MARINA FROTA DE ALBUQUERQUE LANDI

Detecção e análise da distribuição de carbamatos por espectrometria de massa DESI em órgãos de ratos experimentalmente intoxicados

São Paulo

2020

MARINA FROTA DE ALBUQUERQUE LANDI

Detecção e análise da distribuição de carbamatos por espectrometria de massa DESI em órgãos de ratos experimentalmente intoxicados

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

Departamento:

Departamento de Patologia

Área de concentração:

Patologia Experimental e Comparada

Orientador:

Prof. Dr. Paulo Cesar Maiorka

De acordo:

Orientador

São Paulo
2020

Obs: A versão original encontra-se disponível na Biblioteca da FMVZ/USP

VERSÃO CORRIGIDA

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

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO

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

T. 3960
FMVZ

Landi, Marina Frota de Albuquerque
Detecção e análise da distribuição de carbamatos por espectrometria de massa DESI em órgãos de ratos experimentalmente intoxicados / Marina Frota de Albuquerque Landi. – 2020.
60 p. : il.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Patologia, São Paulo, 2020.

Programa de Pós-Graduação: Patologia Experimental e Comparada.

Área de concentração: Patologia Experimental e Comparada.

Orientador: Prof. Dr. Paulo Cesar Maiorka.

1. Medicina Veterinária Legal. 2. Toxicologia. 3. Carbamato. 4. Espectrometria de massa.. I. Título.

Ficha catalográfica elaborada pela bibliotecária Maria Aparecida Laet, CRB 5673-8, da FMVZ/USP.

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Detecção e análise da distribuição de carbamatos por espectrometria de massa DESI em órgãos de ratos experimentalmente intoxicados.", protocolada sob o CEUA nº 4997020519 (ID 006892), sob a responsabilidade de **Paulo César Maiorka** *e equipe; Marina Frota de Albuquerque Landi* - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (CEUA/FMVZ) na reunião de 14/08/2019.

We certify that the proposal "Detection and analysis of carbamate distribution by DESI mass spectrometry in tissues of experimentally intoxicated rats.", utilizing 15 Heterogenics rats (15 males), 5 Dogs (males and females), 5 Cats (males and females), protocol number CEUA 4997020519 (ID 006892), under the responsibility of **Paulo César Maiorka** *and team; Marina Frota de Albuquerque Landi* - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the School of Veterinary Medicine and Animal Science (University of São Paulo) (CEUA/FMVZ) in the meeting of 08/14/2019.

Finalidade da Proposta: Pesquisa

Vigência da Proposta: de 06/2019 a 07/2019 Área: Patologia Experimental E Comparada

Origem:	Biotério Central do Instituto de Ciências Biomédicas da USP						
Espécie:	Ratos heterogênicos	sexo:	Machos	idade:	70 a 75 dias	N:	15
Linhagem:	Wistar			Peso:	300 a 350 g		
Origem:	Amostras biológicas estocadas						
Espécie:	Cães	sexo:	Machos e Fêmeas	idade:	0 a 20 anos	N:	5
Linhagem:	Indiferente			Peso:	1 a 30 kg		
Origem:	Amostras biológicas estocadas						
Espécie:	Gatos	sexo:	Machos e Fêmeas	idade:	0 a 20 anos	N:	5
Linhagem:	Indiferente			Peso:	1 a 8 kg		

Local do experimento: A intoxicação, eutanásia e coleta de órgãos e processamento histológico de rotina serão feitas no Departamento de Patologia Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (USP). O corte dos fragmentos congelados será feito no Biotério do Hospital Albert Einstein e a análise por espectrometria de massa DESI será feita na UNICAMP.

São Paulo, 07 de junho de 2020

Prof. Dr. Marcelo Bahia Labruna
Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo

Camilla Mota Mendes
Vice-Coordenador
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autor: LANDI, Marina Frota de Albuquerque Landi

Título: **Detecção e análise da distribuição de carbamatos por espectrometria de massa DESI em órgãos de ratos experimentalmente intoxicados**

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

Data: _____/_____/_____

Banca Examinadora

Prof. Dr._____

Instituição:_____ Julgamento:_____

Prof. Dr._____

Instituição:_____ Julgamento:_____

Prof. Dr._____

Instituição:_____ Julgamento:_____

DEDICATÓRIA

À Griss, meu maior anjo da guarda, e a todos os cães do campus que sempre me lembram do porquê eu comecei.

Aos meus avôs, que eu infelizmente não tive a honra de conhecer, mas sempre admirei.

Às minhas avós, exemplos de força, caráter e elegância. Muitas saudades.

AGRADECIMENTOS

Este trabalho significa mais um sonho realizado. Foram dois anos de muito amadurecimento pessoal e científico. Aprendi a correr atrás, às vezes até literalmente, de cada etapa; a pedir e aceitar ajuda; a aceitar que nem tudo o que eu planejava ia dar certo e fornecer soluções ao invés pedir por elas.

Sou imensamente grata à minha família por serem sempre a minha fortaleza, o meu conforto e a minha companhia: meus pais, Maria de Fatima e Marco Antônio, minha irmã Fabiana e os meus gatos Mussarela e Provolone.

Agradeço do fundo do meu coração ao meu orientador, mentor e amigo, Prof. Dr. Paulo Maiorka. Obrigada por mais uma oportunidade, por todas as portas abertas, pela inspiração e confiança. Espero ter correspondido às suas expectativas.

Agradeço ao colaborador e amigo Dr. Pedro Henrique Vendramini, do Instituto de Química da Unicamp, pelas análises. Obrigada pelos ensinamentos, pela generosidade, pela paciência e principalmente pelo seu tempo e ter lutado para esse experimento acontecer. Também agradeço à Profa. Dra. Taicia Fill por ter possibilitado a reserva do aparelho.

Agradeço à Profa. Dra. Cláudia Mori pela ajuda com os roedores, por responder as minhas milhões de perguntas, pelo acolhimento e pela sensibilidade. Tem sido um grande prazer e aprendizado trabalhar uma equipe incrível.

Um agradecimento mais que especial para a MSc. Mariana Aranha e o MSc. Dennis Zanatto, que me ajudaram não só com o experimento, mas com muito companheirismo durante esses dois anos. Obrigada por me acolherem e manterem um ambiente tão leve e positivo que foi fundamental para a minha saúde mental.

Agradeço à Profa. Dra. Helenice de Sousa Espinosa pelas contribuições e por disponibilizar amostras do LADTOX.

Agradeço também à Profa. Dra. Cristina Massoco pelo valioso apoio; à Profa. Dra Terezinha Knöbl por prontamente me ajudar com a prorrogação do prazo e à Profa. Dra. Claudia Momo pelas avaliações dos relatórios.

Agradeço à Milena de Oliveira por me salvar no meio de toda a burocracia e prazos e aos funcionários da FMVZ que me ajudaram muito direta e indiretamente com os experimentos e amostras: Nelsinho, Herculano, Mauro, Cláudio, Magali, Adriana e Jorge.

Agradeço aos meus incríveis colegas de pós-graduação: Alberto, Alessandra, Cassia, Catalina, Celina, Cintia, Daniel, Gabriel, Jessica, Juliana, Isabela, Isis, Laís, Leonardo, Luana, Marianna, Pedro, Rafael, Raquel, Renata, Victor, Vívian (em ordem alfabética para não dar briga!) e os residentes Jamile, Luiz e Ticiana. Muito obrigada pelo companheirismo, risadas e companhia.

Este trabalho recebeu o apoio e financiamento da FAPESP: processo 2018/04289-9.

Ainda aproveito para agradecer a todos os meus amigos que me deram muita força nessa etapa da minha vida.

“*A verdade é como o fogo; falar a verdade significa brilhar e queimar*” ~ Gustav Klimt

RESUMO

LANDI, Marina Frota de Albuquerque. **Detecção e análise da distribuição de carbamatos por espectrometria de massa DESI em órgãos de ratos experimentalmente intoxicados.** 2020. 60 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2020.

Os carbamatos são praguicidas anticolinesterásicos com inúmeras formulações e usos distintos. O aldicarbe e o carbofurano, formulados para uso agrícola, têm frequentemente uso irregular como abortivos, tentativas de suicídio, homicídio e intoxicações de animais domésticos e silvestres. Eles são conhecidos como "chumbinho" devido à aparência enegrecida e granular, são fornecidos em uma única dose letal a animais junto a alimentos (iscas). Quando encontrados vivos, esses animais apresentam sinais relacionados à inibição da atividade da acetilcolinesterase, que causa estímulo a receptores muscarínicos e nicotínicos, resultando em sinais como diarreia, vômitos, depressão e convulsões. As alterações macroscópicas e histopatológicas são consideradas inespecíficas, sendo observadas congestões em múltiplos órgãos. O diagnóstico da intoxicação é feito a partir da análise de amostras colhidas durante a necropsia e os métodos mais utilizados são a cromatografia em camada delgada (CCD) e a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), além da recém validada cromatografia líquida de alta pressão com detector de matriz de diodos (HPCL-DAD). O método de detecção por imageamento por espectrometria de massas DESI (*desorption electrospray ionization* ou ionização por dessorção por eletrospray) pode ser utilizada para esse fim. Nele, um solvente é direcionado para a superfície da amostra para dessorver e ionizar o material. Esses íons são evaporados, passam por analisador Orbitrap Q-Exactive. Por último, a amostra é escaneada e a informação correlacionada com a distribuição espacial da espécie química.

Palavras-chave: Medicina Veterinária Legal, toxicologia, carbamato, imageamento por espectrometria de massas.

ABSTRACT

LANDI, Marina Frota de Albuquerque. **Detection and analysis of carbamate distribution by DESI mass spectrometry in tissues of experimentally intoxicated rats.** 2020. 60 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2020.

Carbamates are acetylcholinesterase inhibitors with many different formulations and uses. Aldicarb and carbofuran, originally formulated for agricultural use, are frequently employed to cause abortions, homicides, suicides and intoxications of domestic and wild animals. They are known as “small lead” due to its dark granular presentation, are offered to animals with food (bait) in a single quickly lethal dosage. When found alive, these animals present clinical signs related to the inhibition of the acetylcholinestesase enzyme, which stimulates muscarinic and nicotinic receptors, such as diarrhea, vomits, depression and convulsions. The macroscopic and histopathological changes are considered unspecific; such are blood ingurgitation in many organs. The diagnosis is obtained after the analysis of samples taken during necropsy and the most used methods are the thin layer chromatography (TLC), high performance liquid chromatography (HPLC), and the recently validated High-performance liquid chromatography-diode array detection (HPLC-DAD). The method of desorption electrospray ionization mass spectrometry (DESI-MS) can also be used. In this technique, a solvent is directed towards a sample surface to desorb and ionize the material, which will be evaporated and analyzed using Orbitrap Q-Exactive. Lastly, the sample is scanned and the information correlated with the spatial distribution of the chemical specimen.

