acid, the toxic principle of "Gifblaar" *Dichapetalum cymosum* (Hook) Engl. **Onderstepoort. J.Vet.Sci.An.Ind.**, Pretoria, **20**(1):67-73, 1944.
87. MARCUS, A. & ELLIOT, W.B. - Enzymic reactions of fluoroacetate and fluoroacetyl coenzyme A. **J.Biol.Chem.**, Baltimore, **218**: 823-30, 1956.
88. MATTOS, F.J.A. - **Introdução à fitoquímica experimental.**, Fortaleza, 1980. 128p. [apostila]
89. MATTSON, M.P.; GUTHRIE, P.B.; KATER, S.B. - A role for Na⁺- dependent Ca²⁺ extrusion in protection against neuronal excitotoxicity. **FASEB J.**, Bethesda, **3**:2519-26, 1989.
90. McEWAN, T. - Isolation and identification of the toxic principle of *Gastrolobium grandiflorum*. **Nature**, London, **201**:827, 1964.
91. MEAD, R.J.; OLIVER, A.J.; KING, D.R. - Metabolism and defluorination of fluoroacetate in the brush-tailed possum (*Trichosurus vulpecula*). **Aust.J.Biol.Sci.**, Melbourne, **32**: 15-26, 1979.

92. MÉNDEZ, M.C.; RIET-CORREA, F.; SCHILD, A.L. - Intoxicação por *Senecio* spp. (Compositae) em bovinos no Rio Grande do Sul. **Pesqui.Vet.Bras.**, Rio de Janeiro, 7(2) 51-6, 1987.
93. MENDEZ, M.C.; RIET-CORREA, F.; SCHILD, A.L.; FERREIRA, J.L.; PIMENTEL, M.A. - Fotossensibilização em bovinos causada por *Ammi majus* (Umbelliferae) no Rio Grande do Sul. **Pesqui.Vet.Bras.**, Rio de Janeiro, 11(1/2) 17-9, 1991.
94. MÉNDEZ, M.C.; RIET-CORREA, F.; SCHILD, A.L.; GARCIA, J.T.C. - Intoxicação por *Echium plantagineum* (Boraginaceae) em bovinos no Rio Grande do Sul. **Pesqui.Vet.Bras.**, Rio de Janeiro, 5(2): 57-63, 1985.
95. MÉNDEZ, M.C.; RIET-CORREA, F.; SCHILD, A.L.; MARTZ, W. - Intoxicação experimental por cinco espécies de *Senecio* em bovinos e aves. **Pesqui.Vet.Bras.**, Rio de Janeiro, 10(3/4): 63-9, 1990.
96. MILLER, S.F.; QUINN, L.R.; MOTT, G.O. - Análise econômica de experimentos com forragens e gado realizados no Estado de São Paulo. **Pesqui.Agropec.Bras.**, Brasília, 5: 101-16, 1970.
97. MIROSEVIC-SORGO, P. & SAUNDERS, B.C. - Toxic fluorine compounds containing the C-F link-X. Rupture of the C-F link by alkali and other reagents. **Tetrahedron**, Oxford, 5: 38-43, 1959.
98. MORITA, H.; ICHIHARA, Y.; TAKEYA, K.; WATANABE, K.; ITOKAWA, H.; MOTIDOME, M. - A new indole alkaloid glycoside from the leaves of *Palicourea marcgravii*. **Planta Med.**, Stuttgart, 55: 288-9, 1989.
99. MORRISON, J.F. & PETERS, R.A. - Biochemistry of fluoroacetate poisoning: the effect of fluorocitrate on purified aconitase. **Biochem.J.**, London, 58: 473-9, 1954.
100. NOBRE, D.; CAPPELARO, C.E.M.P.D.M.; SOUZA, A.C. - *Riedeliella graciliflora*: estudo toxicológico em cobaias e ruminantes. **Arq.Inst.Biol.**, São Paulo, 56(1/2): 39-42, 1989.
101. OELRICHS, P.B. & McEWAN, T. - Isolation of the toxic principle in *Acacia georginae*. **Nature**, London. 190: 808-9, 1961.

