

DEBORA DA SILVA FREITAS RIBEIRO

**VALIDAÇÃO DE MÉTODO E DETERMINAÇÃO DE PTAQUILOSÍDEO E
PTEROSINA B POR CROMATOGRÁFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA EM
SAMAMBAIAS E NO LEITE DE VACAS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial para obtenção do título de Doutor na área de concentração Medicina e Cirurgia Veterinárias.

Orientador: Prof. Benito Soto Blanco.

**Belo Horizonte
Escola de Veterinária da UFMG
2018**

R484v Ribeiro, Debora da Silva Freitas, 1979-
Validação de método e determinação de ptaquilosídeo e pterossina B por
cromatografia líquida de alta eficiência em samambaias e no leite de vacas / Debora
da Silva Freitas Ribeiro. – 2018.
81 p. : il.

Orientador: Benito Soto Blanco
Tese (doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais. Escola de Veterinária
Inclui bibliografia

1. Leite – Análise – Teses. 2. Samambaia – Teses. 3. Cromatografia líquida de
alta eficiência – Teses. 4. Plantas venenosas – Teses. 5. Plantas venenosas para o gado –
Teses. I. Blanco, Benito Soto. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Escola de
Veterinária. III. Título.

CDD – 636.208 959 52

FOLHA DE APROVAÇÃO

DEBORA DA SILVA FREITAS RIBEIRO

Tese submetida à banca examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIA ANIMAL, como requisito para obtenção do grau de DOUTOR em CIÊNCIA ANIMAL, área de concentração em MEDICINA E CIRURGIA VETERINÁRIAS.

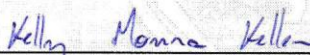
Aprovada em 27 de Abril de 2018, pela banca constituída pelos membros:



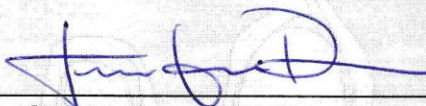
Prof. Benito Soto Blanco
Presidente - Orientador



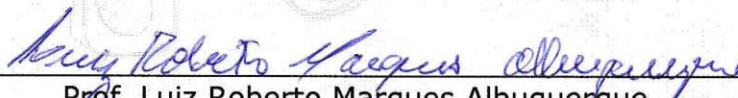
Prof. Elias Jorge Facury Filho
Escola de Veterinária - UFMG



Profª. Kelly Moura Keller
Escola de Veterinária - UFMG



Profª. Josilene Nascimento Seixas
Universidade Federal de Lavras - UFLA



Prof. Luiz Roberto Marques Albuquerque
Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri - UFVJM

"Eu tudo posso naquele que me fortalece"
Filipenses 4:13

Ao meu Esposo,
Filho e meus Pais

Rodrigo Martins Ribeiro

Gabriel Freitas Ribeiro

Maria Lúcia C. da Silva Freitas e

Norberto Souza Freitas

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por me iluminar e por sempre me conduzir pelos melhores caminhos.

Ao meu orientador Prof. Dr. Benito Soto Blanco, pela confiança depositada em mim, pelo empenho em ensinar as coisas da melhor forma possível, pela acessibilidade em todos os momentos.

À minha co-orientadora Profa. Dra. Marília Martins Melo pela confiança depositada em mim, por todos os ensinamentos, sugestões e carinho, os quais muito colaboraram para que eu alcançasse o tão sonhado objetivo.

À minha co-orientadora Profa. Dra. Mônica Maria Oliveira Pinho Cerqueira pela atenção, e principalmente pela maneira tão gentil em que sempre me atendeu.

À Profa. Dra. Kelly Moura Keller por todo empenho na execução dos experimentos, pela acessibilidade em todos os momentos e por todo o conhecimento repassado durante os anos no laboratório.

Agradeço a todos os estagiários e ICs do laboratório de toxocologia, em especial, ao Daniel.

A “família” da Pós, da UFMG, Jéssica, Ana Flávia, Heloisa Pedroza, Lilian, Marina com os quais convivi e aprendi.

Ao Departamento de Pós-Graduação de Ciência Animal da Universidade Federal de Minas Gerais, por me aceitar no curso de doutorado.

À CAPES e FAPEMIG pelo financiamento do experimento.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

“Teu coração está onde estão teus tesouros”

Mateus 6

Ao meu Esposo, Rodrigo Martins Ribeiro, por toda dedicação, por sempre dizer que tudo vai dar certo e que sempre vai estar do meu lado me apoiando. Muito obrigada por tanto amor, sou mais feliz por você fazer parte da minha vida. Amo você.

Ao meu filho, Gabriel Freitas Ribeiro, razão da minha vida e do grande amor que carrego no coração.

A minha Mãe, Maria Lúcia Conceição da Silva Freitas, pelo amor incondicional e por todo incentivo, confiança e dedicação compartilhados os quais foram certamente essenciais para a concretização de meus objetivos. Amo você.

Ao meu Pai, Norberto Souza Freitas (*in memorian*), meu modelo de homem: caráter, doçura, dedicação e persistência. Insostituível. Penso em você todos os dias, em cada detalhe pequeno do cotidiano, o quanto está presente em minha vida, mesmo em outro plano, dentro do meu coração, nas minhas atitudes e decisões. Te amo muito.

Ao meu Irmão, Murilo da Silva Freitas, parceiro fiel e indissolúvel.

Aos meus tios Fátima e Norival, por todo amor, carinho e apoio desde a infância até os dias de hoje.

Aos meus Avôs paternos Amélia e Sebastião (*in memorian*) e maternos Irene e João (*in memorian*), por me proporcionarem tanto amor.

A Nadir e Altair por sempre estarem presentes me apoiando.

A todos meus familiares por suas presenças constantes e apoio inigualáveis.

SUMÁRIO

RESUMO	14
ABSTRACT.....	15
1. INTRODUÇÃO GERAL	16
2. OBJETIVOS	17
2.1. Objetivo geral.....	17
2.2. Objetivos específicos.....	17
3. REVISÃO DE LITERATURA	18
INTOXICAÇÃO POR PLANTAS DO GÊNERO <i>Pteridium</i> (Dennstaedtiaceae) EM ANIMAIS	18
3.1. Introdução	18
3.2. Compostos bioativos	19
3.3. Mecanismo de ação do ptaquilosídeo.....	21
3.4. Intoxicação por <i>Pteridium</i> spp. em animais de produção	23
3.5. Risco à saúde humana	28
3.6. Técnicas analíticas para detecção e quantificação de ptaquilosídeo e seus produtos em matrizes diversas	28
3.7. Possibilidades e tendências no preparo de amostra.....	30
3.8. Métodos de extração para análise de resíduos.....	30
3.9. Métodos de “clean-up” para análise de resíduos.....	31
3.10. Método QuEChERS	31
3.11. Cromatografia	33
3.12. Cromatografia líquida	34
3.13. Parâmetros analíticos para validação de métodos	35
4. MATERIAL E MÉTODOS	38
4.1. Instrumentação	38
4.2. Reagentes e material diverso.....	38
4.3. Metodologia para obtenção do padrão de Pterosina B	39
4.4. Metodologia para quantificação de ptaquilosídeo e pterosina B em samambaias	42
4.4.1. Amostras de plantas analisadas	42
4.4.2. Método de extração para identificação de pterosina B.....	42
4.4.3. Método de extração para identificação de ptaquilosídeo	43
4.5. Técnica para detecção em leite.....	44

4.5.1. Preparo das amostras de leite	44
4.6. Detecção de pterossina B e ptaquilosídeo no material vegetal e no leite por CLAE-UV ..	49
4.6.1. Preparo da curva do padrão analítico	49
4.6.2. Condições cromatográficas	50
4.7. Parâmetros analíticos para validação da técnica	50
4.7.1. Estudo da seletividade	50
4.7.2. Determinação da linearidade das curvas analíticas	50
4.7.3. Determinação do limite de detecção (LD) e quantificação (LQ)	50
4.7.4. Exatidão.....	51
4.8. Análise estatística.....	51
5. RESULTADOS.....	52
5.1. Obtenção do padrão de Pterossina B para análise das amostras	52
5.2. Validação do método analítico por CLAE-UV para pesquisa de ptaquilosídeo e pterossina B em folhas maduras e brotos de samambaias	52
5.2.1. Linearidade.....	53
5.2.3. Limite de detecção e quantificação	53
5.3. Quantificação de ptaquilosídeo e pterossina B em espécies de samambaias.....	54
5.2. Validação do método analítico por CLAE-UV para pesquisa de ptaquilosídeo e pterossina B no leite cru	60
5.2.1. Estudos de métodos de extração e <i>clean-up</i> para as amostras de leite cru	60
5.2.2. Linearidade.....	60
5.2.3. Seletividade	60
5.2.4. Exatidão e limites de detecção e de quantificação	61
5.3. Quantificação de ptaquilosídeo no leite cru	61
6. DISCUSSÃO.....	62
7. CONCLUSÕES.....	66
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	67
9. ANEXOS.....	81

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Relação do número de amostras de folhas	42
Tabela 2. Relação do número de amostras de brotos	42
Tabela 3. Valores médios \pm SM de ptaquilosídeo e pterosina B (mg/g) em folhas maduras de <i>P. arachnoideum</i> de diferentes regiões do Brasil	54
Tabela 4. Valores médios \pm SM de ptaquilosídeo e pterosina B (mg/g) em brotos de <i>P. arachnoideum</i> de diferentes regiões do Brasil	54
Tabela 5. Concentração média de ptaquilosídeo e pterosina B (mg/g) em duas espécies de samambaias responsáveis por surtos de hematúria enzoótica bovina em duas propriedades na região noroeste da Argentina	58
Tabela 6. Valores médios \pm SM de ptaquilosídeo e pterosina B (mg/g) em samambaias coletadas no estado de Minas Gerais	58

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Detalhe de frondes de: A- <i>Pteridium arachnoideum</i> (Belo Horizonte, MG) e B- <i>Pteridium aquilinum</i> (Parque Nacional de Picos de Europa, Espanha).	18
Figura 2. Esquema da via de reação do ptaquilosídeo (adaptado de Yamada et al., 2007).....	21
Figura 3. Modelo de múltiplos estágios da carcinogênese induzida por samambaia. PT- ptaquilosídeo, PTA- ptaquilosídeo ativado (dienona). Fonte: adaptado de Shahin et al., (1999).	22
Figura 4. Vaca apresentando hematúria em decorrência do consumo de <i>Pteridium arachnoideum</i> (São Roque de Minas, MG).....	26
Figura 5. Exemplo de esquema de uma aplicação do método QuEChERS. Fonte Bandeira et al. (2014).	32
Figura 6. Diagrama esquemático de um sistema de cromatografia líquida de alta eficiência. Fonte: Lanças (2009).....	34
Figura 7. Fluxograma da metodologia para obtenção do padrão de Pterosina B.	41
Figura 8. Fluxograma da metodologia para identificação de pterosina B no material vegetal. ..	43
Figura 9. Metodologia para identificação de ptaquilosídeo no material vegetal.....	44
Figura 10. Fluxograma do método de extração A (Método de QuEChERS) para clean-up das amostras de leite cru.....	46
Figura 11. Fluxo do método de extração B para <i>clean-up</i> das amostras de leite cru.	47
Figura 12. Fluxograma do método de extração C para <i>clean-up</i> das amostras de leite cru.	48
Figura 13. Fluxograma do método de extração D para <i>clean-up</i> das amostras de leite cru.	49
Figura 14. Cromatograma do padrão de pterosina B com 71,6% de pureza determinada por CLAE-UV.	52
Figura 15. Cromatograma do padrão de pterosina B.....	53
Figura 16. Linearidade da curva do padrão de pterosina B.....	53
Figura 17. Cromatograma do padrão de Pterosina B.	55
Figura 18. Cromatograma da extração de folhas maduras de <i>P. arachnoideum</i> da região de Esmeraldas/MG para determinação de ptaquilosídeo.	55
Figura 19. Cromatograma da extração de folhas maduras de <i>P. arachnoideum</i> da região de Esmeraldas/MG para determinação de pterosina B.	55
Figura 20. Cromatograma do padrão de Pterosina B.	56
Figura 21. Cromatograma da extração de brotos de <i>P. arachnoideum</i> da região de Ouro Branco/MG para determinação de ptaquilosídeo.	56
Figura 22. Cromatograma da extração de brotos de <i>P. arachnoideum</i> da região de Ouro Branco/MG para determinação de pterosina B.	56
Figura 23. Correlação entre as concentrações de ptaquilosídeo e de pterosina B nas folhas maduras de <i>P. arachnoideum</i> . Teste de correlação de Pearson.....	57
Figura 24. Correlação entre as concentrações de ptaquilosídeo e de pterosina B nos brotos de <i>P. arachnoideum</i> . Teste de correlação de Pearson.	57
Figura 25. Cromatograma do padrão de Pterosina B.	59
Figura 26. Cromatograma da extração de <i>Pteris deflexa</i> da região de Orán/Argentina para determinação de ptaquilosídeo.	59
Figura 27. Cromatograma da extração de <i>Pteris deflexa</i> da região de Orán/Argentina para determinação de pterosina B.	59
Figura 28. Linearidade da curva na matriz leite cru.....	60

Figura 29. Cromatograma da solução padrão de Pterosina B no leite.....	61
Figura 30. Cromatograma da extração no leite sem nenhum analito.	61

LISTA DE ABREVIATURAS

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária
BPV-2 – Papilomavírus Bovino do tipo 2
CCD – Cromatografia de Camada Delgada
CEMM – Centro de Excelência em Monitoramento de Multirresíduos
CLAE – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CV – Coeficiente de variação
CVDS – Carcinoma de Vias Digestivas Superiores
DLLME – *Dispersive Liquid-Liquid Microextraction*
DMVP – Departamento de Medicina Veterinária Preventiva
DPR – Desvio Padrão Relativo
D-SPE – *Dispersive Solid Phase Extraction*
ESI+ - Ionização por Electrospray em Modo Positivo
HEB – Hematúria Enzoótica Bovina
HCN – Ácido Cianídrico
HPLC – *High Performance Liquid Chromatography*
GC-MS/MS – Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas em Série
GPC – Cromatografia de Permeação em Gel
IARC – Agência Internacional de Pesquisa sobre o Câncer
KOH – Hidróxido de Potássio
LD – Limite de Detecção
LINACH – Lista Nacional de Agentes Cancerígenos para Humanos
LC-MS/MS - Cromatografia Líquida acoplada à Espectrometria de Massas em Série
LLE – *Liquid-Liquid Extraction*
LMR – Limite Máximo Residual
LQ – Limite de Quantificação
MAPA – Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento
MMQO – Método do Mínimo Quadrado Ordinário
PAMVET – Programa de Análise de Resíduos de Medicamentos Veterinários em Alimentos
PNCR – Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes
PSA – *Primary Secondary Amine*
SBSE – *Stir Bar Sorptive Extraction*
Pta – Ptaquilosídeo
PtB – Pterosina B
SPE – *Solid Phase Extraction*
SPME – *Solid Phase Microextraction*
TPP – Pirofosfato de Tiamina
UFMG – Universidade Federal de Minas Gerais
UPLC – Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência
UV –Ultravioleta

RESUMO

A espécie *Pteridium* spp. é conhecida no Brasil como samambaia, samambaia do campo ou pluma. As espécies existentes são: *P. arachnoideum* e *P. caudatum*. A samambaia já foi registrada em praticamente todos os estados brasileiros. Quanto a sua ocorrência, está presente em regiões montanhosas, desde o sul da Bahia até o Rio Grande do Sul, porém também é invasora em áreas dos estados do Amazonas, Acre, Mato Grosso e Pernambuco. É encontrada em regiões frias de alta pluviosidade, solos ácidos, arenosos e bem drenados. *P. arachnoideum* tem dois princípios tóxicos: a tiaminase, responsável pela intoxicação em monogástricos, e o ptaquilosídeo (Pta), substância cancerígena, responsável pela intoxicação em ruminantes. Os animais de produção consomem a samambaia, especialmente as suas partes mais jovens, mesmo não sendo palatável. Os efeitos da ingestão são vários, dependendo da espécie animal e da dose ingerida. Cinco diferentes síndromes clínicas são descritas na literatura: deficiência de tiamina, degeneração progressiva da retina, síndrome hemorrágica aguda (diátese hemorrágica), hematúria enzoótica bovina (HEB) e carcinomas de vias digestivas superiores. As técnicas disponíveis atualmente para determinação do Pta promovem sua conversão em pterosina B (PtB), mas esta possui limitada disponibilidade comercial. O presente estudo teve por objetivos desenvolver uma metodologia para obtenção de PtB e determinar a quantidade do Pta, por meio de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), em samambaias e no leite. Foram mensurados Pta e PtB em samambaias das espécies *Pteridium arachnoideum*, coletadas nos estados de Minas Gerais e Rio Grande do Sul, e *Dicranopteris flexuosa*, *Gleichenella pectinata* e *Sticherus lanuginosus* coletadas no Estado de Minas Gerais. Além disto, foram avaliadas amostras das samambaias *Pteris deflexa* e *Pteris plumula*, provenientes de propriedades da Argentina com casos de HEB, mas livres de qualquer espécie de *Pteridium*. Ao todo, foram utilizadas 47 amostras de folhas maduras e 23 amostras de broto. Foram utilizadas amostras de leite brancas para o desenvolvimento e avaliação da técnica analítica. Para a aplicação da técnica validada, foram utilizadas 60 amostras de leite cru de tanques provenientes de diversas propriedades do estado de Minas Gerais (MG), além de 20 amostras de leite cru de pequenas propriedades do município de Ouro Branco, MG, e 5 amostras do município de Esmeraldas, MG, ambas propriedades com histórico de casos de HEB e com presença da *P. arachnoideum* na pastagem. A concentração de Pta presente nas amostras de folhas maduras de *P. arachnoideum* variou de 2,486±0,439 a 2,753±0,844 mg/g e de PtB variou de 0,684±0,152 a 0,885±0,197 mg/g. Em brotos de *P. arachnoideum* obtivemos para Pta valores entre 12,472±5,620 a 18,809±2,338 mg/g e de PtB variou de 4,026±0,982 a 10,424±0,233 mg/g. Os valores encontrados nas espécies *P. deflexa* e *P. plumula*, para Pta variou de 2,424 a 3,235 mg/g e para PtB 0,727 a 1,543 mg/g. Além disso, *S. lanuginosus* apresentou níveis de Pta entre 2,466±0,173 mg/g e de PtB 1,572±0,166 mg/g e *D. flexuosa* apresentou níveis de Pta entre 0,892±0,215 mg/g e de PtB 0,466±0,083 mg/g. Em *G. pectinata*, não foi detectada a presença destes compostos tóxicos até o presente momento. Assim, *S. lanuginosus* e *D. flexuosa* foram identificadas pela primeira vez como produtoras de Pta e PtB, potencialmente tóxicas para ruminantes. Com relação às metodologias utilizadas para o *clean-up* das amostras de leite, foram encontradas duas metodologias eficientes na limpeza da matriz e também na recuperação do padrão nos testes de fortificação. No entanto, não foram detectadas amostras de leite positivas para Pta e PtB.