Keywords: Forensic veterinary medicine, toxicology, carbamate, mass spectrometry imaging.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Esquema do suporte de corte histológico congelado..... 30
Figura 2 – Esquema da configuração das amostras na lâmina de vidro.....31
Figura 3 – Espectro do íon m/z 104,10715 e imageamento por espectrometria de massas (MSI) por DESI de cortes de estômago de animais número 4 do grupo controle, aldicarbe e carbofurano, respectivamente 42
Figura 4 – Imageamento por espectrometria de massas (MSI) por DESI de cortes de estômago de animais número 4 do grupo controle, aldicarbe e carbofurano, respectivamente. Os íons dos animais intoxicados com aldicarbe estão selecionados nesta figura.....43
Figura 5 – Imageamento por espectrometria de massas (MSI) por DESI de cortes de estômago de animais número 4 do grupo controle, aldicarbe e carbofurano, respectivamente. Os íons dos animais intoxicados com carbofurano estão selecionados nesta figura..... 43
Figura 6 – Espectro do íon m/z 104,10715 e imageamento por espectrometria de massas (MSI) por DESI de cortes de estômago de animais número 2 do grupo controle, aldicarbe e carbofurano, respectivamente..... 44
Figura 7 – Imageamento por espectrometria de massas (MSI) por DESI de cortes de estômago de animais número 2 do grupo controle, aldicarbe e carbofurano, respectivamente. Os íons dos animais intoxicados com aldicarbe estão selecionados nesta figura..... 44
Figura 8 – Imageamento por espectrometria de massas (MSI) por DESI de cortes de estômago de animais número 2 do grupo controle, aldicarbe e carbofurano, respectivamente. Os íons dos animais intoxicados com carbofurano estão selecionados nesta figura..... 45
Figura 9 – Espectro do íon m/z 104,10715 e imageamento por espectrometria de massas (MSI) por DESI de cortes de estômago de animais número 5 do grupo controle, aldicarbe e carbofurano, respectivamente..... 45
Figura 10 – Imageamento por espectrometria de massas (MSI) por DESI de cortes de estômago de animais número 5 do grupo controle, aldicarbe e carbofurano, respectivamente. Os íons dos animais intoxicados com aldicarbe estão selecionados nesta figura.....46

Figura 11 – Imageamento por espectrometria de massas (MSI) por DESI de cortes de estômago de animais número 5 do grupo controle, aldicarbe e carbofurano, respectivamente. Os íons dos animais intoxicados com carbofurano estão selecionados nesta figura..... 46

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 –Casos sugestivos e confirmados de intoxicação por carbamato ao longo de 10 anos (2009-2018) 38
Tabela 2 – Alterações microscópicas observadas nos ratos do grupo controle..... 39
Tabela 3 – Alterações microscópicas observadas nos ratos intoxicados por aldicarbe..... 39
Tabela 4 – Alterações microscópicas observadas nos ratos intoxicados por carbofurano..... 39
Tabela 5 – Compostos encontrados nas análises por DESI-MS..... 40

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 – Intoxicações de humanos por agrotóxicos de uso agrícola..... 20
Gráfico 2 – Intoxicações de animais por agrotóxicos de uso agrícola..... 20
Gráfico 3 e 4 – Espectros de (+)-ESI-MS para amostra de estômago de rato intoxicado com aldicarbe.....42
Gráfico 4 – Espectros de (+)-ESI-MS para amostra de estômago de rato intoxicado com carbofurano..... 43

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Anvisa – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

CIAT – Centro de Informação e Assistência Toxicológica

CCD – Cromatografia em camada delgada

CLAE – Cromatografia líquida de alta eficiência

DESI-MS – *Desorption electrospray ionization mass spectrometry*

DL_{50} – Dose Letal a 50% dos indivíduos de uma espécie

FMVZ – Faculdade de Medicina Veterinaria e Zootecnia

Fiocruz – Fundação Oswaldo Cruz

HPLC-DAD – Cromatografia líquida de alta pressão com detector de matriz de diodos

ICB – Instituto de Ciências Biomédicas

LADTOX – Laboratório De Diagnóstico Toxicológico

MAPA – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

NA – Não analisado

NDN – Nada digno de nota

SINITOX – Sistema Nacional de Informação Toxicológica

SPF – *Specific Pathogen Free* (Livre de patógenos específicos)

USP – Universidade de São Paulo

VPT – Departamento de Patologia

WHO – World Health Organization (Organização Mundial da Saúde)

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 18

2 – Objetivos 25

2.1 – OBJETIVOS GERAIS 25

2.2 – Objetivos específicos 25

3 - MATERIAIS E MÉTODOS 27

3.1 – LEVANTAMENTO DE CASOS DE INTOXICAÇÃO EXÓGENA DO SERVIÇO DE PATOLOGIA DO DEPARTAMENTO DE PATOLOGIA DA FMVZ-USP 27

3.2 – EXPERIMENTO: ANIMAIS UTILIZADOS 27

3.3 – INTOXICAÇÃO EXPERIMENTAL 28

3.4 – EUTANÁSIA 29

3.5 – NECROPSIA E COLETA DE AMOSTRAS 29

3.6 – CORTE DE AMOSTRAS CONGELADAS 30

3.7 – CORTE DE AMOSTRAS CONGELADAS DE FÍGADOS DE CÃES E GATOS PROVENIENTES DE NECROPSIAS 31

3.8 – CORTE DE AMOSTRAS FIXADAS 32

3.9 – ANÁLISE POR DESI-MSI 33

4 RESULTADOS 35

4.1 – Levantamento de casos de intoxicação exógena 35

4.2 – INTOXICAÇÃO EXPERIMENTAL 37

4.3 – NECROPSIA 38

4.4 – ANÁLISE POR DESI-MSI 40

5 DISCUSSÃO 49

6 CONCLUSÕES 55

REFERÊNCIAS 56

1. INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

Os carbamatos são derivados do ácido carbâmico e, junto aos organofosforados, são agentes anticolinesterásicos praguicidas usados de inúmeras formulações e nomes comerciais e podem ter uso veterinário, agrícola ou domiciliar. Dentre as vantagens desses compostos, estão a eficiência sem a persistência no meio ambiente e a não acumulação no tecido adiposo (XAVIER; RIGHI; SPINOSA, 2007).

Os carbamatos aldicarbe e carbofurano são formulações de uso exclusivamente agrícola. O aldicarbe, produzido inicialmente na década de 1960, originalmente era indicado para cultivos de algodão, batata, café, cana-de-açúcar, citros e feijão. Em 2006, a Comissão de Reavaliação Toxicológica da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa) estabeleceu medidas restritivas para o uso do praguicida, como a “exclusão de uso do produto em diversas culturas; restrição de venda aos estados da Bahia, Minas Gerais e São Paulo, exclusivamente para agricultores certificados e propriedades cadastradas para uso do produto; diminuição do número de revendas de mais de 200 para apenas 34 canais; e inclusão de agente amargante e emético (substância que induz ao vômito) na formulação do produto” (Portal Anvisa, 2019). Em 2011, a Bayer S/A apresentou um cronograma de descontinuidade, quando se comprometeu também a recolher todas os produtos que estivessem com agricultores. No ano seguinte, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) publicou o cancelamento do registro do Temik® 150, por ser considerado um grave risco de saúde pública devido ao seu uso irregular como abortivo, em tentativas de homicídio, suicídio, intoxicações acidentais de trabalhadores rurais e mortes de animais domésticos, de produção e silvestres. Desde então, estão proibidos a

produção, uso e distribuição de qualquer agrotóxico à base de aldicarbe. Embora tenha perdido o seu registro, ainda são diagnosticadas intoxicações de animais pelo praguicida no Serviço de Patologia Animal do Departamento de Patologia (VPT) da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ) da Universidade de São Paulo (USP) (XAVIER; RIGHI; DE SOUZA SPINOSA, 2007; FUKUSHIMA, 2016).

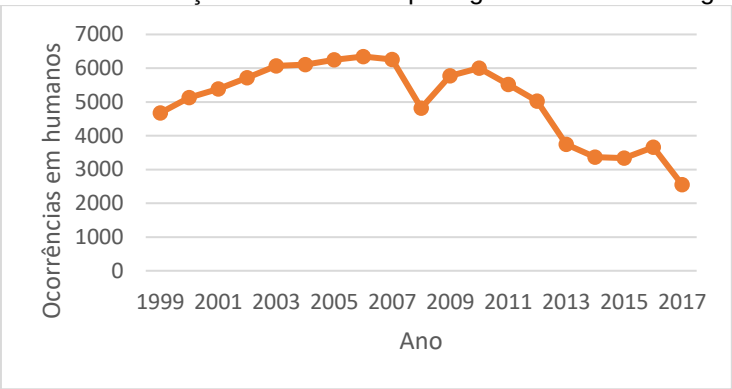
O carbofurano, por sua vez, era indicado para cultivos de café, banana e cana-de-açúcar. A Anvisa, em 2017, também baniu sua produção e importação do mercado brasileiro até abril de 2018.

A Organização Mundial de Saúde (WHO) reportou que praguicidas muitas vezes não possuem seletividade de organismo a ser intoxicado. Em países em desenvolvimento, a ingestão desses agentes é um dos meios mais usados para o suicídio. Assim, surge a necessidade de novas medidas para a diminuição do uso de praguicidas perigosos, como a ecoagricultura e agentes de menor toxicidade (WHO SUICIDE). Essa organização estipulou uma classificação dos pesticidas quanto ao perigo de intoxicação. O critério utilizado foi a DL_{50} (dose mínima letal para 50% dos indivíduos) desses agentes em ratos. Os classificados como “Ia” são considerados extremamente perigosos, por ter DL_{50} de 5mg/kg ou menos em formulações sólidas. O aldicarbe, cujo DL_{50} é de 0,5 a 1,5mg/kg, se encaixa neste grupo. Os “Ib”, por sua vez, são os altamente perigosos, com DL_{50} de 5 a 50mg/kg. O carbofurano, cujo DL_{50} é de 5 a 13mg/kg, pertence a essa classificação (WHO REPORTS).

Os últimos dados do Sistema Nacional de Informações Toxico-farmacológicas (SINITOX), da Fiocruz, Fundação Oswaldo Cruz, revelam 2.548 casos de intoxicações de humanos por agrotóxicos de uso agrícola e 64 de animais em

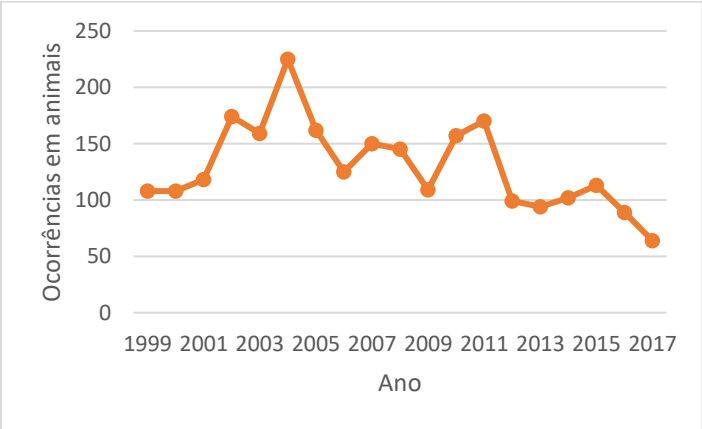
2017. No entanto, o próprio website da Instituição afirma que são dados possivelmente subestimados devido à diminuição da participação dos Centros de Informação e Assistência Toxicológica (CIATs) nesses levantamentos. Mesmo assim, é possível observar que há uma diminuição expressiva de casos em humanos após 2011, época em que a Bayer S/A iniciou seu cronograma de descontinuidade. Infelizmente, os dados acerca de intoxicações de animais são escassos e os números do SINITOX estão muito subestimados, uma vez que maioria dos animais encontrados mortos não são necropsiados e testados para carbamatos e outros agentes (XAVIER; RIGHI; DE SOUZA SPINOSA, 2007).

Gráfico 1 – Intoxicações de humanos por agrotóxicos de uso agrícola



Fonte: SINITOX (2020)

Gráfico 2 – Intoxicações de animais por agrotóxicos de uso agrícola



Fonte: SINITOX (2020)

Os carbamatos inibem reversivelmente a enzima acetilcolinesterase por meio da ligação competitiva nos sítios aniônicos e estéricos. Essa enzima catalisa a hidrólise do neurotransmissor acetilcolina e, quando inibida, ocorre o aumento do neurotransmissor nos receptores colinérgicos nervosos ou na junção neuromuscular, causando estímulo contínuo do nervo ou da fibra muscular (FUKUTO, 1990; KLAINBART et al., 2019). Em oposição aos organofosforados, os carbamatos demoram um pouco mais para ultrapassar a barreira hematoencefálica, sendo vários sinais da intoxicação possíveis de serem atribuídos à hipóxia cerebral (VALE; LOTTI, 2015). Os sinais observados em animais intoxicados são colinérgicos, tanto pelo estímulo exacerbado de receptores nicotínicos (fasciculação, fraqueza, paralisia, taquicardia e hipertensão), receptores muscarínicos (salivação, náuseas, dor abdominal, incontinência urinária e fecal, tosse, miose, lacrimejação, bradicardia e hipotensão) e receptores centrais (alteração de consciência, convulsão, depressão respiratória, ataxia e fasciculações) (BARDIN, 1994). Em alguns casos em que o animal sobrevive, pode ocorrer a chamada síndrome intermediária, uma resposta tardia à intoxicação que consiste na fraqueza neuromuscular de membros torácicos, pescoço, músculos respiratórios e nervos cranianos (TINSON E; BOLLER E, 2017). Ainda, formulações comerciais podem conter componentes que frequentemente contribuem para a toxicidade desses praguicidas (VALE; LOTTI, 2015).

