



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA  
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

**DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIA PARA DETERMINAÇÃO DE  
MONOFLUOROACETATO EM ESPÉCIES VEGETAIS**

Camila Letícia Ferreira

Matrícula 140017917

Professor Orientador: Maurício Homem de Mello

BRASÍLIA 2018

Camila Letícia Ferreira

Matrícula 140017917

**DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIA PARA DETERMINAÇÃO DE  
MONOFLUOROACETATO EM ESPÉCIES VEGETAIS**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Graduação em Farmácia da Universidade de Brasília, como requisito parcial para obtenção do Título de Bacharela em Farmácia.

Professor orientador: Maurício Homem de Mello

BRASÍLIA 2018

Camila Letícia Ferreira

Matrícula 140017917

**DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIA PARA DETERMINAÇÃO DE  
MONOFLUOROACETATO EM ESPÉCIES VEGETAIS**

BANCA EXAMINADORA

---

Professor orientador: Maurício Homem de Mello

Faculdade de Ciências da Saúde

Universidade de Brasília

---

Avaliador: Diegue Henrique Nascimento Martins

Faculdade de Ciências da Saúde

Universidade de Brasília

BRASÍLIA 2018

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço primeiramente a minha mãe, Maria Neusa, a minha maior fonte de incentivo para a busca do conhecimento e melhor exemplo de força e altruísmo, pois mesmo com todas as dificuldades sempre me proporcionou os subsídios necessários para que eu continuasse estudando. Agradeço também a todos os outros membros da minha família que me deram apoio e incentivo.

Aos meus amigos, principalmente aqueles que me ajudaram a superar a distância da família, propiciando momentos felizes e me acolhendo sempre que a ansiedade falava alto demais.

Aos responsáveis, técnicos, e alunos dos Laboratórios de Controle de Qualidade de Medicamentos e Produtos Naturais, que me auxiliaram no desenvolvimento dos experimentos.

Agradeço a todos os professores que souberam passar com dedicação e didática o conhecimento necessário para minha formação, em especial, meu orientador e amigo Maurício Homem de Mello.

## RESUMO

As intoxicações veterinárias causadas pelas espécies do gênero *Palicourea* são provocadas pela presença de monofluoroacetato (MFA), principalmente, nas folhas dessas plantas, e dessa forma, produzem impacto econômico para a pecuária nacional. O desenvolvimento de metodologia capaz de quantificar o MFA é um importante passo para o estudo toxicológico dessas espécies. Assim, o presente estudo objetivou desenvolver metodologia analítica para quantificação dessa substância nas espécies vegetais *Palicourea marcgravii* e *Palicourea aeneofusca*. Ao longo do estudo algumas técnicas para a extração do analito foram desenvolvidas com base em metodologias disponíveis na literatura, até chegar a uma metodologia capaz de detectar e quantificar o MFA. Amostras das folhas secas e pulverizadas foram maceradas com água, liofilizadas para a concentração do analito e submetidas à extração em fase sólida (SPE) antes de serem analisadas por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) utilizando uma coluna que combina cromatografia por troca iônica e cromatografia por exclusão. Os resultados conseguiram detectar e quantificar a substância em todas as amostras analisadas, no entanto, esses resultados tiveram uma variação grande entre as replicatas, bem como os resultados das amostras contendo o padrão, impossibilitando o cálculo da porcentagem de recuperação do método. Assim, o estudo não chegou a um consenso sobre a concentração do MFA nessas espécies. No entanto, é provável que se aprimorada, a metodologia consiga obter resultados reprodutíveis. Para isso, sugestões foram apresentadas para futuros estudos, como o aumento do conteúdo das colunas de SPE e mudanças na etapa de separação das fases do extrato. Espera-se que a metodologia contribua para os estudos de toxicidade do MFA.

**Palavras-chave:** *Palicourea marcgravii*, *Palicourea aeneofusca*, MFA, SPE, CLAE.

## ABSTRACT

The veterinary poisoning caused by species of the genus *Palicourea* is caused by the presence of monofluoroacetate (MFA), mainly in the leaves of these plants, producing economic impact for the national livestock. The development of a methodology capable of quantifying MFA is an important step for the toxicological study of these species. Thus, the present study aimed to develop an analytical methodology for quantification of this substance in *Palicourea marcgravii* and *Palicourea aeneofusca* species. Throughout the study some techniques for the extraction of the analyte were developed based on methodologies available in the literature, until achieving a methodology capable of detecting and quantifying the MFA. Samples of the dried and powdered leaves were macerated with water, lyophilized for analyte concentration and subjected to solid phase extraction (SPE) before being analyzed by high performance liquid chromatography (HPLC) using a column which combines ion exchange chromatography and exclusion chromatography. The results were able to detect and quantify the substance in all analyzed samples, however, these results had a large variation between the replicates, as well as the results of the samples containing the standard, making it impossible to calculate percent recovery. Thus, the study did not reach a consensus on the concentration of the MFA in these species. However, it is likely that if the methodology is improved, the methodology can achieve reproducible results. To this end, suggestions were presented for future studies, such as the increase of SPE column contents and changes in the step of phase separation of the extract. The methodology is expected to contribute to the toxicity studies of the MFA.

**Keywords:** *Palicourea marcgravii*, *Palicourea aeneofusca*, MFA, SPE, CLAE.

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> <i>Palicourea marcgravii</i> .....	14
<b>Figura 2.</b> <i>Palicourea aeneofusca</i> .....	15
<b>Figura 3.</b> Monofluoroacetato (MFA) se liga à coenzima A (CoA), levando a formação do fluorocitrato. ....	16
<b>Figura 4.</b> Fluorocitrato inibe competitivamente aconitase no ciclo de Krebs. ....	17
<b>Figura 5.</b> Fluxograma representativo da extração do MFA para as espécies <i>P. marcgravii</i> e <i>P. aeneofusca</i> com extração em ácido fosfórico (H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> ) 0,02 M e homogeneização em Ultra-turrax. ....	29
<b>Figura 6.</b> Fluxograma representativo da extração do MFA para as espécies <i>P. marcgravii</i> e <i>P. aeneofusca</i> com extração em ácido fosfórico (H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> ) 0,02 M e sem homogeneização em Ultra-turrax. ....	30
<b>Figura 7.</b> Fluxograma representativo da extração do MFA para as espécies <i>P. marcgravii</i> e <i>P. aeneofusca</i> com extração em água e agitação em agitador orbital. ....	31
<b>Figura 8.</b> Fluxograma representativo da extração do MFA para as espécies <i>P. marcgravii</i> e <i>P. aeneofusca</i> com extração em água, agitação em agitador orbital, liofilização e SPE. ...	32
<b>Figura 9.</b> Passos para extração em fase sólida (SPE) sem retenção. O cartucho é preenchido com o sorvente sílica C-18, e nesse tipo de extração o composto de interesse (polar) sai com a lavagem enquanto o contaminante fica retido na coluna.....	33
<b>Figura 10.</b> Imagem da SPE realizada na “Extração 4”. Etapa de adição da amostra nos cartuchos de SPE acoplados ao <i>manifold</i> . ....	34
<b>Figura 11.</b> Diluições dos pontos da curva analítica do MFA a partir da solução mãe (SM). .....	35
<b>Figura 12.</b> Cromatógrafo líquido de alta eficiência, modelo LaChrom Elite (Hitachi, Tóquio, Japão). ....	37

<b>Figura 13.</b> Cromatógrafo líquido de ultra alta eficiência, modelo UltiMate 3000 (Thermo Scientific™ Dionex™, Sunnyvale, CA, EUA). .....	37
<b>Figura 14.</b> Curva analítica para determinação do MFA. ....	38
<b>Figura 15.</b> Perfil cromatográfico do MFA na concentração (A) 25 µg/mL, (B) 200 µg/mL e (C) 1600 µg/mL em 210 nm. ....	39
<b>Figura 16.</b> Cromatograma referente à análise da <i>P. aeneofusca</i> submetida à "Extração 1". .....	40
<b>Figura 17.</b> Cromatograma referente à análise da <i>P. marcgravii</i> submetida à "Extração 1". .....	40
<b>Figura 18.</b> Cromatograma referente à análise da <i>P. aeneofusca</i> submetida à "Extração 2". .....	41
<b>Figura 19.</b> Cromatograma referente à análise da <i>P. marcgravii</i> submetida à "Extração 2". .....	42
<b>Figura 20.</b> Cromatogramas da curva analítica do MFA sobrepostos. ....	42
<b>Figura 21.</b> Cromatograma referente à análise da <i>P. aeneofusca</i> submetida à "Extração 3". .....	43
<b>Figura 22.</b> Cromatograma referente à análise da <i>P. marcgravii</i> submetida à "Extração 3". .....	44
<b>Figura 23.</b> Cromatogramas sobrepostos do ponto 400 µg/mL e as três primeiras frações desse ponto após SPE. A segunda fração é que contém a maior parcela do MFA.....	45
<b>Figura 24.</b> Curva analítica do MFA, em triplicata, referente ao quarto ensaio. $R^2 = 0,99$ ..	47
<b>Figura 25.</b> Cromatograma do Branco 2. A presença do pico é indicativa de efeito residual "carry over" .....	47
<b>Figura 26.</b> Cromatograma referente à análise da <i>P. marcgravii</i> submetida à "Extração 4". É possível observar a presença do perfil cromatográfico do MFA. ....	48



**Figura 27.** Cromatograma referente à análise da *P. aeneofusca* submetida à "Extração 4".

É possível observar a presença do perfil cromatográfico do MFA. .... 48

## ÍNDICE DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Detecção e quantificação do MFA em amostras de <i>P. marcgravii</i> e <i>P. aeneofusca</i> .....	49
<b>Tabela 2.</b> Detecção e quantificação do MFA em amostras de <i>P. marcgravii</i> e <i>P. aeneofusca</i> contendo padrão.....	50

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

**APCI-MS:** Espectrômetro de Massas com Ionização Química à Pressão Atmosférica

**ATP:** Adenosina trifosfato

**CE:** Cromatografia por Exclusão

**CG:** Cromatografia Gasosa

**CLAE:** Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

**CLC:** Cromatografia Líquida Clássica

**CTI:** Cromatografia por Troca Iônica

**CoA:** Coenzima A

**DAD:** Detector de Arranjo de Diodos

**ELL:** Extração Líquido-Líquido

**<sup>19</sup>F RMN:** Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear de Flúor

**MFA:** Monofluoracetato

**SPE:** Extração em Fase Sólida

**UV-Vis:** Ultravioleta visível

## SUMÁRIO

<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>13</b>
1.1 Gênero <i>Palicourea</i> .....	13
1.2 Monofluoroacetato (MFA).....	15
1.3 Epidemiologia das intoxicações veterinárias .....	18
1.4 Quantificação do MFA .....	20
1.5 Técnicas Analíticas .....	21
1.5.1 Amostragem e Preparo de amostras .....	21
1.5.2 Extração em Fase Sólida .....	22
1.5.3 Técnicas Cromatográficas .....	23
1.5.4 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) .....	24
<b>2. JUSTIFICATIVA .....</b>	<b>26</b>
<b>3. OBJETIVOS .....</b>	<b>27</b>
2.1 Objetivo geral.....	27
2.2 Objetivos específicos .....	27
<b>4. METODOLOGIA.....</b>	<b>28</b>
4.1 Amostragem.....	28
4.2 Extração do MFA.....	28
4.2.1 Extração 1.....	28
4.2.2 Extração 2.....	29
4.2.3 Extração 3.....	30

4.2.3 Extração 4.....	31
4.3 Preparação da Curva Analítica.....	34
4.4 Análise Cromatográfica .....	35
<b>5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>38</b>
5.1 Análise da primeira extração do MFA.....	38
5.2 Análise da segunda extração do MFA .....	41
5.3 Análise da terceira extração do MFA .....	43
5.4 Análise da quarta extração do MFA .....	44
<b>6. CONCLUSÕES.....</b>	<b>51</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>52</b>
<b>ANEXO.....</b>	<b>55</b>

## INTRODUÇÃO

### 1.1 Gênero *Palicourea*

O gênero *Palicourea* pertence à família Rubiaceae e conta com cerca de 200 espécies distribuídas nos trópicos do Novo Mundo, variam de arbustos a árvores de pequeno porte, sendo encontradas na vegetação de baixo nível de florestas tropicais. As flores do gênero *Palicourea* possuem tubos bem desenvolvidos e não possuem odor, além disso, possuem cores vivas, sendo polinizadas por beija-flores e seus frutos (azuis, roxo enegrecido) dispersos por pássaros. (TAYLOR, 2009)

Entre as várias espécies de *Palicourea* algumas se destacam por serem letalmente tóxicas, principalmente para animais como o gado, produzindo impacto econômico negativo para a pecuária. São exemplos a *Palicourea marcgravii*, que possui ampla distribuição no Brasil, e a *Palicourea aeneofusca*, com presença mais limitada no território brasileiro. Os casos de morte súbita causada pela ingestão dessas plantas têm como principal agente tóxico a presença de monofluoracetato (MFA) em suas folhas e frutos, o que tem levado a pesquisas de quantificação dessa substância e busca por possíveis tratamentos, uma vez que a mortalidade chega perto de 100% nas intoxicações veterinárias, com a prevenção ainda sendo a melhor opção (TOKARNIA *et al*, 2002; TOKARNIA *et al*, 2012).

A *P. marcgravii* (Figura 1) é caracterizada como um arbusto de 2m de altura aproximadamente, ramos secundários cilíndricos, os terminais compridos, angulosos, delgados, de cor vermelha escura ao secar, com superfície lisa ou levemente pubescentes na parte superior, estípulas agudas, triangulares, soldadas na base. As folhas possuem pecíolo curto, com penugens quando novas, opostas (no mesmo nó em oposição uma da outra), oblongas, longamente acuminadas na parte superior. Inflorescências em panícula,

com flores tubulosas amareladas na base e azul-arroxeadas na parte superior. Os frutos com bagas biloculares são de início avermelhados e depois arroxeados. É conhecida popularmente como “erva-de-rato verdadeira” (outras plantas possuem “erva-de-rato” como nome popular), “cafezinho”, “café bravo”, “erva café”, “roxa”, “roxinha”, “roxona”. Tem distribuição em todo território brasileiro com exceção da região sul. A intoxicação do gado por esta planta é conhecida desde o século XVII (BLANCO *et al*, 2004; OLIVEIRA, 2017).



Figura 1. *Palicourea marcgravii*.

(Fonte: Adaptado de COOK, 2014)

A espécie *P. aeneofusca* (Figura 2), menos descrita que a *P. marcgravii*, consiste em um arbusto presente principalmente na região litorânea do nordeste brasileiro, como Zona da Mata de Pernambuco, leste da Bahia e Alagoas. Possui como nome popular “erva-de-rato” e “papaconha”. O seu habitat é matas úmidas e fechadas. Apresenta boa palatabilidade, pois há indícios de que os bovinos a ingerem sem fome, em qualquer época do ano, o mesmo se aplica para a *P. marcgravii* (TOKARNIA *et al*, 2012; VASCONCELOS *et al*, 2008).



Figura 2. *Palicourea aeneofusca*.