- 102.OKUNO, I. & MEEKER, D.L. - Gas-liquid chromatographic determination of sodium fluoroacetate (Compound 1080). **J.Assoc.Off.Anal.Chem.**, Washington, **63**(1): 49-55, 1980.
- 103.OKUNO, I.; MEEKER, D.L.; FELTON, R.R. - Modified gas-liquid chromatographic method for determination of compound 1080 (sodium fluoroacetate). **J.Assoc.Off.Anal.Chem.**, Washington, **65**(2): 1102-5, 1982.
- 104.OLIVEIRA, M.M. - Chromatographic isolation of monofluoroacetic acid from *Palicourea marcgravii*, St. Hill. **Experientia**, Basel, **19**: 586, 1963.
- 105.OMARA, F. & SISODIA, C. - Evaluation of potencial antidotes for sodium fluoroacetate in mice. **Vet.Hum.Toxicol.**, Manhattan, **32**(5): 427-31, 1990.
- 106.ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAUDE (OMS). **Principios y métodos para evaluar la toxicidad de las sustancias químicas**. 1980. part1, 287p. [Critérios de Salud Ambiental nº 6, Publicación Científica nº 402].
- 107.OSWEILER, G.D.; CARSON, T.L.; BUCK, W.B.; VAN GELDER, G.A. - **Clinical and diagnostic veterinary toxicology**. 3^{ed}. Dubuque, Kendall/Hunt Publishing Co., 1985, p.340-4.
- 108.OTTERSEN,O.P. - Excitatory amino acid neurotransmitters: anatomical systems. In: MELDRUM, B.S. ed. - **Excitatory amino acid antagonists**. Oxford, Blackwell Scientific., 1991. p. 14-38.
- 109.PACHECO, G. & CARNEIRO, V. - Estudos experimentais sobre plantas tóxicas. I - Intoxicação dos animais pela "herva de rato da mata". **Rev.Soc.Paul.Med.Vet.**, São Paulo, **2**(2-3): 23-46, 1932.
- 110.PATEL, S.S. & WALT, D.R. - Substrate specificity of acetyl coenzyme A synthetase. **J.Biol.Chem.**, Baltimore, **262**: 7132-4, 1987.
- 111.PATTISON, F.L.M. - **Toxic aliphatic fluorine compounds**. Amsterdam. Elsevier, 1959. 227p.
- 112.PEIXOTO, P.V.; TOKARNIA, C.H.; DÖBEREINER, J.; PEIXOTO, C.S. - Intoxicação experimental por *Palicourea marcgravii* (Rubiaceae) em coelhos. **Pesqui.Vet.Bras.**, Rio de Janeiro, **7**(4): 117-29, 1987.

113. PERRONE, E.A.; HARAGUCHI, M.; NOBRE, D.; XAVIER, J.G.; GUERRA, J.L.; GÓRNIK, S.L. - Toxicidade de *Riedeliella graciliflora*, provável causadora da mortalidade de bovinos. **Rev.Soc.Bras.Toxicol.**, São Paulo, 4(supl 2): 101, 1991 [Congresso Brasileiro de Toxicologia, 7. Niteroi, 1991].
114. PERRY, V.A. - Thin layer chromatography determination of sodium monofluoroacetate. **J.Assoc.Off.Anal.Chem.**, Washington, 53(4): 737-41, 1970.
115. PETERS, R.A. - Lethal synthesis. **Proc.R.Soc. London B.**, 139: 143-70, 1952.
116. PETERS, R.A. - Mechanims of the toxicity of the active constituent of *Dichapetalum cymosum* and related compounds. **Adv.Enzymol.Related.Subjects of Biochemi.**, New York, 18: 113-59, 1957.
117. PETERS, R.A.; WAKELIN. R.W.; RIVETT, D.E.A.; THOMAS, L.C. - Fluoroacetate poisoning: comparison of synthetic fluorocitric acid with the enzymically synthesized fluorotricarboxylic acid. **Nature**, London, 171: 1111-2, 1953.
118. PETERS, R.A. & WILSON, T.H. - A further study of inhibition of aconitase by "inhibitor fraction" isolated from tissues poisoned with fluoroacetate. **Biochim.Biophys.Acta**, Amsterdam, 9: 310-5, 1952.
119. PETERSON, J.E. - A gas chromatographic method for sodium fluoroacetate (Compound 1080) in biological materials. **Bull.Environ.Contam.Toxicol.**, New York, 13: 751-7, 1975.
120. QUEIROZ, E.A. - **Produtividade dos fatores, custos de produção e oferta de bovinos de corte em três microrregiões selecionadas do Estado de Mato Grosso**. Viçosa, 1975, 105p. [Tese de Mestrado - Curso de Economia Rural/Universidade Federal de Viçosa].
121. QUIN, J.I. & CLARK, R. - Studies on the action of potassium monofluoroacetate (CH_2FCOOK) [*Dichapetalum cymosum* (Hook) Engl.] toxin on animals. **Ondestepoort J.Vet.Sci.Animal. Ind.**, Pretoria, 22: 77-82, 1947.
122. RAMMELL, C.G.; HOOGENBOOM, J.J.L.; JULIAN, A.F.; LIVINGSTONE, P.G. - Treatment of 1080 poisoning in dogs with glycerol monoacetate. **N.Z.Vet.J.**, Wellington, 33: 149-50, 1985.