O aldicarbe e o carbofurano, conhecidos no mercado ilegal como “chumbinho”, são facilmente misturados a alimentos (iscas) fornecidos aos animais em dose única, levando-os rapidamente à morte e, quando encontrados vivos, apresentam sinais clínicos graves, como os já citados. As alterações

macroscópicas e histopatológicas dos animais são normalmente inespecíficas, como áreas de congestão e hemorragia, em órgãos como cérebro, pulmão, coração, estômago, pâncreas e rim (XAVIER; RIGHI; SPINOSA, 2007; DE SIQUEIRA et al., 2015).

É essencial que as amostras coletadas durante a necropsia sejam devidamente identificadas, acondicionadas e uma cadeia de custódia seja criada, de forma que seja possível obter-se nexo causal para que possuam validade judicial. Ainda, é necessário que sejam feitas análises em três fases para a confirmação da presença do praguicida (FUKUSHIMA, 2016). Recomenda-se que sejam coletadas durante a necropsia amostras de sangue, fígado, conteúdo gástrico, humor vítreo e pulmões (XAVIER; RIGHI; SPINOSA, 2007). Como método de triagem, tanto em medicina veterinária quanto em laboratórios oficiais, normalmente é utilizada a cromatografia em camada delgada (CCD), porém ela possui limitações, como a baixa sensibilidade e especificidade, além de não ser um método quantitativo. Alternativamente, é possível ser feita a avaliação da atividade enzimática da acetilcolinesterase. A detecção do aldicarbe pode ser feita por diversos métodos, sendo a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) o mais utilizado (XAVIER et al., 2007; FUKUSHIMA, 2016). Recentemente, Gonçalves et al., (2017) desenvolveu e validou um método de análise do carbofurano por cromatografia líquida de alta pressão com detector de matriz de diodos (HPLC-DAD), que consiste na identificação do praguicida e seu metabólito em matrizes de conteúdo estomacal, fígado, humor vítreo e sangue. Todos esses testes são realizados com matrizes biológicas colhidas e congeladas.

O método de análise por espectrometria de massas por dessorção por eletrospray recebe a sigla DESI (*desorption electrospray ionization*) e pode ser utilizado para diversos fins. A técnica já foi utilizada com sucesso em análise de lipídeos, metabólitos de drogas, biomarcadores de doenças e tecidos biológicos (ALBERICI; VENDRAMINI; EBERLIN, 2017). Nele, um solvente em spray é direcionado para a superfície da amostra, para dessorver e ionizar a amostra a ser analisada. Num processo chamado "*droplet pick-up model*" (modelo de captação de gotículas), as gotículas produzidas pela fonte da DESI colidem contra a superfície, que é umedecida, formando um fino filme onde o material se dissolve. As colisões de gotículas seguintes resultam em transferência de momento e o material é suspenso. As gotículas, por fim, evaporam, transferindo os íons para a fase gasosa. A sensibilidade depende muito da solubilidade do material. Esses íons passam por um analisador Orbitrap Q-Exactive. Posteriormente, a amostra é escaneada unidirecionalmente e a informação é correlacionada com a distribuição espacial da espécie química (BENNET; GAMAGE; FERNÁNDEZ, 2013).

2. OBJETIVOS

2 – OBJETIVOS

2.1 – OBJETIVOS GERAIS

- Aplicar uma técnica de detecção e análise espacial em tecidos (encéfalo, pulmão, coração, fígado, estômago, rim e baço) de ratos Wistar experimentalmente intoxicados.
- Verificar se há diferença na intensidade da marcação nos diferentes tecidos coletados e congelados.
- Discutir as vantagens e desvantagens do imageamento por espectrometria de massas em análises forenses

2.2 – OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar se é possível a detecção por espectrometria de massa DESI em tecidos congelados de animais intoxicados enviados para exame necroscópico no Laboratório de Patologia Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo.
- Verificar quais tecidos congelados coletados apresentam positividade no exame.
- Determinar se os achados macro e microscópicos corroboram com outros trabalhos publicados.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3 - MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 – LEVANTAMENTO DE CASOS DE INTOXICAÇÃO EXÓGENA DO SERVIÇO DE PATOLOGIA DO DEPARTAMENTO DE PATOLOGIA DA FMVZ-USP

Para determinar a frequência com que são observadas intoxicações exógenas na rotina de necropsia do Serviço de Patologia do Departamento de Patologia da FMVZ-USP nos últimos anos, foi realizado um levantamento de casos a partir dos registros de necropsia dos anos de 2009 a 2018.

Foram levantados os dados: ano, espécie, idade, sexo e resultado (positivo ou sugestivo). Foram considerados como “sugestivos” casos em que foram observados grânulos enegrecidos em conteúdo estomacal e nenhuma outra grave comorbidade. Foram considerados como “positivos” casos que foram testados no Laboratório de Diagnóstico Toxicológico (LADTOX) do Departamento de Patologia da FMZ-USP por meio de métodos já validados.

3.2 – EXPERIMENTO: ANIMAIS UTILIZADOS

Para a etapa da intoxicação experimental, serão utilizados ratos da linhagem Wistar SPF (*specific pathogen free*) provenientes do Biotério de Produção de Ratos “Zuleica Bruno Fortes” do Instituto de Ciências Biomédicas (ICB) da Universidade de São Paulo. Foram adquiridos 15 ratos Wistar SPF machos de 10 semanas, pesando de 328 a 440 gramas no dia do experimento.

Foram mantidos no Biotério do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ) da Universidade de São Paulo (USP) em caixas de plástico e grade metálica, forradas por maravalha com 5 animais, com água e ração *ad libitum* e enriquecimento ambiental com rolos de papelão autoclavados, a temperatura ambiente de 24-26ºC, umidade de 60 a 70% e ciclos de claro/escuro de 12 horas. Foram feitos 14 dias de ambientação e treinamento com o cano de gavagem para que o estresse do animal tivesse a mínima influência possível no experimento.

3.3 – INTOXICAÇÃO EXPERIMENTAL

De forma a evitar a realização de testes piloto com a utilização de muitos animais, além de gastos com materiais, foi utilizado o protocolo de um experimento com intoxicações agudas letais com aldicarbe e carbofurano (SIQUEIRA, 2016a). Assim como no protocolo citado, foram utilizadas as formulações comerciais Temik®, de aldicarbe, e Furadan®, de carbofurano, gentilmente cedidos pela Profa. Dra. Helenice Spinosa. Os grânulos enegrecidos foram macerados em água filtrada, mas observamos que não houve dissolução completa. Foi feita nova tentativa de dissolução em óleo de girassol, igualmente malsucedida. Assim, optamos por preparar doses individuais ajustadas para o peso de cada animal, de forma a manter a concentração descrita no protocolo para a intoxicação aguda letal. Os grânulos foram macerados em 2,5mL de água filtrada, levando em conta que o rato wistar adulto pode consumir no máximo de 3mL por vez.

Para o ajuste da dose, foram realizados os seguintes cálculos para o aldicarbe: foi determinada por SIQUEIRA (2016a) como 3mg/mL, a concentração

necessária para a intoxicação aguda. O Temik® possui 15% de aldicarbe em sua formulação. Assim, teriam que ser fornecidos 20mg para um animal de 300 gramas em 1 mL de solução para chegar à concentração esperada. Esses 20mg foram ajustados ao peso de cada animal com regra-de-três e multiplicado por 2,5, pois fornecemos 2,5mL para cada animal. De forma análoga, a concentração letal em ratos de carbofurano foi determinada como 4mg/mL. O Furadan® possui concentração de 5%, sendo, portanto, necessário fornecer 80mg para um animal de 300 gramas em 1mL de solução. Os cálculos foram feitos seguindo os mesmos raciocínios.

Os preparados foram ressuspendidos no momento do fornecimento ao animal por gavagem com um fino tubo de silicone, uma vez que o tradicional, metálico, entupiu com os grânulos.

3.4 – EUTANÁSIA

Para evitar ao máximo a presença de outros elementos químicos nas amostras, optou-se por não realizar um protocolo de sedação. Os animais foram, assim que apresentaram os primeiros sinais clínicos de intoxicação, rapidamente encaminhados para eutanásia em câmara saturada de CO_2 por 12 minutos.

3.5 – NECROPSIA E COLETA DE AMOSTRAS

Todos os animais foram necropsiados imediatamente ao fim do ciclo de eutanásia por CO_2 e confirmação do óbito.

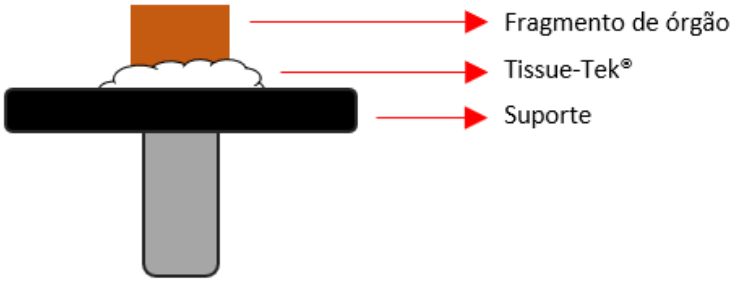
Foram coletados encéfalo, pulmões, coração, baço, pâncreas, fígado, rins e estômago. Pequenos fragmentos foram fixados em solução de formaldeído a 10% e o resto congelados individualmente em sacos plásticos estéreis. Para a

coleta dos estômagos, os órgãos foram abertos pela curvatura maior e lavados suavemente de forma a não alterar a morfologia da mucosa gástrica à microscopia. Do encéfalo, separou-se somente um fragmento de córtex frontal para fixação em formol e o resto foi congelado. Ambos os olhos foram congelados. Os estômagos foram lavados suavemente somente para retirar o conteúdo visível. As amostras foram mantidas em freezer a -20ºC.

3.6 – CORTE DE AMOSTRAS CONGELADAS

Os ratos foram separados em três grupos de cinco animais: o grupo controle; os intoxicados por aldicarbe e os intoxicados por carbofurano. Cada animal dentro de um grupo foi numerado de um a cinco. Foram utilizadas lâminas de vidro sem qualquer tratamento e foram feitos cortes histológicos de cada fragmento de órgão na espessura de 14 µm com o criostato modelo CM1850 da Leica Biosystems na temperatura de -23º a -25º C. Alguns órgãos, como pulmão e baço, apresentaram melhores resultados em temperaturas um pouco maiores do que outros. O fragmento a ser seccionado era fixado ao suporte por uma gota de composto Tissue-Tek® O.C.T™ (ótima temperatura de corte) da Sakura, de forma que não houvesse contaminação do composto na amostra, conforme a figura 1.

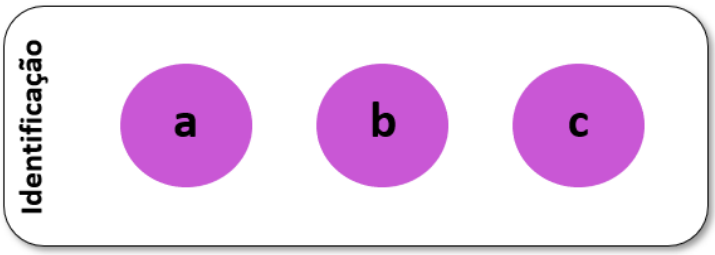
Figura 1 – Esquema do suporte de corte histológico congelado.



Fonte: Landi (2020)

Em cada lâmina, havia três amostras do mesmo órgão de três animais diferentes, sempre na mesma ordem: controle, aldicarbe e carbofurano. Por exemplo, o fígado do rato 1 do grupo controle foi colocado na mesma lâmina do rato 1 do grupo aldicarbe e do rato 1 do grupo carbofurano, conforme a figura 2. Cada grupo foi cortado com navalhas diferentes e em dias diferentes, para evitar a contaminação. Foram feitas duplicatas de cada lâmina. Somente o encéfalo teve mais cortes, sendo confeccionadas lâminas em dois cortes sagitais e três coronais, evidenciando córtex parietal, hipocampo, cerebelo e tronco.

Figura 2 – Esquema da configuração das amostras na lâmina de vidro.



Fonte: Landi (2020)

Legenda: O (a) corresponde à amostra controle, o (b), ao intoxicado por aldicarbe e o (c), por carbofurano.

Para cada corte, foi feito um corte subsequente nas mesmas condições de espessura e temperatura, mas colocado em lâmina silanizada StarFrost®. Estas lâminas foram descongeladas e secas para a bateria de coloração de hematoxilina e eosina sem as etapas de desparafinização e desidratação com xilol e álcool. Em seguida, foram fixadas as lamínulas. Essas lâminas foram usadas para a comparação visual com as imagens produzidas durante a análise por DESI-MSI.