(Fonte: Adaptado de COOK, 2014)

## 1.2 Monofluoroacetato (MFA)

O monofluoroacetato, ou fluoroacetato ( $\text{FC}_2\text{H}_2\text{O}_2$ ) normalmente encontrado como o sal monofluoroacetato de sódio ( $\text{NaFC}_2\text{H}_2\text{O}_2$ ) é caracterizado como cristais incolores, sem odor, solúvel em água ( $25^\circ\text{C}$ ) e etanol, com ponto de fusão a  $35,2^\circ\text{C}$  e ponto de ebulição a  $168^\circ\text{C}$ . Pode ser absorvido por via inalatória, pela epiderme (a pele intacta dificilmente absorve, mas é importante a precaução, especialmente quando manipulado em conjunto com compostos lipofílicos) e por meio da ingestão. É altamente tóxico na ocorrência de exposição (PUBCHEM, 2017; MAYNARD, 1949).

Considerado um potente veneno, pode ser encontrado naturalmente em plantas que o produzem como um metabólito secundário (produtos presentes nas plantas que não são necessariamente vitais a sobrevivência desses organismos), e é também sintetizado, conhecido comercialmente como “1080”. A síntese, comercialização e utilização do MFA são proibidas pela Organização Mundial da Saúde, no entanto, ainda é utilizado em países como México e Israel como pesticida. Os Estados Unidos fazem uso restrito da substância como protetor de criações (EASON, 2002; DAVID *et al*, 1977).



Os efeitos tóxicos e mecanismos de toxicidade do MFA encontrado em plantas e do “1080” são basicamente os mesmos. Sinais tóxicos aparecem entre 30 minutos e 3 horas após a exposição, sendo que concentrações abaixo daquela considerada tóxica (0,3-0,7 mg/kg em caprinos e 0,15-0,62 mg/kg em bovinos) provoca sintomas mais amenos e os animais conseguem se recuperar em até quatro dias. No entanto, já foi visto o efeito cumulativo do MFA, portanto, em doses pequenas repetidas o efeito tóxico é aumentado gradativamente. Doses letais provocam efeitos graves com morte por insuficiência cardíaca ou respiratória (EASON, 2002; COLLICCHIO-ZUANAZE & SAKATE, 2005).

O MFA é metabolizado em fluorocitrato pelo organismo na chamada “síntese letal”, ele se liga à coenzima A (CoA) formando fluoroacetil-CoA, que substitui o acetil CoA no ciclo de Krebs (Figura 3). A fluoroacetil-CoA conjuga-se com o oxaloacetato e reage com a enzima citrato sintase para produzir fluorocitrato (Figura 3). O fluorocitrato, por sua vez, inibe competitivamente a aconitase, impedindo que o citrato seja convertido em isocitrato (Figura 4). Dessa forma, há um acúmulo de citrato nos tecidos e um decréscimo na produção de adenosina trifosfato (ATP) em até 50%. Processos metabólicos dependentes de energia ficam comprometidos (COLLICCHIO-ZUANAZE & SAKATE, 2005).

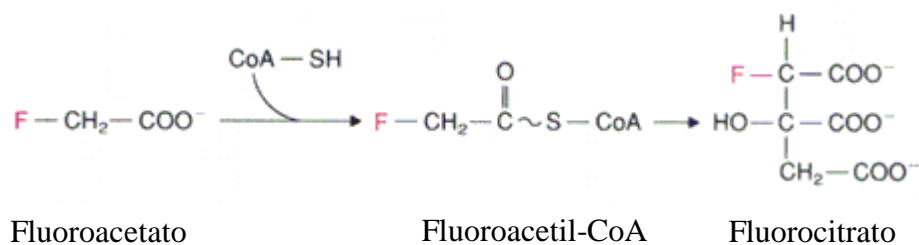


Figura 3. Monofluoroacetato (MFA) se liga à coenzima A (CoA), levando a formação do fluorocitrato.

(Fonte: Adaptado de CHHABRA, 2015)

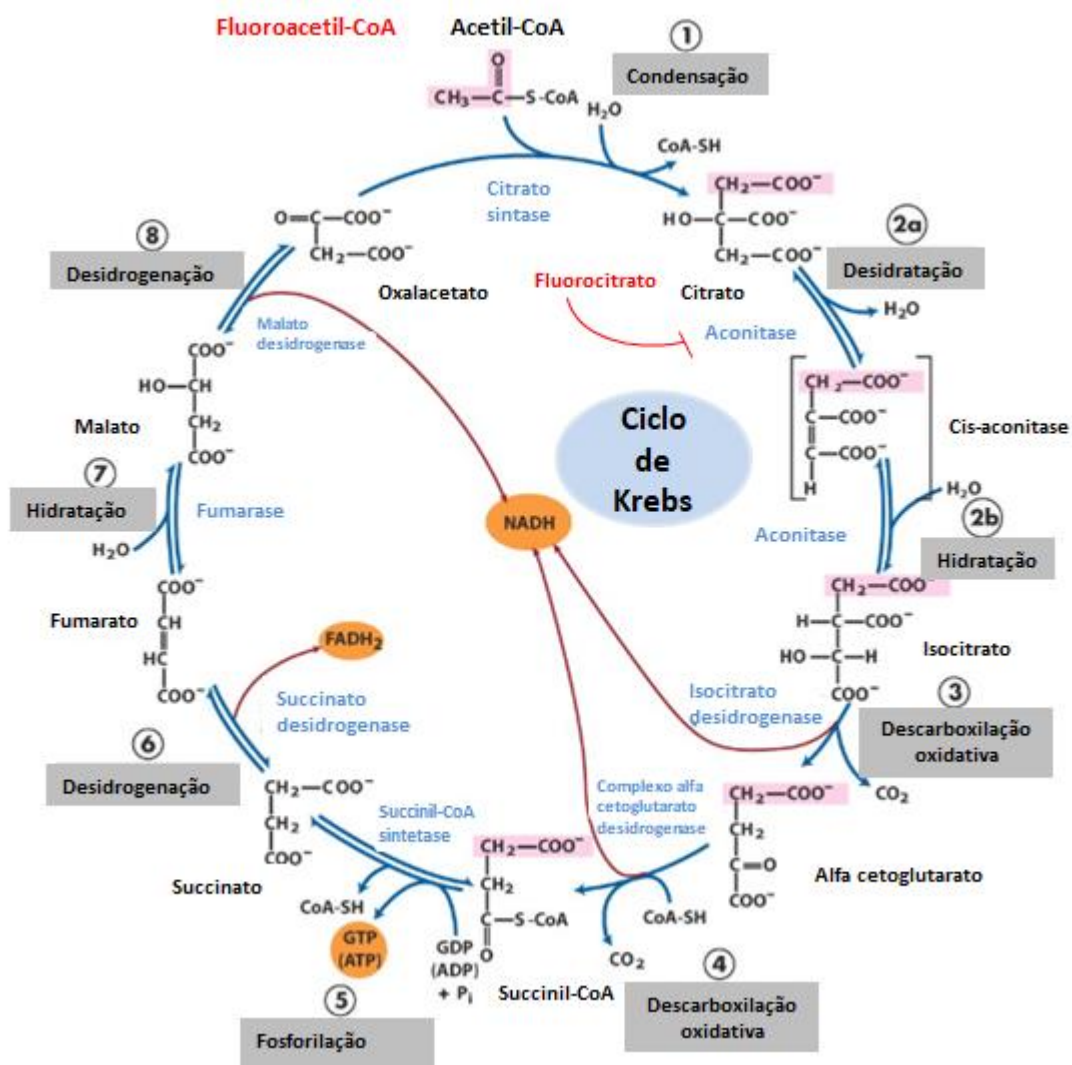


Figura 4. Fluorocitrato inibe competitivamente aconitase no ciclo de Krebs.

(Fonte: Adaptado de CHHABRA, 2015)

Além da diminuição energética, o acúmulo de citrato no organismo é um dos caminhos da toxicidade do MFA, ele exerce efeito quelante sobre o cálcio sérico que leva à hipocalcemia. É também responsável por efeitos cardiotoxicos e neurotóxicos. A cardiotoxicidade é expressa em forma de arritmias, fibrilação e parada ventricular, e a neurotoxicidade apresenta-se como ataxia, excitação e convulsões. Esses quadros clínicos são variáveis entre espécies, mas geralmente levam à morte súbita (PEIXOTO *et al*, 2010).

Inicialmente o tratamento da intoxicação por MFA era apenas sintomático, com resultados pouco satisfatórios. Em fases de descoberta do mecanismo de ação do MFA foi

utilizado experimentalmente acetato de sódio com álcool em macacos, que demonstrou alguma proteção. Mais tarde, o uso de acetato de glicerol demonstrou também eficiente proteção contra a intoxicação. Outra forma preventiva encontrada foi o uso da acetamida. Essas substâncias são consideradas, nesse caso, “doadoras de acetato”, elas parecem reduzir a inibição competitiva do MFA pelo mesmo sítio ativo, a coenzima A, dessa forma, a acetil-CoA é formada normalmente e o citrato pode ser convertido em isocitrato. Ocorre, então, um efeito profilático na intoxicação, por meio da diminuição da síntese de fluoroacetil-CoA e conseqüentemente do fluorocitrato (NOGUEIRA *et al*, 2011; GITTER, 1955).

### **1.3 Epidemiologia das intoxicações veterinárias**

Apesar de ser considerada a principal planta tóxica causadora de mortes veterinárias no Brasil, em especial bovina, existem poucos trabalhos na literatura relatando intoxicação por *Palicourea marcgravii* (BLANCO *et al*, 2004).

Alguns casos bem descritos de possíveis intoxicações pelas espécies *Palicourea marcgravii* e *Palicourea aeneofusca* são exemplificados a seguir:

*Em uma pequena propriedade, de aproximadamente 6.000 m<sup>2</sup>, localizada no município de Joanópolis (SP), vieram a óbito 2 caprinos e 2 ovinos entre a segunda metade de fevereiro e a primeira de março de 2000. O rebanho total era composto de 4 ovinos sem raça definida e 9 caprinos mestiços Toggenburg e Saanen, que foram adquiridos de diversos fornecedores. Os animais foram mantidos em uma área de aproximadamente 500 m<sup>2</sup>, numa pastagem esparsa de braquiária, onde os animais tinham acesso à água e a uma cobertura com cocho. Neste cocho foi oferecida braquiária picada e rolão de milho. Os animais tinham, também, livre acesso a uma área de aproximadamente 3.000 m<sup>2</sup> com mata nativa. A morte dos animais ocorreu sem que qualquer alteração no comportamento destes pudesse ser notada pelo proprietário, exceto um ovino, que apresentou tremores musculares 3 horas antes de ser encontrado morto. Ao exame necroscópico destes animais, foi verificada somente presença de hemorragia focal pulmonar no ovino que apresentou tremores musculares. O exame clínico de todos os animais sobreviventes revelou apenas sarna em um caprino e ectima contagioso em outro. O resultado da pesquisa de raiva no encéfalo do ovino foi negativo, podendo-se, então, descartar esta doença como possível etiologia da mortalidade destes ruminantes. Após a última morte, os animais não tiveram mais acesso à mata nativa e as mortes cessaram, sugerindo fortemente esta ser a causa destes óbitos. Assim, uma cuidadosa busca de plantas tóxicas nesta mata revelou a presença de Palicourea marcgravii e de Lantana camara. Entretanto, fortes indícios de ingestão pelos animais foram*

*encontrados nos arbustos de P. marcgravii, sendo que vários deles apresentavam grande quantidade de folhas comidas, o que não foi observado nos arbustos de L. camara. (BLANCO et al, 2004, p. 53).*

No mês de agosto de 2007 foi relatado um surto de intoxicação por *P. aeneofusca* no município de Jacaraú na zona da mata do estado da Paraíba. Os animais que sofreram intoxicação, um total de quatro entre os oitenta que residiam na propriedade, apresentaram cambaleio, tremores musculares e quedas, resultando no óbito dos animais. O proprietário mencionou que anualmente mortes desse tipo em bovinos ocorriam e suspeitava de duas plantas, uma conhecida na região como “erva-de-rato” e outra como “cipó-de-cururú”. Ambas as plantas foram encontradas e identificadas como *P. aeneofusca* e *Mascagnia rigida* (VASCONCELOS et al, 2008).

Em junho de 2016, outro surto de intoxicação foi observado, no município de Areia, também situado no estado da Paraíba. Essa região consiste em florestas tropicais e um clima tropical úmido com um verão seco e pouco chuvoso. O incidente ocorreu com um rebanho de cabras que pastava em uma vegetação composta principalmente por plantas do gênero *Brachiaria* no Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal da Paraíba. Todas as cabras foram previamente desparasitadas e vacinadas contra doenças clostridiais. Foram autorizadas a pastar durante a manhã e mantiveram-se confinadas na parte da tarde. Um suplemento composto de milho, soja e minerais foi fornecido pela manhã e novamente à tarde. Devido a um buraco na cerca, algumas cabras acessaram uma área florestada contendo *P. aeneofusca*. Apesar da abundância de forragem disponível fora do pasto, os animais consumiram *P. aeneofusca* que estava perto da cerca e limitava a floresta. Nenhuma outra planta tóxica foi encontrada no local. Uma das cabras foi encontrada morta no local pela manhã depois da primeira vez que as cabras tiveram acesso a floresta. No mesmo dia, outra cabra foi encontrada perto da cerca apresentando tremores musculares e dispnéia, acabou morrendo após uma hora aproximadamente. Todas as cabras voltaram ao cocho, no entanto, outras três apresentaram sinais clínicos de intoxicação, duas acabaram

morrendo, uma delas apresentou sinais tóxicos leves e conseguiu se recuperar após 20 horas aproximadamente. Uma grande quantidade de *P. aeneofusca* foi encontrada no conteúdo ruminal dos animais mortos após a necropsia (NETO *et al*, 2017).

#### 1.4 Quantificação do MFA

A primeira tentativa de mensurar o MFA nas folhas da *P. marcgravii* foi descrita por Krebs *et al.* (1994), utilizando espectroscopia de ressonância magnética nuclear de flúor ( $^{19}\text{F}$  RMN), e demonstrou uma concentração de 3,8  $\mu\text{g}$  de MFA por grama de folhas secas. A partir da correção feita com um padrão de MFA, que passou pelo mesmo processo de extração, chegou-se a concentração de 5,4  $\mu\text{g}$  de MFA por grama de folhas secas (KREBS *et al*, 1994).

Em outro trabalho, utilizando cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrômetro de massas com ionização química à pressão atmosférica (HPLC-APCI-MS) como método de quantificação, foi relatada uma porcentagem de 0,24 (2.400  $\mu\text{g}$  de MFA por grama de folha)  $\pm$  0,10% e 0,21 (2.100  $\mu\text{g}$  de MFA por grama de folha)  $\pm$  0,17% em amostras de folhas maduras de *P. marcgravii* colhidas em Goiás e São Paulo, respectivamente (LEE *et al*, 2012).

Lee *et al.* (2012) relatou uma porcentagem de 0,09 (900  $\mu\text{g}$  de MFA por grama de folha)  $\pm$  0,05% de MFA em espécies de *P. aeneofusca* encontradas no leste da Paraíba, utilizando cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrômetro de massas com ionização química a pressão atmosférica (HPLC-APCI-MS) como técnica analítica (LEE *et al*, 2012).