123. RAY, A.C.; POST, L.O.; REAGOR, J.C. - High pressure liquid chromatographic determination of sodium fluoroacetate (Compound 1080) in canine gastric content. **J.Assoc.Off. Anal.Chem.**, Washington, **64** (1): 19-24, 1981.
124. REGO, J.L. da S. - **Fatores que interferem na taxa de desfrute bovino em uma microrregião do Estado da Bahia**. Viçosa, 1975. 87p. [Tese de Mestrado - Curso de Extensão Rural/Universidade Federal de Viçosa].
125. REVISTA CACEX - Rio de Janeiro, **23**(1087): 4-9, 1988.
126. RIET-CORREA, F.; MÉNDEZ, M.C.; SCHILD, A.L.; PETIZ, C.A.; SCARSI, R.M. - Aspectos epidemiológicos da intoxicação por *Nierembergia veitchii* em ovinos e bovinos. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA, 17. Fortaleza, 1980. **Resumos do trabalhos.**, Rio de Janeiro, Sociedade Brasileira de Medicina Veterinária, 1980. p.104.
127. RIET-CORREA, F.; MÉNDEZ, M.C.; SCHILD, A.L.; RIET-CORREA, I.; SILVA NETO, S.R. - Intoxicação por *Lantana glutinosa* (Verbenaceae) em bovinos no Estado de Santa Catarina. **Pesqui.Vet.Bras.**, Rio de Janeiro, **4**(4): 147-53, 1984.
128. RIET-CORREA, F.; SCHILD, A.L.; MÉNDEZ, M.C.; PINHEIRO, M.H. - Intoxicação por *Cestrum parqui* (Solanaceae) em bovinos no Rio Grande do Sul. **Pesqui.Vet.Bras.**, Rio de Janeiro, **6**(4): 111-5, 1986.
129. RIET-CORREA, F.; SCHILD, A.L.; MÉNDEZ, M.C.; TAVARES, A.S.; RODRIGUES, J.O. - Intoxicação por *Claviceps paspali* em bovinos no Rio Grande do Sul. **Pesqui.Vet.Bras.**, Rio de Janeiro, **3**(2): 59-65, 1983.
130. ROBISON, W.H. - Acute toxicity of sodium monofluoroacetate to cattle. **J.Wildl. Manage**, Washington, **34**(3): 647-8, 1970.
131. ROCHA e SILVA, M. - Fotossensibilização em bovinos. A "peste das queimadas", doença causada pelo *Holocalyx glaziovii* Taub. **Arq.Inst.Biol.**, São Paulo, **11**: 461-88, 1940.
132. ROCHA e SILVA, M. - **Fundamentos da farmacologia e suas aplicações à terapêutica**. 3ed. São Paulo, EDART, 1973. v.1, p. 59-84.