3.7 – CORTE DE AMOSTRAS CONGELADAS DE FÍGADOS DE CÃES E GATOS PROVENIENTES DE NECROPSIAS

Em uma segunda etapa, foram utilizados os fígados mantidos em congelamento de cinco cães ou gatos com grande suspeita de intoxicação, determinada pela presença de grânulos enegrecidos em meio ao conteúdo estomacal. A escolha do órgão se deu pelo fato deste ser o único a ser coletado rotineiramente, além do conteúdo estomacal. Dada a escassez de amostras armazenadas, não houve critério de exclusão de fígados quanto ao estado de decomposição.

Essas amostras são provenientes de necropsias realizadas no Departamento de Patologia Veterinária (VPT) da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (FMVZ – USP) realizadas entre os anos de 2017 a 2019. Como controle positivo e negativo, foram utilizados os fígados dos ratos do experimento já descrito. As lâminas foram produzidas usando a mesma metodologia, com a adição de uma amostra à esquerda da amostra controle.

3.8 – CORTE DE AMOSTRAS FIXADAS

Os fragmentos foram acondicionados em cassetes, enviados para processamento de rotina, incluídos em parafina, cortados em 5µm, corados em Hematoxilina & Eosina e colocadas as lamínulas. As lâminas foram avaliadas com a ajuda de um microscópio óptico para a determinação de possíveis alterações microscópicas dos tecidos dos ratos intoxicados.

3.9 – ANÁLISE POR DESI-MSI

Esta etapa do trabalho foi realizada no Laboratório Thomson de Espectrometria de Massas do Instituto de Química da Universidade Estadual de Campinas – Unicamp.

Inicialmente, foi necessário determinar quais eram as moléculas a serem buscadas e suas respectivas massas, determinadas por meio das fórmulas moleculares obtidas no website Pubchem. Além do adicarbe e carbofurano, seus metabólitos poderiam, teoricamente, ser encontrados nos tecidos. Os principais metabólitos do aldicarbe são o aldicarbe sulfóxido e o aldicarbe sulfona e o do carbofurano é o 3-hidroxi-carbofuran.

A lâmina a ser analisada foi descongelada e seca em temperatura ambiente. Foi feita a análise no espectrômetro de massas Q-Exactive – Thermo Scientific®, com a fonte de ionização DESI – Prosolia®. As análises foram conduzidas em modo positivo, na faixa de massas de 100-300 Dalton, com 70 de S-lens, voltagem do spray de 5,0 kV, temperatura do capilar de 300ºC, e vazão do solvente 3 μL/min. Todos os ângulos foram ajustados para a obtenção do melhor sinal/ruído e foi utilizado metanol (MeOH) como solvente de dessolvatação, velocidade de varredura de 740 μm/s, e resolução espacial de 200 μm (*pixel*).

Após a aquisição dos dados, foi realizada a conversão do dado bruto em imagem pelo software FireFly 2.1.05. Em seguida, a geração de imagem foi obtida pelo software BioMap 3.8.0.4.

4. RESULTADOS

4 RESULTADOS

4.1 – LEVANTAMENTO DE CASOS DE INTOXICAÇÃO EXÓGENA

A partir dos livros de registro de necropsia, foi feito um levantamento dos casos de intoxicação exógena por carbamatos, conforme a tabela abaixo.

Tabela 1: Casos sugestivos e confirmados de intoxicação por carbamato ao longo de 10 anos (2009-2018).

Ano	Espécie	Raça	Sexo	Idade	Resultado
2009	Felina	SRD	Macho	-	Positivo (sem histopatológico)
2009	Canina	Pitbull	Fêmea	1 ano	Sugestivo de intoxicação
2009	Canina	Akita	Fêmea	5 anos	Sugestivo de intoxicação/animal autolisado
2009	Felina	SRD	Macho	2 anos	Sugestivo de intoxicação
2009	Felina	SRD	Macho	1 ano	Sugestivo de intoxicação/animal autolisado
2009	Canina	SRD	Fêmea	4 anos	Positivo
2009	Felina	SRD	Fêmea	2 anos	Positivo
2010	Canina	SRD	Macho	3 anos	Sugestivo de intoxicação/animal autolisado
2010	Felina	SRD	Macho	25 anos	Positivo
2010	Canina	Maltês	Fêmea	4 anos	Positivo
2010	Canina	SRD	Macho	1 ano	Sugestivo de intoxicação
2010	Canina	SRD	Fêmea	8 meses	Positivo (sem histopatológico)
2010	Felina	SRD	Macho	8 meses	Sugestivo de intoxicação
2010	Felina	SRD	Macho	1 ano	Positivo
2010	Felina	SRD	Fêmea	1 ano	Positivo
2010	Canina	SRD	Fêmea	Adulto	Positivo
2010	Felina	SRD	Macho	1 ano	Sugestivo de intoxicação
2010	Felina	SRD	Fêmea	9 meses	Sugestivo de intoxicação
2011	Felina	SRD	Fêmea	-	Sugestivo de intoxicação
2011	Canina	Pitbull	Fêmea	5 anos	Sugestivo de intoxicação
2011	Felina	SRD	Fêmea	1 ano	Sugestivo de intoxicação
2011	Felina	SRD	Macho	1 ano	Sugestivo de intoxicação
2011	Felina	SRD	Macho	1 ano	Sugestivo de intoxicação
2011	Felina	SRD	Fêmea	-	Sugestivo de intoxicação
2011	Felina	SRD	Fêmea	1 ano	Sugestivo de intoxicação
2011	Felina	SRD	Macho	3 meses	Sugestivo de intoxicação
2011	Felina	SRD	-	6 meses	Sugestivo de intoxicação

2011	Felina	SRD	-	6 anos	Positivo
2011	Felina	SRD	Macho	-	Sugestivo de intoxicação
2011	Felina	SRD	Fêmea	-	Sugestivo de intoxicação
2012	Canina	Teckel	Macho	8 anos	Positivo
2012	Canina	Pastor Belga	Fêmea	9 anos	Positivo
2012	Felina	SRD	Fêmea	-	Positivo
2012	Canina	Pinscher	-	1 ano	Positivo
2012	Felina	SRD	Macho	1 ano	Positivo
2012	Felina	SRD	Macho	4 meses	Positivo
2012	Canina	SRD	Fêmea	Adulto	Positivo
2012	Felina	SRD	Fêmea	4 meses	Sugestivo de intoxicação
2012	Felina	SRD	Macho	4 meses	Sugestivo de intoxicação
2012	Felina	SRD	Macho	3 anos	Positivo
2012	Canina	Lhasa Apso	Macho	11 anos	Positivo
2012	Canina	Border Collie	Fêmea	3 anos	Positivo
2012	Canina	SRD	-	1 ano	Positivo
2013	Canina	SRD	Macho	4 anos	Sugestivo de intoxicação
2013	Canina	Pinscher	Fêmea	4 anos	Positivo
2013	Felina	SRD	Macho	Adulto	Sugestivo de intoxicação
2013	Felina	SRD	Macho	Adulto	Sugestivo de intoxicação
2013	Felina	SRD	Fêmea	Adulto	Sugestivo de intoxicação
2013	Felina	SRD	Fêmea	Adulto	Sugestivo de intoxicação
2013	Canina	SRD	Macho	6 anos	Positivo
2013	Felina	SRD	Macho	2 anos	Positivo
2013	Canina	P. de Shetland	Macho	8 meses	Positivo
2013	Felina	SRD	Macho	1 ano	Sugestivo de intoxicação
2013	Felina	SRD	Fêmea	10 anos	Positivo
2013	Canina	Labrador	Fêmea	10 anos	Sugestivo de intoxicação
2013	Felina	SRD	Macho	1 ano	Sugestivo de intoxicação
2013	Felina	SRD	Macho	2 anos	Sugestivo de intoxicação
2013	Felina	SRD	Macho	-	Positivo
2013	Canina	SRD	Fêmea	8 anos	Positivo
2013	Canina	SRD	Fêmea	14 anos	Positivo
2013	Felina	SRD	Fêmea	Adulto	Positivo
2013	Canina	SRD	Macho	7 anos	Sugestivo de intoxicação
2013	Felina	SRD	Macho	2 anos	Positivo
2013	Felina	SRD	Macho	Adulto	Positivo
2013	Felina	SRD	Fêmea	1 ano	Positivo
2013	Felina	SRD	Macho	Adulto	Positivo

2013	Felina	SRD	Fêmea	Adulto	Positivo
2014	Canina	SRD	Macho	8 anos	Positivo
2014	Felina	SRD	Macho	3 anos	Positivo
2014	Felina	SRD	Macho	Adulto	Positivo
2014	Felina	SRD	Macho	10 anos	Sugestivo de intoxicação
2014	Felina	SRD	Macho	1 ano	Positivo
2014	Felina	SRD	Fêmea	5 anos	Positivo
2014	Felina	SRD	Macho	1 ano	Positivo
2014	Felina	SRD	Fêmea	2 anos	Positivo
2014	Felina	SRD	Macho	1 ano	Positivo
2014	Felina	SRD	Macho	1 ano	Positivo
2015	Felina	SRD	Macho	1 ano	Positivo
2015	Canina	Golden Retriever	Macho	-	Positivo
2016	Felina	SRD	Fêmea	9 meses	Positivo
2017	Felina	SRD	Macho	Filhote	Positivo
2017	Felina	SRD	Macho	2 anos	Sugestivo de intoxicação

Fonte: Landi (2020)

SRD = Sem raça definida.

Durante os 10 anos (2009-2018), foram registrados 82 casos suspeitos e confirmados. Dentre esses, 68,3% eram gatos (n=56) e 31,7%, cães (n=26); 56,1% eram machos (n=46), 39% fêmeas (n=32) e 4,9% não identificados ou não registrados.

A maioria dos casos, 58,53% (n=48), foi confirmada positiva no LADTOX. O restante, 41,47% (n=32), provavelmente tinha sinais muito sugestivos de intoxicação, como os grânulos negros em conteúdo estomacal, congestão de múltiplos órgãos, sinais e histórico clínicos compatíveis, mas não foram confirmados.

4.2 – INTOXICAÇÃO EXPERIMENTAL

Os primeiros sinais de intoxicação foram observados após cerca de dois minutos para o aldicarbe e três para o carbofurano. Observamos inicialmente o

andar em círculos, seguido de fasciculação e dispneia. Os animais intoxicados por carbofurano tentaram ficar sobre os membros pélvicos e um pareceu tentar comer a maravalha.

O animal 1 do grupo carbofurano roeu a sonda durante o processo de gavagem, impedindo a total administração da dose. Optamos pela eutanásia antes dos sinais de intoxicação, neste caso. Dessa forma, as lâminas foram montadas com as três amostras dos animais número 1, conforme descrito na seção 3, mas não foram usadas, uma vez que a concentração fornecida ao animal era desconhecida.

4.3 – NECROPSIA

Não foram observadas alterações macroscópicas dignas de nota. Os pulmões de todos estavam acentuadamente congestos e os fígados friáveis, drenando moderada quantidade de sangue ao corte. Essas alterações hepáticas, porém, também são comumente observadas em roedores eutanasiados com CO_2 e foram observadas também nos animais do grupo controle.

Dois animais do grupo aldicarbe apresentaram pequena quantidade de sangue nas pálpebras.

4.3 – AMOSTRAS FIXADAS

As lâminas coradas em H&E foram analisadas e as alterações classificadas quanto à natureza, como hemorragia, congestão e enfisema; distribuição – focal, multifocal, focalmente extenso e difuso; e intensidade, sendo (+) o menos intenso, (++) moderado e (+++) acentuado.

Tabela 2 – Alterações microscópicas observadas nos ratos do grupo controle.

ÓRGÃO	CONTROLE 1	CONTROLE 2	CONTROLE 3	CONTROLE 4	CONTROLE 5
Encéfalo	NDN	NDN	NDN	NDN	NDN
Estômago	NDN	NDN	NDN	NDN	NDN
Rim	NDN	NDN	NDN	NDN	NDN
Pulmão	Congestão difusa +	Congestão difusa +	Congestão difusa +	Congestão difusa +	Congestão difusa +
Baço	NDN	NA	Hematopoiese extramedular	NDN	NDN
Fígado	Congestão difusa ++	Congestão difusa ++	Congestão difusa ++	Congestão difusa ++	Congestão difusa ++
Coração	NDN	NA	Congestão difusa +	NDN	NDN
Pâncreas	NA	NA	NDN	NA	NDN

Fonte: Landi (2020)

Legenda: NDN: nada digno de nota; NA: não analisado.