Palavras Chave: *Pteridium aquilinum*. *Pteridium arachnoideum*. *Pteris deflexa*. *Pteris plumula*. *Dicranopteris flexuosa*. *Sticherus lanuginosus*. Plantas tóxicas.

ABSTRACT

The species Pteridium spp. is a poisonous plant known as bracken fern. The existing species in Brazil are: P. arachnoideum and P. caudatum. The fern has already been recorded in practically all Brazilian states. As for its occurrence, it is present in mountainous regions, from the south of Bahia to Rio Grande do Sul states, but is also invasive in areas of the states of Amazonas, Acre, Mato Grosso and Pernambuco. It is found in cold regions of high rainfall, acid soils, sandy and well drained. P. arachnoideum has two toxic principles: thiaminase, responsible for monogastric intoxication, and ptaquiloside (Pta), the carcinogenic substance responsible for intoxication in ruminants. Production animals consume the fern, especially its younger parts, even though it is not palatable. The effects of the ingestion are several, depending on the animal species and the dose ingested. Five different clinical syndromes are described in the literature: thiamine deficiency, progressive retinal degeneration, acute hemorrhagic syndrome (hemorrhagic diathesis), bovine enzootic hematuria (BEH) and upper digestive tract carcinomas. The currently available techniques for determination of Pta promote its conversion into pterosin B (PtB), but this has limited commercial availability. The aim of the present study was to develop a methodology for obtaining pterosin B (PtB) and for determining the amount of the ptaquiloside (Pta) carcinogen in plants and milk by high performance liquid chromatography (HPLC). Pta and PtB were measured in ferns Pteridium arachnoideum, collected in the states of Minas Gerais and Rio Grande do Sul, and in Dicranoptris flexuosa, Gleichenella pectinata and Sticherus lanuginosus collected in the state of Minas Gerais. In addition, samples of the ferns Pteris deflexa and Pteris plumula were sampled from Argentinian farms with BEH cases, but free of any Pteridium species. A total of 47 samples of mature leaves and 23 shoots samples were used. Blank milk samples were used for the development and evaluation of the analytical technique. For the application of the validated technique, 60 samples of raw tank milk from several farms in Minas Gerais (MG) state, and 20 samples of raw milk from small properties from Ouro Branco city, MG, and 5 samples from Esmeraldas city, MG, both with cases of HEB and presence of P. arachnoideum in the rangeland. The concentration of Pta in leaf samples of P. arachnoideum ranged from 2.486±0.439 to 2.753±0.844 mg/g and PtB ranged from 0.684±0.152 to 0.885±0.197 mg/g, in P. arachnoideum sprouts Pta values ranged from 12.472±5.620 to 18.809±2.338 mg/g and PtB ranged from 4.026±0.982 to 10.424±0.233 mg/g. The values found in P. deflexa and P. plumula for Pta ranged from 2.424 to 3.235 mg/g and for PtB ranged from 0.727 to 1.543 mg/g. In addition, S. lanuginosus showed Pta levels of 2.466±0.173 mg/g and PtB levels of 1.572±0.166 mg/g, and D. flexuosa had Pta levels of 0.892-0.215 mg/g and PtB 0.466-0.083 mg/g. In G. pectinata, these toxic compounds were not detected until the present moment. Thus, S. lanuginosus and D. flexuosa were identified for the first time as producers of Pta and PtB, potentially toxic to ruminants. Regarding the methodologies used for the clean-up of the milk samples, two methods were efficient in cleaning the matrix and in the recovery of the standard after fortification tests. However, no milk samples were found positive for Pta and PtB.

Keywords: *Pteridium aquilinum. Pteridium arachnoideum. Pteris deflexa. Pteris plumula. Dicranoptris flexuosa. Sticherus lanuginosus. Poisonous plants.*

1. INTRODUÇÃO GERAL

A produção brasileira de leite, em 2016, foi de 33,62 bilhões de litros, destacando-se os estados de Minas Gerais, Goiás, Rio Grande do Sul e Paraná como os maiores produtores (IBGE, 2016). Com relação à bovinocultura de corte, em 2015, o Brasil se destacou com o maior rebanho bovino (209 milhões de cabeças), o segundo maior consumidor (38,6 kg/habitante/ano) e o segundo maior exportador (1,9 milhões toneladas equivalente carcaça) de carne bovina do mundo (Gomes, et al., 2017). Levando em consideração estes valores, é evidente que a bovinocultura representa uma das mais importantes e tradicionais atividades econômicas em nosso país. No entanto, a produtividade do rebanho nacional é impactada negativamente por problemas na saúde dos animais, gerando consideráveis perdas econômicas. Uma das mais importantes causas destas perdas é promovida pelas plantas tóxicas (Barbosa et al., 2007). As plantas tóxicas de interesse na pecuária são aquelas espécies que provocam intoxicação nos animais, mas apenas sob condições naturais (Barbosa et al., 2007). Os principais fatores responsáveis pela intoxicação e morte dos animais, são a falta de pastagens adequadas, de modo geral, a escassez de alimentos (Pessoa et al., 2013).

Na pecuária, as ingestões de plantas tóxicas representam uma significativa causa de prejuízos econômicos uma vez que influenciam diretamente na produção animal (Mello et al., 2010). Podem-se classificar estes prejuízos em perdas diretas (morte, perda de peso ou redução do crescimento, distúrbios reprodutivos) e indiretas (custo médicos, construção de cercas, alterações no manejo) (Barbosa et al., 2007). Ainda, deve-se enfatizar que as intoxicações por plantas podem afetar indiretamente seres humanos. Dentre estes riscos, o principal está na contaminação do alimento produzido (carne, leite ou mel) por resíduos de toxinas das plantas (Riet-Correa e Medeiros, 2001). Estes resíduos muitas vezes são de difícil determinação e falta também legislação que estabeleça os limites máximos residuais (LMR) permitidos.

A samambaia anteriormente classificada como *Pteridium aquilinum* é uma das plantas tóxicas de grande importância no país, responsável por importantes perdas econômicas na pecuária nacional, principalmente, mas não exclusivamente, nas regiões Sul e Sudeste (Anjos et al., 2008; Furlan et al., 2014). Recentemente, esta espécie foi reclassificada em diversas espécies do mesmo gênero, sendo *Pteridium arachnoideum* e *Pteridium caudatum* as existentes no Brasil (Der et al., 2009; Yanez et al., 2016). As plantas do gênero *Pteridium* contêm diversos princípios ativos, sendo o de maior relevância toxicológica o ptaquilosídeo, um composto carcinogênico. Os efeitos tóxicos variam de acordo com a espécie animal, a dose ingerida e o tempo de consumo. Os quadros clínicos são a intoxicação cianídrica, a deficiência de tiamina, a degeneração progressiva da retina, a síndrome hemorrágica aguda ou diátese hemorrágica, a hematuria enzoótica bovina e as neoplasias do trato gastrointestinal superior (Anjos et al., 2008; Furlan et al., 2014). É importante ressaltar que outras espécies de samambaias além daquelas do gênero *Pteridium* podem causar intoxicações nos animais de produção (Micheloud et al., 2017). No entanto, ainda não está bem elucidado, a quantidade que seus constituintes tóxicos são eliminados nos produtos de origem animal e o risco real para o ser humano na América dos Sul.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Deteccção e quantificação do carcinógeno ptaquilosídeo e da pterosina B, por meio de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) com deteccção por ultravioleta (UV) em samambaias e no leite.

2.2. Objetivos específicos

Padronizar formas de extração e condições cromatográficas por meio de CLAE para a determinação das concentrações do ptaquilosídeo e da pterosina B em diferentes partes de samambaias.

Determinar as concentrações de ptaquilosídeo e pterosina B em *Pteridium arachnoideum*, *Pteris deflexa*, *Pteris plumula*, *Dicranoptris flexuosa*, *Gleichenella pectinata* e *Sticherus lanuginosus* coletadas no Brasil e na Argentina.

Comparar os níveis de ptaquilosídeo e pterosina B em diferentes partes de *Pteridium arachnoideum* coletadas em diferentes localizações.

Desenvolver uma metodologia analítica utilizando CLAE para a determinação das concentrações do ptaquilosídeo no leite bovino.

Pesquisar a quantidade residual de ptaquilosídeo no leite de vacas em propriedades no estado de Minas Gerais, Brasil.

3. REVISÃO DE LITERATURA

INTOXICAÇÃO POR PLANTAS DO GÊNERO *Pteridium* (Dennstaedtiaceae) EM ANIMAIS

3.1. Introdução

As plantas do gênero *Pteridium* são conhecidas no Brasil como samambaia, samambaia do campo ou pluma (Tokarnia et al., 2012). Anteriormente, este gênero já foi classificado como pertencente à família Polypodiaceae e foi considerado com apenas uma espécie, *Pteridium aquilinum*, mas com 12 variedades (Tryon, 1941; Tryon; Tryon, 1982). No entanto, após a realização de estudos biomoleculares, o gênero *Pteridium* passou a pertencer à família Dennstaedtiaceae, e outras espécies foram reconhecidas (Thomson, 2000). Segundo a classificação proposta por Der et al. (2009), as espécies existentes na América do Sul são *Pteridium arachnoideum* (Figura 1) e *Pteridium caudatum* (Assis; Salino, 2011; Yanez et al., 2016).



Figura 1. Detalhe de frondes de: A- *Pteridium arachnoideum* (Belo Horizonte, MG) com a presença de uma protuberância entre as folhas e B- *Pteridium aquilinum* (Parque Nacional de Picos de Europa, Espanha).

No Brasil, estas espécies já foram registradas em praticamente todos os estados (Schwartzburd, 2015). Quanto a sua ocorrência, está presente em regiões montanhosas, desde o sul da Bahia até o Rio Grande do Sul, mas também é invasora em áreas dos estados do Amazonas, Acre, Mato Grosso e Pernambuco. É encontrada em regiões frias de alta pluviosidade, solos ácidos, arenosos e bem drenados (Tokarnia et al., 2012). Estas samambaias são plantas muito resistentes frente a diversos ambientes. Uma das características que confere a resistência é o rizoma, que está profundamente enterrado, permitindo à samambaia resistir quando roçada ou queimada (Durão et al., 1995). Além disso, possui capacidade invasora muito grande em decorrência de seus esporos (Rodríguez de la Cruz et al., 2009).

Em 1893, na Inglaterra, foi relatada uma série de casos de intoxicações em bovinos após o consumo de *Pteridium aquilinum*. Foram levantadas suspeitas sobre o potencial tóxico da samambaia, entretanto, apenas décadas mais tarde, com a reprodução experimental da diátese hemorrágica, estas suspeitas foram confirmadas (Naftalin; Cushine, 1954; Evans et al., 1954). Antes disso, os trabalhos de pesquisa com esta planta estavam voltados para seu potencial tiaminolítico, comprovado por meio da indução de lesões neurológicas em ratos (Evans; Evans, 1949; Thomas; Walker, 1949).

Em 1940, foi estabelecida a relação entre hematúria enzoótica bovina (HEB) e tumores de bexiga em bovinos que ingeriam samambaia, durante períodos prolongados (Hirono et al., 1977). O efeito carcinogênico desta planta foi confirmado por Rosenberger e Heesch (1960) após a reprodução experimental de neoplasias na bexiga de bovinos alimentados com *Pteridium aquilinum*. Evans e Mason (1965) também demonstraram este efeito após a constatação de múltiplos adenocarcinomas intestinais em camundongos tratados com ração contendo esta planta.

No Brasil, os primeiros casos de intoxicação pela samambaia em bovinos foram descritos no início da década de 1950. Daí por diante estabeleceu-se uma correlação entre pastos severamente invadidos pela *Pteridium arachnoideum* com uma alta incidência de carcinomas nas vias digestivas superiores em bovinos, tumores raros em regiões onde a planta não existe (Döbereiner et al., 1967; Tokarnia et al., 1969).

São citadas três formas de intoxicação do homem pela samambaia: ingestão da planta, contato físico com os esporos (inalação ou ingestão da água) e ingestão do leite cru de animais contaminados (Potter; Baird, 2000). O consumo do broto de samambaia é bastante comum, reconhecido como tradicional em algumas regiões como o Japão. Para o consumo, o broto é fervido na água com cinzas ou bicarbonato de sódio, sendo ingerido como salada (Santos et al., 1992). Este procedimento reduz, porém não elimina a carcinogenicidade do broto (Hirono et al., 1972). No Brasil esse hábito, existe em populações orientais da cidade de São Paulo e norte do Paraná. Populações não orientais também consomem o broto nas regiões de Minas Gerais e Espírito Santo. Alguns estudos demonstram correlação entre regiões infestadas por samambaia e índices elevados de câncer gástrico em seres humanos, principalmente os que vivem em áreas rurais (Cruz; Bracarense, 2004).

3.2. Compostos bioativos

A samambaia contém uma variedade de compostos químicos heterogêneos, cujas propriedades biológicas ainda continuam mal compreendidas (Tourchi-Roudsari, 2014). Todas as partes da planta são tóxicas; no entanto, os brotos e as folhas, partes mais consumidas pelos animais, são os locais onde se acumulam os mais importantes princípios tóxicos da planta (Gil da Costa et al., 2012).

Glicosídeos cianogênicos

O principal glicosídeo cianogênico presente na planta é a prunasina, cuja função é a proteção da planta contra ataques de insetos e mamíferos herbívoros (Tourchi-Roudsari, 2014). De acordo com Vetter (2009), a concentração de prunasina é de 10,4-61,3 mg/g na planta fresca. Os glicosídeos cianogênicos são hidrolisados enzimaticamente por glicosidases, liberando o ácido cianídrico (HCN), que bloqueia a fosforilação oxidativa celular por meio da inibição da enzima

citocromo c oxidase (citocromo a-a3 e complexo 4) da cadeia transportadora de elétrons (Câmara et al., 2014).

Constituintes antagonistas da tiamina

A presença de enzimas que degradam a tiamina (vitamina B1), as tiaminases, foram verificadas nas samambaias (Kenten, 1957; Meyer, 1989), sendo estas enzimas caracterizadas como tiaminases tipos 1 e 2 (Meyer, 1989). A concentração das tiaminases é mais alta nos rizomas do que na parte aérea da planta (Evans, 1976). A ação desta enzima pode resultar na deficiência de tiamina no organismo, levando a lesões no sistema nervoso central (Meyer, 1989; Gil da Costa et al., 2012).

Flavonoides, taninos e ácido chiquímico

Uma série de flavonoides foram identificados na samambaia, incluindo quercetina e caempferol. Esses compostos estão presentes em concentrações de até 10-25 mg/g de material vegetal (Gil da Costa et al., 2012).

Os taninos são principalmente derivados da procianidina e prodelfidina, e podem atingir até 120 mg/g em material vegetal. Embora a toxicidade da samambaia não esteja comumente ligada aos taninos, é concebível que estes compostos possam contribuir para irritar o trato gastrointestinal de animais alimentados com a samambaia (Gil da Costa et al., 2012).