- 133.ROCHA e SILVA, M. - O problema das plantas tóxicas no Estado de São Paulo. II. A análise dos sintomas. **Biológico**, São Paulo, **6**: 254-8, 1940.
- 134.ROY(SHAPIRA), A.; TAITELMAN, U.; BURSZEIN, S. - Evaluation of the role of ionized calcium in sodium fluoroacetate ("1080") poisoning. **Toxicol.Appl. Pharmacol**, New York, **56**: 216-20, 1980.
- 135.SAAD, A.D. & CAMARGO, W.V.A. - Intoxicação cianídrica em animais domésticos. O "pessegueiro bravo" (*Prunus sphaerocarpa* Sw.), planta cianogênica da média Mogiana, como responsável por mortes de bovinos e caprinos. **Biológico**, São Paulo, **33**(10): 211-20, 1967.
- 136.SANTOS, M.N.; BARROS, S.S.; BARROS, C.S.L. - Intoxicação em bovinos pelo cogumelo *Ramaria flavobrunnescens*. **Pesqui.Agropec.Bras.**, Ser.Vet., Rio de Janeiro, **10**: 105-9, 1975.
- 137.SAUNDERS, B.C. & STACEY, G. J. - Toxic fluorine compounds containing the C-F linkg. Part I. Methyl fluoroacetate and related compounds. **J.Chem.Soc.**, London, p.1773-9, 1948.
- 138.SEMA.STC - Coordenadoria de Toxicologia Ambiental. **Manual de testes para avaliação da ecotoxicidade de agentes químicos**. Brasília, 1988. 351p.
- 139.SMITH, F.A.; GARDNER, D.E.; YUILE, C.L. - Defluorination of fluoroacetate in the rat. **Life Sci.**, Oxford, **20**: 1131-8, 1977.
- 140.SOIEFER, A.I. & KOSTYNIK, P.J. - Purification of a fluoroacetate-specific defluorinase from mouse liver cytosol. **J.Biol.Chem.**, Baltimore, **259**: 10787-92, 1984.
- 141.SOIEFER, A.I. & KOSTYNIK, P.J. - The enzymatic defluorination of fluoroacetate in mouse liver cytosol: the separation of defluorination activity from several glutathione S-transferases of mouse liver. **Arch.Biochem.Biophys.**, New York, **225**: 928-35, 1983.
- 142.STAHR, H.M. - Quantitative gas-liquid chromatographic method for sodium fluoroacetate. **J.Assoc.Off.Anal. Chem.**, Washington, **60**(6): 1434-5, 1977.
- 143.STAHR, H.M.; BUCK, W.B.; ROSS, P.F. - Gas-liquid chromatographic determination of sodium fluoroacetate **J.Assoc.Off.Anal.Chem.**, Washington, **57**(2): 405-7, 1974

144. STEVENS, H.M.; MOFFAT, A.C.; DRAYTON, J.V. - The recovery and identification of fluoroacetamide and fluoroacetic acid from tissues. **Forensic Sci.**, Lausanne, **8**: 131-7, 1976.
145. STYS, P.K.; WAXMAN, S.G.; RANSOM, B.R. - Ionic mechanisms of anoxic injury in mammalian CNS white matter: roles of Na⁺ channels and Na⁺-Ca²⁺ exchanger. **J.Neurosci.**, Baltimore, **12**(2): 430-9, 1992.
146. SWARTS, F. - Sur l'acide fluoroacétique. **Bull.Soc.Chim.Fr.**, Sér.3, Paris, **15**: 1134, 1896.
147. SYKES, T.R.; QUASTEL, J.H.; ADAM, M.J.; RUTH, T.J.; NOUJAIM, A.A. - The disposition and metabolism of (¹⁸F)-fluoroacetate in mice. **Biochem.Arch.**, **3**(3): 317-23, 1987. Apud: **Chem.Abstr.**, Columbus, **107**: 230781n, 1987.
148. SZERB, J.C. & ISSEKUTZ, B. - Increase in the stimulation-induced overflow of glutamate by fluoroacetate, a selective inhibitor of the glial tricarboxylic cycle. **Brain Res.**, Amsterdam, **410**: 116-20, 1987.
149. TECLE, B. & CASIDA, J.E. - Enzymatic defluorination and metabolism of fluoroacetate, fluoroacetamide, fluoroethanol and (-)-erythro-fluorocitrate in rats and mice examined by fluorine-19 and carbon-13 NMR. **Chem.Res.Toxicol.**, Washington, **2**(6): 429-35, 1989. Apud: **Chem.Abstr.**, Columbus, **111**: 210300j, 1989.
150. TOKARNIA, C.H.; CANELLA, C.F.C.; DÖBEREINER, J. - Intoxicação experimental pela fava da "timbaúba" [*Enterolobium contortisilliquum* (Vell.) Morong] em bovinos. **Arq.Inst.Biol.Anim.**, Rio de Janeiro, **3**: 73-81, 1960.
151. TOKARNIA, C.H.; CANELLA, C.F.C.; DÖBEREINER, J. - Intoxicação por um "tingui" (*Mascagnia rigida* Griseb.) em bovinos no nordeste do Brasil. **Arq.Inst.Biol.Anim.**, Rio de Janeiro, **4**: 203-15, 1961.
152. TOKARNIA, C.H. & DÖBEREINER, J. - "Espichamento", intoxicação por *Solanum malacoxylon*, no pantanal de Mato Grosso. II. Estudos complementares. **Pesqui.Agropec.Bras.**, Ser.Vet., Rio de Janeiro, **9**: 53-62, 1974.
153. TOKARNIA, C.H. & DÖBEREINER, J. - Intoxicação em bovinos por *Vernonia rubricaulis* (Compositae) em Mato Grosso. **Pesqui.Vet.Bras.**, Rio de Janeiro, **2**(4): 143-57, 1982.