## **1.5 Técnicas Analíticas**

### **1.5.1 Amostragem e Preparo de amostras**

Anterior à aplicação das técnicas analíticas como cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), a amostragem e o preparo das amostras devem ser realizados. A amostragem é o passo inicial, em que deve ser decidido onde coletar, qual a melhor forma de obtenção e as quantidades das amostras. É importante que elas representem todo o material a ser analisado com o propósito de gerar resultados significativos (SIQUEIRA, 2008).

O preparo das amostras é, geralmente, o passo mais oneroso e a maior fonte de erros no desenvolvimento da metodologia, essa etapa tem como objetivos isolar os componentes de interesse, purificar amostras muito complexas (retirar interferentes) e concentrar analitos de acordo com a capacidade de detecção do método. Posto isso, processos básicos, como redução do tamanho das partículas, homogeneização e centrifugação, são desenvolvidos a partir da amostra bruta gerada na amostragem. Mas também, técnicas mais complexas como extração em fase sólida (SPE, do inglês *solid phase extraction*) e extração líquido-líquido (ELL), são empregadas com o intuito de limpar, concentrar e até mesmo trocar o solvente da amostra. Assim, os resultados apresentados nos registros gráficos podem ser mais bem visualizados e interpretados (ANDRADE-EIROA *et al.*, 2015; SIQUEIRA, 2008).

A escolha dos processos e técnicas que serão aplicados no preparo das amostras é fundamentada nas propriedades físico-químicas dos seus constituintes (analitos, interferentes, matriz), como polaridade e solubilidade, e também no conhecimento ou projeção das concentrações dos analitos e interferentes. Além disso, é crucial entender as

características do equipamento a ser utilizado, buscando, por exemplo, compatibilidade entre os solventes do preparo e os componentes do instrumento de análise (SIQUEIRA, 2008).

### **1.5.2 Extração em Fase Sólida**

A extração em fase sólida (SPE), que teve início na década de 80, é uma técnica que se fundamenta na passagem e interação da amostra líquida em uma coluna contendo recheio sólido (sorvente) pela aplicação de pequena sucção e/ou pressão, semelhante ao que ocorre na CLAE. A SPE permite a realização simultânea de purificação e enriquecimento do analito, pois é possível passar um grande volume de amostras através da fase extratora, que retém seletivamente os analitos e deixa passar os interferentes, que serão descartados. Os analitos retidos podem ser eluídos com um pequeno volume de solvente orgânico, resultando uma concentração adequada para análise instrumental posterior, geralmente CLAE ou cromatografia gasosa (CG) (ANDRADE-EIROA *et al.*, 2015, SIQUEIRA, 2008).

O sorvente pode apresentar diferentes características, é necessário avaliar o analito para escolher o tipo de preenchimento. Uma coluna tradicional de SPE é composta de um tubo de polipropileno, recheado com 50 a 500 mg de sorvente (formado por partículas de 40-60  $\mu\text{M}$  de tamanho), fixado no tubo mediante dois discos de retenção (SIQUEIRA, 2008).

A coluna de SPE é inicialmente condicionada e equilibrada com solvente orgânico e água, para aumentar a área de superfície e reduzir interferentes. Em seguida, a amostra é adicionada, e deve ser passada em uma velocidade adequada para que haja interação dos seus componentes com o sorvente. O próximo passo é lavar a coluna com solventes que não tenham afinidade com a analito, mas sim com os interferentes, que serão recolhidos e

descartados. Por fim, coloca-se solvente que tenha compatibilidade com o analito, que ficou retido na fase sólida, fazendo com que ele seja eluído e recolhido para análise. O contrário também pode ser realizado, a depender do recheio da coluna, na SPE sem retenção os interferentes ficam retidos e a amostra é eluída no processo de lavagem, dessa forma, não há a concentração do analito, mas sim diluição (ANDRADE-EIROA *et al.*, 2015).

### 1.5.3 Técnicas Cromatográficas

A cromatografia é uma técnica analítica que, por meio de processos físico-químicos, viabiliza a separação de componentes de uma mistura. Possibilita também a identificação e quantificação das espécies químicas, podendo estar ou não em conjunto com outras técnicas de análise instrumental. Tem como base a utilização de uma fase móvel e uma fase estacionária, o coeficiente de partição e outras diferenças entre as duas fases é responsável pela separação dos constituintes da amostra. Ao longo dos anos várias formas de articular as técnicas cromatográficas foram desenvolvidas. São exemplos, as técnicas de cromatografia por troca iônica, cromatografia por exclusão e cromatografia por adsorção (COLLINS *et al.*, 1997; THAMMANA, 2016).

O termo “cromatografia” e suas derivações teve origem em 1906 com o botânico Mikhail Semyonovich Tsvett. As partículas “*Chrom*” e “*graphie*” tem origem grega e significam cor e escrever, respectivamente, ainda que a cor não seja fundamental na separação, pode facilitar a identificação dos compostos separados. Tsvett desenvolveu experimentos de separação de componentes de gema de ovo e de extratos de folhas utilizando colunas de vidro recheada de diferentes sólidos (finamente divididos) e éter de petróleo para arrastar os compostos. No entanto, antes mesmo da criação do termo cromatografia com os estudos de Tsvett, as técnicas de migração diferencial já eram



utilizadas, inclusive no final do século XIX, em que Beyerinck usou sólidos em camada delgada sobre vidro, no lugar de papel, para o desenvolvimento circular de misturas de sais inorgânicos (COLLINS *et al*, 1997).

A década de 30 foi considerada a época moderna da cromatografia, diversas técnicas foram aperfeiçoadas. A cromatografia por troca iônica teve seu início, com Adams e Holmes que produziram a primeira resina que permitia a troca de cátions. Outras épocas também tiveram grande impacto, como a década de 60 com o aperfeiçoamento de sistemas de bombeamento e detecção de cromatografia líquida de alta eficiência. Em resumo, as técnicas cromatográficas, principalmente a gasosa e líquida, aumentaram cada vez mais sua acurácia e hoje são amplamente utilizadas nas análises qualitativas e quantitativas laboratoriais (COLLINS *et al*, 1997).

#### **1.5.4 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)**

A cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) foi desenvolvida a partir da cromatografia líquida clássica (CLC), que é uma versão mais simples e menos eficiente, visto que sua fase estacionária normalmente não é recuperada, o esforço manual é grande e a sensibilidade do método é muito baixa. A CLAE é a representante mais importante das cromatografias, uma vez que a técnica permite quantificação com alto nível de precisão e exatidão de uma ampla variedade de amostras, inclusive as mais complexas; possui menor tempo de análise em relação à CLC; é automatizada para quase todos os processos; e suas colunas podem ser reutilizadas em diversos ensaios, a depender da sua preservação. Sua maior limitação é o alto custo dos equipamentos, no entanto, é possível que com o aumento da demanda e o aparecimento de novas tecnologias essa barreira seja vencida em breve (COLLINS *et al*, 1997).

A CLAE é frequentemente comparada à cromatografia gasosa (CG), pois ambas apresentam alto desempenho. Entretanto, as duas técnicas possuem diferenças significativas nos tipos de amostras que são capazes de analisar, por esse motivo elas não competem, na verdade se complementam. Em razão disso, é importante ser crítico na escolha do método analítico frente às características do analito a ser estudado (COLLINS *et al*, 1997).

Diferentes mecanismos são empregados na fase estacionária da CLAE. De acordo com a classe dos compostos submetidos à análise, um mecanismo pode ser mais ou menos adequado (COLLINS *et al*, 1997).

Entre os mecanismos aplicados nas colunas da CLAE têm-se a cromatografia por exclusão (CE), em que o tamanho efetivo das moléculas é usado para promover a separação. A fase estacionária apresenta pequenos poros fazendo com que as moléculas grandes sejam eluídas primeiro e as moléculas pequenas (mais susceptíveis a ficarem presas na coluna) eluídas por último (COLLINS *et al*, 1997).

Outro mecanismo utilizado é a cromatografia por troca iônica (CTI). Nas colunas desse tipo a fase estacionária, comumente resina de poliestireno-divinilbenzeno, possui grupos iônicos ligados a ela (pode ser do tipo trocador de cátions ou trocador de ânions). A fase móvel viabiliza o arraste de contra-íons (carga oposta àquela da fase estacionária), presentes na fase móvel e também na amostra. Dessa forma, há um equilíbrio entre os contra-íons de ambas as fontes, aqueles presentes na amostra que sofrem menor atração são eluídos mais rapidamente (COLLINS *et al*, 1997).

## 2. JUSTIFICATIVA

Entre as várias espécies de *Palicourea*, aquelas que se destacam por serem letalmente tóxicas, principalmente para animais como o gado, produzem impacto econômico negativo para a pecuária. São exemplos a *Palicourea marcgravii*, que possui ampla distribuição no Brasil e a *Palicourea aeneofusca* com presença mais limitada no território brasileiro, mas que ainda é causa importante de intoxicações nos pastos.

Os casos de morte súbita causada pela ingestão dessas plantas têm como principal intoxicante a presença de monofluoroacetato (MFA) em suas folhas e frutos. Esse composto é altamente tóxico, sua utilização e comercialização como praguicida é proibida pela Organização Mundial da Saúde.

Poucos são os trabalhos que relatam a detecção e quantificação dessa substância nessas espécies vegetais e entre eles há uma grande variação entre as concentrações de MFA encontrada. Além disso, nas técnicas analíticas descritas normalmente são utilizados equipamentos de detecção muito sensíveis, mas que não são triviais na rotina de um laboratório.

O desenvolvimento de metodologia que possibilite a quantificação do MFA em espécies vegetais, utilizando equipamento de detecção menos sensível, mas frequente nas análises laboratoriais, como CLAE-DAD, com foco no preparo das amostras é um importante avanço no estudo da toxicidade dessas espécies.

Sobretudo, esse estudo pode ser base para metodologias de biópsia em tecidos de animais intoxicados, e também provedora de dados para desenvolvimento de tratamentos, visto que a mortalidade chega perto de 100% nas intoxicações veterinárias, com a prevenção ainda sendo a melhor opção.

### **3. OBJETIVOS**

#### **2.1 Objetivo geral**

Desenvolver metodologia analítica para quantificar o monofluoroacetato em duas espécies do género *Palicourea* (*Palicourea marcgravii* e *Palicourea aeneofusca*).

#### **2.2 Objetivos específicos**

- Adaptar técnicas de extração e análise do teor do MFA encontradas na literatura.
- Detectar e quantificar o MFA nas amostras de *Palicourea marcgravii* e *Palicourea aeneofusca*.
- Analisar estatisticamente os dados obtidos.

## **4. METODOLOGIA**

### **4.1 Amostragem**

Foram analisadas as folhas de espécies de *Palicourea marcgravii* e *Palicourea aeneofusca* cedidas e identificadas pelo Professor Márcio Botelho de Castro da Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária – UnB. O material foi colhido na região do Distrito Federal e entorno, entregue previamente seco e grosseiramente pulverizado e foi mantido acondicionado em garrafas PET em temperatura ambiente, protegido de luz solar e umidade intensas.

### **4.2 Extração do MFA**

Ao longo do estudo sucessivas técnicas de extração do analito foram realizadas até que se chegasse a uma técnica em que as amostras quando submetidas à Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada ao Detector de Arranjo de Diodos (CLAE-DAD), possibilitassem a detecção e quantificação do MFA. As extrações foram realizadas nos Laboratórios de Controle de Qualidade de Medicamentos e Produtos Naturais.

#### **4.2.1 Extração 1**

Foi pesado 1 g das folhas de cada espécie e colocado em um tubo tipo Falcon de 50 mL. Cada tubo recebeu 20 mL de uma solução aquosa de ácido fosfórico ( $H_3PO_4$ ) 0,02 M (pH 1,14). A suspensão de cada espécie foi então homogeneizada com a utilização do equipamento Ultra-turrax (T 25 digital ULTRA-TURRAX®). O volume foi aumentado para 30 mL e a suspensão agitada em agitador Vórtex por 1 minuto. Uma alíquota de 3 mL de cada amostra foi transferida para tubo tipo Falcon de 15 mL e centrifugada por uma hora a 8500 RCF (*Relative Centrifugal Force*). O sobrenadante foi filtrado em filtro de

seringa com poro 0,22  $\mu\text{m}$  e colocado em *vial* para posterior análise por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE). O procedimento foi realizado em triplicata (Figura 5).

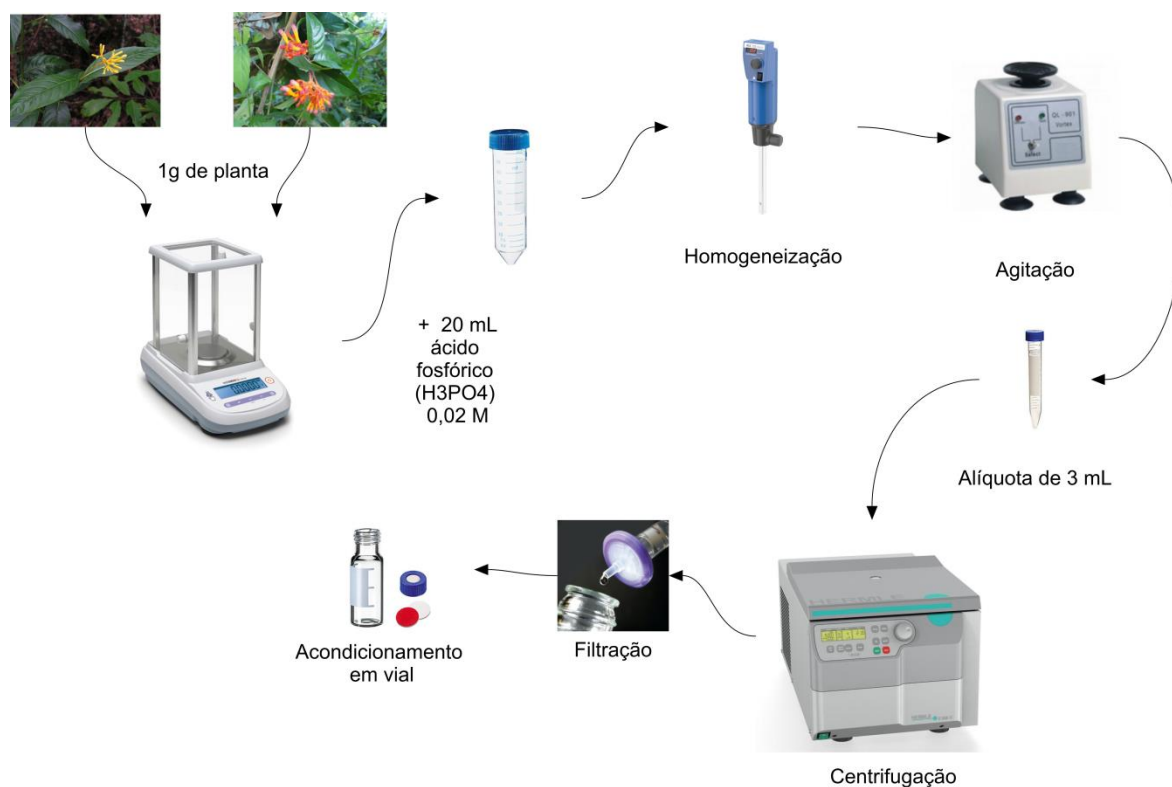


Figura 5. Fluxograma representativo da extração do MFA para as espécies *P. marcgravii* e *P. aeneofusca* com extração em ácido fosfórico (H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>) 0,02 M e homogeneização em Ultra-turrax.