O ácido chiquímico foi encontrado na concentração 1,44 mg/g de planta seca em samambaias na Inglaterra. É improvável que este composto desempenhe um papel importante em carcinogênese induzida pela samambaia, já que a formação do princípio tóxico ocorre em pH alcalino, e nesta condição, o ácido chiquímico é eliminado (Gil da Costa et al., 2012).

Iludano, Iludano Sesquiterpeno e Nor-Sesquiterpeno

Esses compostos incluem uma numerosa família de pterosinas (mais de 20 tipos) e seus glicosídeos, denominados pterósidos (Turchi-Roudsari, 2014). Pouco se sabe sobre as propriedades tóxicas desses compostos, mas é esperado a mesma reatividade e efeitos tóxicos do ptaquilósido (Gil da Costa et al., 2012). O ptaquilósido foi descoberto em 1983, tendo sua carcinogenicidade comprovada em 1984 (Yamada et al., 2007). Além da *Pteridium arachnoideum*, o ptaquilósido também foi encontrado em outras espécies de samambaias, como *Cheilanthes sieberi* na Austrália (Smith et al., 1989), *Pteris deflexa* e *Pteris plumula* na Argentina (Micheloud et al., 2017) e *Pteris cretica*, *Dryopteris cochleata*, *Hypodematium crenatum*, *Onychium cryptogrammoides*, *Onychium tenuifrons* (Pathania et al., 2012), *Onychium contiguum* e *Onychium japonicum*, na Índia (Rai et al., 2017).

O composto químico da samambaia mais importante das plantas do gênero *Pteridium* é um glicosídeo norsesquiterpenóide, do tipo iludano, denominado de ptaquilósido, que possui potente propriedade cancerígena (Yamada et al., 2007). Este composto pode ser transferido pelo leite (Francesco et al., 2011), o que representa um potencial risco para quem o consuma.

3.3. Mecanismo de ação do ptaquilosídeo

Diversos trabalhos vêm sendo realizados com objetivo de elucidar o mecanismo de toxicidade e o seu potencial carcinogênico. Desde a publicação de Evans e Mason (1965), relatando a potente carcinogenicidade da samambaia, a natureza química do carcinógeno permaneceu incerta por muito tempo. Estudos de indução de carcinogenicidade foram realizados com várias substâncias isoladas da planta, dentre elas o ácido chiquímico, taninos, pterosinas, pterosídeos e quercetina, porém todas foram descartadas como sendo o principal carcinógeno desta planta (Yamada et al., 2007).

Niwa e colaboradores (1983) e Van Der Hoeven e colaboradores (1983), trabalhando de forma independente, conseguiram isolar e identificar o composto químico da samambaia, demonstrando que se trata de um glicosídeo norsesquiterpeno, do tipo iludano. O composto, denominado de ptaquilosídeo teve sua carcinogênese comprovada em ratos por Hirono e colaboradores (1984).

O ptaquilosídeo (Pta) é um composto químico de fórmula molecular $C_{20}H_{30}O_8$, instável em solução aquosa dependente do pH da solução e temperatura. Em solução de pH ácido, o ptaquilosídeo libera a D-glicose, originando a molécula da pterosina B (PtB). No entanto, em solução de pH alcalino (entre 8 a 11), há também a liberação da D-glicose, mas o ptaquilosídeo é convertido em uma molécula instável chamada de dienona (Yamada et al., 2007; Francesco et al., 2011). A dienona atua no organismo animal e humano como a forma ativa do carcinógeno, e reage irreversivelmente alquilando o DNA (Freitas et al., 2001; Yamada et al., 2007; Hojo-Souza et al., 2010). As reações químicas do ptaquilosídeo estão apresentadas na Figura 2.

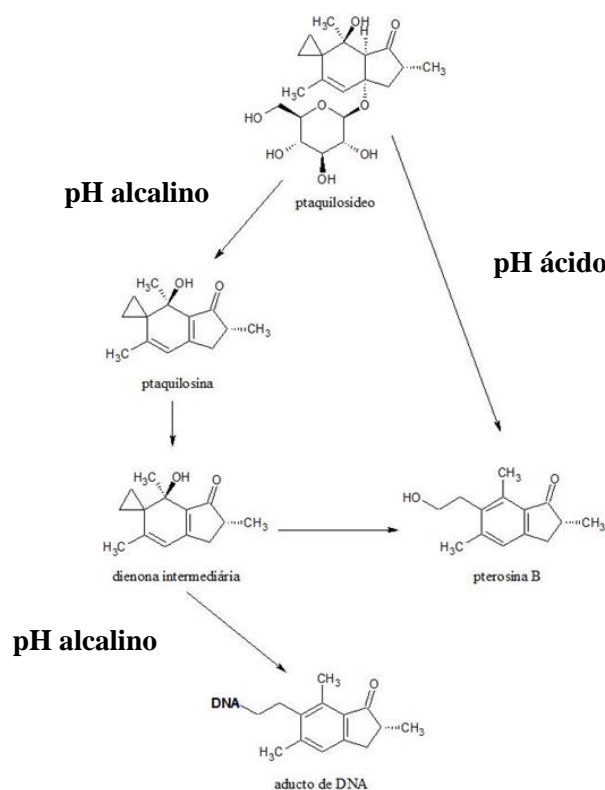


Figura 2. Esquema da via de reação do ptaquilosídeo (adaptado de Yamada et al., 2007).

Os carcinógenos podem ser divididos em duas classes de compostos: aqueles que interagem diretamente com o DNA ou proteínas, sem metabolização enzimática; e aqueles que requerem ativação metabólica para gerar eletrófilos reativos (carcinógenos finais), os quais reagem com DNA ou proteínas (Oliveira et al., 2007). Assim, há uma controvérsia sobre a classificação do ptaquilosídeo como carcinógeno direto ou indireto. Todavia, segundo Yamada et al. (2007) o ptaquilosídeo é um carcinógeno que atua diretamente, sem necessidade de ativação metabólica, já que a formação da dienona (carcinógeno final) é apenas pH-dependente, sendo a liberação da D-glicose uma etapa fundamental no processo de clivagem do DNA.

Shahin et al. (2000) realizaram experimentos em ratos com ptaquilosídeo ativado e sugeriram um modelo de carcinogênese em que a dienona induzia a lesões multi-estágio. Os eventos moleculares encontrados sob condições alcalinas o ptaquilosídeo é convertido em dienona, por exemplo no fêo em roedores ou na bexiga urinária de ruminantes, tornando-se uma molécula alquilante, capaz de fracionar o nitrogênio 3 da adenina e nitrogênio 7 da guanina (Prakash et al., 1996; Shahin et al., 1999; Freitas et al., 2001). Nos eventos celulares as mutações nas células afetadas podem ser reparadas ou, ocasionalmente, estas mutações evoluem para estágios hiperplásicos, displásicos e neoplásicos (Shahin et al., 1999; Yamada et al., 2007; Hojo-Souza et al., 2010).

Corroborando com estes estudos, Shahin et al. (1999) observaram em seus experimentos com ratas e administração de ptaquilosídeo ativado (dienona) por via intra-venosa a ocorrência de mutações (códon 58 e 59) no oncogene *H-ras* em 60% do tecido de adenocarcinoma da glândula mamária quando estas fêmeas eram expostas por 10 semanas ao carcinógeno. No entanto, não foi observada nenhuma mutação do gene supressor *p53* nos exons 5 e 7 em tecido pré-neoplásico ou nos de carcinoma de glândula mamária. Os pesquisadores citados acima sugerem como evento inicial da carcinogênese induzida pela samambaia, a ativação do gene *H-ras* pela formação de adutos, que não reparados, provocam mutações, como pode-se observar na figura 3.

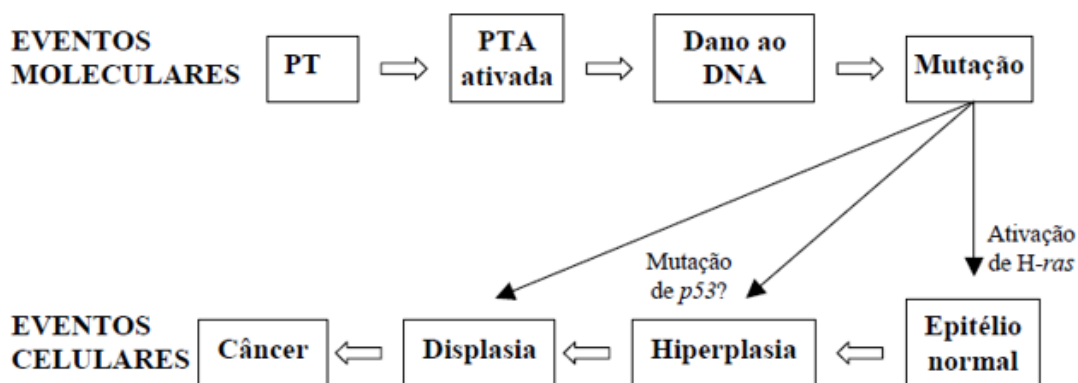


Figura 3. Modelo de múltiplos estágios da carcinogênese induzida por samambaia. PT- ptaquilosídeo, PTA- ptaquilosídeo ativado (dienona). Fonte: adaptado de Shahin et al., (1999).

Freitas et al. (2001) tentando elucidar o mecanismo de ação do ptaquilosídeo investigaram se o ptaquilosídeo era capaz de formar adutos de DNA em camundongos BDF1 tratados com extrato de samambaia por via intragástrica. Entretanto, o resultado encontrado foi negativo, discordando dos achados de Prakash et al. (1996) em seu experimento com bovinos. Este achado, pode sugerir diferenças específicas no metabolismo do ptaquilosídeo entre espécies. No mesmo sentido,

Freitas et al. (2002), em Ouro Preto/MG, realizaram experimentos com ratos alimentados com samambaia, não encontrando alteração do gene supressor *p53* nos exons 5-9, nem nos exons 1 e 2 dos oncogenes *K-ras* e *H-ras* do DNA de células tumorais malignas de fígado e de bexiga.

Alguns autores, após isolar o Papilomavirus bovino (BPV-2) em lesões tumorais de bovinos com HEB, sugeriram uma interação do vírus com o ptaquilosídeo da samambaia no desenvolvimento da carcinogênese (Campo et al., 1992, 1999; Borzacchiello et al., 2003; Resendes et al., 2011; Loria et al., 2012). Além disto, Campo et al. (2002) identificaram formas de cooperação sinérgica entre este vírus e a quercetina, um composto flavonoide presente na planta. O BPV-2 é um patógeno capaz de permanecer de forma latente em vários tecidos e foi isolado no epitélio urinário normal, sem qualquer correlação com a HEB, naturalmente ou de forma experimental (Campo et al., 1992, 1999; Loria et al., 2012). Acredita-se que a intoxicação por *Pteridium arachnoideum* resultaria em imunossupressão, possibilitando maior atividade do BPV-2 e a proliferação de papilomas transicionais, que com a ação do carcinógeno presente na planta, levaria a um processo de malignização (Campo et al., 1992, 1999; Borzacchiello et al., 2003).

3.4. Intoxicação por *Pteridium* spp. em animais de produção

Os animais de produção consomem as samambaias do gênero *Pteridium*, especialmente as suas partes mais jovens, mesmo não sendo palatáveis. Os efeitos da ingestão da samambaia são vários, dependendo da espécie animal e da dose ingerida. Cinco diferentes síndromes são descritas na literatura: deficiência de tiamina, síndrome hemorrágica aguda ou diátese hemorrágica, hematúria enzoótica bovina (HEB), carcinomas de vias digestivas superiores (CVDS) e degeneração progressiva da retina (Fenwick, 1988; Vetter, 2009; Tokarnia et al., 2012).

Deficiência de tiamina

Um dos princípios tóxicos presentes na samambaia é a tiaminase, enzima que inativa a tiamina (vitamina B1) (Evans, 1963). Este tipo de intoxicação é observado espontaneamente sobretudo em animais monogástricos, principalmente equinos e, em menor proporção em suínos (Vetter, 2009); a reprodução experimental foi feita nestas duas espécies (Evans et al., 1951; Evans et al., 1963, 1972) e em ratos (Evans; Evans, 1949). No Brasil, no estado do Paraná, foi descrito um surto de neurotoxicidade fatal em oito asininos após dois meses de serem mantidos em local infestado por *P. aquilinum* (provavelmente *P. arachnoideum* na classificação atual) (Diniz; Basile, 1984). Também no estado do Paraná, este quadro de deficiência de tiamina foi atribuído ao consumo de outra espécie de samambaia, *Marsilea ancylopoda*, em oito equinos, mas o consumo da planta disponibilizada experimentalmente a outras oito éguas não resultou em intoxicação (Skalski et al., 2016). Os ruminantes, cuja microbiota ruminal produz tiamina suficiente, são geralmente resistentes, embora a síndrome tenha sido reproduzida experimentalmente em carneiros alimentados com samambaias (Vetter, 2009).

A vitamina B1 ou tiamina é uma vitamina hidrossolúvel, cuja forma ativa pirofosfato de tiamina (TPP) atua no organismo como coenzima das descarboxilases e transferases, age na descarboxilação oxidativa do piruvato (durante a degradação dos carboidratos) e do α -cetoglutarato (ciclo de Krebs), como também, nas reações de transcetolização que ocorrem na via das pentoses (Rucker e Morris, 1997). A deficiência ou degradação desta vitamina leva ao acúmulo de ácido pirúvico e ácido láctico no organismo. No sistema nervoso central acarreta a degeneração das fibras mielínicas e conseqüentemente leva ao surgimento de transtornos

neurológicos, em humanos conhecido como “beri beri”, inicialmente caracterizada por anorexia e ataxia, seguida por convulsões e morte (Vetter, 2009).

A intoxicação de equinos raramente ocorre na pastagem uma vez que a planta não tem boa palatabilidade. Contudo, a intoxicação ocorre quando há ingestão da planta acidentalmente misturada ao feno ou quando ela é a única planta verde no pasto, por um período de 30 a 60 dias (Jubb; Huxtable, 1993).

De acordo com a literatura, os animais apresentam alguns sintomas inespecíficos como anorexia, perda de peso, sonolência, hipertermia, alterações cardíacas como arritmias e taquicardia. Com a evolução do quadro clínico, os animais podem apresentar sintomatologia nervosa como opistótono, espasmos e tremores musculares graves, incoordenação motora e quedas com incapacidade de reergue-se, depressão progressiva, bradicardia, coma e morte (Fernandes et al., 1990; Martini-Santos, 2010).

O diagnóstico baseia-se nos sinais clínicos de paralisia e na comprovação da ingestão de samambaia (Jubb; Huxtable, 1993). O diagnóstico diferencial deve ser realizado, excluindo encefalopatias de origem viral e bacteriana. Como tratamento, preconizam-se a reposição de vitamina com doses diárias de 100mg de cloridrato de tiamina. Na necropsia, as lesões pós-morte não são características e a morte ocorre por insuficiência cardíaca (Martini-Santos, 2010).

Diátese hemorrágica

A síndrome hemorrágica aguda ou diátese hemorrágica ocorre em bovinos jovens e adultos (Fenwick, 1988), principalmente animais de até 2 anos, inclusive bezerros de seis meses (Tokarnia et al., 2012). Há relatos de intoxicação natural também em ovinos (Parker et al., 1965; Sunderman, 1987), entretanto, o hábito alimentar mais seletivo destes animais associado à menor ingestão da planta parece ser responsável por uma menor incidência (Parker et al., 1965; Sunderman, 1987). A diátese hemorrágica ocorre principalmente em épocas de escassez de forragem onde a samambaia planta invasora consegue resistir a condições adversas (Barros et al., 1987; Tokarnia et al., 2002).

Para o desenvolvimento dos sinais clínicos da intoxicação os bovinos necessitam ingerir doses diárias de samambaia entre 10-30 g/kg de peso corporal por períodos entre 1 a 2 meses; já os ovinos apresentariam os sinais clínicos da doença quando ingerisse quantidades da planta próximas ao seu peso corporal (Evans et al., 1954; Naftalin; Cushnie, 1954). Aos exames laboratoriais, a ação do ptaquilosídeo, leva a aplasia do tecido mielóide, onde observam-se anemia arregenerativa, leucopenia, trombocitopenia. Foram observados também fragilidade vascular, distúrbios da hemostasia, aumento do tempo de sangramento, com diminuição na retração do coágulo e aumento do fibrinogênio (Evans et al., 1964; Yamane et al., 1975; Valli, 2007).

Os sinais clínicos aparecem depois de três semanas do início da ingestão da planta e baseiam-se em febre (39°C a 42°C) e hemorragias. Observa-se sangramento na pele, podendo ocorrer petéquias e equimoses nas conjuntivas oculares, na cavidade oral e na mucosa das narinas, na mucosa vulvar e vaginal. Foi observado ainda hematúria e diarreia sanguinolenta (França et al., 2002; Tokarnia et al., 2002). Adicionalmente, Evans (1984, 1986) demonstrou que há alterações semelhantes a inflamatória sistêmica aguda, modificações humorais, como aumento da concentração de heparina e histamina no sangue e nos tecidos, aumento do número de mastócitos no tecido conjuntivo subcutâneo.