154. TOKARNIA, C.H. & DÖBEREINER, J. - Intoxicação experimental em bovinos por "mio-mio". *Bacharis coridifolia*. **Pesq. Agropec. Bras.**, Ser. Vet., Rio de Janeiro, 10: 79-97, 1975.
155. TOKARNIA, C.H. & DÖBEREINER, J. - Intoxicação experimental pela fava da "faveira" (*Dimorphandra mollis* Benth) em bovinos. **Pesqui. Agropec. Bras.**, Brasília 2: 367-73, 1967.
156. TOKARNIA, C.H. & DÖBEREINER, J. - Intoxicação experimental por *Coutoubea ramosa* (Gentianaceae) em bovinos. **Pesqui. Vet. Bras.**, Rio de Janeiro, 1(2): 55-69, 1981.
157. TOKARNIA, C.H. & DÖBEREINER, J. - Intoxicação experimental por *Crotalaria anagyroides* (Leg. Papilionoideae) em bovinos. **Pesqui. Vet. Bras.**, Rio de Janeiro, 3(4): 115-23, 1983.
158. TOKARNIA, C.H. & DÖBEREINER, J. - Intoxicação experimental por *Palicourea juruana* (Rubiaceae) em bovinos e coelhos. **Pesqui. Vet. Bras.**, Rio de Janeiro, 2(1): 17-26, 1982.
159. TOKARNIA, C.H. & DÖBEREINER, J. - Intoxicação experimental por *Plumbago scandens* (Plumbaginaceae) em bovinos. **Pesqui. Vet. Bras.**, Rio de Janeiro, 2(3): 105-12, 1982.
160. TOKARNIA, C.H. & DÖBEREINER, J. - Intoxicação experimental por *Senecio brasiliensis* (Compositae) em bovinos. **Pesqui. Vet. Bras.**, Rio de Janeiro, 4(2): 39-65, 1984.
161. TOKARNIA, C.H. & DÖBEREINER, J. - Intoxicação experimental por *Vernonia squarrosa* (Compositae) em ovinos e bovinos. **Pesqui. Vet. Bras.**, 3(2): 45-52, 1983.
162. TOKARNIA, C.H. & DÖBEREINER, J. - Intoxicação por *Arrabidaea japurensis* (Bignoniaceae) em bovinos em Roraima. **Pesqui. Vet. Bras.**, Rio de Janeiro, 1(1): 7-17, 1981.
163. TOKARNIA, C.H. & DÖBEREINER, J. - Intoxicação por *Mascagnia pubiflora* em bovinos no Estado de Mato Grosso. **Pesqui. Agropec. Bras.**, Brasília, 8: 61-9, 1973.