#### 4.2.2 Extração 2

Foi pesado 1 g das folhas de cada espécie e colocado em um tubo tipo Falcon de 50 mL. Cada tubo recebeu 30 mL de uma solução aquosa de ácido fosfórico (H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>) 0,02 M (pH 1,29) e a suspensão agitada em agitador Vórtex por 1 minuto. Uma alíquota de 3 mL de cada amostra foi transferida para tubo tipo Falcon de 15 mL e centrifugada por uma hora a 8500 *RCF*. O sobrenadante foi filtrado em filtro de seringa com poro 0,22  $\mu\text{m}$  e colocado em *vial* para posterior análise por CLAE. O procedimento foi realizado em triplicata para cada espécie vegetal analisada (Figura 6).

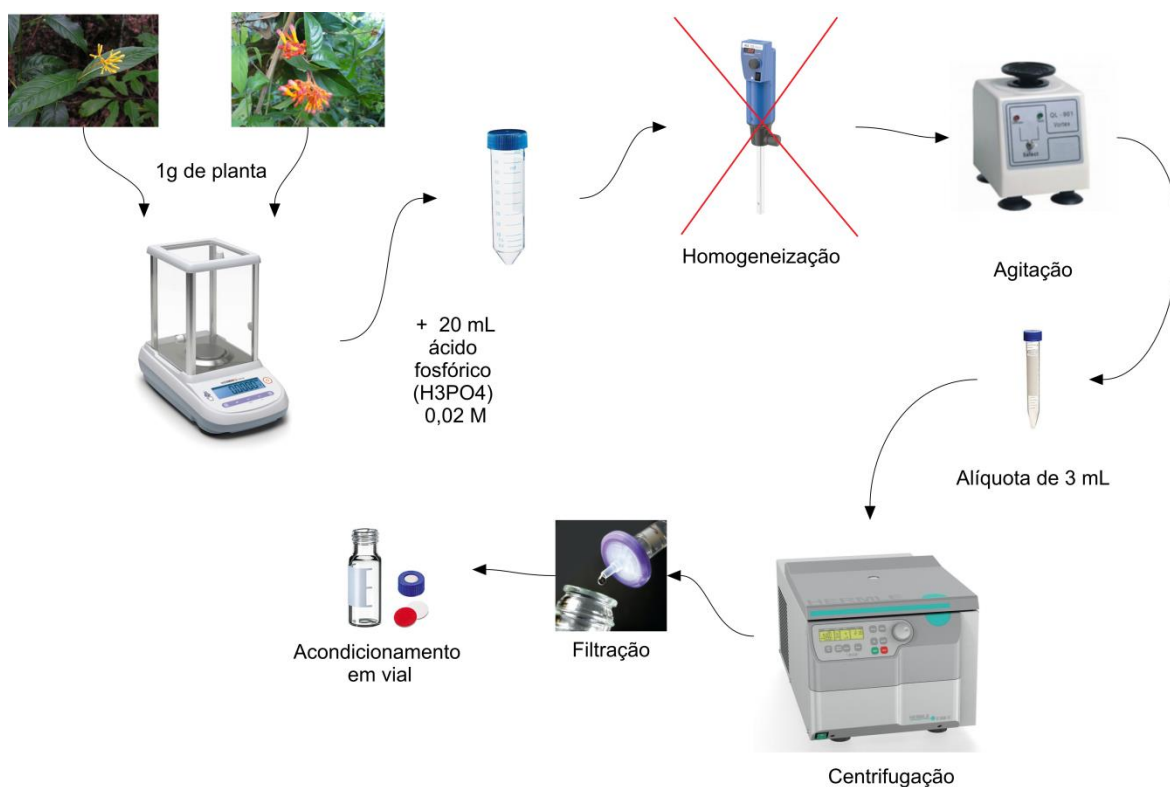


Figura 6. Fluxograma representativo da extração do MFA para as espécies *P. marcgravii* e *P. aeneofusca* com extração em ácido fosfórico ( $H_3PO_4$ ) 0,02 M e sem homogeneização em Ultra-turrax.

### 4.2.3 Extração 3

Foram pesadas 100 mg das folhas de cada espécie e colocadas em um tubo tipo Falcon de 15 mL. Cada tubo recebeu 5 mL de água deionizada e a suspensão foi agitada em agitador orbital por 30 minutos a 4 *RCF*. Após a agitação os tubos foram centrifugados a 1008 *RCF* por 30 minutos. Foi retirado o sobrenadante e novos 5 mL de água deionizada foram acrescentados ao tubo para que a extração fosse repetida. Os sobrenadantes foram somados ao final do procedimento e 1 mL foi filtrada em filtro de seringa com poro 0,22  $\mu m$  e uma alíquota colocada em *vial* para posterior análise por CLAE (Figura 7).

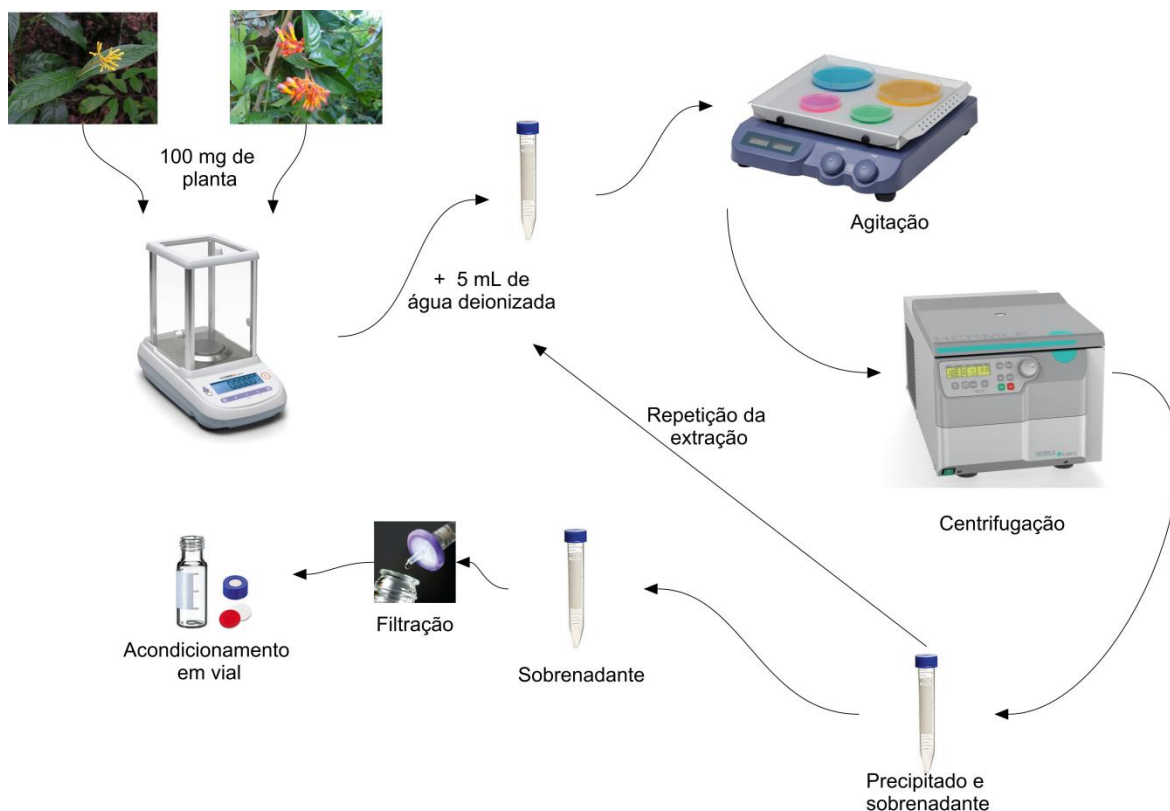


Figura 7. Fluxograma representativo da extração do MFA para as espécies *P. marcgravii* e *P. aeneofusca* com extração em água e agitação em agitador orbital.

#### 4.2.3 Extração 4

Foram pesadas 500 mg das folhas de cada espécie e colocadas em um tubo tipo Falcon de 15 mL. Cada tubo recebeu 5 mL de água deionizada e a suspensão foi agitada em agitador orbital por 30 minutos a 4 *RCF*. Após a agitação cada amostra foi filtrada em filtro de papel com auxílio do funil de vidro. Mais 5 mL de água deionizada foram acrescentados ao tubo contendo o resíduo da filtração para que a extração fosse repetida. Os extratos aquosos foram somados ao final do procedimento, resultando em aproximadamente 6 mL de cada amostra. Os tubos foram congelados a  $-80^{\circ}\text{C}$  e passaram pelo processo de liofilização. Após serem liofilizadas as amostras foram ressuspensas com 1 mL de água deionizada. Em seguida elas passaram por SPE. As fases recolhidas foram filtradas em filtro de seringa com poro  $0,22\ \mu\text{m}$  e uma alíquota colocada em *vial*



para posterior análise cromatográfica. Esse procedimento foi realizado em triplicata para cada espécie vegetal analisada (Figura 8).

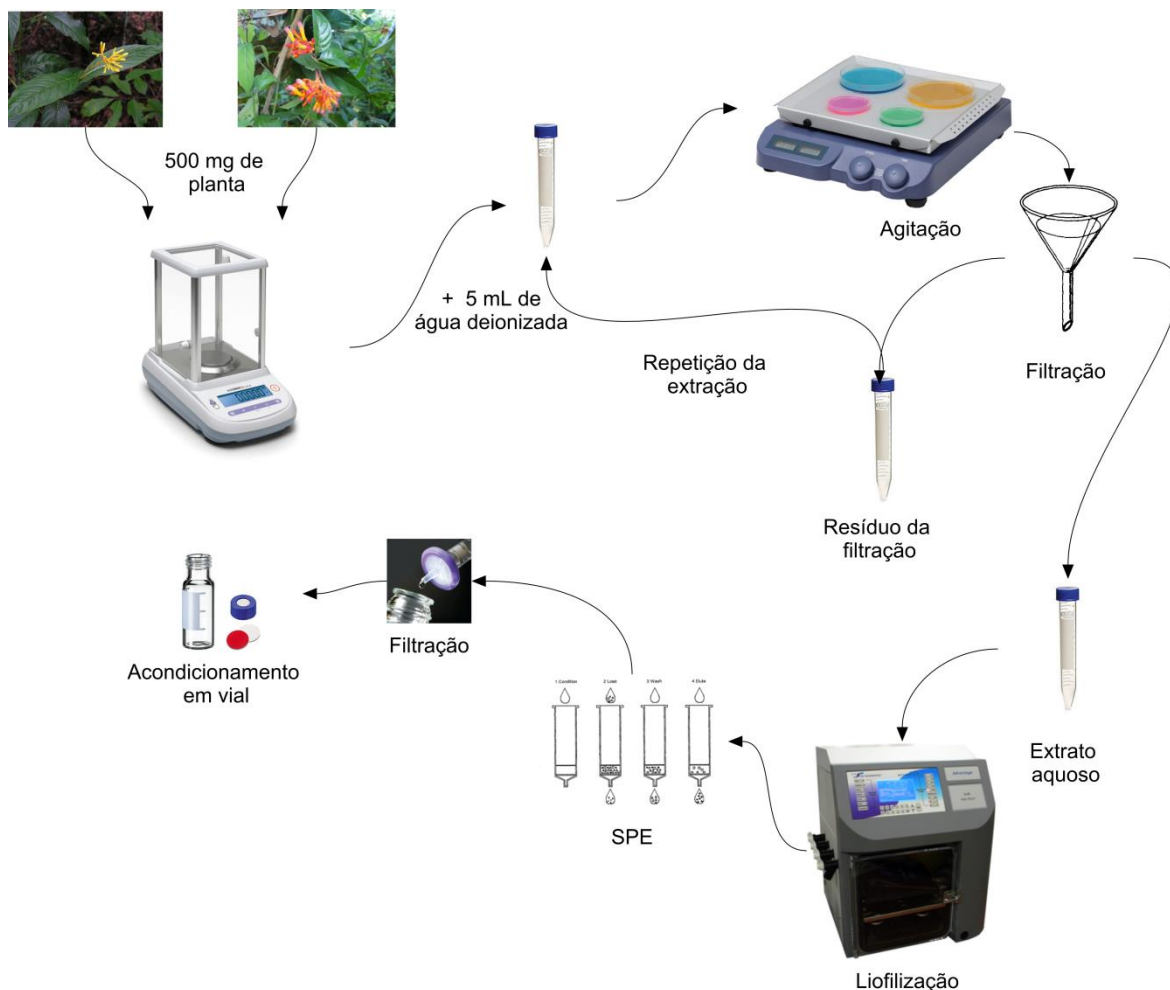


Figura 8. Fluxograma representativo da extração do MFA para as espécies *P. margravii* e *P. aeneofusca* com extração em água, agitação em agitador orbital, liofilização e SPE.

Colunas de polipropileno para extração em fase sólida (SPE) foram preenchidas com 200 mg de sílica C-18 (SUPELCO® Discovery® DSC-18). Foram colocados, antes e depois do conteúdo, discos de retenção. As colunas foram encaixadas no *manifold* (Vasiprep™ SPE Vacuum Manifold), que por sua vez foi acoplado à bomba de vácuo.

Inicialmente as colunas foram condicionadas com 2 mL de Metanol e equilibradas com 4 mL de água deionizada, esses volumes foram descartados. Sem deixar que o

sorvente secasse, 1 mL da amostra foi adicionada (Figura 10), seguida de 1 mL de acetonitrila 30% para lavagem. O líquido resultante dessas adições foi recuperado em um tubo de ensaio até o volume de 1,5 mL. A extração realizada foi sem retenção, em que o analito é eluído na lavagem e no cartucho ficam retidas as impurezas ou contaminantes, como representado na Figura 9.

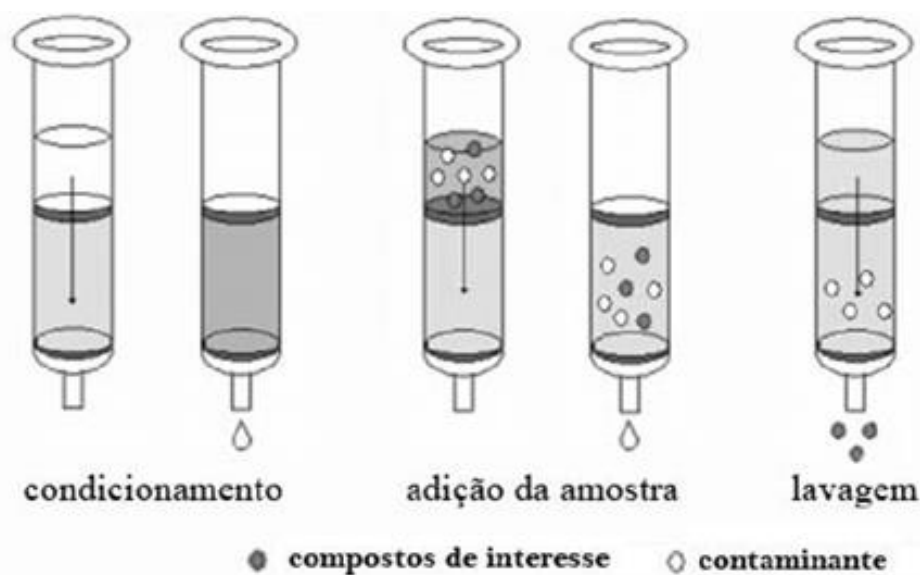


Figura 9. Passos para extração em fase sólida (SPE) sem retenção. O cartucho é preenchido com o sorvente sílica C-18, e nesse tipo de extração o composto de interesse (polar) sai com a lavagem enquanto o contaminante fica retido na coluna.