Os achados na necropsia de bovinos mortos após intoxicação aguda incluem hemorragias em todos os órgãos e tecidos, como: hemotórax, hemoperitônio, hemorragias em serosas, petéquias na mucosa intestinal e na bexiga, úlceras e coágulos no cólon e hemorragias inter e intramusculares (Tokarnia et al., 2012). Ao exame histopatológico, observa-se além de hemorragias e úlceras, ausência de tecido hematopoético (Barros et al., 1987).

No diagnóstico diferencial, devem-se considerar enfermidades com sinais clínicos semelhantes, como a pasteurelose (Tokarnia et al., 1969, 2012), babesiose, anaplasnose, leptospirose, intoxicação por *Crotalaria* spp., intoxicação por trevo doce mofado, hemoglobinúria bacilar, intoxicação por warfarina e estrógenos (Polack, 1990), carbúnculo hemático e síndrome produzida por irradiação ionizante (Evans et al., 1954).

Hematúria enzoótica bovina (HEB)

Um dos efeitos da intoxicação crônica pela planta é a hematúria enzoótica bovina (HEB) também conhecida como: hematúria vesical bovina, hematúria essencial, hematúria vesical crônica e cistite crônica hemorrágica (Döbereiner et al., 1967; Tokarnia et al., 1969; Barros et al., 1987; Gava et al., 2002; Souto et al., 2006a). Além das espécies de *Pteridium*, casos de HEB também foram associados ao consumo de outras espécies de samambaias: *Cheilanthes sieberi* na Austrália (Mckenzie, 1978), *Onychium contiguum* na Índia (Dawra et al., 2001), e *Pteris deflexa* e *Pteris plumula* na Argentina (Micheloud et al., 2017). Outras espécies suspeitas incluem *Onychium contiguum* e *Onychium japonicum*, na Índia (Rai et al., 2017).

Os bovinos apresentam hematúria (Figura 4) quando há ingestão da samambaia em quantidade inferior a 10g/kg/dia durante um ou mais anos. Este quadro pode estar associado a lesões tumorais benignas ou malignas na bexiga, por ação do princípio tóxico carcinogênico e mutagênico da samambaia o ptaquilosídeo. Acomete principalmente bovinos com idade superior a dois anos. (Evans et al., 1954; Naftalin; Cushnie, 1954; Campo et al., 1992; Gabriel, 2008; Tokarnia et al., 2012).



Figura 4. Vaca apresentando hematúria em decorrência do consumo de *Pteridium arachnoideum* (São Roque de Minas, MG).

A HEB é uma doença que causa a morte do animal em meses ou anos após o início dos sinais clínicos (Tokarnia et al., 2012). Os animais afetados apresentam anemia arregenerativa, hematúria intermitente, prostração e emagrecimento. Foi relato períodos de remissão, alternado por agravamento do quadro (Fenwick, 1988). Nos exames laboratoriais, foram observadas alterações hematológicas como anemia progressiva, leucopenia por neutropenia e linfocitose. Quanto aos exames bioquímicos, foram observadas aumento da creatinina, diminuição dos níveis séricos de cálcio e fósforo, aumento da fosfatase ácida, ainda hipoalbuminemia, hiperglobulinemia (Döbereiner et al., 1967; Peixoto et al., 2003; Souto et al., 2006b).

A HEB caracteriza-se por hematúria e pela presença de neoplasias na parede da bexiga (Vetter, 2009). As lesões determinantes do quadro de hematúria enzoótica em bovinos estão localizadas na bexiga urinária. São observados nódulos de alguns milímetros ou formações com aspecto de couve-flor de vários centímetros de diâmetro, de coloração branco-amarelada ou avermelhada; nos casos mais graves há espessamento da parede (Tokarnia et al., 2012). Na mucosa podem ser vistas ainda, congestão, focos de hemorragia e crescimentos vasculares (Pamukcu, 1980).

As lesões encontradas na bexiga variam de nódulos pequenos de alguns milímetros a formações de vários centímetros de diâmetro, com colorações esbranquiçadas, avermelhadas ou amareladas, de aspecto liso a de couve flor, os animais podem apresentar espessamento da parede da bexiga, com incontinência urinária e hidronefrose bilateral. Ao exame histológico, ocorre o predomínio de processo neoplásico de origem epitelial ou mesenquimal, acompanhado de reação inflamatória com predomínio de mononucleares e intensa anaplasia celular (Souto et al., 2006b; Vetter, 2009; Tokarnia et al., 2012).

A ocorrência de neoplasias na bexiga de bovinos é rara (Vetter, 2009), quando excluídos os casos de ingestão de *Pteridium*. A HEB pode ser acompanhada de neoplasias no trato digestório superior, tais como carcinomas epidermoides (Döbereiner et al., 1967; Tokarnia et al., 1969).

Carcinoma de vias digestivas superiores (CVDS)

A ocorrência dos CVDS é rara em regiões onde não há a *Pteridium*. Devido a esta correlação, os autores estão atribuindo a etiologia destes processos neoplásicos ao ptaquilosídeo presente nesta planta (Souto et al., 2006; Vetter, 2009; Tokarnia et al., 2012). Os animais acometidos geralmente apresentam idade mais avançada, e a evolução é crônica, varia de meses a anos (Tokarnia et al., 2012).

Os sinais clínicos variam com a localização da neoplasia, mas os principais sinais dos CVDS são de ordem mecânica, dificultando a ingestão e ruminação dos alimentos (Tokarnia *et al.*, 2012). As neoplasias são observadas com maior frequência na base da língua, na faringe, no esôfago e no rúmen (Gava et al., 2002; Souto et al., 2006a; Masuda, 2010). Os sinais clínicos incluem emagrecimento progressivo, tosse, regurgitação, disfagia, halitose, timpanismo, pele seca e mucosas pálidas (Gava et al., 2002; Souto et al., 2006a).

Tokarnia et al. (1969) relataram, em animais com CVDS, tosse, dificuldade respiratória, edema submaxilar, corrimento nasal, dificuldade de mastigação e ruminação, diarreia, timpanismo crônico intermitente e emagrecimento progressivo. À necropsia, observaram-se papilomas pinceliformes ou com forma de couve-flor, no palato mole, rugosidades, formações pedunculadas e ulceração na base da língua, proliferação nodular saliente na faringe, formação oval, pedunculada e de coloração amarelada no rúmen. Profundas úlceras envolvendo o palato duro e mole, proliferações tumorais no seio maxilar e formações pinceliformes no esôfago também foram encontradas. O exame histopatológico demonstrou carcinoma epidermoide e queratinizado em todos os casos (12/12), acompanhados de infiltrados linfocitários (11/12) e calcificação da substância córnea (3/12), além de metástases para linfonodos, fígado e pulmão em (2/12).

Souto et al. (2006) estudaram 30 casos de CVDS em bovinos provenientes de diversas propriedades rurais, no Rio Grande do Sul. Os sinais clínicos foram, em ordem decrescente de frequência, emagrecimento progressivo (30/30), atonia ruminal (20/30) associada a tumores localizados principalmente no rúmen, tosse (17/30) e disfagia (12/30) quando a lesão estava na base da língua, regurgitação (12/30) associada a tumores no esôfago, halitose (10/30) relacionada à necrose, diarreia (9/30) e timpanismo (8/30) quando os tumores estavam na entrada do rúmen, apetite seletivo (7/30), dispneia (3/30) e salivação (3/30). Os principais achados histológicos observados consistiam de papilomas, papilomas em transformação maligna, carcinomas escamosos e metástases para linfonodos regionais e outros órgãos.

Degeneração progressiva da retina

Foi verificada em ovinos que ingeriam *Pteridium* na Inglaterra, uma lesão oftalmológica denominada “bright blindness” (cegueira brilhante), caracterizada por degeneração progressiva da retina (Watson et al., 1965, 1972; Hirono et al., 1993; França et al., 2002). O princípio tóxico responsável é o ptaquilosídeo (Hirono et al., 1993). Os animais afetados apresentam idade entre três a quatro anos (Watson et al., 1965, 1972; França et al., 2002); experimentalmente, o início da sintomatologia ocorreu a partir de quatro meses de ingestão da planta (Hirono et al., 1993). O principal sinal clínico é a cegueira bilateral, com pouca resposta da pupila ao estímulo luminoso,

que não apresenta regressão clínica (Watson et al., 1965, 1972; Hirono et al., 1993; França et al., 2002).

A denominação cegueira brilhante se deve à coloração azulada ou esverdeada da pupila, provavelmente por reflexo da coloração do fundo do olho. Microscopicamente na retina, há degeneração e atrofia das células da camada de cones e bastonetes e da lâmina nuclear externa, além de estreitamento dos vasos sanguíneos. O desenvolvimento da degeneração progressiva da retina parece ser causado pela interferência na microcirculação sanguínea na retina (Hirono et al., 1993).

3.5. Risco à saúde humana

O ptaquilosídeo e seus metabólitos já foram identificados como o principal constituinte da samambaia causador de neoplasia em animais de laboratório e de produção (Vetter, 2009; Yamada et al., 2007; Gil da Costa et al., 2012; Gomes et al., 2012). Alguns autores também salientaram a importância desta toxina estar presente no leite e carne dos animais, revelando rotas importantes de contaminação do ser humano (Alonso-Amelot e Avendano, 2002; Rasmussen et al., 2003b; Shahin et al., 1999). Os humanos também podem ser expostos ao ptaquilosídeo diretamente ingerindo a planta como hábitos culturais orientais, pela inalação de esporos ou pelo consumo de água contaminada (Gil da Costa et al., 2012; Gomes et al., 2012).

Segundo Alonso-Amelot et al. (1996) existe uma correlação positiva entre ingestão de leite de vaca contaminado com ptaquilosídeo e maior incidência de neoplasias esofágica e gástrica no ser humano. Além disso, estudos epidemiológicos na Costa Rica, Venezuela e Grã-Bretanha relataram maior prevalência de neoplasias gástricas em áreas infestadas de samambaia (Alonso-Amelot e Avendano, 2002). Assim como, no Japão e no Brasil (Ouro Preto/MG), em estudos epidemiológicos com a população que tem o hábito de consumir o broto de samambaia como alimento foi observada forte associação com neoplasia de trato digestivo superior (Hojo-Souza et al., 2010). Segundo Virgilio et al. (2015), a samambaia aumenta a risco oncogênico também em seres humanos e o ptaquilosídeo é responsável por anormalidades cromossômicas humanas graves.

Com base nestas informações, a Agência Internacional de Pesquisa sobre Câncer (IARC) classificou a *P. arachnoideum* como cancerígena para animais e possivelmente cancerígena para humanos (Grupo 2B) com base em dados epidemiológicos e evidência experimental (IARC, 1986). Segundo IARC (2003), na sexta monografia, o ptaquilosídeo foi considerado com alta prioridade entre “substâncias que ocorrem naturalmente”. No Brasil, através da Portaria Interministerial número 9, de 07 de outubro de 2014, foi publicada a Lista Nacional de Agentes Cancerígenos para Humanos (LINACH), a *P. arachnoideum* também foi classificada no grupo de agentes possivelmente cancerígenos para os seres humanos (BRASIL, 2014). Estudos de Gil da Costa et al. (2012) e Gomes et al. (2012), afirmam a necessidade de investigar o potencial toxicológico do ptaquilosídeo e seus metabólitos como potente carcinógeno para humanos em todos os níveis de ingestão.

3.6. Técnicas analíticas para detecção e quantificação de ptaquilosídeo e seus produtos em matrizes diversas

A sociedade tem exigido maior qualidade e inocuidade dos produtos de origem animal a serem consumidos. Diversos acontecimentos envolvendo a contaminação de alimentos têm despertado a atenção do consumidor, especialmente no que se refere aos resíduos de agrotóxicos, toxinas, antibióticos e hormônios (Paschoal et al., 2008). Este quadro tem forçado os países a estabelecerem normas legislativas rígidas que garantam o consumo de alimentos seguros por parte da população. Diversos métodos analíticos cada vez mais eficientes têm sido desenvolvidos para determinação de resíduos de contaminantes em alimentos com o objetivo de assegurar que os produtos estejam enquadrados nas determinações legais.

Existem dois programas nacionais que fiscalizam a presença de resíduos químicos oriundos de medicamentos veterinários em produtos de origem animal. O Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes (PNCRC) cujo órgão responsável é o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) e o Programa de Análise de Resíduos de Medicamentos Veterinários em Alimentos (PAMVet), da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) (Pacheco-Silva e Caldas, 2014).

Já está bem estabelecida em literatura, o limite máximo residual (LMR) que se refere a concentração máxima de resíduo aceitável em um alimento de origem animal resultante do uso de um medicamento veterinário, por exemplo, antibióticos, antiparasitários, hormônios, ou ainda pela contaminação por agrotóxicos e micotoxinas (ANVISA, 2009). Estes limites foram estabelecidos para proteger a saúde dos consumidores evitando a exposição excessiva a agentes químicos (Pacheco-Silva e Caldas, 2014). Entretanto, existem plantas tóxicas de interesse agropecuário que quando consumidas pelos animais podem gerar resíduos de princípios tóxicos no leite, carne, ovos e demais produtos de origem animal (Panter, 2004).

No caso das samambaias do gênero *Pteridium*, a importância do isolamento dos compostos químicos não se deve apenas às intoxicações nos animais, mas à presença do ptaquilosídeo no leite dos animais que consomem estas plantas, representando a exposição a um possível agente cancerígeno para os consumidores humanos (Evans et al., 1986, 1971). Além disto, existem também relatos de contaminação de águas subterrâneas com o princípio tóxico, por meio do processo de lixiviação, sendo outra fonte de contaminação para as pessoas que dependem desse abastecimento (Jensen et al., 2008; Tokarnia et al., 2012).

Apesar de alguns estudos terem determinado que o ptaquilosídeo possa ser secretado no leite dos animais (Alonso-Amelot et al., 1996; Vetter, 2009; Francesco et al., 2011), ainda não foi determinada a extensão desta transferência no Brasil nem o risco da exposição de humanos à esta toxina transmitida pelo leite.

A determinação de resíduos do agente tóxico da samambaia, nas mais diferentes matrizes, é tradicionalmente realizada utilizando-se técnicas cromatográficas, em função de sua capacidade de separação, identificação e quantificação dos compostos através de detectores apropriados (Galli et al., 2006; Caldas, 2011). A determinação do agente tóxico em diversas matrizes geralmente requer um pré-tratamento da amostra, pois caso as interferências não sejam removidas poderão afetar a identificação e a quantificação (Bruzzoniti et al., 2000).

Tão importantes quanto as metodologias de análises, são os métodos de pré-tratamento das amostras. Estes incluem o isolamento e a pré-concentração dos analitos. Métodos tradicionais de preparo da amostra, tal como a extração líquido-líquido (LLE - *Liquid-Liquid Extraction*), requerem grandes volumes de solventes orgânicos, apresentam custo elevado, são de difícil

automação e trabalhosos, sendo também prejudiciais ao meio ambiente (Pichon, 2000). Nesse sentido, novas técnicas que consomem menos tempo são efetivas e requerem uma menor quantidade de solventes vêm sendo desenvolvidas (Caldas, 2011).

O termo “cromatografia” é usado para indicar uma variedade de métodos de separação físico-químicos baseados na distribuição dos componentes entre uma fase móvel e uma fase estacionária. A cromatografia pode ser utilizada para a identificação de compostos, por comparação com padrões previamente existentes, para a purificação de compostos, separando-se as substâncias indesejáveis e para a separação dos componentes de uma mistura (Niessen, 2006).

3.7. Possibilidades e tendências no preparo de amostra

A complexidade da composição dos extratos de plantas e também dos alimentos acarreta dificuldades para a quantificação de estruturas de interesse, sendo necessária a realização de uma etapa de limpeza (*clean-up*) do extrato, após extração com solvente. Esta etapa é fundamental, uma vez que reduz as interferências e o efeito matriz, além de diminuir a necessidade de manutenção técnica do sistema cromatográfico (Prestes et al., 2011).

As técnicas de preparação de amostras removem interferentes em excesso para produzir cromatogramas mais limpos e com mais informação. Acompanhando o desenvolvimento tecnológico, ocorreu também um avanço nas técnicas de preparo de amostras. Estes avanços tiveram como objetivo a substituição dos métodos tradicionais de análise de resíduos que apresentavam como característica a morosidade de suas diversas etapas, o emprego de grandes volumes de solvente, o alto custo, etc. (Kaufmann et al., 2008; Kinsella et al., 2009).

3.8. Métodos de extração para análise de resíduos

Os analitos se apresentam nas matrizes de forma bastante variada. Muitas vezes não se encontram na forma originalmente ingerida ou administrada, mas na forma de derivados ou metabólitos. A maioria das substâncias de interesse (agrotóxicos, antimicrobianos, hormônios, micotoxinas, agentes tóxicos de plantas) são extraídas das matrizes por solventes orgânicos, água ou soluções tampão (Kinsella et al., 2009). No entanto, algumas vezes, elas se encontram em forma conjugada, com ligações ou interações fracas com a matriz e necessitam de condições mais específicas para sua extração como, por exemplo, hidrólises químicas ou enzimáticas (Dibai, 2012).