164. TOKARNIA, C.H. & DÖBEREINER, J. - Intoxicação por *Palicourea marcgravii* (Rubiaceae) em bovinos no Brasil. **Pesqui.Vet.Bras.**, Rio de Janeiro, 6(3): 73-92, 1986.
165. TOKARNIA, C.H. & DÖBEREINER, J. - Plantas tóxicas para herbívoros no Brasil. **Agroquímica**, São Paulo, 19: 20-6, 1982.
166. TOKARNIA, C.H.; DÖBEREINER, J. ; CANELLA, C.F.C. - Estudo experimental sobre a toxidez do "canudo" (*Ipomoea fistulosa* Mart.) em ruminantes. **Arq.Inst.Biol.Anim.**, Rio de Janeiro, 3: 59-71, 1960.
167. TOKARNIA, C.H.; DÖBEREINER, J.; CANELLA, C.F.C. - Intoxicação experimental em bovinos pelas folhas de *Ricinus communis*. **Pesqui.Agropec.Bras. Ser.Vet.**, Rio de Janeiro, 10: 1-7, 1975.
168. TOKARNIA, C.H.; DÖBEREINER, J.; CANELLA, C.F.C. - Intoxicação experimental por *Polygala klotzchii* em bovinos. **Pesqui. Agropec.Bras.**, Ser.Vet., Rio de Janeiro, 11: 73-86, 1976.
169. TOKARNIA, C.H.; DÖBEREINER, J. ; CANELLA, C.F.C. - Ocorrência da intoxicação aguda pela "Samambaia" (*Pteridium aquilinum* Kuhn) em bovinos no Brasil. **Pesqui.Agropec.Bras.**, Brasília, 2: 329-36, 1967.
170. TOKARNIA, C.H.; DÖBEREINER, J. ; CANELLA, C.F.C.; CORDEIRO, J.E.M.; SILVA, A.C.C.; ARAÚJO, F.V. - Intoxicação por *Thilsea glaucocarpa* (Combretaceae) em bovinos no nordeste do Brasil. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA, 17. Fortaleza, 1980. (Trabalho apresentado).
171. TOKARNIA, C.H.; DÖBEREINER, J. ; CANELLA, C.F.C.; GUIMARÃES, D.J. - Intoxicação experimental por *Pseudocalymma elegans* (Vell.) Kuhl. em bovinos. **Pesqui.Agropec.Bras.**, Brasília, 4: 195-204, 1969.
172. TOKARNIA, C.H.; DÖBEREINER, J.; COUCEIRO, J.E.M.; SILVA, A.C.C. - Intoxicação por *Palicourea aeneofusca* (Rubiaceae), a causa de "mortes súbitas" em bovinos na Zona da Mata de Pernambuco. **Pesqui.Vet.Bras.**, Rio de Janeiro, 3(3): 75-9, 1983.
173. TOKARNIA, C.H.; DÖBEREINER, J.; LAZZARI, A.A.; PEIXOTO, P.V. - Intoxicação por *Lantana* spp (Verbenaceae) em bovinos nos Estados de Mato Grosso e Rio de Janeiro. **Pesqui.Vet.Bras.**, Rio de Janeiro, 4(4): 129-41, 1984.