Tabela 3 – Alterações microscópicas observadas nos ratos intoxicados por aldicarbe

ÓRGÃO	ALDICARBE 1	ALDICARBE 2	ALDICARBE 3	ALDICARBE 4	ALDICARBE 5
Encéfalo	Edema vasogênico difuso +	Edema vasogênico difuso +	NDN	Edema vasogênico difuso +	Edema vasogênico difuso +
Pulmão	Enfisema difuso +++; congestão de grandes vasos ++	Enfisema difuso +++; congestão de grandes vasos ++	Enfisema difuso +++; hemorragia MF ++; congestão alveolar difusa ++	Enfisema difuso +++; hemorragia MF +; congestão alveolar focal ++	Enfisema difuso +++; congestão de grandes vasos ++
Fígado	Congestão centrolobular ++; hemorragia FE ++.	Congestão centrolobular +.	Congestão centrolobular ++; hemorragia FE ++.	Congestão centrolobular +.	Congestão centrolobular +.
Rim	Congestão MF +; hemorragia MF +.	Congestão MF +	Congestão MF +; hemorragia MF +.	Congestão MF +	Congestão MF +
Pâncreas	NDN	NDN	NDN	NDN	NDN
Baço	NA	NDN	NDN	NDN	NDN
Coração	NDN	NDN	NDN	NDN	NDN
Estômago	NDN	NDN	NDN	NDN	NDN

Fonte: Landi (2020)

Legenda: NDN: nada digno de nota; NA: não analisado; MF: multifocal; FE: focalmente extenso.

Tabela 4 – Alterações microscópicas observadas nos ratos intoxicados por carbofurano

ÓRGÃO	CARBOFURANO 1*	CARBOFURANO 2	CARBOFURANO 3	CARBOFURANO 4	CARBOFURANO 5
Encéfalo	NA	Edema vasogênico difuso +	NDN	Edema vasogênico difuso +	Edema vasogênico difuso +
Pulmão	NA	Enfisema difuso +++; congestão de grandes vasos ++	Enfisema difuso +++; hemorragia MF ++; congestão alveolar difusa ++	Enfisema difuso +++; hemorragia MF +; congestão alveolar focal ++	Enfisema difuso +++; congestão de grandes vasos ++
Fígado	NA	Congestão centrolobular +.	Congestão centrolobular ++; hemorragia FE ++.	Congestão centrolobular +.	Congestão centrolobular +.
Rim	NA	Congestão MF +	Congestão MF +; hemorragia MF +.	Congestão MF +	Congestão MF +
Pâncreas	NA	NDN	NDN	NDN	NDN
Baço	NA	NDN	NDN	NDN	NDN
Coração	NA	NDN	NDN	NDN	NDN
Estômago	NA	NDN	NDN	NDN	NDN

Fonte: Landi (2020)

Legenda: NDN: nada digno de nota; NA: não analisado; MF: multifocal; FE: focalmente extenso. *O animal 1 desse grupo não foi analisado por não ter passado pela intoxicação na dose letal.

4.4 – ANÁLISE POR DESI-MSI

Amostras de todos os órgãos selecionados – olho, cérebro, coração, pulmão, estômago, fígado, rim e baço – foram submetidos à análise por DESI em modo negativo para a obtenção do perfil de íons presentes. Os espectros obtidos das amostras dos animais do grupo controle foram usados para eliminar as moléculas que eram comuns aos outros grupos.

De todos os tecidos analisados, somente os fragmentos de estômago apresentaram resultados compatíveis com as massas procuradas. A **Tabela 5** apresenta as moléculas encontradas nos grupos aldicarbe e carbofurano. Nas amostras de fígado obtidas de animais necropsiados no Serviço de Patologia da FMVZ-USP, não foram detectados carbamatos.

Tabela 5: Compostos encontrados nas análises por DESI-MS

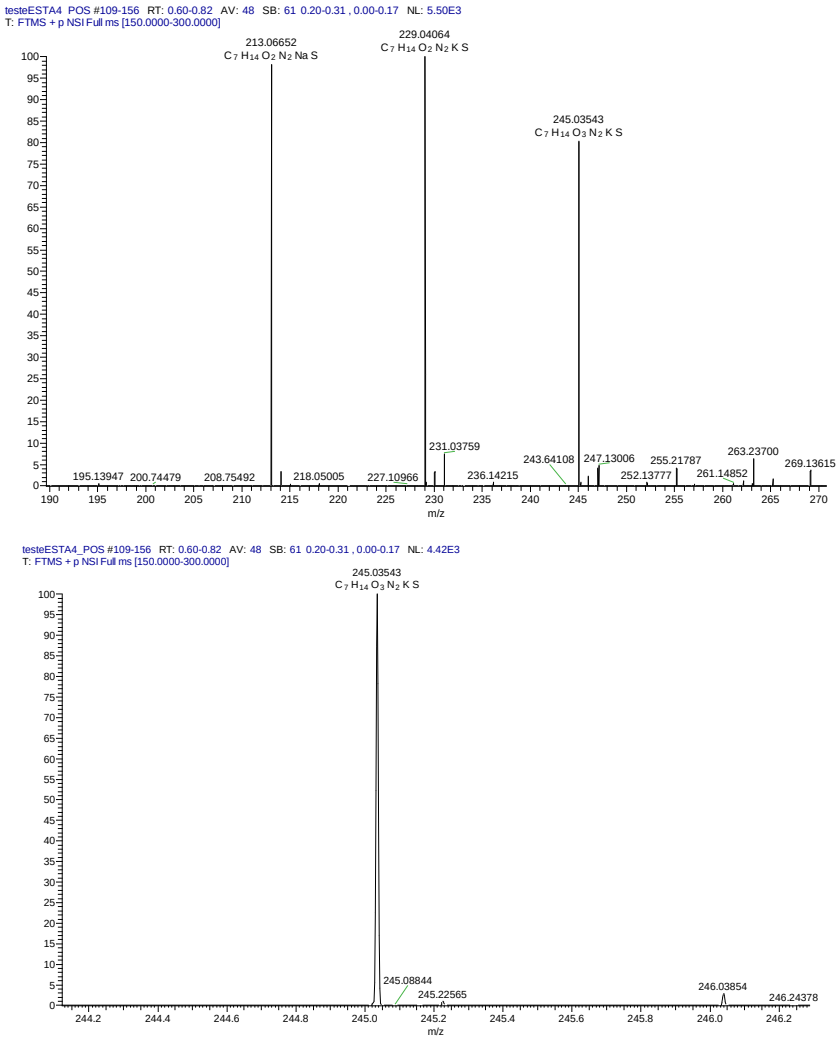
Identificação	Fórmula molecular	Massas experimentais (*m/z*)
Aldicarbe*	$C_7H_{14}N_2O_2S$	213,06652[a]; 229,04064[b]
Sulfóxido de aldicarbe*	$C_7H_{14}N_2O_3S$	245,03543[b]; 229,06140[a]
Carbofurano**	$C_{12}H_{15}O_3N$	222,11221[c]; 244,09411[a]; 260,06824[b]

Fonte: Landi (2020)

Legenda: *encontrados nas amostras do grupo aldicarbe; **encontrado nas amostras do grupo carbofurano; [a]: $[M+Na]^+$; [b]: $[M+K]^+$; [c]: $[M+H]^+$.

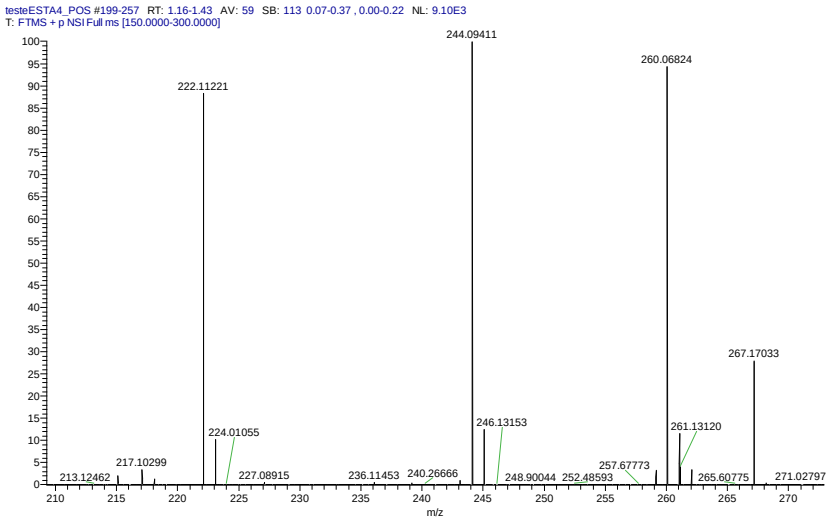
Para cada grupo, um gráfico dos espectros foi gerado demonstrando as abundâncias relativas de cada íon em eixo x e a massa/carga de cada pico em eixo y.

Gráficos 3 e 4: Espectros de (+)-ESI-MS para amostra de estômago de rato intoxicado com aldicarbe.



Fonte: Landi (2020)

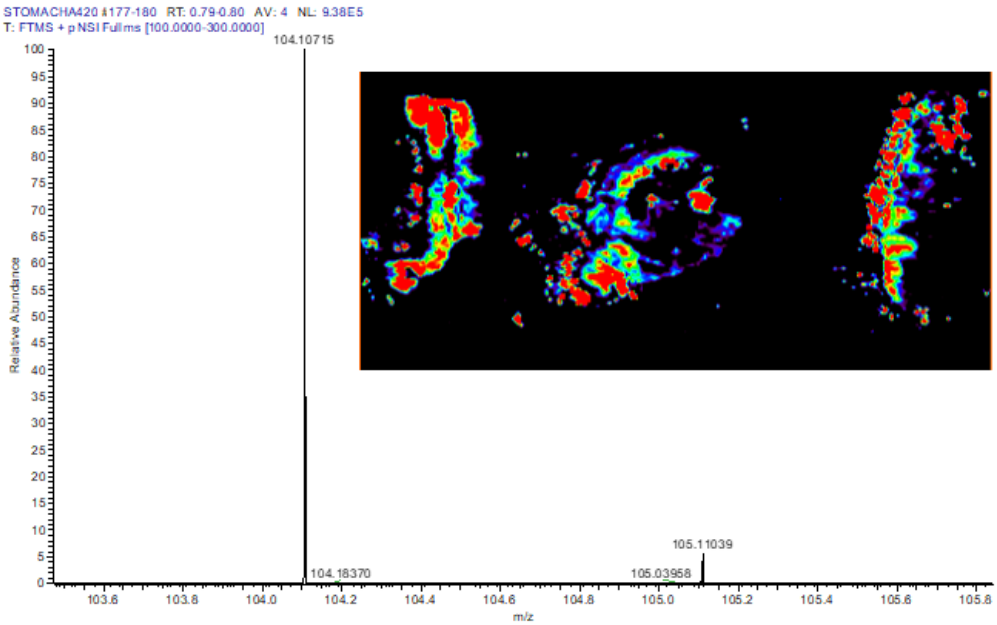
Gráfico 5: Espectros de (+)-ESI-MS para amostra de estômago de rato intoxicado com carbofurano



Fonte: Landi (2020)

Para efeito comparativo, foi produzida uma imagem a partir de um íon que era abundante em todas as três amostras, o m/z 104,10715, como pode ser observado na figura 3.