Em reações de hidrólise química, geralmente são verificadas variação de pH, temperatura e tempo de extração, que devem ser otimizadas por serem capazes de provocar degradação do analito a ser pesquisado. Com relação à hidrólise enzimática, geralmente se estudam pequenas variações da reação em meio alcalino ou levemente ácido. Em ambos os casos, a otimização dos métodos objetiva maior eficiência na extração dos resíduos da matriz em estudo (Kinsella et al., 2009).

A etapa de extração tem como objetivo isolar os analitos de todos os co-extrativos (interferentes) presentes na matriz. Métodos tradicionais de preparo da amostra, tal como a extração líquido-líquido, requerem grandes volumes de solventes orgânicos, apresentam custo elevado, são de difícil automação e trabalhosos (Pichon, 2000, Caldas, 2011). Nesse sentido, novas técnicas que consomem menos tempo são efetivas e requerem uma menor quantidade de solventes vêm sendo desenvolvidas e aplicadas.

Dentre estas técnicas, destacam-se a extração em fase sólida (SPE - *Solid Phase Extraction*), a microextração em fase sólida (SPME - *Solid Phase Microextraction*), a extração sortiva em barra magnética (SBSE - *Stir Bar Sorptive Extraction*) e a microextração líquido-líquido dispersiva (DLLME - *Dispersive Liquid-Liquid Microextraction*) (Oliveira e Melo, 2011, Prestes et al., 2011, Bandeira et al., 2014).

Estes novos métodos possuem como base a instrumentação, sendo a extração muitas vezes automatizada, demandando analistas treinados e etapas de limpeza no intervalo entre extrações, o que implica em um maior tempo de análise (Oliveira e Melo, 2011, Prestes et al., 2011).

Na extração em fase sólida (SPE), a fase estacionária se apresenta na forma de um cartucho contendo, geralmente, sílica empacotada ou compostos poliméricos (Kinsella et al., 2009). Técnica introduzida como método alternativo para o preparo de amostras destinadas a análise de resíduos de agrotóxicos. Este método tem como característica a redução do uso de solventes (Anastassiades et al., 2003).

Outra técnica bastante difundida é a microextração em fase sólida (SPME). Esta técnica também consome um pequeno volume de solventes, porém, a extração e concentração dos analitos são realizadas em uma única etapa. SPME têm sido aplicada com bastante sucesso na determinação de resíduos de agrotóxicos em alimentos, água e solo, outra característica desta técnica é o ganho de sensibilidade, uma vez que a fração extraída pode ser introduzida quantitativamente dentro do cromatógrafo a gás através de desorção térmica (Anastassiades et al., 2003).

3.9. Métodos de “*clean-up*” para análise de resíduos

O *clean-up* eficiente do extrato minimiza a presença de interferentes melhorando a sensibilidade e permitindo que resultados mais consistentes e reprodutíveis sejam alcançados. Vários métodos têm sido testados para eliminar interferentes co-extraídos, como o congelamento, centrifugação, partição líquido-líquido, cromatografia de permeação em gel (GPC), SPE e SPME (Pichon, 2000, Caldas, 2011).

Anastassiades et al. (2003) com o objetivo de superar limitações no preparo de amostra para extração de resíduos de pesticidas existentes, na época, elaboraram uma nova metodologia denominada QuEChERS (*Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, Safe*). Esse método, que tem como vantagens ser rápido, fácil, econômico, efetivo, robusto e seguro, atende ainda aos rigorosos Limites Máximos de Resíduos, estabelecidos por legislações internacionais. Outro objetivo alcançado por este método foi gerar extratos que pudessem ser analisados por cromatografia líquida e/ou cromatografia gasosa acopladas à espectrometria de massas em série (GC-MS/MS e LC-MS/MS) (Prestes et al., 2011).

3.10. Método QuEChERS

Resumidamente o método QuEChERS consta nas seguintes etapas: extração com acetonitrila, seguida da partição, promovida pela adição de sais (ex. sulfato de magnésio - $MgSO_4$, e cloreto de sódio - $NaCl$) (Figura 5). Um novo método de limpeza denominado Extração em Fase Sólida Dispersiva (*Dispersive Solid Phase Extraction*, D-SPE) foi proposto juntamente com o método QuEChERS (Bandeira et al., 2014).

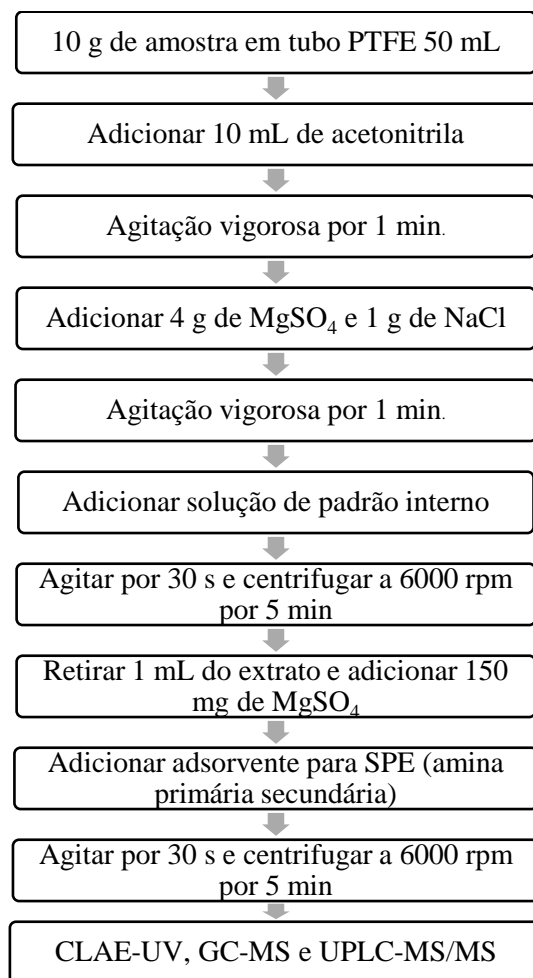


Figura 5. Exemplo de esquema de uma aplicação do método QuEChERS. Fonte Anastassiades et al., (2003).

A acetonitrila foi escolhida como solvente de extração para o método QuEChERS pois, possibilita a extração de uma menor quantidade de co-extrativos lipofílicos provenientes da amostra, como por exemplo, ceras, gorduras e pigmentos (Bandeira et al., 2014). Outra grande vantagem é que acetonitrila é mais adequada para cromatografia líquida associada à espectrometria de massas acoplada à espectrometria de massas (LC-MS/MS) do que acetona e acetato de etila e pode ser utilizada sem problemas na análise por cromatografia gasosa associada à espectrometria de massas acoplada à espectrometria de massas (GC-MS/MS) (Anastassiades et al., 2003; Oliveira e Melo, 2011).

A escolha do $MgSO_4$ no desenvolvimento do método QuEChERS foi devido a maior capacidade de remover água quando comparado a outros sais. Além de reduzir o volume de fase aquosa, ocorre o aquecimento da amostra entre 40 e 45 °C durante as etapas de extração/partição, favorecendo a extração, especialmente dos compostos apolares (Anastassiades et al., 2003; Prestes et al., 2011).

A etapa de limpeza é essencial para promover robustez e confiabilidade aos resultados obtidos pelo sistema cromatográfico, uma vez que componentes não-voláteis da matriz podem ficar aderidos no sistema de injeção e também na coluna cromatográfica, alterando a resposta do sistema e aumentando a frequência de manutenções técnicas no equipamento (Oliveira e Melo, 2011; Bandeira et al., 2014).

Tradicionalmente a etapa de limpeza emprega SPE, a qual utiliza cartuchos ou colunas que contêm entre 250 e 1000 mg de sorvente. Na escolha do adsorvente deve-se levar em conta as informações a respeito dos analitos de interesse, a natureza da matriz e das impurezas a serem eliminadas. Fases sólidas como C8, C18, carbono grafitizado, resina trocadora iônica e materiais poliméricos, tal como estireno divinilbenzeno, comercializados em cartuchos e discos, são os sorventes mais usados em SPE (Caldas, 2011). Esta técnica envolve operação manual, uso de diferentes solventes para lavagem do sorvente, etapas de evaporação e secagem (Prestes et al., 2011; Bandeira et al., 2014).

Ao contrário dos métodos já existentes para limpeza com SPE que utilizam cartuchos ou colunas, a D-SPE permite que a limpeza e a redução de água residual sejam efetuadas de uma forma rápida e simultânea (Anastassiades et al., 2003). Esta etapa de remoção de água proporciona um extrato final de menor polaridade, facilitando assim a precipitação de co-extrativos polares.

O adsorvente PSA (do inglês, *primary secondary amine*) retém as interferências da matriz, sendo que depois da agitação manual e centrifugação o extrato está pronto para ser injetado no sistema cromatográfico (Anastassiades et al., 2003). PSA é um sorvente de troca aniônica fraco, com a habilidade em remover ácidos graxos, açúcares, alguns pigmentos e outros co-extrativos da matriz que formam ligações de hidrogênio (Bandeira et al., 2014).

3.11. Cromatografia

A cromatografia é um método de separação de substâncias baseado na distribuição seletiva dos diferentes componentes de uma mistura entre duas fases imiscíveis. Os métodos cromatográficos permitem separar os componentes de uma mistura, baseados na migração seletiva e diferencial dos solutos através de um sistema constituído de duas fases: uma estacionária (ou fixa) e outra fluida (ou móvel). A fase estacionária é denominada adsorvente e a fase móvel é o eluente (Collins, 2011). Adsorção é a capacidade de uma substância (o adsorvente) de deter ou concentrar seletivamente sobre a superfície de gases, líquidos ou sólidos, que podem ser arrastados pelo eluente (Chiaradia et al., 2008).

A fase estacionária é formada de um material escolhido para reter de forma diferenciada os componentes da amostra que se deseja separar. A fase móvel é o material que se desloca pela fase estacionária, arrastando os componentes da amostra. Após transitar pela fase estacionária, por um percurso de distância adequadamente escolhida, os componentes da amostra se separam e são assinalados pelo sistema detector na seqüência: do primeiro componente menos retido, ao último componente mais retido pela fase estacionária (Niessen, 2006).

A cromatografia é muito utilizada para análise, separação e purificação de produtos naturais, tais como, extratos de plantas, antibióticos, vitaminas, hormônios, corantes, entre outros, tanto em laboratório quanto em escala industrial. Seu uso mais conhecido, no entanto, é o da análise, localização e identificação de microgramas de substâncias em meios biológicos (por exemplo, em

exames "anti-doping" e de medicina legal). Em laboratórios de síntese orgânica é muito utilizada no acompanhamento de reações e na purificação de substâncias (Collins, 2011).

3.12. Cromatografia líquida

A Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) ou do inglês *high performance liquid chromatography* (HPLC) se desenvolveu muito nos últimos anos, recebendo o nome de cromatografia líquida por que a sua fase móvel é um solvente. Os componentes de um cromatógrafo líquido são: bomba, coluna cromatográfica, detector e o registrador (Figura 6). É um método utilizado para separação de espécies iônicas ou macromoléculas e compostos termolábeis (Maldaner e Jardim, 2009; Swartz, 2010).



Figura 6. Diagrama esquemático de um sistema de cromatografia líquida de alta eficiência. Fonte: Lanças (2009).

A fase móvel da CLAE deve ser um solvente que respeite algumas características impostas por esse método analítico. A principal característica é que a fase móvel dissolva a amostra sem qualquer interação química entre ambas (Snyder e Kirkland, 1979). Esta fase deve ter alto grau de pureza ou ser de fácil purificação, para que se possam fazer análises de alta sensibilidade, pois as impurezas podem interferir na detecção do analito por ultravioleta (UV) (Swartz, 2010). A fase móvel deve ser compatível com o detector empregado e, também possuir polaridade adequada para permitir uma separação conveniente dos componentes da amostra. Embora existam vários solventes, três deles são mais utilizados: água, metanol e acetonitrila (Oliveira, 2011).

A coluna cromatográfica é feita de um material inerte que resiste a todas as pressões em que ela vai ser usada (Snyder e Kirkland, 1979). A capacidade da coluna é determinada pelo comprimento, diâmetro e pelo material de recheio. As colunas geralmente utilizadas são: octadecil (C18, RP18, ODS), octil (C8, RP8), CN (cianopropil) e NH₂ (amina) (Oliveira, 2011). Quanto aos detectores, não existe um que apresente todas as propriedades para que ele seja ideal para CLAE (Snyder e Kirkland, 1979; Maldaner e Jardim, 2009).

Os detectores mais usados na CLAE são os fotométricos, baseados na absorbância no ultravioleta e no visível. Os detectores de fluorescência, utilizados como método de detecção específica, são sensíveis para substâncias que fluorescem. Este tipo de detector pode detectar quantidades de ordem picograma (Swartz, 2010). Também são utilizados detectores por índice de refração, os quais acompanham continuamente a diferença no índice de refração entre a fase móvel pura e o

efluente que sai da coluna contendo os componentes da amostra. A resposta deste detector é moderada, geralmente de ordem micrograma (Maldaner e Jardim, 2009; Niessen, 2006).

A maioria dos métodos que utilizam a cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas emprega coluna de fase reversa. As colunas mais amplamente empregadas contêm como fase estacionária sílica quimicamente modificada, estas modificações determinam a polaridade da coluna. A fase estacionária mais popular é aquela que emprega grupos C18-álquil ligados à superfície da sílica (octadecil silano) (Oliveira, 2011).

A eficiência da separação está relacionada ao tamanho das partículas do material que constitui a fase estacionária. Tipicamente em cromatografia líquida de alta eficiência as colunas empregadas possuem as seguintes dimensões 100 a 250 mm de comprimento e 4,6 mm de diâmetro interno recheadas com partículas de diâmetros entre 3 e 5 µm (Swartz e Krull, 2012). Estas colunas são capazes de trabalhar em pressões de até 40 MPa (6000 psi) com fluxos entre 1 a 10 ml/min. O volume de amostra injetado varia de 10 a 20 µl (Schulz, 2014).

3.13. Parâmetros analíticos para validação de métodos

Segundo Cassiano et al. (2009), a literatura descreve os parâmetros que devem ser avaliados na validação de um método bioanalítico e, geralmente há uma concordância que estes parâmetros analíticos devem incluir: seletividade, curva de calibração (linearidade), precisão, exatidão, limite de quantificação, limite de detecção, eficiência de extração (recuperação), integridade da diluição, estabilidade e robustez.

Seletividade (ou especificidade)

Segundo Thompson et al. (2002), seletividade é a capacidade de um método quantificar com exatidão o analito mesmo na presença de interferentes existentes na amostra. Esses interferentes podem ser substâncias quimicamente relacionadas com o analito, entre elas isômeros, metabólitos, substâncias endógenas, produtos de degradação, impurezas e outros (Paschoal et al., 2008).

Para os métodos cromatográficos, a seletividade é avaliada no sentido de garantir que o pico de resposta do analito (avaliado no tempo de retenção característico) seja proveniente exclusivamente do mesmo e não de outros compostos (interferentes) presentes na amostra. Para tanto, é conveniente a utilização de testes de pureza de pico com auxílio de detector de arranjo de fotodiodos ou espectrometria de massas (Paschoal et al., 2008).

Sensibilidade

Segundo o INMETRO (2010), a sensibilidade pode ser definida como a capacidade do método em distinguir, com determinado nível de confiança, duas concentrações próximas. Sob o ponto de vista prático, a sensibilidade constitui o coeficiente angular do gráfico analítico expresso pela equação 1.

$$S = \frac{dy}{dc}$$

Onde:

S = sensibilidade;

dy = variação da resposta;

dc = variação da concentração.

Linearidade

A linearidade é a habilidade do método analítico em fornecer resultados diretamente proporcionais à quantidade do analito presente na amostra, em um intervalo especificado (Eurachem, 1998; Thompson et al., 2002). Ainda podemos observar a linearidade de um método através do gráfico dos resultados dos ensaios em função da concentração do analito e é verificada a partir de uma equação de regressão linear, determinada pelo método dos mínimos quadrados. Segundo o INMETRO (2011), para construção da curva analítica são necessários vários níveis de concentração, no mínimo cinco. O número de replicatas deve ser, no mínimo, de duas a sete em cada nível de concentração.

A equação da reta é:

$$y = ax \pm b$$

Sendo:

y = resposta medida (área do pico);

x = concentração;

a = interseção com o eixo y , quando $x = 0$;

b = inclinação da curva analítica (sensibilidade).

Efeito Matriz

Efeito Matriz é um estudo de seletividade que objetiva verificar possíveis interferentes gerados pelas diversas substâncias que compõem a matriz amostral, produzindo, basicamente, fenômenos de diminuição ou ampliação do sinal instrumental ou resposta instrumental (BRASIL, 2011).