174. TOKARNIA, C.H.; DÖBEREINER, J.; PEIXOTO, P.V. - Intoxicação experimental por *Conium maculatum* (Umbeliferae) em bovinos e ovinos. **Pesqui.Vet.Bras.**, Rio de Janeiro, 5(1): 15-25, 1985.
175. TOKARNIA, C.H.; DÖBEREINER, J.; PEIXOTO, P.V. - Intoxicação por *Mascagnia* aff. *rigida* (Malpighiaceae) em bovinos no norte do Estado do Espírito Santo. **Pesqui.Vet.Bras.**, Rio de Janeiro, 5(3): 77-91, 1985.
176. TOKARNIA, C.H.; DÖBEREINER, J.; PEIXOTO, P.V. - Metodologia da investigação sobre plantas tóxicas de interesse pecuário. **Pesqui.Vet.Bras.**, Rio de Janeiro, 9(3/4) 68, 72, 84, 1989.
177. TOKARNIA, C.H.; DÖBEREINER, J.; SILVA, M.F. - Intoxicação por *Palicourea grandiflora* (Rubiaceae) em bovinos no Território de Rondônia. **Pesqui.Vet.Bras.**, Rio de Janeiro, 1(3): 85-94, 1981.
178. TOKARNIA, C.H.; DÖBEREINER, J.; SILVA, M. F. - **Plantas Tóxicas da Amazônia e outros herbívoros**. INPA, Manaus, 1979. 95p.
179. TOKARNIA, C.H.; GAVA, A.; PEIXOTO, P.V.; STOLF, L.; CONSORTE, L.B.; DÖBEREINER, J. - Intoxicação experimental por *Senecio desiderabilis* (Compositae) em bovinos. **Pesqui.Vet.Bras.**, Rio de Janeiro, 10(1/2): 35-42, 1990.
180. TOKARNIA, C.H.; GAVA, A.; STOLF, L.; PEIXOTO, P.V. - Intoxicação experimental por *Brunfelsia pauciflora* (Solanaceae) em bovinos. **Pesqui.Vet.Bras.**, Rio de Janeiro, 11(1/2): 9-12, 1991.
181. TOKARNIA, C.H.; PEIXOTO, P.V.; DÖBEREINER, J. - Intoxicação experimental por *Palicourea marcgravii* (Rubiaceae) em ovinos. **Pesqui.Vet.Bras.**, Rio de Janeiro, 6(4): 121-31, 1986.
182. TOKARNIA, C.H.; PEIXOTO, P.V.; DÖBEREINER, J. - Poisonous plants affecting heart function of cattle in Brazil. **Pesqui.Vet.Bras.**, Rio de Janeiro, 10(1/2): 1-10, 1990.
183. TOKARNIA, C.H.; PEIXOTO, P.V.; DÖBEREINER, J.; CONSORTE, L.B.; GAVA, A. - *Tetrapteryx* spp. (Malpighiaceae), a causa de mortandades em bovinos caracterizadas por alterações cardíacas. **Pesqui.Vet.Bras.**, Rio de Janeiro, 9(1/2): 23-44, 1989.

184. TOKARNIA, C.H.; PEIXOTO, P.V.; GAVA, A.; DÖBEREINER, J. - Intoxicação experimental por *Stryphnodendron coriaceum* (Leg.Mimosoideae) em bovinos. **Pesqui.Vet.Bras.**, Rio de Janeiro, 11(1/2): 25-9, 1991.
185. TOURTELLOTTE, W.W. & COON, J.M. - Synergistic effect of sodium acetate and ethanol in antagonizing sodium fluoroacetate (1080) poisoning in mice. **Fed.Proc.**, Washington, 8: 339, 1949.
186. TWIGG, L.E. & KING, D.R. - The impact of fluoroacetate-bearing vegetation on native Australian fauna: a review. **OIKOS**, Copenhagen, 61: 412-30, 1991.
187. VICKERY, B. & VICKERY, M.L. - Fluoride metabolism in *Dichapetalum toxicarium*. **Phytochemistry**, Oxford, 11: 1905-9, 1972.
188. VICKERY, B & VICKERY, M.L. - The synthesis and defluorination of monofluoroacetate in some *Dichapetalum* species. **Phytochemistry**, Oxford, 14: 423-7, 1975.
189. VICKERY, B.; VICKERY, M.L.; ASHU, J.T. - Analysis of plants for fluoroacetic acids. **Phytochemistry**, Oxford, 12: 145-7, 1973.
190. VIEIRA, C.A. & FARINA, E.M.M.Q. - **Pecuária bovina brasileira: as causas da crise**. São Paulo, FEA/USP, 1987. 110p. [Série Relatório de Pesquisa nº 37].
191. WARD, J.C. & SPENCER, D.A.- Notes on the pharmacology of sodium fluoroacetate - Compound 1080. **J.Am.Pharm.Assoc.**, Washington, 36(2): 59-62, 1947.
192. ZAMBRANO, M.S.; RIET-CORREA, F.; SCHILD, A.L.; MÉNDEZ, M.C. - Intoxicação por *Solanum fastigiatum* var. *fastigiatum*: evolução e reversibilidade das lesões em bovinos e susceptibilidade de ovinos, coelhos, cobaias e ratos. **Pesqui.Vet.Bras.**, Rio de Janeiro, 5(4): 133-41, 1985.