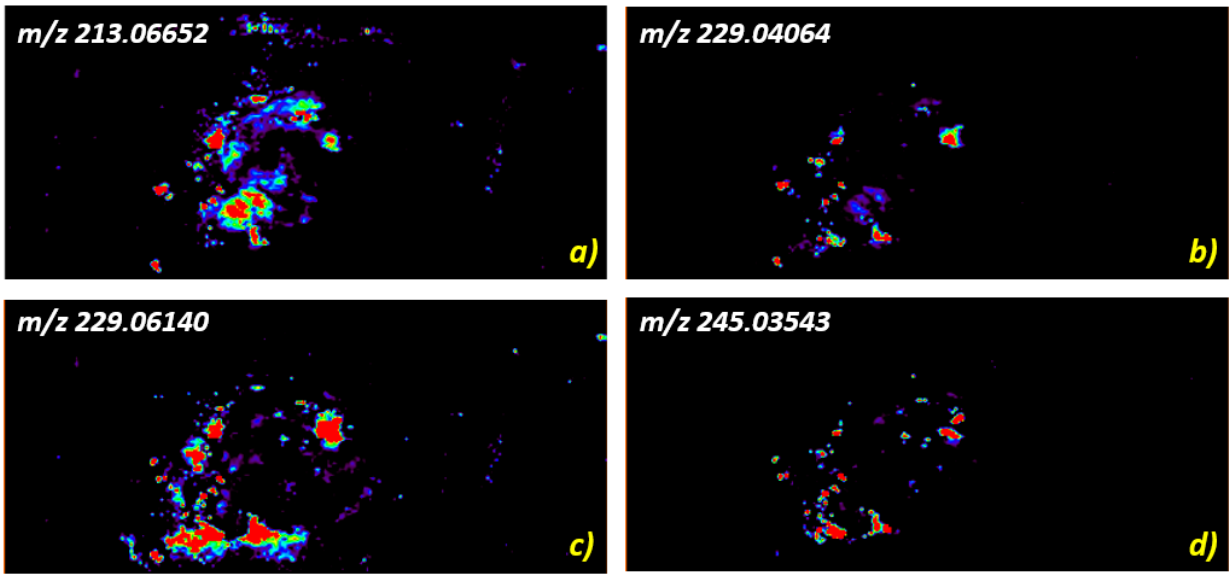
Figura 3: Espectro do íon *m/z* 104,10715 e imageamento por espectrometria de massas (MSI) por DESI de cortes de estômago de animais número 4 do grupo controle, aldicarbe e carbofurano, respectivamente.



Fonte: Landi (2020)

Em seguida, foram obtidas imagens correspondentes às moléculas de interesse que apresentaram os picos já demonstrados anteriormente. A escala de cores de azul a vermelho representa as abundâncias relativas, sendo o azul menos abundante, seguido do verde, amarelo e o vermelho, o mais abundante.

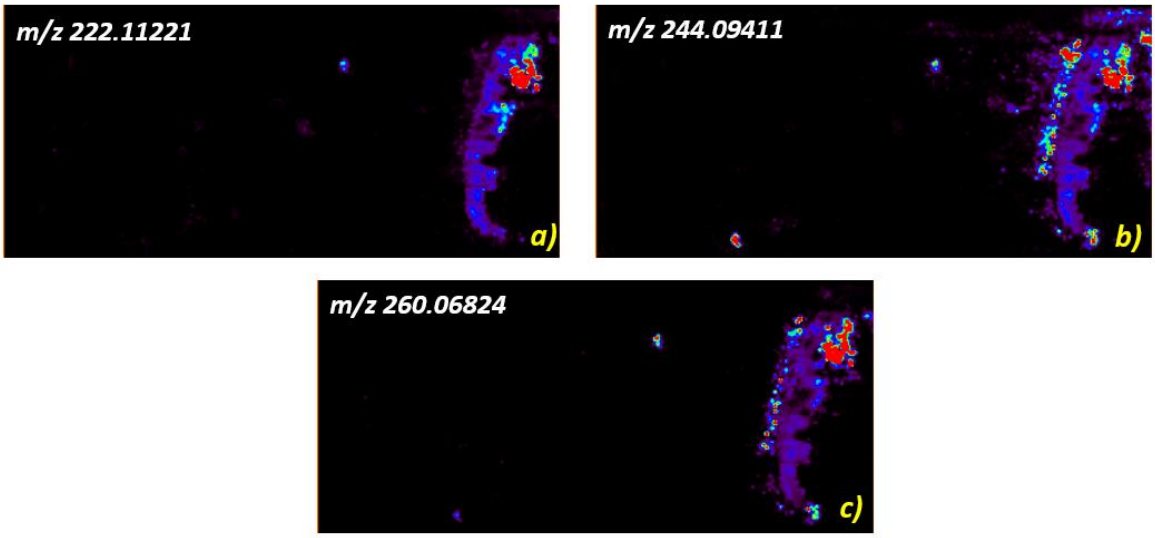
Figura 4: Imageamento por espectrometria de massas (MSI) por DESI de cortes de estômago de animais número 4 do grupo controle, aldicarbe e carbofurano, respectivamente. Os íons dos animais intoxicados com aldicarbe estão selecionados nesta figura.



Fonte: Landi (2020)

Legenda: *a)* aldicarbe $[M+Na]^+$; *b)* aldicarbe $[M+K]^+$; *c)* aldicarbe sulfóxido $[M+Na]^+$; *d)* aldicarbe sulfóxido $[M+K]^+$

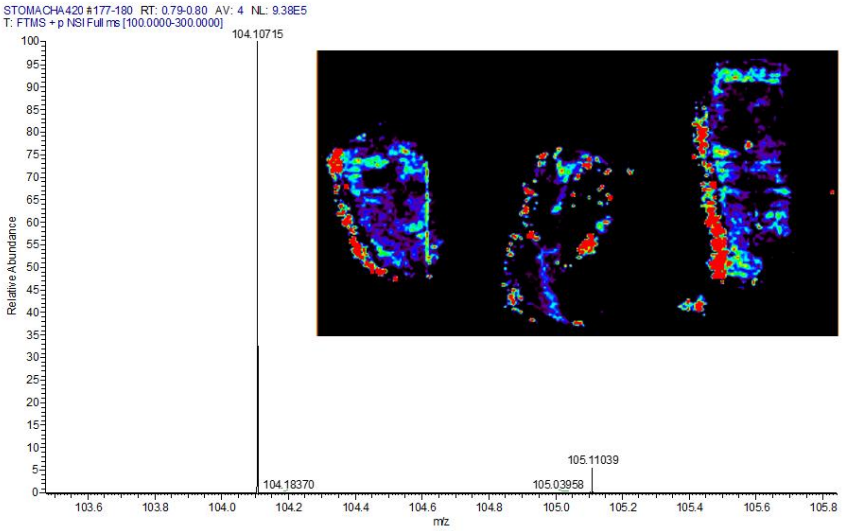
Figura 5: Imageamento por espectrometria de massas (MSI) por DESI de cortes de estômago de animais número 4 do grupo controle, aldicarbe e carbofurano, respectivamente. Os íons dos animais intoxicados com carbofurano estão selecionados nesta figura.



Fonte: Landi (2020)
Legenda: *a)* carbofurano $[M+H]^+$; *b)* carbofurano $[M+Na]^+$; *c)* carbofurano $[M+K]^+$.

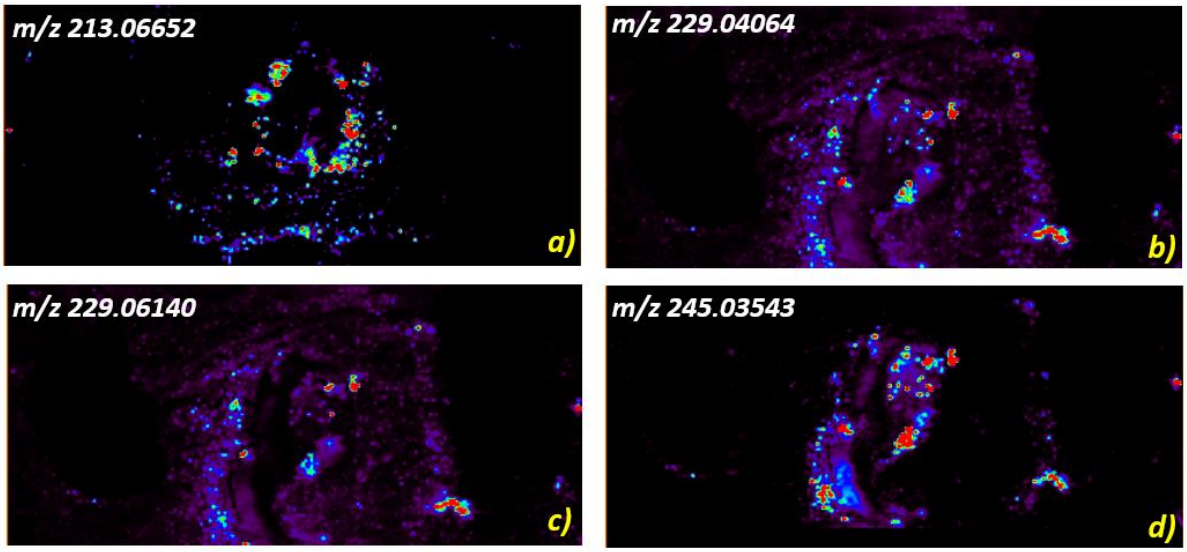
Quanto ao grupo 2, foram obtidos os seguintes resultados:

Figura 6: Espectro do íon m/z 104,10715 e imageamento por espectrometria de massas (MSI) por DESI de cortes de estômago de animais número 2 do grupo controle, aldicarbe e carbofurano, respectivamente.



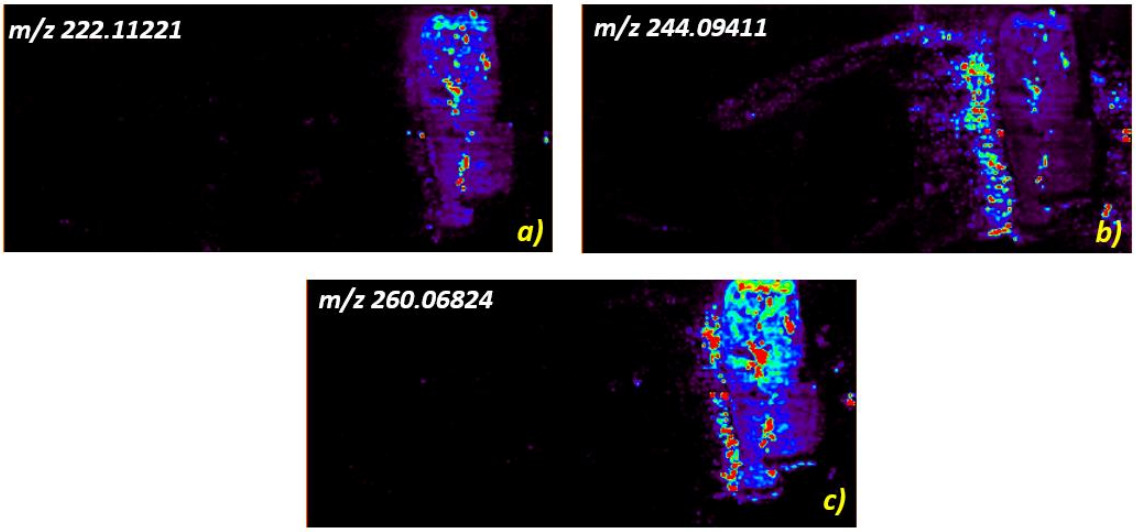
Fonte: Landi (2020)

Figura 7: Imageamento por espectrometria de massas (MSI) por DESI de cortes de estômago de animais número 2 do grupo controle, aldicarbe e carbofurano, respectivamente. Os íons dos animais intoxicados com aldicarbe estão selecionados nesta figura.