Limite de detecção (LD)

O limite de detecção corresponde à menor concentração do analito que pode ser detectada pelo método analítico, mas não sendo necessariamente quantificada (Thompson et al., 2002; Eurachem, 2014). O LD pode ser calculado de três maneiras diferentes: método visual, método relação sinal-ruído, método baseado em parâmetros da curva analítica.

O método visual é utilizado para determinar o LD utilizando a matriz com adição de concentrações conhecidas da substância de interesse, de tal modo que se possa distinguir entre ruído e sinal analítico pela visualização da menor concentração visível (detectável). O método da relação sinal-ruído só pode ser aplicado aos procedimentos analíticos que apresentam ruído da linha de base e é realizada comparando sinais medidos a partir de amostras com baixas e conhecidas concentrações do analito com os sinais de amostras em branco. Geralmente, um sinal-ruído entre 3:1 ou 2:1 é considerado aceitável para a estimativa do limite de detecção (Ribani et al., 2004; INMETRO, 2011).

Frequentemente, a determinação do limite de detecção é feita com base no desvio padrão da resposta e na inclinação ou coeficiente angular da curva analítica. O LD pode ser calculado como (Thompson et al., 2002; Eurachem, 2014):

$$LD = 3,3 \times s / S$$

Em que:

LD = limite de detecção

s = coeficiente linear da curva analítica

S = inclinação da curva analítica

Limite de quantificação (LQ)

O limite de quantificação representa a menor concentração da substância em exame que pode ser medida, utilizando um determinado procedimento experimental (Eurachem, 1998; Thompson et al., 2002).

Semelhante à forma utilizada para o cálculo do limite de detecção, o limite de quantificação pode ser feito pelo método visual, método da relação sinal-ruído e o método baseado em parâmetros da curva analítica. Entretanto, a relação sinal-ruído deve ser de 10:1 e na equação usada para determinação do limite de detecção pelos parâmetros da curva analítica ao invés de utilizar 3,3, a multiplicação é feita por 10 (Ribani et al., 2004), sendo:

$$LQ = 10 \times s / S$$

Em que:

LQ = limite de quantificação

s = coeficiente linear da curva analítica

S = inclinação da curva analítica

Precisão

A precisão pode ser definida como a proximidade dos resultados obtidos em ensaios independentes, repetidos de uma mesma amostra e pode ser expressa em desvio padrão relativo (DPR%) ou coeficiente de variação (CV%) (INMETRO, 2010).

Exatidão

Representa o grau de concordância entre os resultados individuais encontrados em um determinado ensaio e um valor de referência aceito como verdadeiro (Ribani et al., 2004). É determinada após o estabelecimento da linearidade, do intervalo linear e da especificidade do mesmo, a partir de três concentrações (alta, média e baixa) com, no mínimo, duplicata de cada concentração (INMETRO, 2010).

Robustez

A robustez de um método mede a sensibilidade que este apresenta face a pequenas variações (INMETRO, 2010). Segundo Ribani et al. (2004), a robustez de um método cromatográfico é avaliada, por exemplo, pela variação de parâmetros como a concentração do solvente orgânico, pH e força iônica da fase móvel em CLAE, programação da temperatura, natureza do gás de arraste em GC, bem como o tempo de extração, agitação, etc.

4. MATERIAL E MÉTODOS

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Toxicologia, Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinárias, e no Centro de Excelência em Monitoramento de Multirresíduos (CEMM), Departamento de Medicina Veterinária Preventiva (DMVP), ambos da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG). O projeto teve apoio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais – FAPEMIG (Edital 01/2014 - Demanda Universal, processo APQ-01394-14).

4.1. Instrumentação

A instrumentação utilizada no desenvolvimento do método está descrita a seguir:

- Centrífuga de bancada, modelo NT 805, New Química (Belo Horizonte, MG);
- Ultra-som sonicador Saunders Medical SoniClean 2, Unique (Indaiatuba, SP);
- Balança analítica de precisão modelo Shimadzu AUY 220, com resolução de 0,00001g, Shimadzu (Kyoto, Japão);
- Micropipetas monocal HTL Labmate PRO, com faixa de trabalho de 20-200 µL, (Warszawa, Polônia);
- Micropipetas monocal HTL Labmate PRO, com faixa de trabalho de 100-1000 µL, (Warszawa, Polônia);
- Mesa agitadora temporizada, modelo NL-229-03, (Piracicaba, SP);
- Agitador orbital tipo vortex Fisatom, modelo 772, IKA® Works Inc. (Wilmington, Estados Unidos);
- Freezer vertical Continental, modelo CVU18GB (São Paulo, SP);
- Freezer horizontal Metalfrio, modelo DA550 (São Paulo, SP);
- Sistema de purificação de água por osmose reversa Quimis, modelo Q842/Q342 (Diadema, SP);
- Sistema de ultra-purificação de água Direct-Q UV3® Millipore (água produzida com resistividade 18,2 MW cm)
- Rotoevaporador - Evaporador Rotativo, modelo Fisatom 803, (São Paulo, SP);
- CLAE-UV (LC-2000Plus, JASCO, Tóquio, Japão) JASCO;
- Sistema de cromatografia líquida de ultra performance Acquity® UPLC, Waters (Milford, Estados Unidos);
- Detector MS, espectrômetro de massas híbrido Xevo® G2-S QToF, Waters (Milford, Estados Unidos);
- Sistema de aquisição de dados *software* MassLynx 4.1, Waters (Milford, Estados Unidos);
- Sistema gerador de nitrogênio para LC-MS, Peak Scientific Instruments Ltd. (Inchinnan, Reino Unido).

4.2. Reagentes e material diverso

- Acetato de amônio P.A. ACS, Vetec (Rio de Janeiro, RJ);
- Acetona P.A., Dinâmica (São Paulo, SP);
- Acetonitrila grau HPLC, Lichrosolv, Merck (Darmsdat, Alemanha);
- Ácido acético glacial P.A., Merck (Darmsdat, Alemanha);

- Ácido fórmico 96%, Tedia (Ohio, Estados Unidos);
- Clorofórmio P.A., Dinâmica (São Paulo, SP);
- Diclorometano P.A., Lichrosolv, Merck (Darmsdat, Alemanha);
- Hexano P.A., Dinâmica (São Paulo, SP);
- Metanol grau HPLC, pureza J. T. Baker (Xalostoc, México);
- Sulfato de magnésio anidro, Sigma-Aldrich (Sant Louis, Estados Unidos);
- Filtro de seringa CHROMAFIL® O-20/15 MS (PTFE) 15 mm x 0,20 µm (Düren, Alemanha);
- Lã de vidro, lote 0883236, Reagen (Rio de Janeiro, RJ);
- Resina Diaion® HP-20, lote 07497JH Sigma-Aldrich (Sant Louis, Estados Unidos);
- Silica gel G, lote BR0579-015, Merck (Darmsdat, Alemanha);
- Vials Waters, 12x32 mm com tampa pré-fendida (Milford, Estados Unidos).

4.3. Metodologia para obtenção do padrão de Pterosina B

Foram coletados 200g de brotos frescos de *P. arachnoideum* na zona rural do município de Santana dos Montes, MG. Estes brotos foram triturados em 1L de água destilada, e a mistura foi mantida no escuro a 15 °C por 2 horas. O extrato aquoso obtido foi filtrado em filtro de pano, e as sobras da planta do filtro foram colocadas em um frasco de Erlenmeyer contendo 500mL de água destilada, para nova extração. Em seguida, ambos os extratos aquosos obtidos foram misturados e foram adicionados 25g da resina Diaion®. Após 15 minutos de homogeneização em agitador magnético, a solução foi filtrada com filtro de pano.

O extrato aquoso filtrado foi transferido para um funil de separação e extraído por partição três vezes com 300mL de diclorometano cada etapa. As fases de diclorometano formadas nas extrações foram separadas, filtradas em sulfato de sódio para remoção de resíduos de água e juntadas para completa remoção do solvente em evaporador rotativo a pressão reduzida e temperatura máxima de 40 °C, dando origem ao resíduo 1 (R1). A fase aquosa formada no funil de separação foi transferida para um frasco de Erlenmeyer de capacidade de 2L, e foram adicionados 16g de carbonato de cálcio, alcalinizando o pH da solução para 11,0, por uma hora, e extraído por partição três vezes com 300 mL de diclorometano, e a fase deste solvente seguiu evaporador rotativo a pressão reduzida e temperatura máxima de 40 °C para remoção do solvente, dando origem ao resíduo 2 (R2).

A resina Diaion® utilizada na homogeneização foi lavada com 500ml de água destilada e, então, eluída com 40mL de metanol. O eluato obtido teve o solvente removido em evaporador rotativo a pressão reduzida e temperatura máxima de 60 °C, para obtenção do resíduo metanólico, denominado resíduo 3 (R3).

O R1 foi solubilizado com 20mL de clorofórmio, sonificado e adicionados 60mL de hexano, colocado em geladeira (2-8 °C, por 24 horas) para precipitar, que resultou na formação de um sobrenadante (R4) e sedimento (R5), foram separados e secos em capela a temperatura ambiente. O rendimento do o do sobrenadante (R4) foi de 30,3mg e do sedimento (R5) foi de 99,3mg.

Todos os resíduos obtidos foram analisados por meio de cromatografia de camada delgada (CCD) em placas de sílica gel 60 (Silica-Gel 60 F254, Merck), desenvolvidas em fase móvel de diclorometano:acetona (7:3), com visualização da fluorescência por luz UV (360 nm). A pterosina B foi identificada na faixa de Rf 0,8.

Os resíduos extraídos também foram avaliados em sistema de cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a detector ultra-violeta (CLAE-UV). Para este sistema, foi utilizada uma coluna ODS (Shim-pack CLC-ODS [M]), e a fase móvel foi acetone:metanol:água com 1 mM de ácido acético (25:25:50) em modo isocrático, em fluxo de 1,200 mL/minuto, com determinação a 230 nm. O pico da pterossina B ocorreu em cerca de 5-5,5 minutos.

A identidade química da pterossina B obtida foi confirmada por meio de sistema de cromatografia líquida de ultraperformance (UPLC) Acquity® (Waters, Milford, MA, USA), acoplado a um espectrômetro de massas (MS) híbrido Xevo® G2-S QToF (Waters, Milford, MA, USA). A separação cromatográfica foi realizada por meio de uma coluna Acquity® UPLC BEH C18 (2,1 x 100 mm, diâmetro de partícula de 1,7 µm) a 45°C e amostra em 15°C. O volume injetado foi de 10 µL e a fase móvel constituída do eluente A (água com 0,1% de ácido fórmico) e eluente B (metanol com 0,1% de ácido fórmico) em um fluxo de 0,5 mL/min. A eluição foi realizada em modo gradiente de acordo com os seguintes intervalos: 0 – 3,0 min, 75 – 50% A; 3,0 – 3,2 min, 50 – 5% A; 3,2 – 3,4 min, 5% A; 3,4 – 3,5 min, 5 – 75% A; 3,5 – 4,0 min, 75% A. As análises de massas foram obtidas por meio de ionização por electrospray em modo positivo (ESI+), voltagem do capilar de 3,0 kV, temperatura do gás de dessolvatação de 150°C e temperatura da fonte de 80°C. O fluxo do gás de dessolvatação foi de 600 L/hora de nitrogênio. A aquisição dos dados foi pelo método MS^E em modo positivo, alternando alta e baixa energia na câmara de colisão. Foi monitorada a relação massa e carga para o íon precursor. O *software* MassLynx 4.1 foi utilizado como instrumento de controle para detectar e integrar os picos. Na figura 7 está representado resumidamente o fluxograma da metodologia para obtenção do padrão de Pterossina B.

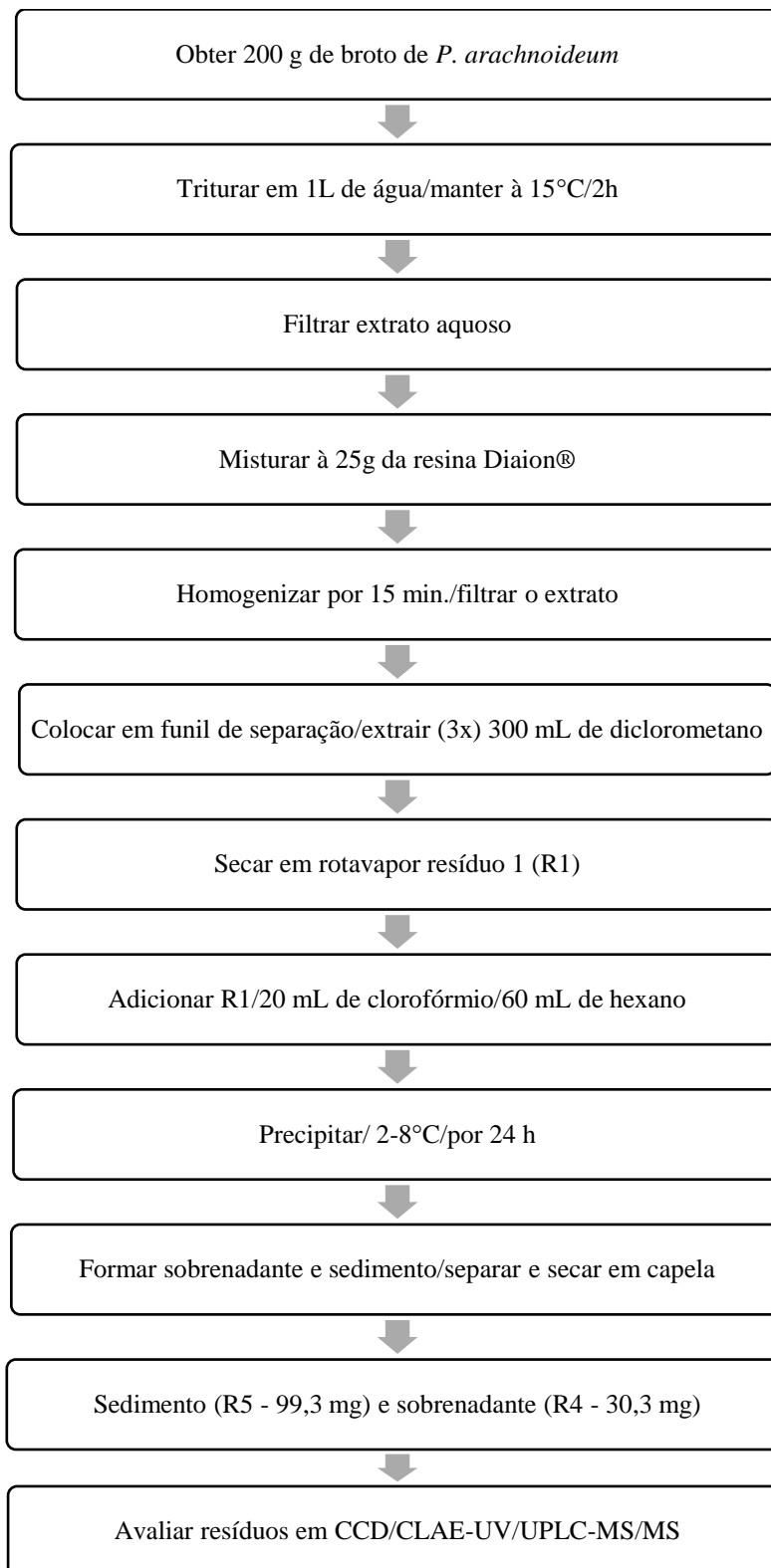


Figura 7. Fluxograma da metodologia para obtenção do padrão de Pterocarpin B.

4.4. Metodologia para quantificação de ptaquilosídeo e pterosina B em samambaias

4.4.1. Amostras de plantas analisadas

Foram mensurados ptaquilosídeo e pterosina B em samambaias das espécies *Pteridium arachnoideum*, coletadas nos estados de Minas Gerais e Rio Grande do Sul, e *Dicranopteris flexuosa* (Schrad.) Underw., *Gleichenella pectinata* (Willd.) Ching e *Sticherus lanuginosus* (Fée) Nakai, todas da família Gleicheniaceae, coletadas no Estado de Minas Gerais. Além disto, foram avaliadas amostras das samambaias *Pteris deflexa* Link e *Pteris plumula* Desv. (*Pteris quadriaurita* Retz.), ambas da família Pteridaceae, provenientes de propriedades da região noroeste da Argentina com casos de hematúria enzoótica bovina, mas livres de qualquer espécie de *Pteridium*. Ao todo, foram utilizadas 47 amostras de folhas maduras e 23 amostras de broto (Tabelas 1 e 2). Para todas as amostras foram realizados os métodos de extração para pterosina B e ptaquilosídeo, em duplicata.