APÊNDICE

PROCESSO ANALÍTICO PARA A OBTENÇÃO DA FUNÇÃO DOSE x RESPOSTA

A variável independente x (dose) e a variável dependente y (porcentagem de letalidade) da curva dose/resposta, precisam ser transformadas, a fim de possibilitar uma relação linear entre elas, de acordo com as seguintes funções:

$$x = \log(x')$$

$$y' = \int_{-\infty}^y \frac{1}{\sqrt{2\pi}} e^{-\frac{y'^2}{2}} dy$$

onde:

x' - dose administrada;

y' - % de letalidade encontrada;

x - valor correspondente à linearização da dose ministrada;

y - valor correspondente à linearização da % de letalidade encontrada (representação analítica da distribuição normal).

É necessário transformar x' em x e y' em y para que os pares (x,y) sejam utilizados para a obtenção de uma regressão linear simples, conforme modelo existente na maioria dos livros de estatística básica ou calculadoras científicas (método dos mínimos quadrados).

A transformação de x' em x é imediata, basta calcular o logaritmo de cada dose ministrada.

Para simplificar o cálculo complexo da transformação de y' em y , existe uma tabela de quantis da distribuição normal, calculados a partir desta função, onde a leitura é direta. A tabela de quantis, bem como sua utilização é apresentada a seguir.

UTILIZAÇÃO DA TABELA

A tabela foi construída para uma distribuição normal padrão, isto é, com **média zero e desvio padrão 1**.

Os valores de y' são obtidos na tabela, conforme os valores de y encontrados no experimento (% de letalidade). Então:

a) quando $50,00\% \leq y \leq 99,99\%$, a leitura é direta.

Exemplo: $y = 50,00\% \rightarrow y' = 0,000$

$y = 69,50\% \rightarrow y' = 0,5101$

$y = 99,81\% \rightarrow y' = 2,894$

b) quando $0,01 \leq y < 50,00\%$, a leitura deve ser feita pela porcentagem complementar ($100-y$), com o sinal contrário.

Exemplo: $y = 30,00\%$; porcentagem complementar = $70,00\% \rightarrow y' = -0,5244$

$y = 14,00\%$; porcentagem complementar = $86,00\% \rightarrow y' = -1,080$

$y = 0,12\%$; porcentagem complementar = $99,88\% \rightarrow y' = -3,036$

c) quando $y > 99,99\%$ ou $y < 0,01\%$, deve-se utilizar as duas últimas linhas do lado direito da tabela. O expoente colocado acima do nove indica a contidade de "noves" após a vírgula. A leitura é direta quando $y > 99,99\%$ e feita pela porcentagem complementar com o sinal contrário quando $y < 0,01\%$.

Exemplo: $y = 99,9999999\% \rightarrow y' = 5,998$

$y = 0,0001\%$;

porcentagem complementar = $99,9999\% \rightarrow y' = -4,753$

$y = 0,005\%$;

porcentagem complementar = $99,995\% \rightarrow y' = -3,891$

d) quando $y = 100\%$ ou $y = 0\%$, adota-se o valor 6 ou -6, respectivamente.

EXEMPLO ILUSTRATIVO

Cálculo da DL_{50} do padrão de monofluoroacetato de sódio (mg/kg)

x' dose ministrada (mg/kg)	x $\log(x')$	y' letalidade encontrada %	y quantil encon- trado na tabela.
0,6	-0,2218	0	-6
1,0	0	60	0,2533
1,4	1,461	80	0,8416
2,0	0,3010	100	6

Equação da reta obtida através dos pares (x,y):

$$y = 21,5395 \log(x') - 0,9395$$

Para cálculo de DL_{50} :

$y' = 50\%$ que corresponde a $y = 0$ (tabela dos quantis); substituindo na equação da reta obtida acima:

$$0 = 21,5395 \log(x') - 0,9395$$

$$\log(x') = 0,9395/21,5395$$

$$\log(x') = 0,04362$$

$$x' = \text{antilog}(0,04362)$$

$$x' = 1,1057 \text{ mg/kg (= } DL_{50} \text{ do padrão de monofluoroacetado de sódio)}$$