Fonte: Landi (2020)
Legenda: *a)* aldicarbe $[M+Na]^+$; *b)* aldicarbe $[M+K]^+$; *c)* aldicarbe sulfóxido $[M+Na]^+$; *d)* aldicarbe sulfóxido $[M+K]^+$

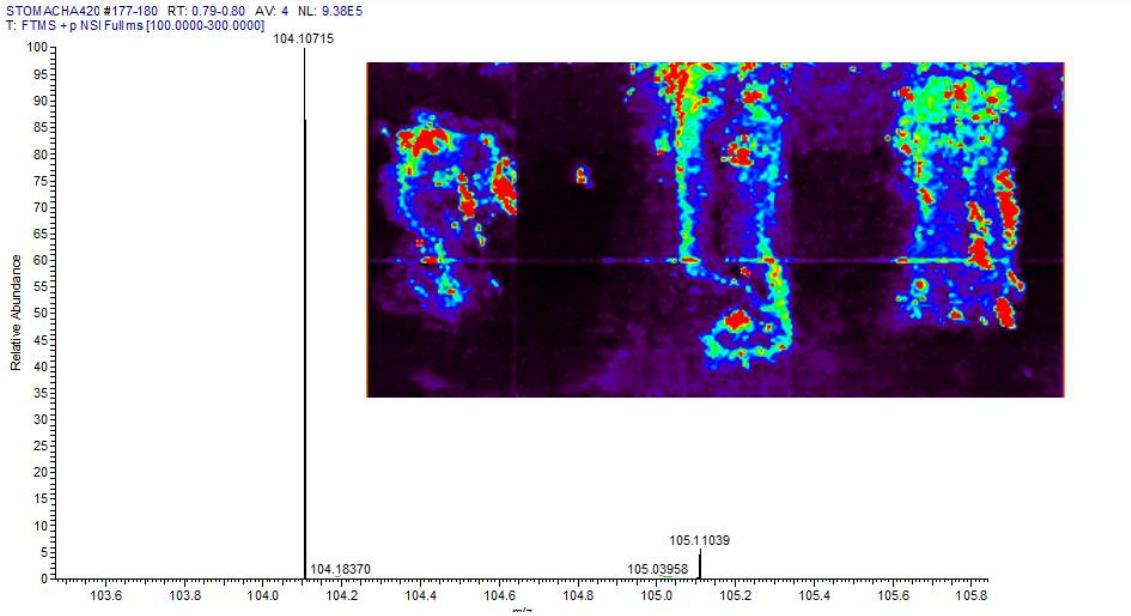
Figura 8: Imageamento por espectrometria de massas (MSI) por DESI de cortes de estômago de animais número 2 do grupo controle, aldicarbe e carbofurano, respectivamente. Os íons dos animais intoxicados com carbofurano estão selecionados nesta figura.



Fonte: Landi (2020)
Legenda: *a)* carbofurano $[M+H]^+$; *b)* carbofurano $[M+Na]^+$; *c)* carbofurano $[M+K]^+$;

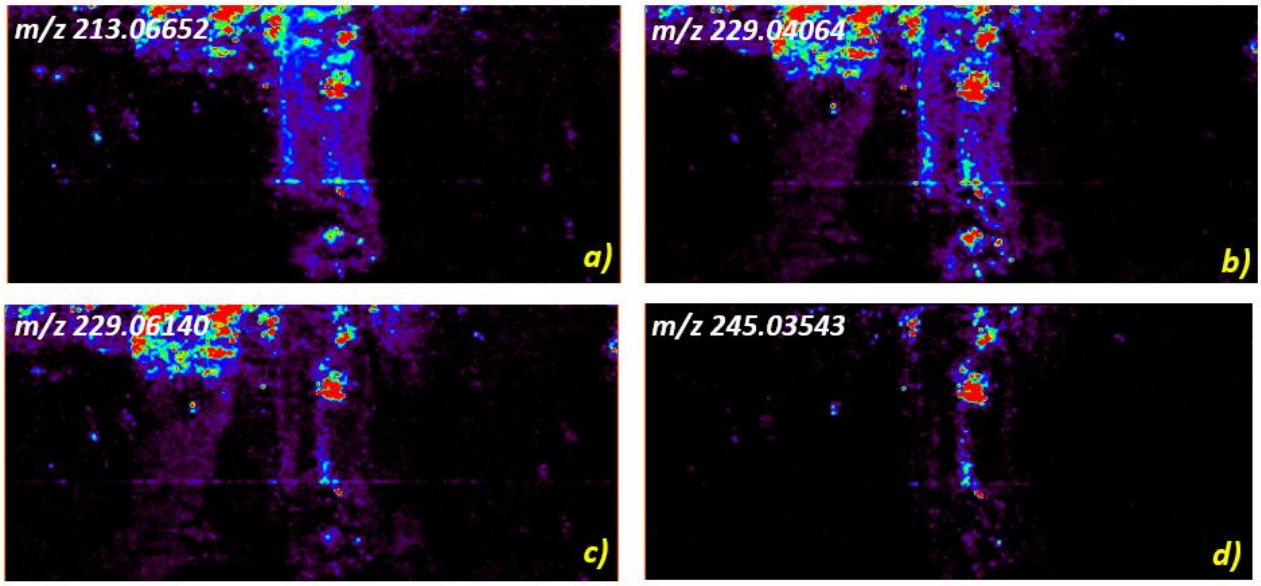
Quanto ao grupo 5, foram obtidos os seguintes resultados:

Figura 9: Espectro do íon m/z 104,10715 e imageamento por espectrometria de massas (MSI) por DESI de cortes de estômago de animais número 5 do grupo controle, aldicarbe e carbofurano, respectivamente.



Fonte: Landi (2020)

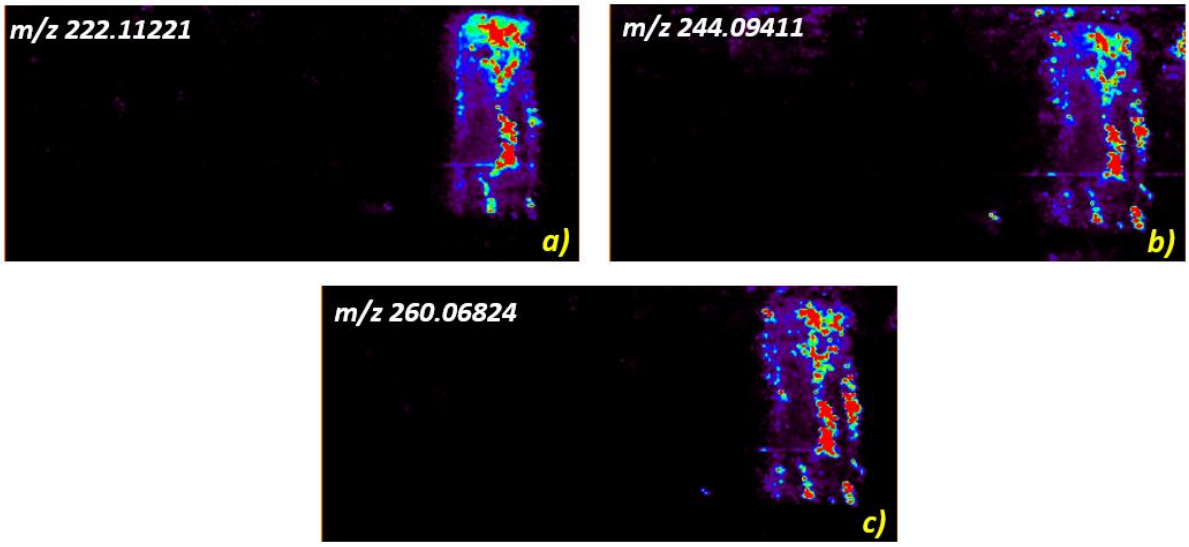
Figura 10: Imageamento por espectrometria de massas (MSI) por DESI de cortes de estômago de animais número 5 do grupo controle, aldicarbe e carbofurano, respectivamente. Os íons dos animais intoxicados com aldicarbe estão selecionados nesta figura.



Fonte: Landi (2020)

Legenda: *a)* aldicarbe $[M+Na]^+$; *b)* aldicarbe $[M+K]^+$; *c)* aldicarbe sulfóxido $[M+Na]^+$; *d)* aldicarbe sulfóxido $[M+K]^+$

Figura 11: Imageamento por espectrometria de massas (MSI) por DESI de cortes de estômago de animais número 5 do grupo controle, aldicarbe e carbofurano, respectivamente. Os íons dos animais intoxicados com carbofurano estão selecionados nesta figura.



Fonte: Landi (2020)
Legenda: *a)* carbofurano $[M+H]^+$; *b)* carbofurano $[M+Na]^+$; *c)* carbofurano $[M+K]^+$.

5. DISCUSSÃO

5 DISCUSSÃO

Os carbamatos, com as suas diversas formulações, são potentes inibidores da enzima acetilcolinesterase e foram inicialmente destinados ao controle de pragas de uso agrícola. No entanto, seu uso irregular como raticida e, posteriormente, para suicídio, homicídio e extermínio de diversas espécies de animais fez com que a Anvisa e o MAPA cancelassem seus registros e proibissem a produção e distribuição dos dois carbamatos mais utilizados, o aldicarbe e o carbofurano, numa tentativa de conter esses riscos à saúde pública.

Mesmo assim, até o ano de 2019, observaram-se casos positivos ou sugestivos de intoxicação exógena de animais enviados para necropsia no Serviço de Patologia Animal do Departamento de Patologia da FMVZ-USP. Muitas vezes, os cadáveres eram enviados pelos proprietários, que provavelmente não podiam ou não queriam arcar com custos da análise, o que justifica, em parte, os resultados sugestivos de intoxicação. Ainda, desde 2018 o Laboratório de Diagnóstico Toxicológico (LADTOX) não realiza mais os testes.

Assim como outros levantamentos realizados no Brasil, a maioria dos animais intoxicados eram gatos. Isso se deve, muito possivelmente, ao comportamento natural dos felinos de passear pelas casas da vizinhança e dos machos de urinar para demarcação de território (DE SIQUEIRA et al., 2012, 2015).

Durante a intoxicação dos ratos para esse trabalho, observamos sinais que podem ser atribuídos ao estímulo de receptores nicotínicos, como a fasciculação e fraqueza e de receptores centrais, como alteração de consciência, convulsão, depressão respiratória e ataxia. Como os sinais clínicos da intoxicação já estão bem descritos em vários trabalhos (FUKUTO, 1990; BARDIN, 1994; SAADEH;

FARSAKH; AL-ALI, 1997; XAVIER; RIGHI; SPINOSA, 2007; DE SIQUEIRA et al., 2015; KING; AARON, 2015; KLAINBART et al., 2019), não pareceu necessário prolongar o estresse do animal, que não estava sob o efeito de anestésicos e sedativos, uma vez que estes fármacos poderiam alterar os resultados das análises. É importante salientar também que, ao contrário de muitas espécies, o rato não é capaz de vomitar (HORN et al., 2013), fazendo com que este sinal comum em cães e gatos não ocorra. O agente emético adicionado aos grânulos em ratos pode provocar náusea, que, nessa espécie, é caracterizada por pica (GOINEAU; CASTAGNÉ, 2016). Um dos ratos intoxicados por carbofurano pareceu tentar comer maravalha, sinal que pode ser interpretado como náusea e, consequentemente, pica.

À necropsia, foram encontradas alterações inespecíficas, como hemorragia e edema pulmonar e congestão de vários órgãos, como já observado e discutido por outros pesquisadores. A hemorragia no pâncreas, já descrita principalmente em felinos, não foi observada. O que, na maioria dos casos, sugere intoxicação por carbamatos nas formulações conhecidas como “chumbinho” é a presença de grânulos enegrecidos em meio ao conteúdo estomacal (XAVIER; RIGHI; SPINOSA, 2007; DE SIQUEIRA et al., 2016; DURÃO; MACHADO, 2016; SIQUEIRA, 2016a). Neste trabalho, mesmo após vigorosa maceração dos grânulos em água filtrada, não houve dissolução completa dos grânulos, que foram observados em meio ao conteúdo estomacal.

As alterações microscópicas corroboram também com achados publicados em outros trabalhos. De Siqueira (2016b) descreveu e quantificou essas lesões. Em comparação com esse trabalho, o estômago, cérebro e pâncreas apresentaram alterações menos intensas; os rins apresentaram alterações semelhantes; e os

pulmões e fígado apresentaram lesões mais intensas. É necessário considerar, entretanto, que essas observações possuem caráter um pouco subjetivas, dependendo dos critérios pessoais de cada patologista. Ainda, pode haver alguma discrepância em relação ao pulmão e fígado que se tornam mais congestos quando submetidos à eutanásia por CO_2.

A técnica de espectrometria de massas com imageamento não é destrutiva, sendo possível fazer a coloração dos tecidos analisados para a comparação entre a imagem produzida e a histologia (PEREZ et al., 2019). Enquanto outras técnicas necessitam destruir moderada quantidade de material para análise, a DESI-MS requer cortes de 10µm (SANTORO et al., 2020) a 14µm, como no presente trabalho. Assim, é possível manter um valioso banco de amostras e tecidos.

Observando as imagens produzidas, é nítido que há maior concentração dos praguicidas na região de mucosa gástrica, definido pelas cores vermelha, amarela e azul. Em alguns casos, parece haver dispersão das moléculas ao redor do fragmento. Isso se deve à própria técnica, que usa um meio líquido, com gotículas sendo aspergidas continuamente, resultando o aspecto de “lavado”. Destaca-se, ainda, que as amostras controle não foram marcadas tanto para o aldicarbe e seu metabólito quanto para o carbofurano, e o fragmentos com praguicidas foram marcados individualmente. Especificamente no animal intoxicado por aldicarbe do grupo 5, é possível notar uma concentração um pouco afastada da mucosa e esta pode ser possivelmente uma contaminação no momento do corte.