(Fonte: Adaptado de LANÇAS, 2004).



Figura 10. Imagem da SPE realizada na “Extração 4”. Etapa de adição da amostra nos cartuchos de SPE acoplados ao *manifold*.

### 4.3 Preparação da Curva Analítica

Foi utilizado monofluoroacetato de sódio em pó, comercializado pela Chem Service inc, com atestado de pureza > 90%. A solução mãe foi produzida com a diluição do MFA em ácido ortofosfórico ( $H_3PO_4$ ) 0,02 M para concentração final de 10.000  $\mu g/mL$ . Determinou-se que a solução mãe teria um volume total de 25 mL. Considerando 100% de pureza do sólido (visto que o grau de pureza não foi bem definido), foram pesadas 250 mg de MFA para preparo da solução.

A partir da solução mãe, foram feitas diluições em  $H_3PO_4$  0,02 M para obtenção dos pontos estabelecidos da curva analítica, como mostra a Figura 11. Uma pequena alíquota de cada diluição foi filtrada em filtro de seringa com poro 0,22  $\mu m$  e transferida para vial para cromatografia. Para cada análise de amostra uma curva analítica foi produzida a partir da solução mãe.

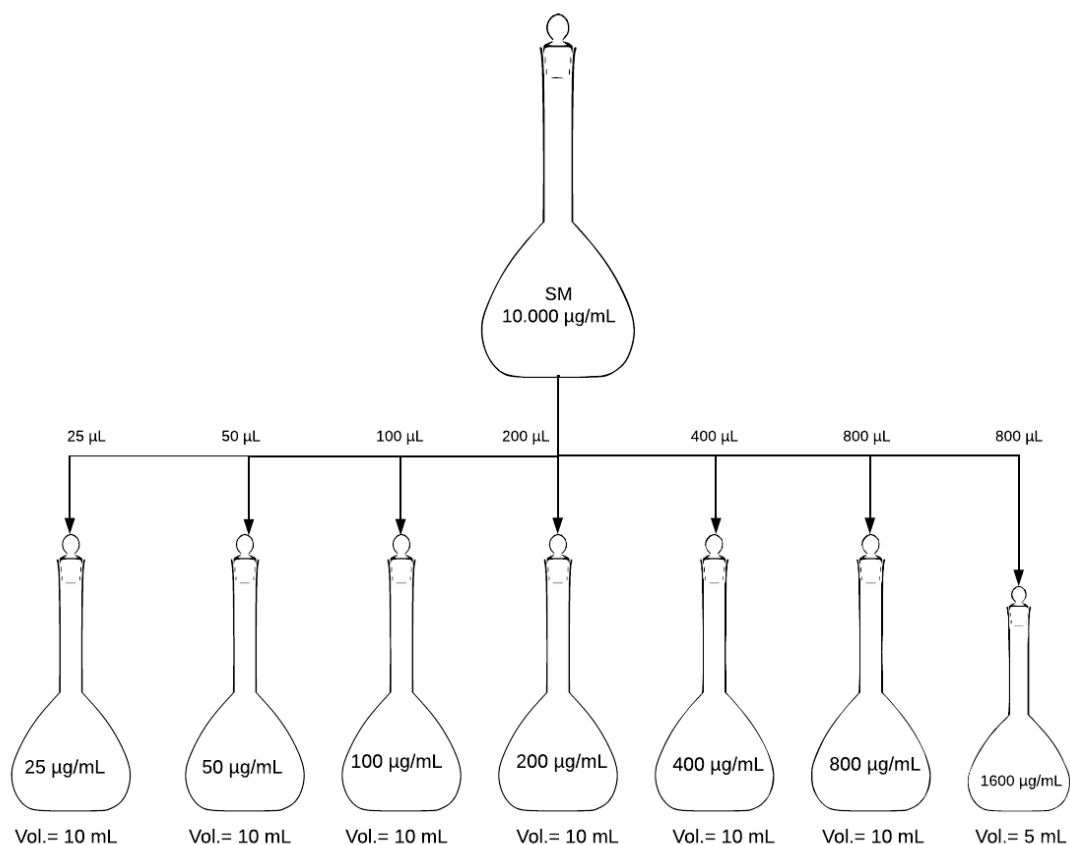


Figura 11. Diluições dos pontos da curva analítica do MFA a partir da solução mãe (SM).

#### 4.4 Análise Cromatográfica

As análises foram realizadas por meio de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada ao Detector de Arranjo de Diodos (CLAE-DAD) inicialmente em parceria com o Laboratório de Controle de Qualidade - UnB, que dispõe do cromatógrafo LaChrom Elite (Hitachi, Tóquio, Japão), equipado com bomba L2130, injetor L2200, forno para coluna L2300 (mantido a 25 °C), detector L2455 DAD (Hitachi, Tóquio, Japão). O detector é conectado ao software EZChrom Elite, version 3.3.2 SP1, Scientific Software. Inc (Figura 12).

Em um segundo momento as análises foram feitas em parceria com o Departamento de Biologia Molecular - UnB, que dispõe do cromatógrafo líquido de ultra alta eficiência

(UHPLC), modelo UltiMate 3000 (Thermo Scientific™ Dionex™, Sunnyvale, CA, EUA). O cromatógrafo é equipado com um rack de solventes SRD-3600, sistema de bombas ternárias DGP-3600SD, injetor automático WPS-3000SL, compartimento de coluna TCC-3200 (mantido a 25°C) e detector de arranjo de diodos na região UV-VIS modelo DAD-3000. O detector se conecta ao software Chromeleon® versão 7.1.2 (Thermo Scientific™ Dionex™, Sunnyvale, CA, USA) (Figura 13).

Foi acoplada a estes sistemas a coluna Supelcogel™ C610H (300 x 7,8 mm, Merck, Alemanha), em conjunto com a pré-coluna Supelcogel™ H (50 x 44,6 mm, Merck, Alemanha). Esse modelo de coluna é preenchido por poliestireno-divinilbenzeno sulfonado, e promove a separação de ácidos orgânicos por meio da combinação dos métodos de exclusão por tamanho e de troca iônica.

A fase móvel utilizada para a eluição das amostras e da curva analítica foi o ácido ortofosfórico ( $\text{H}_3\text{PO}_4$ ) 0,02 M (Bomba A), com um fluxo de 0,8 mL/min, por um sistema de eluição isocrático. Foram injetados 50  $\mu\text{L}$  de cada amostra analisada. A coleta dos dados foi ajustada para o comprimento de onda em 210 nm.



Figura 12. Cromatógrafo líquido de alta eficiência, modelo LaChrom Elite (Hitachi, Tóquio, Japão).

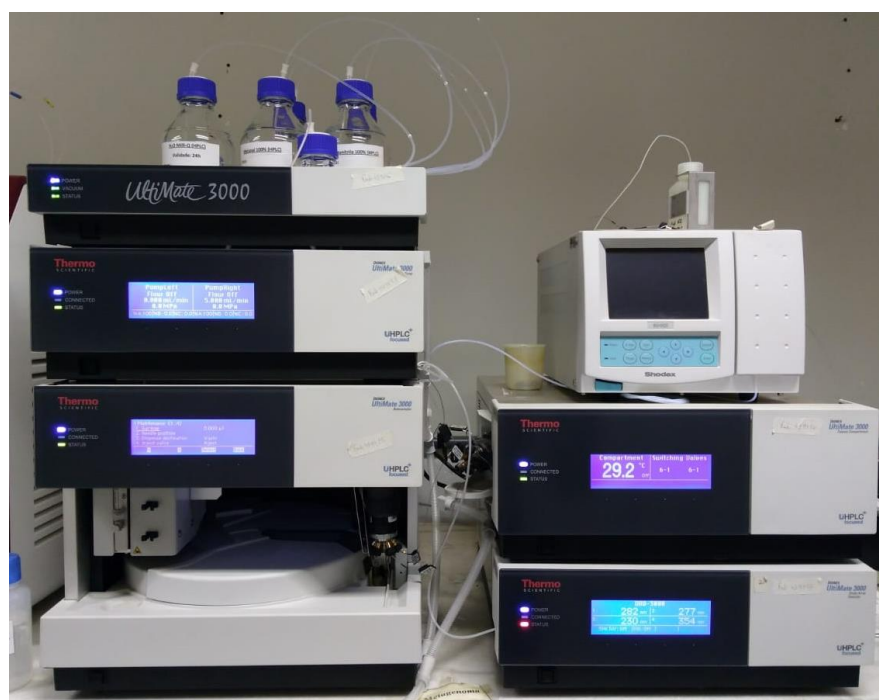


Figura 13. Cromatógrafo líquido de ultra alta eficiência, modelo UltiMate 3000 (Thermo Scientific™ Dionex™, Sunnyvale, CA, EUA).

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Análise da primeira extração do MFA

A primeira metodologia de extração empregada foi baseada no estudo de Minnaar *et al.* (2000). Esse estudo apresenta a possibilidade de detecção do MFA por CLAE, utilizando a coluna Supelcogel™ C610H, e detector UV-Vis. Nos resultados são apresentadas recuperações de MFA em amostras vegetais contaminadas com a substância. Essas recuperações chegam a 96,8%. No entanto, o estudo não apresenta resultados de quantificação do MFA extraído dos vegetais analisados, ainda que a espécie manipulada (*Dichapetalum cymosum*) apresentasse MFA natural, e que na metodologia estivesse presente o procedimento para extração.

A curva analítica produzida no primeiro ensaio do presente estudo confirmou a possibilidade de detecção e quantificação do MFA por CLAE acoplada ao detector UV (Figura 14). A Figura 15 mostra o perfil cromatográfico do composto no menor ponto, no ponto médio e no maior ponto da curva (25, 200 e 1600 µg/mL). Foi possível identificar o composto no comprimento de onda de 210 nm, com tempo de retenção médio de  $11,09 \pm 0,08$  minutos. As análises posteriores tiveram o tempo de análise reduzido para 20 minutos sem prejuízo na detecção e quantificação do analito.

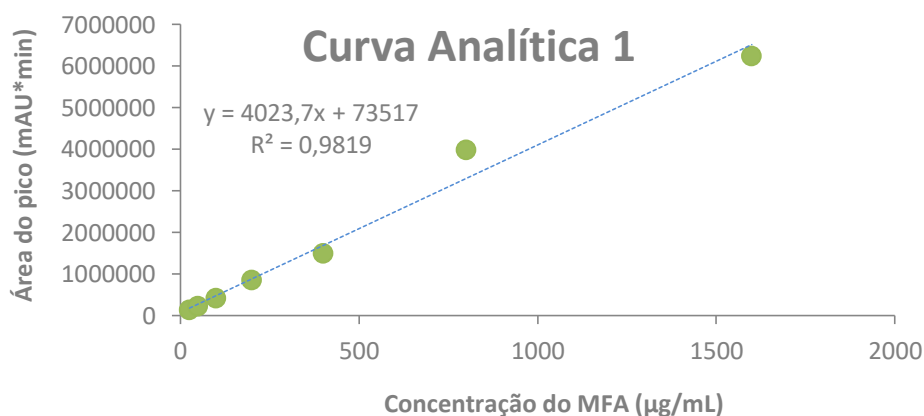


Figura 14. Curva analítica para determinação do MFA.

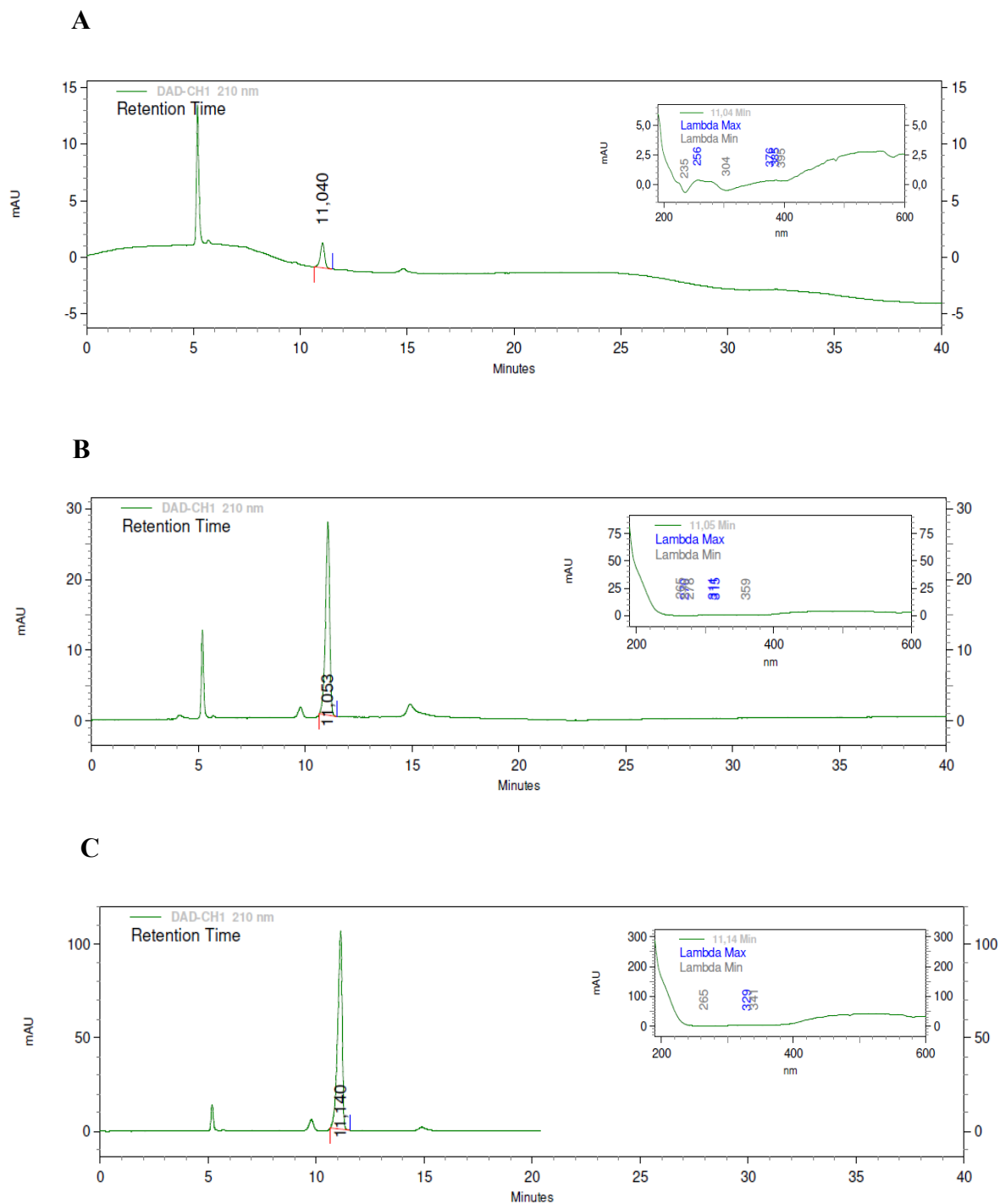


Figura 15. Perfil cromatográfico do MFA na concentração (A) 25 µg/mL, (B) 200 µg/mL e (C) 1600 µg/mL em 210 nm.