Tabela 1. Relação do número de amostras de folhas

Folhas	Região	Número de amostras
<i>Pteridium arachnoideum</i>	Conselheiro Lafaiete/MG	04
<i>Pteridium arachnoideum</i>	Esmeraldas/MG	05
<i>Pteridium arachnoideum</i>	Ouro Branco/MG	07
<i>Pteridium arachnoideum</i>	Nova Petrópolis/RS	06
<i>Pteridium arachnoideum</i>	Canela/RS	06
<i>Sticherus lanuginosus</i>	São Roque de Minas/MG	03
<i>Dicranopteris flexuosa</i>	São Roque de Minas/MG	03
<i>Gleichenella pectinata</i>	Belo Horizonte/MG	04
<i>Pteris deflexa</i>	Orán/Argentina	03
<i>Pteris deflexa</i>	El Jardim/Argentina	03
<i>Pteris plumula</i>	Orán/Salta/Argentina	03
TOTAL		47

Tabela 2. Relação do número de amostras de brotos

Broto	Região	Número de amostras
<i>Pteridium arachnoideum</i>	Conselheiro Lafaiete/MG	05
<i>Pteridium arachnoideum</i>	Esmeraldas/MG	08
<i>Pteridium arachnoideum</i>	Ouro Branco/MG	04
<i>Pteridium arachnoideum</i>	Nova Petrópolis/RS	06
<i>Pteridium arachnoideum</i>	Canela/RS	06
TOTAL		29

4.4.2. Método de extração para identificação de pterosina B

Foram utilizados 1g de planta fresca, adicionados em 100 mL de água destilada, triturados, mantidos no escuro por 2 horas, sob agitação. O extrato aquoso obtido foi filtrado em filtro de papel. Após o procedimento foram retirados 20 mL da solução aquosa transferido para outro frasco e adicionados 10 mL de diclorometano. Foram feitas três extrações com diclorometano e

as amostras foram filtradas em filtro de papel e secas a temperatura ambiente em capela. Para injeção da amostra em CLAE-UV, as amostras foram reconstituídas com 500 μ L de metanol. Na figura 8, está representado resumidamente o fluxograma da metodologia para identificação de pterosina B no material vegetal.

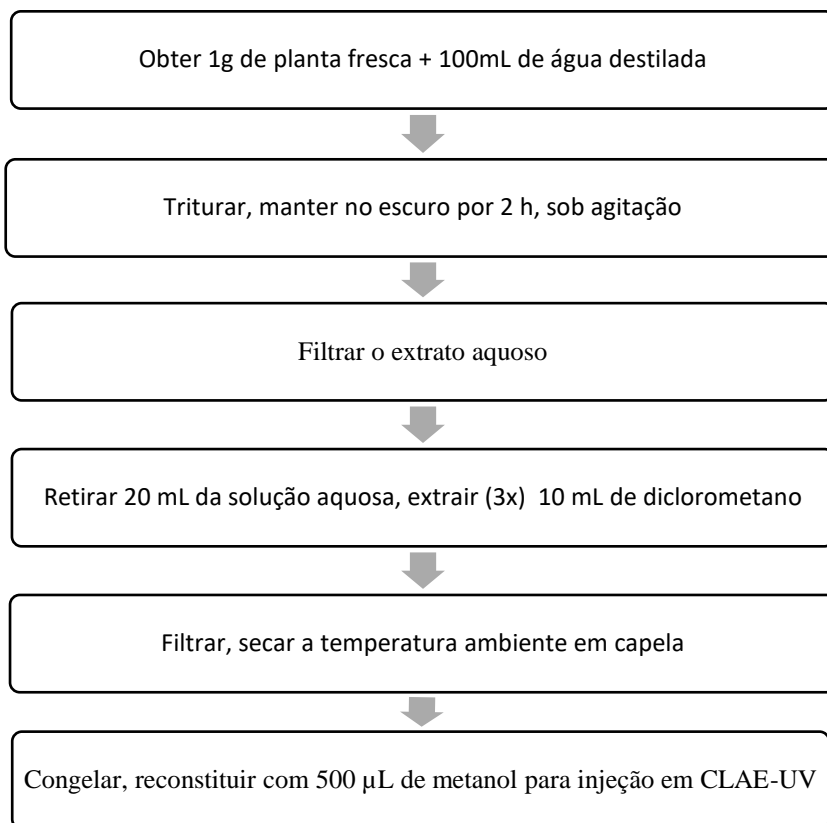


Figura 8. Fluxograma da metodologia para identificação de pterosina B no material vegetal.

4.4.3. Método de extração para identificação de ptaquilosídeo

Foram utilizados 1g de planta fresca, adicionados em 100 mL de água destilada, triturados, mantidos no escuro por 2 horas, sob agitação. O extrato aquoso obtido foi filtrado em filtro de papel. Após o procedimento, foram retirados 20 mL da solução aquosa transferido para outro frasco e adicionados 5 mL de solução de hidróxido de potássio (KOH) a 0,04 M. Esta solução permaneceu em banho-maria a 40 °C durante duas horas. Foram feitas três extrações com diclorometano, as amostras foram filtradas em filtro de papel e secas a temperatura ambiente em capela. Para injeção da amostra em CLAE-UV, as amostras foram reconstituídas com 500 μ L de metanol. Na figura 9 está representado resumidamente o fluxograma da metodologia para identificação de ptaquilosídeo no material vegetal.

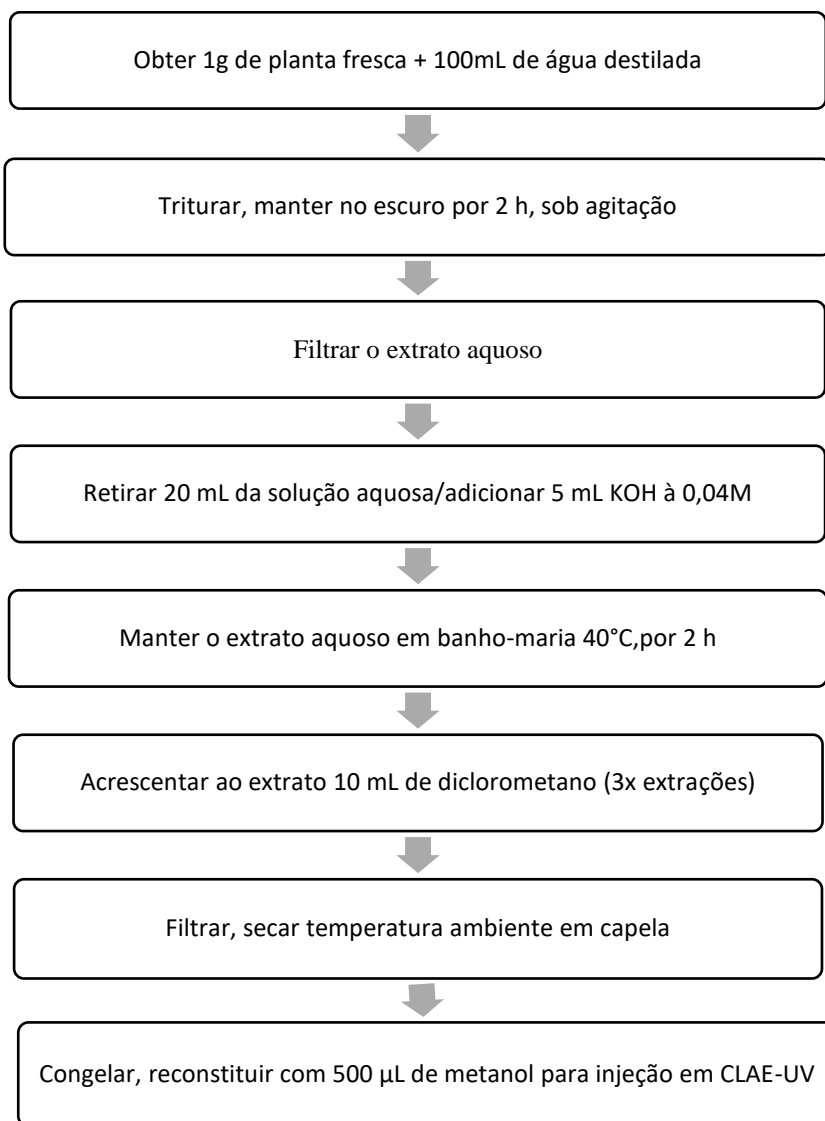


Figura 9. Metodologia para identificação de ptaquilosídeo no material vegetal.

4.5. Técnica para detecção em leite

4.5.1. Preparo das amostras de leite

As amostras de leite utilizadas para o desenvolvimento e avaliação da técnica analítica neste trabalho foram obtidas no Setor de Ruminantes do Hospital Veterinário, Escola de Veterinária da UFMG. Para a aplicação da técnica validada, foram utilizadas 60 amostras de leite do Laboratório de Análise da Qualidade do Leite da Escola de Veterinária da UFMG (LabUFMG), provenientes de tanques de várias propriedades, 20 amostras de leite cru de animais diferentes de pequenas propriedades da região de Ouro Branco/MG e cinco amostras de animais diferentes da região de Esmeraldas/MG, ambas propriedades com histórico de casos de hematúria enzoótica bovina, e com presença da *P. arachnoideum* na pastagem.

Foram testados quatro métodos de *clean-up* descritos a seguir:

Método de extração A (Método de QuECHERS): Em um tubo tipo Falcon de 50 mL, foram adicionados 10 mL de leite em 10 mL de acetonitrila acidificada com 0,1% de ácido acético, agitados no vórtex por 1 min., acrescidos de 1g de acetato de sódio anidro e 4 g sulfato de magnésio. Em seguida, foram realizadas agitação no vórtex por 1 minuto, centrifugação por 11 minutos a 27000 G, e congelamento a -20°C por 24 h. Foram pipetados 5 mL do sobrenadante para outro tubo tipo Falcon contendo 750 mg de sulfato de magnésio, seguido por agitação por 1 minuto em vórtex, e finalmente centrifugação por 9 minutos a 27000 G. Foi pipetado 1,0 mL do extrato para um vial, que foi mantido a -20°C até o momento da injeção em CLAE-UV. Na figura 10 está representado o fluxograma do método de extração A (Método de QuECHERS) para *clean-up* das amostras de leite.

Método de extração B: Em um tubo tipo Falcon de 50 mL, foram adicionados 10 mL de leite e 10 mL de metanol, agitados no vórtex por 1 minuto, acrescidos de 1g de acetato de sódio anidro e 4 g sulfato de magnésio, nova agitação em vórtex por 1 minuto, centrifugação por 11 minutos a 27000 G, seguido por congelamento a -20 °C por 24 horas. Foram pipetados 5 mL do sobrenadante para outro tubo Falcon contendo 750 mg de sulfato de magnésio, agitação por 1 minuto em vórtex, e centrifugação por 9 minutos a 27000 G. Foi pipetado 1,0 mL do extrato para um vial, que foi mantido a -20°C até o momento da injeção em CLAE-UV. Na figura 11 está representado o fluxograma do método de extração B para *clean-up* das amostras de leite.

Método de extração C: Em um tubo tipo Falcon de 50 mL, foram adicionados 10 mL de leite e 10 mL de diclorometano, homogeneizados e congelados em refrigerador a -20 °C por 24 horas. Após este período, as amostras foram descongeladas e centrifugadas. A porção aquosa da solução foi separada da solução de diclorometano e transferida para outro tubo denominado de C1. No tubo C1, foram adicionados 10 mL de solução de hidróxido de potássio (KOH) a 0,04 M. Esta solução permaneceu em banho-maria a 40 °C durante duas horas. Foram feitas três extrações com diclorometano, as amostras foram filtradas e secas a temperatura ambiente em capela. No tubo C que só tinha a solução de diclorometano, foram feitas três extrações com diclorometano, as amostras foram filtradas em filtro de papel e secas a temperatura ambiente em capela. Na figura 12 está representado o fluxograma do método de extração C para *clean-up* das amostras de leite.

Método de extração D: Em um tubo tipo Falcon de 50 mL, foram adicionados 10 mL de leite e 10 mL de solução de hidróxido de potássio (KOH) a 0,04 M e homogeneizado; este tubo foi denominado de D. Esta solução permaneceu em banho-maria a 40 °C durante duas horas. Após esta etapa, foram adicionados 10 mL de diclorometano, homogeneizado e congelado em refrigerador a -20°C por 24 h. Após este período, as amostras foram descongeladas e centrifugadas. Foram feitas três extrações com diclorometano, as amostras foram filtradas em filtro de papel e secas a temperatura ambiente em capela. Na figura 13 está representado o fluxograma do método de extração D para *clean-up* das amostras de leite.

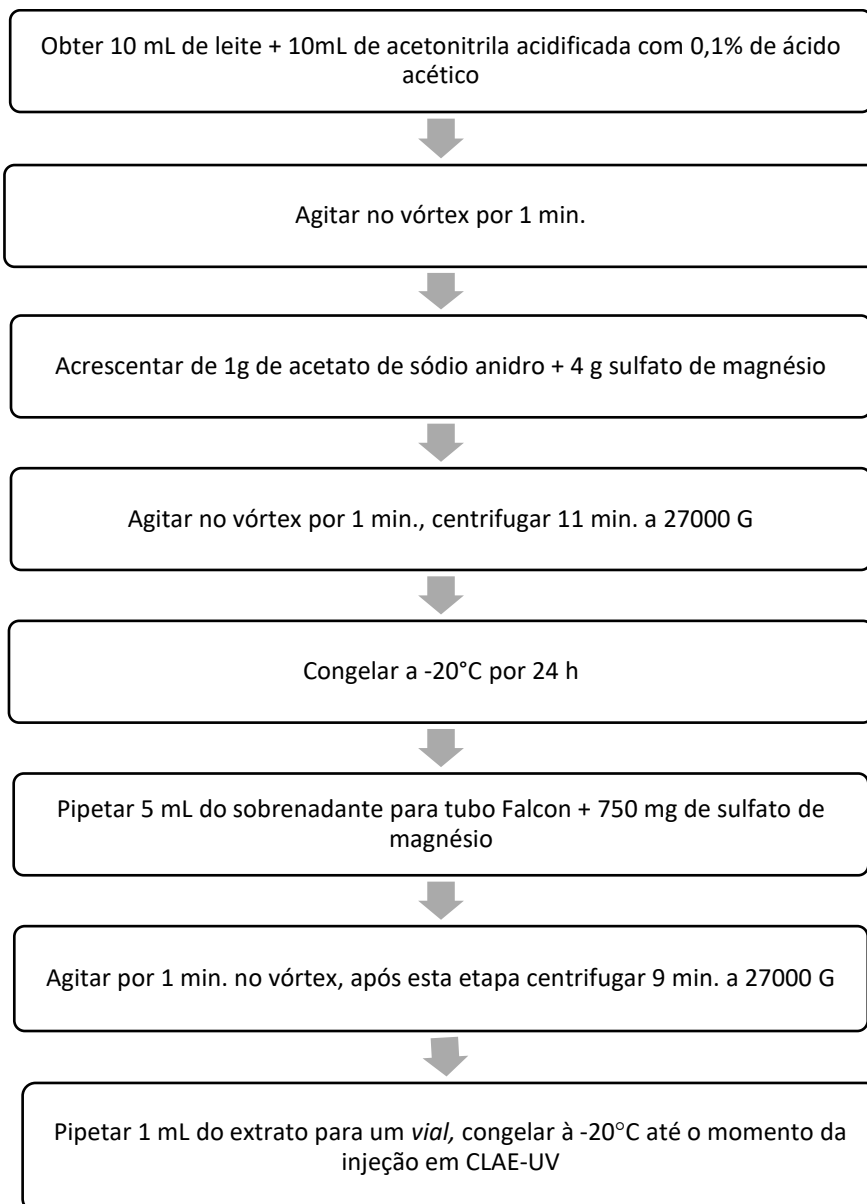


Figura 10. Fluxograma do método de extração A (Método de QuEChERS) para *clean-up* das amostras de leite cru.