Como foi possível observar no capítulo anterior, não foram detectadas moléculas de aldicarbe ou carbofurano em nenhum outro órgão além da mucosa estomacal.

O fígado é considerado um dos tecidos de eleição para a análise toxicológica, principalmente quando não estão disponíveis amostras de sangue, conteúdo estomacal e humor vítreo (DE SIQUEIRA et al., 2016; FUKUSHIMA, 2016; GONÇALVES et al., 2017). Como importante órgão de metabolização de fármacos e toxinas, seria lógico detectar a presença dos carbamatos nesse tecido, mas é necessária a ressalva de que a metabolização dos carbamatos não precisa do citocromo P450 (KLAINBART et al., 2019), uma vez que são rapidamente absorvidos pela mucosa e distribuídos pelo sangue até os seus locais de ação. A hipótese mais coerente é que a morte do animal ocorreu antes da distribuição dos carbamatos a níveis detectáveis pelos tecidos, além da possível distribuição *post mortem* da molécula, uma vez que os animais foram necropsiados imediatamente à eutanásia.

Quanto às amostras armazenadas, nenhuma apresentou traços de aldicarbe, carbofurano ou seus metabólitos. Nesse caso, é possível que as amostras sejam negativas, tenham se degradado ao longo do tempo de armazenamento ou estejam com níveis não detectáveis pela técnica. Outros testes seriam necessários para determinar os limiares máximo e mínimo de detecção.

Metodologias já validadas, como o HPLC-MS e CLAE-DAD (GONÇALVES et al., 2017), podem fornecer valiosas informações acerca das hipóteses levantadas acima, uma vez que são capazes de quantificar os praguicidas nas amostras coletadas.

A análise por DESI-MSI identificou o aldicarbe e um dos seus metabólitos, o sulfóxido de aldicarbe na mucosa gástrica. A partir desse resultado, levantam-se duas hipóteses: houve metabolização do aldicarbe no estômago ou houve processo transformativo no próprio grânulo.

Segundo (FUKUSHIMA, 2016), os grânulos da formulação comercializada como Temik® são compostos de um grânulo de gesso coberto por aldicarbe, um agente emético e odor repulsivo. O autor obteve o perfil da dissolução do Temik® para observar a formação *in vitro* de seus metabólitos em meio ácido, mimetizando a acidez gástrica. Uma das conclusões é que os metabólitos, muito provavelmente, são resultado de síntese em fase sólida e não do contato com o meio ácido. Assim, a hipótese mais provável é a de que houve um processo transformativo nos grânulos previamente à intoxicação. Ainda, a literatura indica que o sulfóxido de aldicarbe é ainda mais tóxico que o aldicarbe, o que contribuiu para o rápido aparecimento dos sinais clínicos de intoxicação.

Quanto ao carbofurano, não foram encontrados metabólitos na mucosa estomacal, o que sugere que foram absorvidos na sua forma original.

A partir dos resultados obtidos, tem-se que a técnica DESI-MSI possui como principais limitações a quantificação ter sua precisão pouco reprodutiva, e trata-se de um equipamento ainda raro no Brasil.

Quanto aos seus potenciais, destacam-se: não é necessária preparação prévia do tecido e uso de muitos reagentes; é feita em temperatura ambiente; é rápido, podendo fornecer informações em tempo real; não necessita de grandes volumes de amostras.

Considerando-se o bom resultado de análises em estômagos mesmo sem conteúdo, é possível sugerir a inserção do órgão nos protocolos de coleta e congelamento, mesmo tendo o animal ou indivíduo apresentado êmese.

6. CONCLUSÕES

6 CONCLUSÕES

Por meio deste trabalho foi possível observar que, apesar da proibição de fabricação e venda de carbamatos, ainda são diagnosticados casos de intoxicações exógenas nos últimos dez anos.

Foi possível, também, corroborar com trabalhos que descrevem achados macro e microscópicos em animais intoxicados por carbamatos.

A partir do experimento, conclui-se que há grande potencial no método analítico por espectrometria de massas com imageamento para diagnóstico forense de intoxicações pelos carbamatos aldicarbe e carbofurano. Mesmo não se tratando de um método que fornece dados quantitativos precisos, a DESI-MS pode ser uma boa técnica para a triagem de casos suspeitos, por ser precisa e rápida.

A partir de intoxicações agudas e letais de ratos wistar pelos praguicidas, determinou-se que o único órgão que apresentou resultado fortemente positivo foi o estômago, mesmo tendo a sua mucosa suavemente lavada com água corrente. Foram detectados aldicarbe e seu metabólito, o sulfóxido de aldicarbe nos animais intoxicados por este praguicida, e somente o carbofurano nos animais deste grupo.

Conclui-se, assim, que o estômago, mesmo vazio, é uma matriz interessante para análise toxicológica.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

ALBERICI, R. M.; VENDRAMINI, P. H.; EBERLIN, M. N. Easy ambient sonic-spray ionization mass spectrometry for tissue imaging. **Analytical Methods**, v. 9, n. 34, p. 5029–5036, 2017. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1039/C7AY00858A>.

ANVISA - AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Gerência de Análise Toxicológica. **Agrotóxicos e Toxicologia: 2107 - Chumbinho (Aldicarbe).** Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/anvisa-esclarece?p_p_id=baseconhecimentoportlet_WAR_baseconhecimentoportlet&p_p_lifecycle=0&p_p_state=normal&p_p_mode=view&p_p_col_id=column-2&p_p_col_pos=1&p_p_col_count=2&_baseconhecimentoportlet_WAR_baseconhecimentoportlet_assuntoId=7&_baseconhecimentoportlet_WAR_baseconhecimentoportlet_conteudoId=2479&_baseconhecimentoportlet_WAR_baseconhecimentoportlet_view=detalhamentos>. Acesso em: 07 jun. 2020.

ANVISA - AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Gerência de Análise Toxicológica. **Nota Técnica Da Reavaliação Do Ingrediente Ativo Aldicarbe.** Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/documents/111215/117797/aldicarbe.pdf/1e2e3d0b-cfe54d5c-ad4d-f3bc58dca316>. Acesso em: 02 nov. 2017.

ANVISA - AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Diretoria de Regulação Sanitária. **Reavaliação Toxicológica do Ingrediente Ativo Carbofurano.** Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/documents/219201/2782895/Relat%C3%B3rio+GGTOX+Carbofurano/11 9beb37-32cd-4265-94d9-0a389c9423ae>. Acesso em: 02 nov. 2017.

BARDIN, P. G. Organophosphate and Carbamate Poisoning. **Archives of Internal Medicine**, v. 154, n. 13, p. 1433, 11 jul. 1994. Disponível em: <http://archinte.jamanetwork.com/article.aspx?doi=10.1001/archinte.1994.00420130020005>.

BENNET, R. V.; GAMAGE, C. M.; FERNÁNDEZ, F. M. Imaging of Biological Tissues by Desorption Electrospray Ionization Mass Spectrometry. **Journal of Visualized Experiments**, n. 77, 2013. Disponível em: <http://www.jove.com/video/50575/imaging-biological-tissues-desorption-electrospray-ionization-mass>.

DE SIQUEIRA, A. et al. Non-accidental injuries found in necropsies of domestic cats: a review of 191 cases. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v. 14, n. 10, p. 723–728, 13 out. 2012. Disponível em: <http://journals.sagepub.com/doi/10.1177/1098612X12451374>.

DE SIQUEIRA, A. et al. Poisoning of cats and dogs by the carbamate pesticides aldicarb and carbofuran. **Research in Veterinary Science**, v. 102, p. 142–149, out. 2015. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0034528815300357>.

DE SIQUEIRA, A. et al. Exhumation of Wistar rats experimentally exposed to the carbamate pesticides aldicarb and carbofuran: A pathological and toxicological study. **Experimental and Toxicologic Pathology**, v. 68, n. 6, p. 307–314, jun. 2016. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0940299316300215>.

DURÃO, C.; MACHADO, M. P. Death by chumbinho: aldicarb intoxication—regarding a corpse in decomposition. **International Journal of Legal Medicine**, v. 130, n. 4, p. 981–983, 25 jul. 2016. Disponível em: <http://link.springer.com/10.1007/s00414-016-1336-1>.

FUKUSHIMA, A. R. **Desenvolvimento de métodos analíticos com finalidade forense aplicados à medicina veterinária legal: ênfase na identificação de agentes anticolinesterásicos**. 2016. Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016. Disponível em: <http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/10/10133/tde-04032016-150046/>.

FUKUTO, T. R. Mechanism of action of organophosphorus and carbamate insecticides. **Environmental Health Perspectives**, v. 87, p. 245–254, 1990.

GOINEAU, S.; CASTAGNÉ, V. Comparison of three preclinical models for nausea and vomiting assessment. **Journal of Pharmacological and Toxicological Methods**, v. 82, p. 45–53, 2016. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.vascn.2016.07.006>.

GONÇALVES, V. et al. Development and validation of carbofuran and 3-hydroxycarbofuran analysis by high-pressure liquid chromatography with diode array detector (HPLC-DAD) for forensic Veterinary Medicine. **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 1065–1066, p. 8–13, 2017.

HORN, C. C. et al. Why Can't Rodents Vomit? A Comparative Behavioral, Anatomical, and Physiological Study. **PLoS ONE**, v. 8, n. 4, 2013.

KING, A. M.; AARON, C. K. Organophosphate and Carbamate Poisoning. **Emergency Medicine Clinics of North America**, v. 33, n. 1, p. 133–151, 2015.

KLAINBART, S. et al. Clinical manifestations , laboratory fi ndings , treatment and outcome of acute organophosphate or carbamate intoxication in 102 dogs : Aretrospective study. **The Veterinary Journal**, v. 251, p. 105349, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2019.105349>.

PEREZ, C. J. et al. Review and perspectives on the applications of mass spectrometry imaging under ambient conditions. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 33, n. S3, p. 27, 2 jul. 2019. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/rcm.8145>.

SAADEH, A. M.; FARSAKH, N. A.; AL-ALI, M. K. Cardiac manifestations of acute carbamate and organophosphate poisoning. **Heart**, v. 77, n. 5, p. 461–464, 1997.

SANTORO, A. L. et al. In Situ DESI-MSI Lipidomic Profiles of Breast Cancer Molecular Subtypes and Precursor Lesions. **Cancer Research**, v. 80, n. 6, p. 1246–1257, 15 mar. 2020. Disponível em: <http://cancerres.aacrjournals.org/lookup/doi/10.1158/0008-5472.CAN-18-3574>.

SIQUEIRA, A. de. **Avaliação dos efeitos tóxicos dos carbamatos: I. Modelo experimental em ratos Wistar e comparação com a intoxicação exógena**

intencional em gatos e cães; II. Análise de estabilidade dos compostos e dos seus efeitos nos post mortem imediato e em a. 2016b. Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016. Disponível em: <http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/10/10133/tde-31082015-142508/>.

TINSON E, BOLLER E, D. M. A suspected case of intermediate syndrome in a dog with carbamate toxicosis. **Australian Veterinary Journal**, v. 95, n. 6, p. 201–206, 2017.

VALE, A.; LOTTI, M. **Organophosphorus and carbamate insecticide poisoning**. 1. ed. [s.l.] Elsevier B.V., 2015. v. 131

XAVIER, F. G. et al. Cromatografia em camada delgada para o diagnóstico da intoxicação por aldicarb ("chumbinho") em cães e gatos. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 59, n. 5, p. 1231–1235, out. 2007. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-09352007000500020&lng=pt&tlng=pt>.

XAVIER, F. G.; RIGHI, D. A.; DE SOUZA SPINOSA, H. Fatal poisoning in dogs and cats - A 6 - year report in a veterinary pathology service. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 44, n. 4, p. 304–309, 2007.

XAVIER, F. G.; RIGHI, D. A.; SPINOSA, H. de S. Toxicologia do praguicida aldicarb ("chumbinho"): aspectos gerais, clínicos e terapêuticos em cães e gatos. **Ciência Rural**, v. 37, n. 4, p. 1206–1211, 2007.