No entanto, perfil cromatográfico do MFA não foi detectado em nenhuma das análises das amostras de *P. aeneofusca* (Figura 16) e *P. marcgravii* (Figura 17) que passaram pela “Extração 1”. Os picos identificados no cromatograma que possuem tempos de retenção próximos a 11,09 minutos não são expressivos e não apresenta espectro UV-



Vis característico do MFA no comprimento de 210 nm. No entanto, não é possível afirmar a ausência do composto nas amostras, isso porque, o sinal-ruído do cromatograma apresentou-se muito alto em todas as análises. Dessa forma, a concentração de MFA presente das amostras pode ter sido insuficiente para sobressair-se aos interferentes.

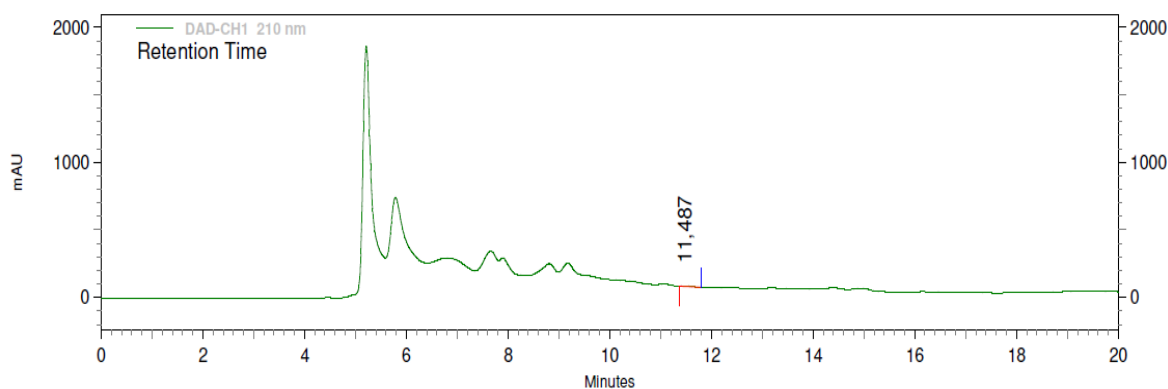


Figura 16. Cromatograma referente à análise da *P. aeneofusca* submetida à "Extração 1".

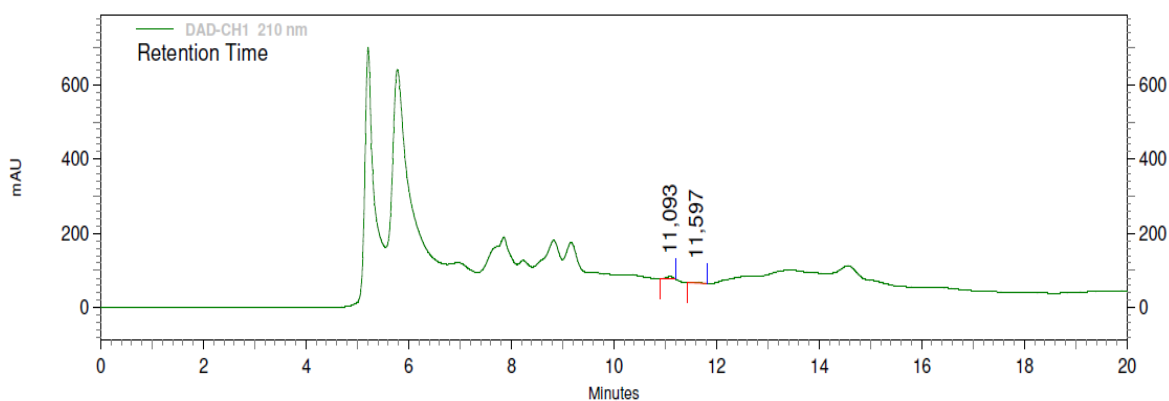


Figura 17. Cromatograma referente à análise da *P. marcgravii* submetida à "Extração 1".

A primeira análise mostrou, então, que o método é eficiente para detecção e quantificação do MFA. No entanto, o processo de extração realizado na amostra trouxe para a análise muitos interferentes, o que impossibilitou a detecção e quantificação da substância nas espécies vegetais.

## 5.2 Análise da segunda extração do MFA

A metodologia de extração descrita por Minnaar *et al.* (2000) foi empregada novamente, mas dessa vez sem a etapa de homogeneização com o equipamento Ultraturrax, na tentativa de diminuir a quantidade de interferentes extraídos junto com o analito. Foi observado que nessa etapa a amostra ficava excessivamente suja, pois o material era ainda mais fragmentado, e os passos seguintes não eram suficientes para limpá-la. No entanto, os resultados mostraram que a retirada da homogeneização não realizou mudanças expressivas nos cromatogramas de nenhuma das espécies vegetais, a linha de base permaneceu muito acima do zero e o perfil cromatográfico do MFA indetectável (Figura 18 e 19).

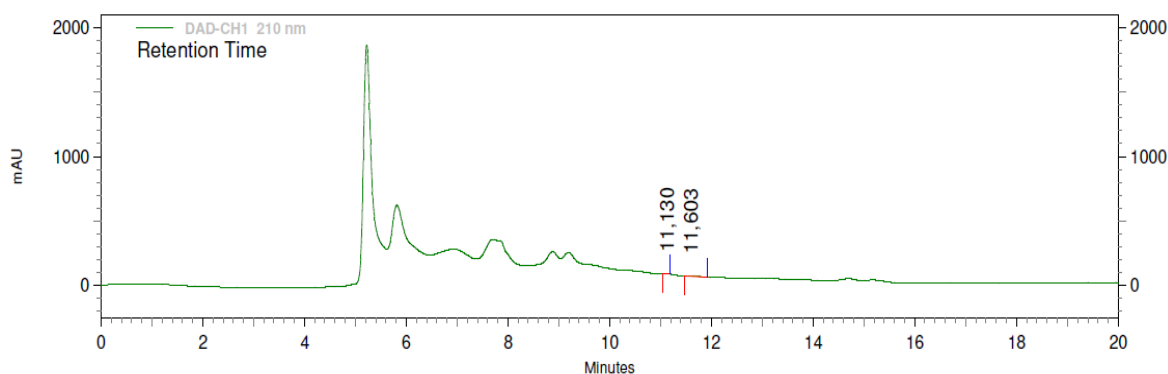


Figura 18. Cromatograma referente à análise da *P. aeneofusca* submetida à "Extração 2".

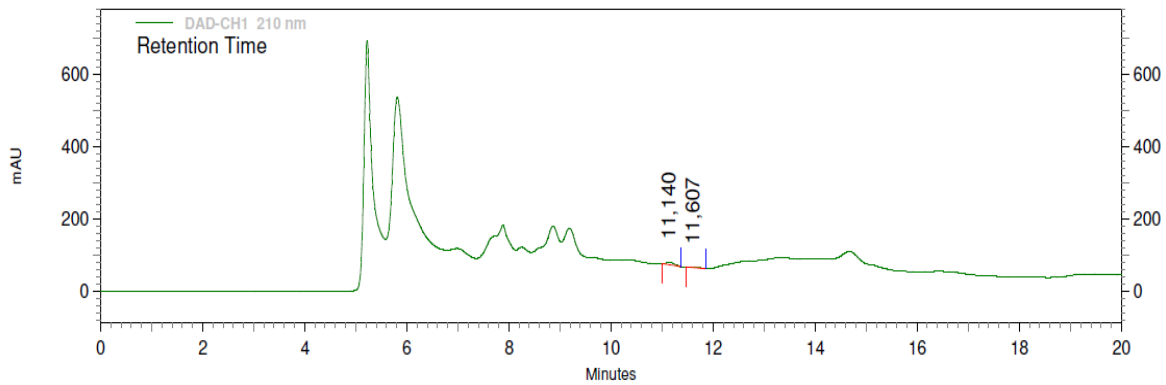


Figura 19. Cromatograma referente à análise da *P. marcovii* submetida à "Extração 2".

Uma nova curva analítica foi produzida, e os resultados continuaram positivos e muito similares aos da primeira análise. A Figura 20 mostra os perfis cromatográficos de todos os pontos da curva sobrepostos, destacando a relação direta entre a concentração do analito e a altura/área do pico.

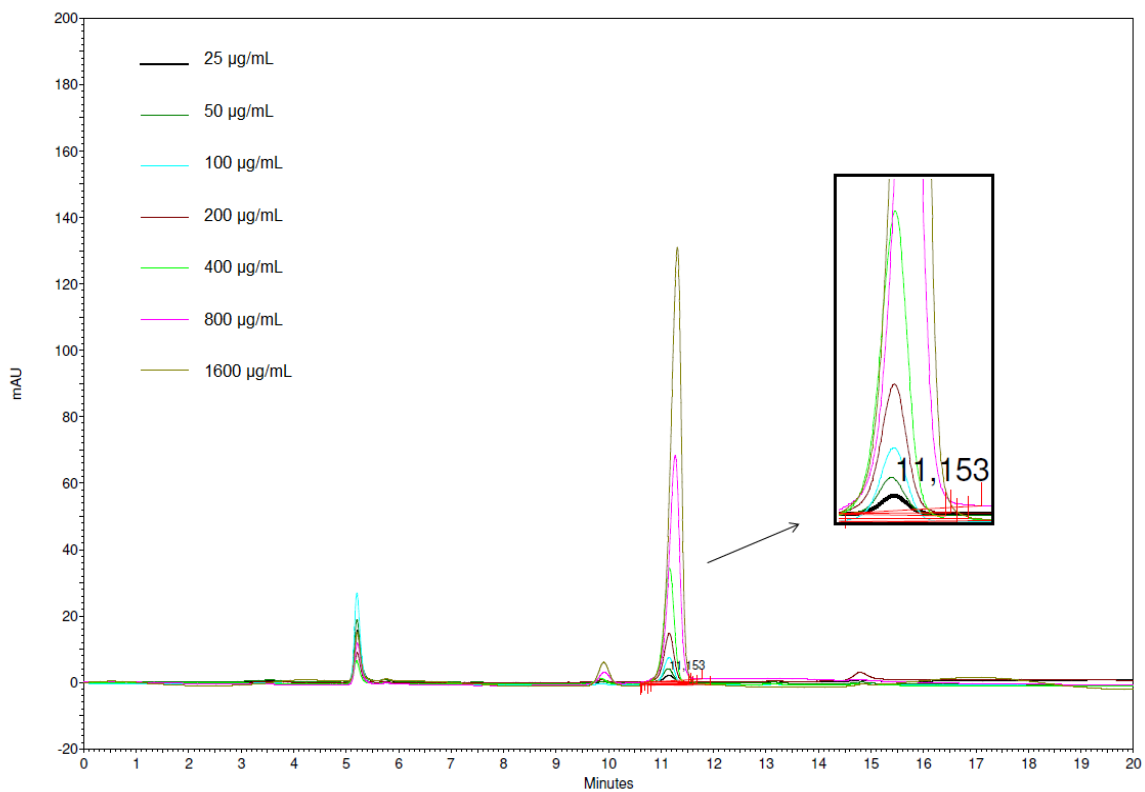


Figura 20. Cromatogramas da curva analítica do MFA sobrepostos.

### 5.3 Análise da terceira extração do MFA

Outra metodologia para extração do MFA em espécies vegetais foi utilizada nessa etapa. A metodologia proposta por Lee *et al.* (2012) utiliza a água como solvente extrator, e o processo é mais simplificado que aquele descrito por Minnaar *et al.* (2012). Lee *et al.* (2012) conseguiu identificar e quantificar o MFA de várias espécies vegetais, inclusive da *P. marcgravii* e *P. aeneofusca*, também utilizando CLAE como técnica analítica. No entanto, o estudo dispunha de detecção por espectrômetro de massas com ionização química a pressão atmosférica, gerada por um detector mais sensível e robusto que o detector por UV-Vis.

Os resultados da análise cromatográfica foram positivos quando comparados ao método anterior de extração, os cromatogramas apresentaram uma linha de base mais próxima ao zero. No entanto, a quantidade de folha por volume de solvente não foi a mesma nas duas extrações, na primeira essa relação era de 33,3 mg/mL e na segunda 10 mg/mL, justificando a diminuição dos interferentes, já que o extrato líquido da segunda estava mais diluído. Mesmo com a redução da linha de base não foi observado o perfil do MFA nas amostras. Isso porque as amostras continuavam muito sujas e/ou porque a concentração do analito era ainda muito baixa.

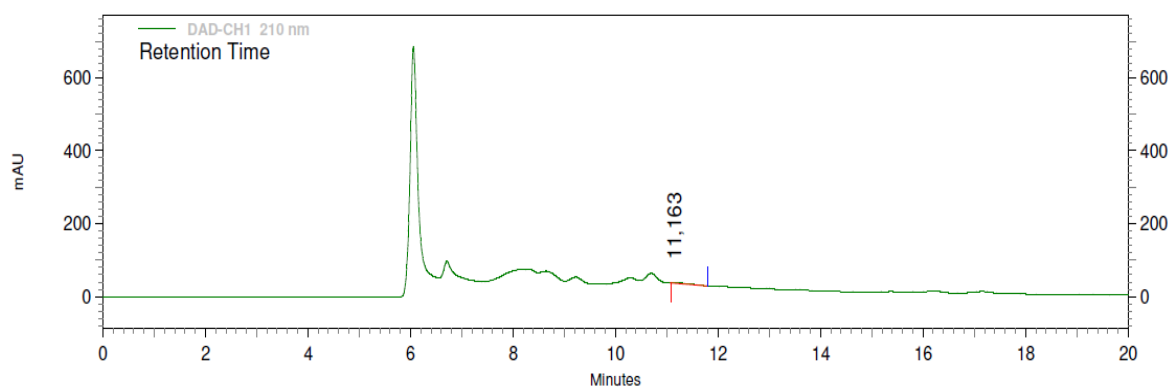


Figura 21. Cromatograma referente à análise da *P. aeneofusca* submetida à "Extração 3".

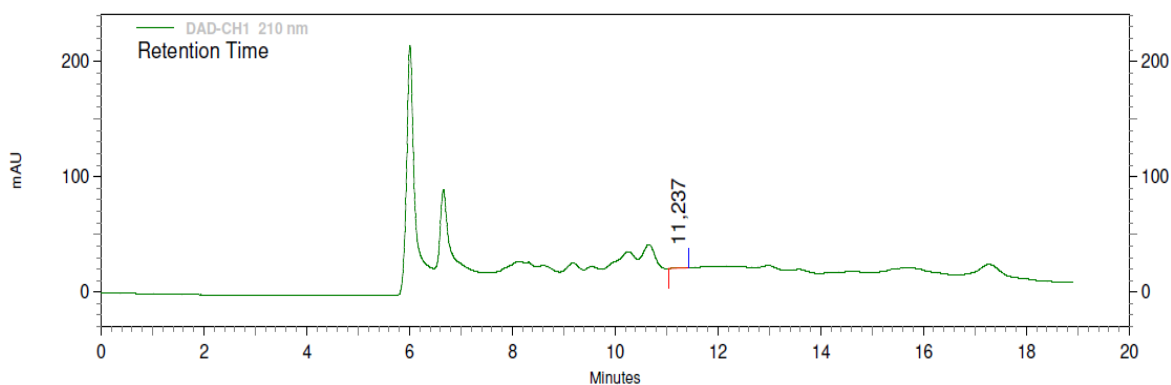


Figura 22. Cromatograma referente à análise da *P. marcgravii* submetida à "Extração 3".

#### 5.4 Análise da quarta extração do MFA

Com o intuito de solucionar os desafios do preparo da amostra, novas etapas foram adicionadas à metodologia proposta por Lee *et al.* (2012). Inicialmente, foi feito um teste com a adição da etapa de extração em fase sólida (SPE) antes da etapa de filtração, visando uma diminuição de interferentes nas amostras. Para tal, 1 mL de cada amostra passou por uma coluna SPE, contendo 200 mg de sílica C-18 (apolar). A extração foi realizada sem retenção, ou seja, era esperado que o analito (polar) saísse rapidamente nas primeiras frações, enquanto os interferentes ficariam retidos na coluna.

Dessa forma, três pontos da curva analítica (25, 400 e 1600  $\mu\text{g/mL}$ ) foram submetidos à SPE, cada ponto foi separado em frações de 0,5 mL, a fim de descobrir em qual dessas estaria o analito. A coluna foi inicialmente condicionada com 3 mL de acetonitrila para aumentar a área de superfície. Recolhendo os volumes resultantes, 1 mL da curva foi adicionada, seguida de 1 mL de acetonitrila e 1 mL de água. Das seis frações analisadas por CLAE as três primeiras foram as que continham as maiores porções de MFA (Figura 23).

O procedimento de SPE foi, então, adicionado a uma extração teste das espécies vegetais, antes da etapa de filtração da "Extração 3". Dessa vez, foram analisadas apenas as três primeiras frações de cada amostra, onde era esperado encontrar o MFA. Os

resultados foram positivos, com a diminuição de interferentes e conseqüentemente uma linha de base muito próxima ao zero. No entanto, não foi encontrado o perfil cromatográfico do MFA nessas amostras.

Tomando como referência os maiores resultados da literatura para quantificação do MFA em *P. marcgravii* e *P. aeneofusca* (2.400 e 900  $\mu\text{g/g}$  de folha, respectivamente) (LEE *et al*, 2012), de fato, a concentração final das amostras, após as diluições, estariam muito próximas e/ou abaixo do menor ponto de quantificação do método (25  $\mu\text{g/mL}$ ). Considerando uma recuperação de 100% após a SPE, seriam encontradas concentrações aproximadas de 21  $\mu\text{g/mL}$  e 8  $\mu\text{g/mL}$  para *P. marcgravii* e *P. aeneofusca*, respectivamente.

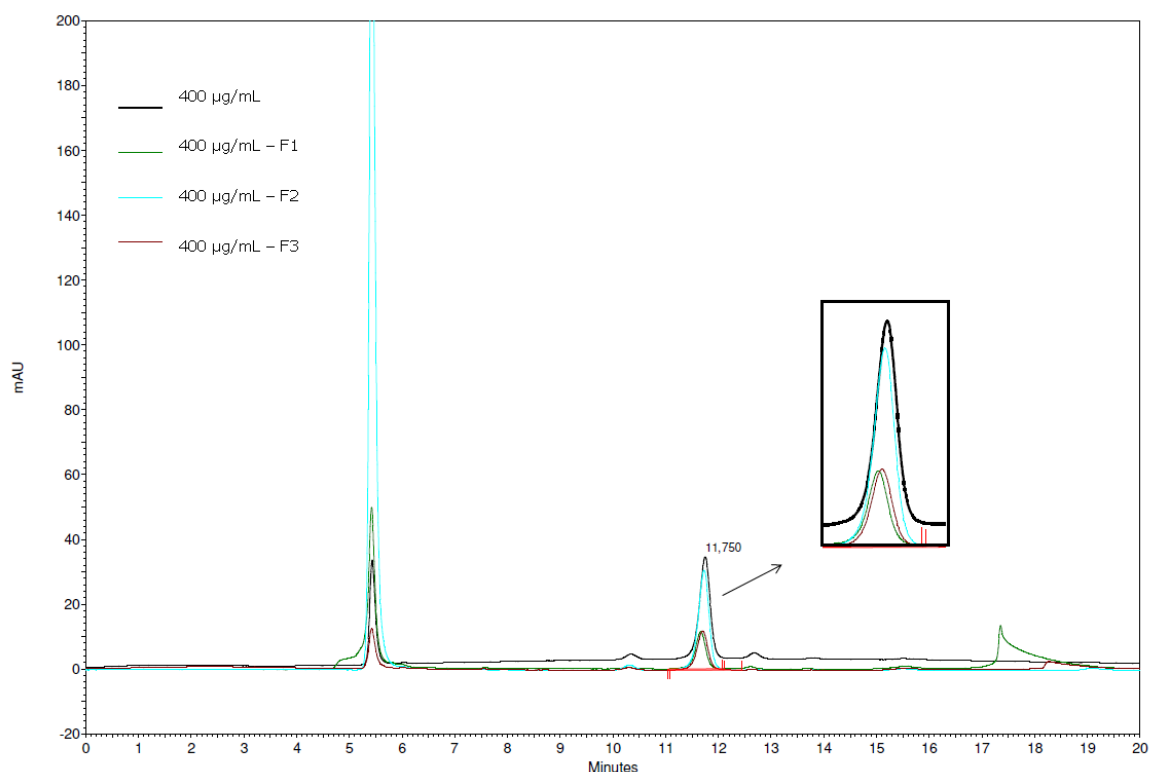


Figura 23. Cromatogramas sobrepostos do ponto 400  $\mu\text{g/mL}$  e as três primeiras frações desse ponto após SPE. A segunda fração é que contém a maior parcela do MFA.

Visto que o procedimento de SPE foi bem sucedido para a retirada de interferentes, mas que a quantidade de MFA presente das amostras não era detectável, o peso das folhas

de cada espécie foi aumentado de 100 mg para 500 mg, e uma nova etapa para concentração do analito foi incorporada à extração, a liofilização.

A liofilização é uma técnica normalmente aplicada em alimentos que visa reduzir a atividade de água por meio da separação por sublimação. O vapor de água é removido do material congelado com aumento gradativo da temperatura, sob vácuo, com redução da pressão até a obtenção de um produto estável e seco (MARQUES & COSTA, 2015). No presente estudo, a liofilização foi utilizada para concentrar o analito após a etapa de filtração. Aproximadamente 6 mL de cada amostra foram recuperados e congelados para realização da técnica.

A curva analítica produzida nesse ensaio foi resultado de uma triplicata, como mostra a Figura 24. O perfil cromatográfico encontrado anteriormente foi mantido, no entanto alguns resultados apresentaram efeito residual “*carry over*”. Apesar disso, a linearidade da curva se manteve ( $R^2 = 0,99$ ).

O efeito residual “*carry over*” se refere a um tipo de contaminação de amostras que causa o reaparecimento de picos de analitos em corridas posteriores, que não deveriam conter de fato aquele analito. É possível observar esse efeito na corrida do Branco (fase móvel), que não deve conter picos expressivos (Figura 27). Esse tipo de contaminação pode ocorrer pelo excesso de analitos na amostra, causando a sobrecarga da coluna, que continua com resíduos da amostra mesmo depois do final da corrida (LETTER, 2015).

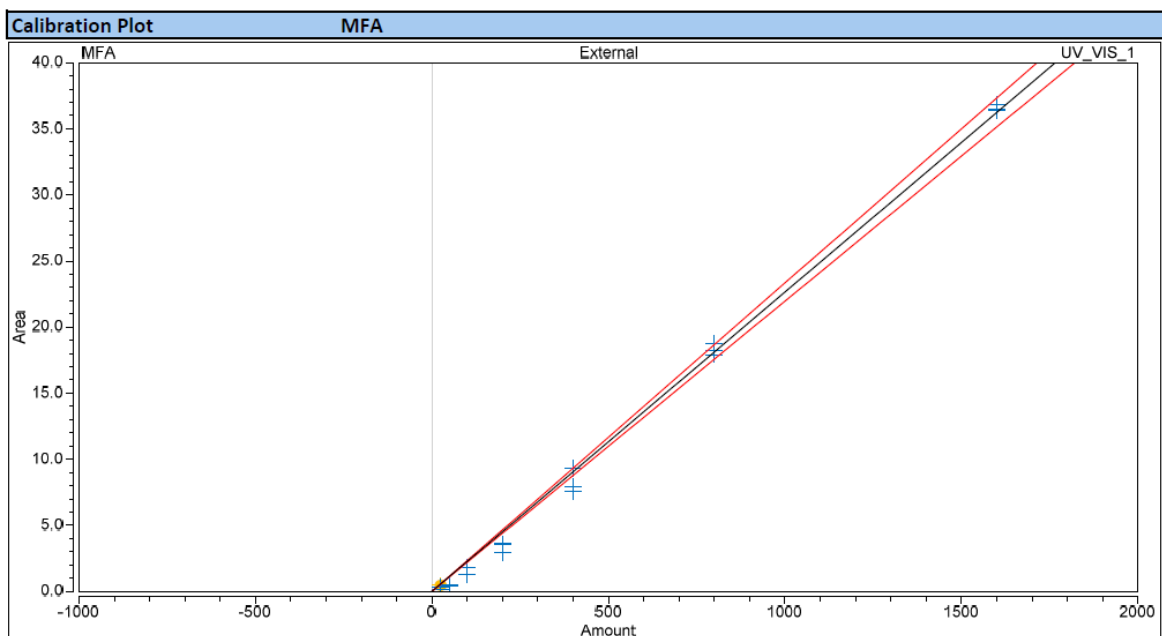


Figura 24. Curva analítica do MFA, em triplicata, referente ao quarto ensaio.  $R^2 = 0,99$ .

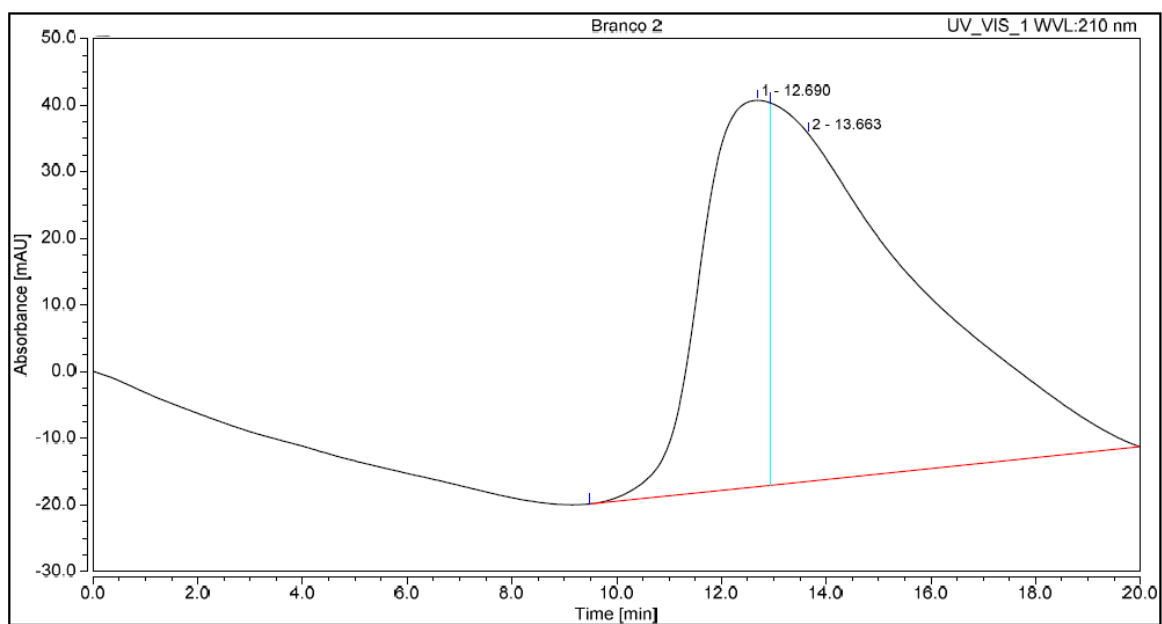


Figura 25. Cromatograma do Branco 2. A presença do pico é indicativa de efeito residual “carry over”.

A partir da “Extração 4” foi possível observar o perfil cromatográfico do MFA nas amostras de *P. marcgravii* e *P. aeneofusca* (Figura 25 e 26). O perfil foi determinado pela combinação do tempo de retenção e do espectro UV-Vis da substância no comprimento de 210 nm. Os resultados de detecção e quantificação estão expressos na Tabela 1.



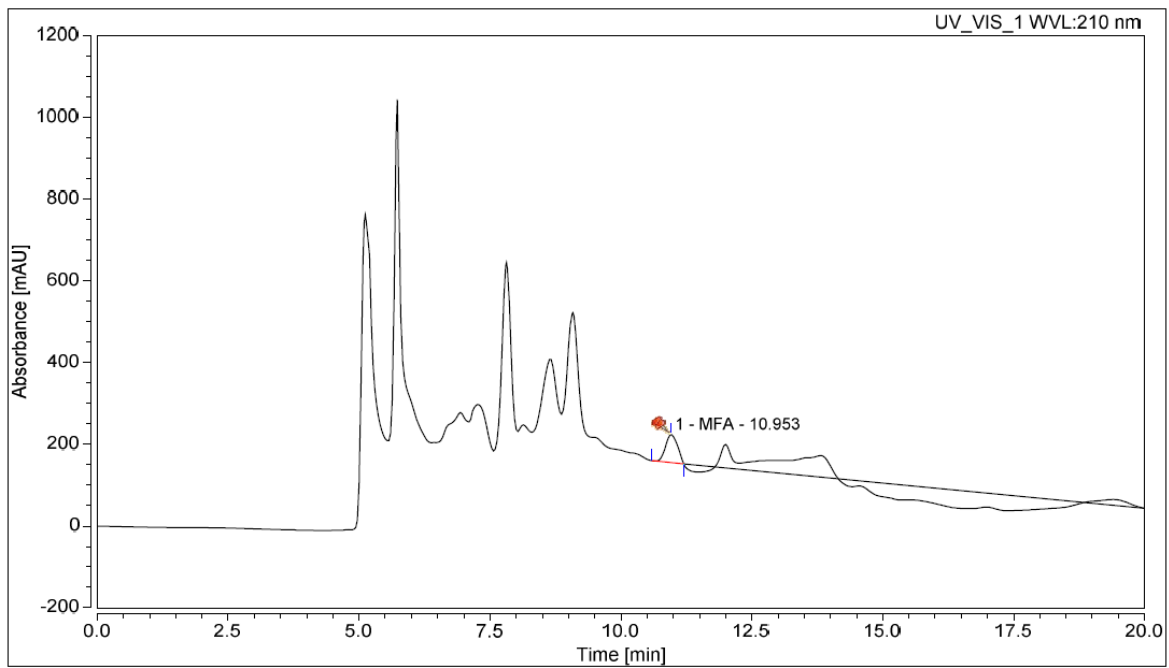


Figura 26. Cromatograma referente à análise da *P. marcgravii* submetida à "Extração 4". É possível observar a presença do perfil cromatográfico do MFA.

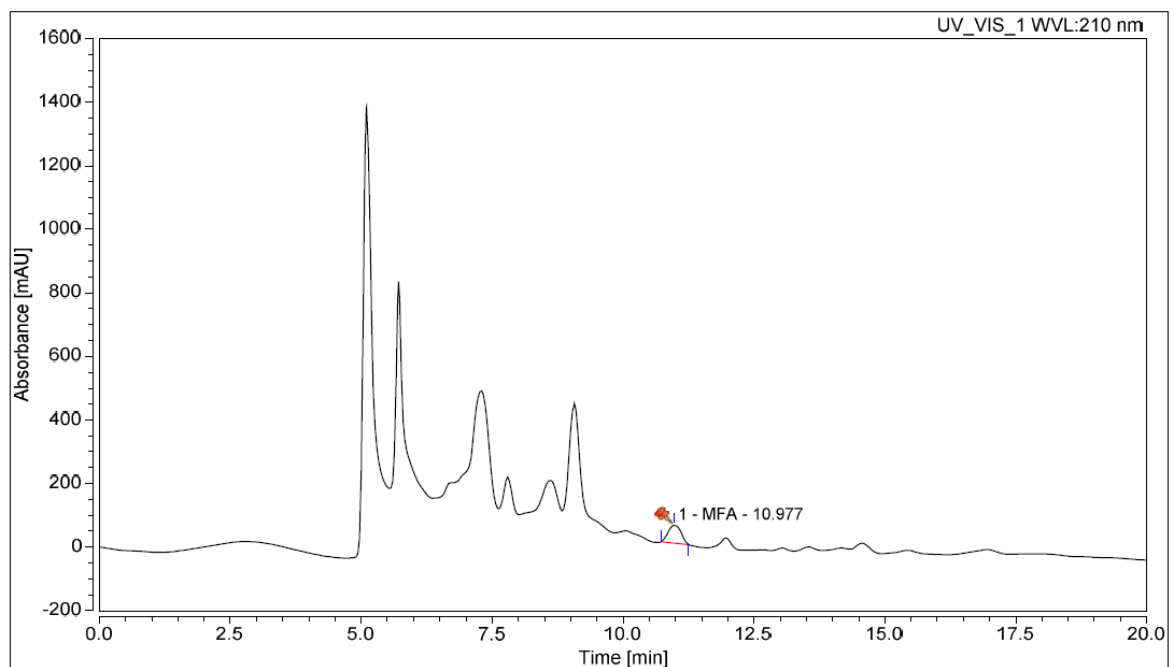


Figura 27. Cromatograma referente à análise da *P. aeneofusca* submetida à "Extração 4". É possível observar a presença do perfil cromatográfico do MFA.

**Tabela 1.** Detecção e quantificação do MFA em amostras de *P. marcgravii* e *P. aeneofusca*.

Amostras	Área do pico (mAU*min)	Média	DP	[MFA] (µg/mL)	Média	DP	CV (%)
<b>P. M. 1</b>	3,785	-	-	167,160	-	-	-
<b>P. M. 2</b>	18,016	15,352	10,5	795,535	677,912	463,3	68,3
<b>P. M. 3</b>	24,255	-	-	1071,043	-	-	-
<b>P. A. 1</b>	16,134	-	-	712,464	-	-	-
<b>P. A. 2</b>	14,498	12,887	4,3	640,1978	569,082	189,2	33,2
<b>P. A. 3</b>	8,03	-	-	354,583	-	-	-

CV: Coeficiente de Variação; DP: Desvio Padrão; [MFA]: Concentração de monofluoroacetato detectada; P. A.: *Palicourea aeneofusca*; P. M.: *Palicourea marcgravii*.

A etapa de concentração foi bem sucedida para a detecção do analito, no entanto, os interferentes também foram concentrados, o que deixou a linha de base com ruídos e que pode ter causado interferência na pureza dos picos de MFA analisados. Explicando, assim, a grande variação na concentração do analito detectado em cada replicata ( $CV > 30\%$ ), como mostra a Tabela 1.

Outra hipótese para a variação da concentração é de que o processo de filtração não foi homogêneo para todas as amostras. A filtração com filtro de papel foi inserida no lugar da centrifugação, pois a relação massa/líquido somada à densidade das folhas impossibilitou a separação por esta técnica. Dessa forma, a repetição da extração ficou prejudicada, pois houve a perda de parte do material vegetal na primeira filtração.

Também foram analisadas amostras contendo o padrão de MFA. Para que assim, fosse determinada a porcentagem de recuperação do analito após o processo de extração. Todavia, os resultados dessas análises, assim como os resultados das amostras sem padrão, sofreram grande variação ( $CV > 20$ ), como mostra a Tabela 2. Dessa forma, não foi possível determinar a porcentagem de recuperação do analito.

**Tabela 2.** Detecção e quantificação do MFA em amostras de *P. marcgravii* e *P. aeneofusca* contendo padrão.

<b>Amostras + 1 mL de MFA 1600 µg/mL</b>	<b>Área do pico (mAU*min)</b>	<b>Média</b>	<b>DP</b>	<b>[MFA] (µg/mL)</b>	<b>Média</b>	<b>DP</b>	<b>CV (%)</b>
<b>P. M. 1 + MFA</b>	15,91	-	-	702,536	-	-	-
<b>P. M. 2 + MFA</b>	29,151	26,825	10,0	1287,253	1184,522	439,7	37,1
<b>P. M. 3 + MFA</b>	35,413	-	-	1563,777	-	-	-
<b>P. A. 1 + MFA</b>	16,114	-	-	711,562	-	-	-
<b>P. A. 2 + MFA</b>	24,711	20,491	4,3	1091,198	904,859	189,9	21,0
<b>P. A. 3 + MFA</b>	20,649	-	-	911,817	-	-	-

CV: Coeficiente de Variação; DP: Desvio Padrão; [MFA]: Concentração de monofluoroacetato detectada; P. A.: *Palicourea aeneofusca*; P. M.: *Palicourea marcgravii*.

Com os resultados encontrados não foi possível chegar a um consenso sobre a real concentração de MFA nas duas espécies vegetais estudadas. Podemos, no entanto, confirmar a presença da substância nessas plantas. Bem como considerar que a metodologia desenvolvida, se aprimorada poderá levar a um modelo de quantificação. Para isso, algumas soluções são possíveis. A primeira, considerando que os interferentes são os responsáveis pela variação do analito, seria aumentar a quantidade de sílica utilizada em cada cartucho de SPE, assim o cartucho aumentaria sua capacidade de reter os interferentes. No entanto, essa solução dependeria fortemente dos recursos financeiros disponíveis para o estudo.

Para a hipótese de que o processo de filtração alterou a concentração final do MFA, outra solução seria aumentar o volume de água da extração, para que o processo de centrifugação fosse novamente eficaz. Nesse caso, a etapa de liofilização seria mais demorada e dependeria da disponibilidade de tempo do analista para o desenvolvimento do método.

## 6. CONCLUSÕES

O desenvolvimento de metodologia capaz de quantificar o MFA é uma etapa importante para o estudo da toxicidade das espécies vegetais estudadas, *P. marcgravii* e *P. aeneofusca*. Tendo em vista os poucos trabalhos que tratam do assunto, com divergências entre os resultados e trazendo técnicas pouco triviais para a rotina laboratorial, o presente estudo conseguiu desenvolver, após sucessivas tentativas um método capaz de detectar e quantificar o MFA. No entanto, a técnica desenvolvida não conseguiu chegar a um consenso sobre a concentração dessa substância nas espécies, visto que as variações de quantificação entre as replicatas foram muito altas ( $CV > 30\%$ ). Por esse motivo a metodologia requer o aprimoramento do preparo das amostras, para que sejam obtidos resultados reprodutíveis. Para isso, sugestões de alterações foram propostas, na tentativa de diminuir ainda mais os interferentes e deixar o processo mais homogêneo. Como o aumento do conteúdo das colunas de SPE e mudanças na etapa de separação das fases do extrato. Estudos futuros deverão solucionar os obstáculos encontrados, bem como a aplicar a metodologia proposta em outras amostras biológicas.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDRADE-EIROA, A.; CANLE, M.; LEROY-CANCELLIERI, V.; CERDÀ, V. **Solid-phase extraction of organic compounds: A critical review (Part I)**. Trac Trends In Analytical Chemistry, [s.l.], v. 80, p. 641-654, jun. 2016.

BLANCO, B.S.; HARAGUCHI, M.; SILVA, J.A.; GÓRNIK, S.L. **Intoxicação natural de caprinos e ovinos por *Palicourea marcgravii* St. Hil. (Rubiaceae)**. Caatinga, Mossoró, v. 17, n. 1, p. 52-56, jan. 2004.

CHHABRA, N. **Mechanism of action of fluoroacetate – “The rat poison”**. Jun. 2015. Disponível em <<http://www.namrata.co/mechanism-of-action-of-fluoroacetate-the-rat-poison/>> Acesso em: 06 out. 2018.

COLLICCHIO-ZUANAZE, R.C.; SAKATE, M. **Aspectos clínicos e terapêuticos da intoxicação por fluoroacetato de sódio em animais domésticos: revisão**. Veterinária Notícias, Uberlândia, v. 11, n. 2, p. 81-89, 2005.

COLLINS, C.H.; BRAGA, G.L.; BONATO, P.S. **Introdução a métodos cromatográficos**. 7. ed. São Paulo: Editora da UNICAMP. 1997. cap. 1, p. 11-26.

COOK, D.; LEE, S.T.; TAYLOR, C.M.; BASSÜNER, B.; RIET-CORREA, F.; PFISTER, J.A.; GARDNER, D.R. **Detection of toxic monofluoroacetate in *Palicourea* species**. Toxicon, Goiânia, n. 80, p. 9-16, jan. 2014.

DAVID, S. **Primary Roles for Secondary Compounds**. Biochemical Systematics and Ecology, Illinois, v. 5, p. 195-199, fev. 1977.

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

GITTER, S. **The Influence of Acetamide on Citrate Accumulation after Fluoroacetate Poisoning**. Department of Biochemistry, University of Oxford, v. 63, p. 182-187, jun. 1955.

KREBS, H.C.; KEMMERLING, W.; HABERMEHL, G. **Qualitative and quantitative determination of fluoroacetic acid in *Arrabidea bilabiata* and *Palicourea marcgravii* by <sup>19</sup>F-NMR spectroscopy.** *Toxicon*, v. 32, n. 8, p. 909-913, mar. 1994.

LANÇAS, F.M. **Extração Em Fase Sólida (spe).** São Carlos: Rima, 2004. p. 93.

LEE, S.T.; COOK, D.; CORREA, F.R.; PFISTER, J.A.; ANDERSON, H.R.; LIMA, F.G.; GARDNER, D.R. **Detection of monofluoroacetate in *Palicourea* and *Amorimia* species.** *Toxicon*, n. 60, p. 791–796, jun. 2012.

LETTER, W. **Sample Carry-Over (Carryover) Contamination in HPLC & LC-MS Systems.** Jul. 2015.

MARQUES, E.C.; COSTA, S.R.R. **Estudo da liofilização pela engenharia de produtos no processamento industrial de alimentos.** *Acta Tecnológica*, Rio de Janeiro, n. 1, v. 10, n. 1, p.44-52, jan. 2015.

MAYNARD, B.C. **Monofluoroacetic acid and related compounds.** Department of Pharmacology, University of Michigan, Ann Arbor, p. 383-424, dez. 1949.

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

NETO, T.S.O.; CORREA, F.R.; LEE, S.T.; COOK, D.; BARBOSA, F.M.S.; NETO, J.F. S.; SIMÕES, S.V.D.; LUCENA R.B. **Poisoning in goats by the monofluoroacetate-containing plant *Palicourea aeneofusca*.** *Toxicon*, Paraíba, n. 135, p. 12-16, 2017.

NOGUEIRA, V.A.; PEIXOTO, T.C.; FRANÇA, T.N.; CALDAS, S.A; PEIXOTO P.V. **Intoxicação por monofluoroacetato em animais.** *Pesq. Vet. Bras., Seropédica*, v. 31, n. 10, p. 823-838, out. 2011.

OLIVEIRA, R.B. **Erva-de-rato**. 2017. Disponível em: <<http://www.geocities.ws/plantastoxicas/erva-de-rato.html>>. Acesso em: 19 ago. 2017.

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

PUBCHEM COMPOUND DATABASE. **Fluoroacetate**. Disponível em <<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/5236#section=Top>>. Acesso em : 29 de agosto de 2017.

SIQUEIRA, M.E.P.B. Fundamentos do Preparo de Amostras. In: MOREAU, R.L.M. **Toxicologia Analítica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008. p. 135-141.

TAYLOR, C.M. *Palicourea* Aubl. (**Rubiaceae: Psychotriaceae**). 2009. Disponível em< <http://www.mobot.org/MOBOT/Research/taylor/palicourea.shtml>>. Acesso em: 29 ago. 2017.

THAMMANA, M. **A Review on High Performance Liquid Chromatography (HPLC)**. *Research & Reviews: Journal of Pharmaceutical Analysis, Visakhapatnam*, v. 5, p. 22-28, out. 2016.

TOKARNIA, C.H.; BRITO, M.F.; BARBOSA, J.D.; PEIXOTO, P.V.; DÖBEREINER J. **Plantas tóxicas do Brasil para animais de produção**. Rio de Janeiro: Helianthus; 2012. p. 286 e 320.

TOKARNIA, C.H.; DÖBEREINER, J.; PEIXOTO, P.V. **Poisonous plants affecting livestock in Brazil**. *Toxicon*, [s.l.], v. 40, p. 1635-1660, dez. 2002.

VASCONCELOS, J.S.; CORREA, F.R.; DANTAS, A.F.M.; MEDEIROS, R.M.T.; DANTAS A.J.A. **Mortes súbitas em bovinos causadas por *Palicourea aeneofusca* (Rubiaceae) e *Mascagnia rigida* (Malpighiaceae) na Zona da Mata Paraibana**. *Pesq. Vet. Bras.* v. 28, n. 10, p. 457-460, out. 2008.

## ANEXO



Ministério do Meio Ambiente  
**CONSELHO DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO**  
SISTEMA NACIONAL DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO E DO CONHECIMENTO TRADICIONAL ASSOCIADO

Comprovante de Cadastro de Acesso  
Cadastro nº A01E08B

A atividade de acesso ao Patrimônio Genético, nos termos abaixo resumida, foi cadastrada no SisGen, em atendimento ao previsto na Lei nº 13.123/2015 e seus regulamentos.

Número do cadastro: A01E08B  
Usuário: Universidade de Brasília  
CPF/CNPJ: 00.038.174/0001-43  
Objeto do Acesso: Patrimônio Genético  
Finalidade do Acesso: Pesquisa

#### Espécie

Palicourea marcgravii  
Palicourea aeneofusca

Título da Atividade: Determinação de monofluoacetato em espécies vegetais

#### Equipe

Mauricio Homem de Mello	Universidade de Brasília
Camila Leticia Ferreira	Universidade de Brasília
Marcio Botelho de Castro	Universidade de Brasília

Data do Cadastro: 06/10/2018 14:42:43  
Situação do Cadastro: Concluído



Conselho de Gestão do Patrimônio Genético  
Situação cadastral conforme consulta ao SisGen em 11:00 de 22/11/2018.



SISTEMA NACIONAL DE GESTÃO  
DO PATRIMÔNIO GENÉTICO  
E DO CONHECIMENTO TRADICIONAL  
ASSOCIADO - **SISGEN**