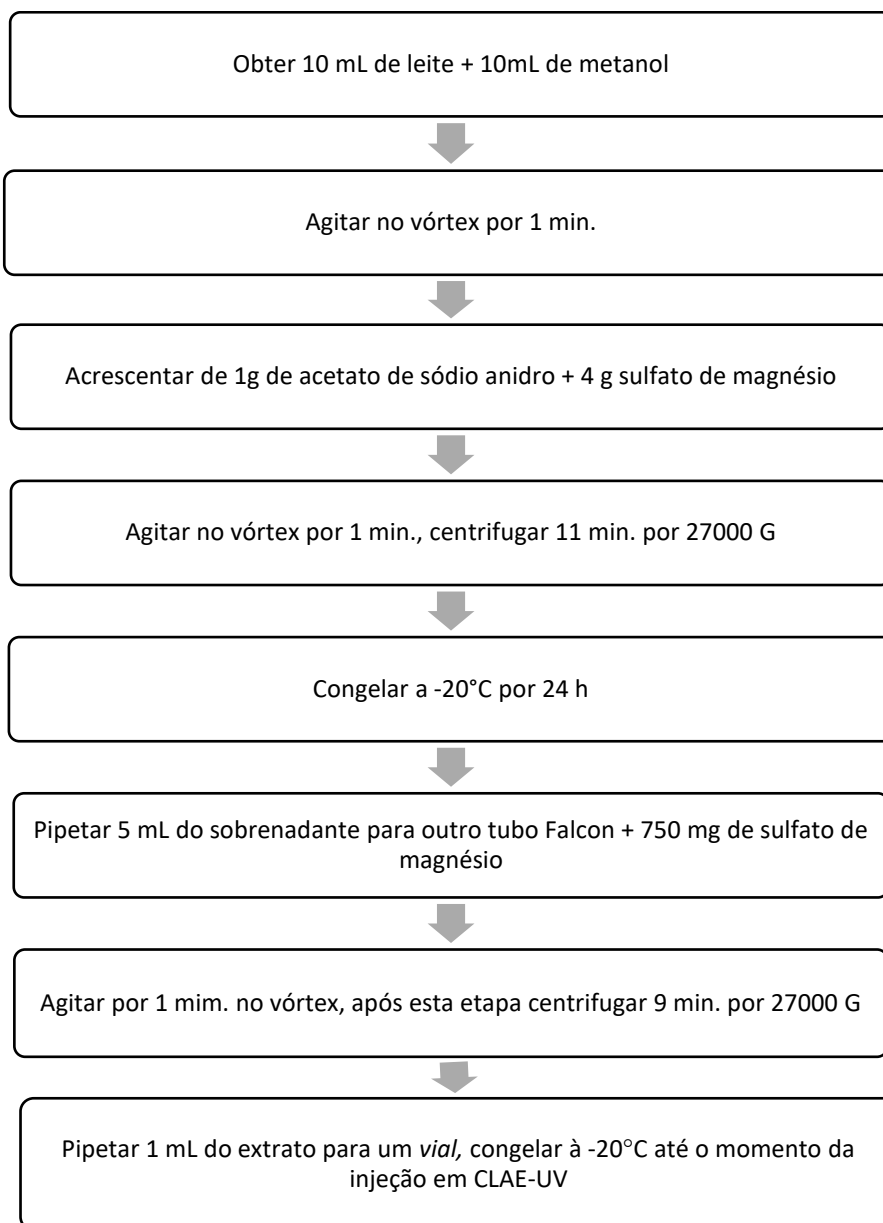


Figura 11. Fluxo do método de extração B para *clean-up* das amostras de leite cru.

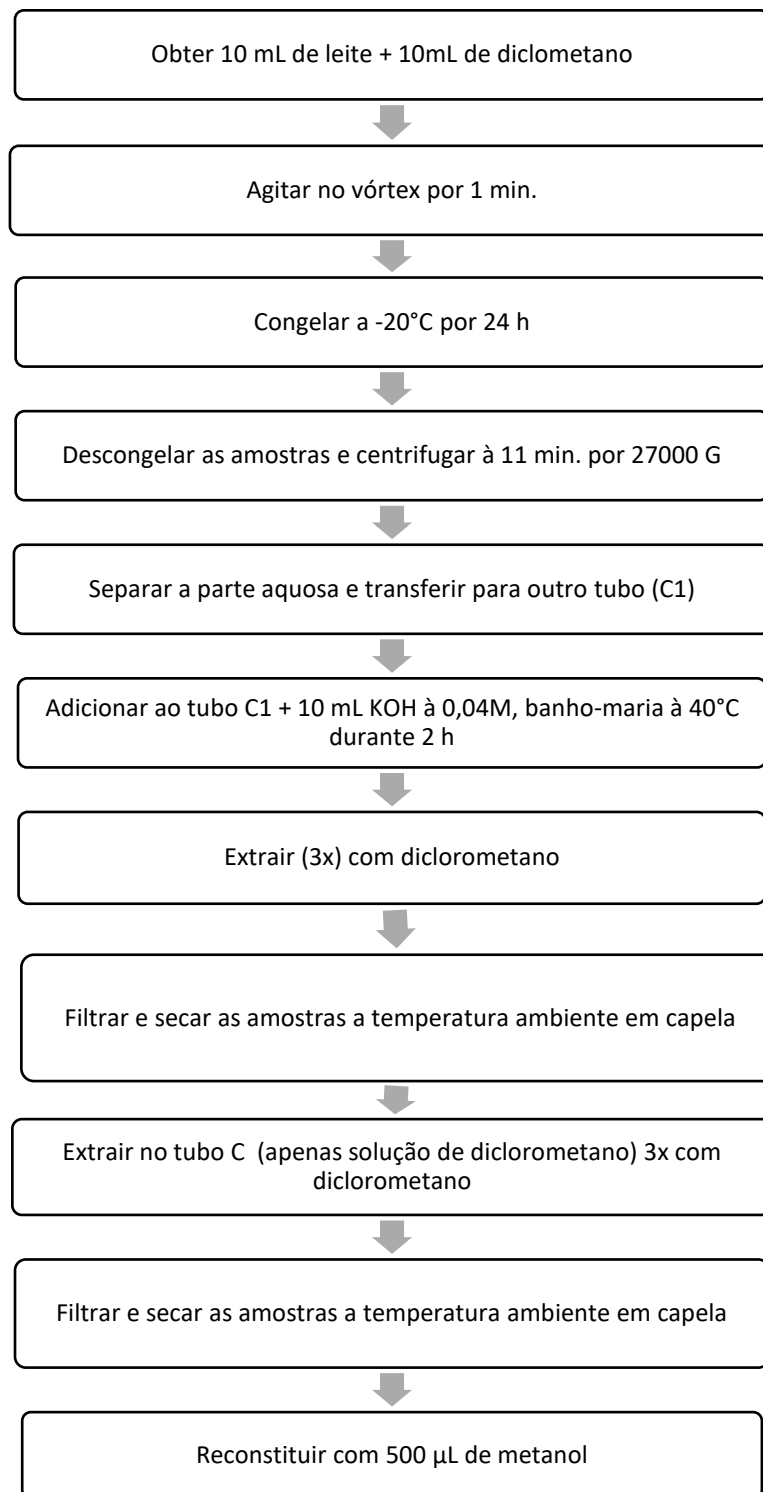


Figura 12. Fluxograma do método de extração C para *clean-up* das amostras de leite cru.

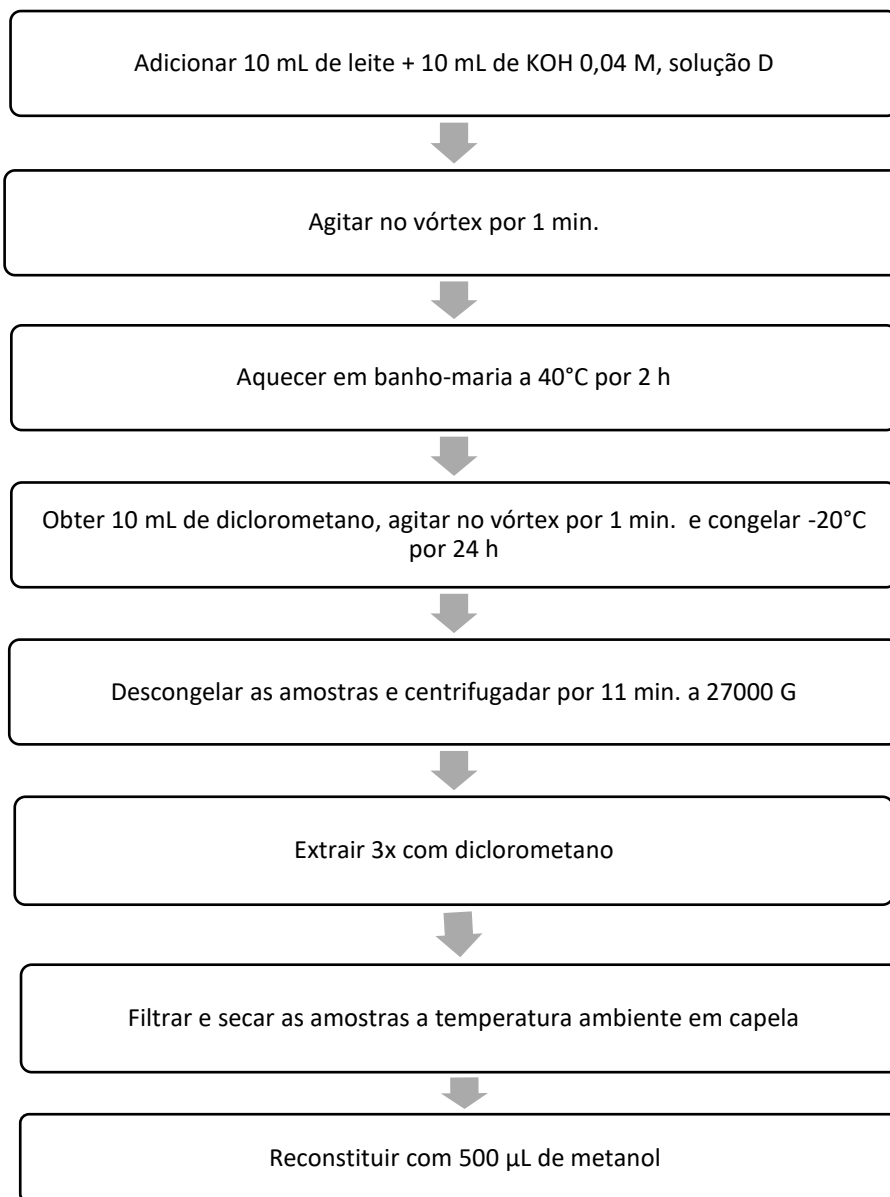


Figura 13. Fluxograma do método de extração D para *clean-up* das amostras de leite cru.

4.6. Detecção de pterosina B e ptaquilosídeo no material vegetal e no leite por CLAE-UV

4.6.1. Preparo da curva do padrão analítico

O padrão analítico foi ressuspensionado em uma solução de estoque preparada na concentração de 20 mmol/L constituída de metanol e armazenada a -20°C. As soluções de trabalho foram

estabelecidas por meio das diluições do padrão, com metanol, nas diferentes concentrações de 5; 2,5; 1,25; 0,625; 0,3125; 0,15625 mmol/L armazenada a -20°C.

4.6.2. Condições cromatográficas

A partir das extrações específicas propostas para os diferentes materiais, a detecção de pterosina B e ptaquilosídeo nas amostras foi avaliada por detecção em CLAE-UV, segundo técnica proposta por Agnew e Lauren (1991). Aliquotas de 20 µl foram injetadas, avaliadas em um fluxo isocrático de 1,200 mL/min. Para separação, utilizou-se uma coluna ODS-C18 (Shim-pack CLC-ODS (M), fase móvel acetone:metanol:água com 1 mM de ácido acético (25:25:50). Para detecção foi utilizada a configuração de 230 nm fixos. Para calibração foi utilizado o padrão de pterosina B construído, a partir de uma curva de calibração de seis pontos entre a faixa de 5 e 0,15625 mmol/L (5; 2,5; 1,25; 0,625; 0,3125; 0,15625).

4.7. Parâmetros analíticos para validação da técnica

4.7.1. Estudo da seletividade

Para a avaliação da seletividade, os cromatogramas gerados a partir das análises de amostras brancas foram comparados com os cromatogramas obtidos nas análises da solução padrão, com o intuito de verificar a ocorrência de compostos interferentes eluindo nos tempos de retenção dos analitos de interesse.

4.7.2. Determinação da linearidade das curvas analíticas

A avaliação da linearidade foi conduzida através da plotagem dos dados experimentais, áreas dos picos cromatográficos em função do nível de concentração. Foram empregados para a construção da curva analítica os seguintes níveis 5; 2,5; 1,25; 0,625; 0,3125; 0,15625 mmol/L em triplicata, afim de verificar a premissa de linearidade. O teste F ANOVA foi utilizado e, quando observada homocedasticidade das variâncias, o modelo de ajuste para a curva analítica no ensaio de validação aplicado foi Método dos Mínimos Quadrados Ordinários (MMQO) sob a premissa de que o desvio padrão dos resíduos da regressão é constante (homocedasticidade).

Os valores da área de pico foram plotados em relação à concentração e as curvas de calibração foram construídas usando uma regressão linear de MMQO. Em seguida, foi construído um gráfico relacionando a área do pico *versus* concentração e, por regressão linear, foram determinados a equação da curva analítica, o coeficiente de determinação (R^2) e coeficiente de correlação (r).

4.7.3. Determinação do limite de detecção (LD) e quantificação (LQ)

O LD foi determinado por meio do método visual em que realizou a adição de várias concentrações conhecidas do analito de modo a distinguir o sinal do ruído pela visualização da menor concentração visível de forma confiável, sendo a relação sinal/ruído de 3/1, enquanto para o LQ, foi utilizado como parâmetro a relação sinal/ruído de 10/1 (INMETRO, 2011). Esta análise foi realizada avaliando seis amostras replicadas.

4.7.4. Exatidão

A exatidão foi avaliada por meio da realização de ensaios de recuperação nas amostras. Amostras brancas foram fortificadas nas concentrações baixa (0,125 mmol/L), média (0,5 mmol/L) e alta (1,0 mmol/L) e a recuperação foi calculada utilizando a seguinte equação:

$$\text{Exatidão} = \frac{\text{concentração média experimental}}{\text{concentração teórica}} \times 100$$

4.8. Análise estatística

Os resultados estão apresentados como média seguida pelo respectivo desvio-padrão. A comparação dos níveis de ptaquilosídeo e de pterossina B entre as diferentes cidades foi feita utilizando o teste de Kruskal-Wallis seguido pelo teste de comparações múltiplas de Dunn, enquanto o teste de Mann-Whitney foi utilizado para comparar os resultados entre Estados. A determinação de correlação entre os níveis de ptaquilosídeo e pterossina B em cada planta foi realizada por meio do teste de correlação de Pearson. O nível de significância estatística foi estabelecido como $p \leq 0,05$.

5. RESULTADOS

5.1. Obtenção do padrão de Pterosina B para análise das amostras

Foi detectada a presença de pterosina B por CCD apresentando forte fluorescência em Rf 0,8 no R1 e no R5, e presença de traços nos demais resíduos.

Na detecção por CLAE-UV, o pico da pterosina B ocorreu em cerca de 5-5,5 minutos (Figura 14), e confirmamos os resultados obtidos com CCD. A maior presença da pterosina B ocorreu no R5, que apresentou pureza determinada por CLAE de 71,6%. Também estabelecemos a identidade química da pterosina B por LC-MS.

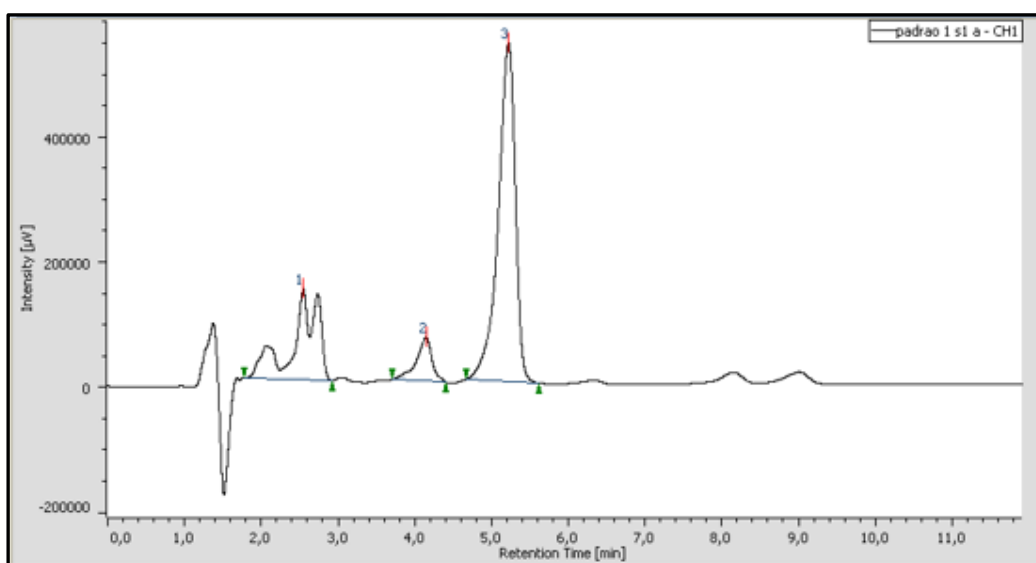


Figura 14. Cromatograma do padrão de pterosina B com 71,6% de pureza determinada por CLAE-UV.

Após a obtenção do padrão próprio de pterosina B, a próxima etapa do projeto foi a validação da metodologia analítica por CLAE-UV para análise de ptaquilosídeo e pterosina B de folhas maduras e brotos de diferentes espécies de samambaias coletadas no Brasil e na Argentina. Ainda, em uma etapa posterior, validamos a metodologia analítica por CLAE-UV para análise de ptaquilosídeo no leite cru de vacas de propriedades de Ouro Branco e Esmeraldas/MG.

5.2. Validação do método analítico por CLAE-UV para pesquisa de ptaquilosídeo e pterosina B em folhas maduras e brotos de samambaias

O método analítico por CLAE-UV foi validado e apresentou critérios de desempenho adequados para detecção e quantificação de pterosina B e ptaquilosídeo (Figura 15).

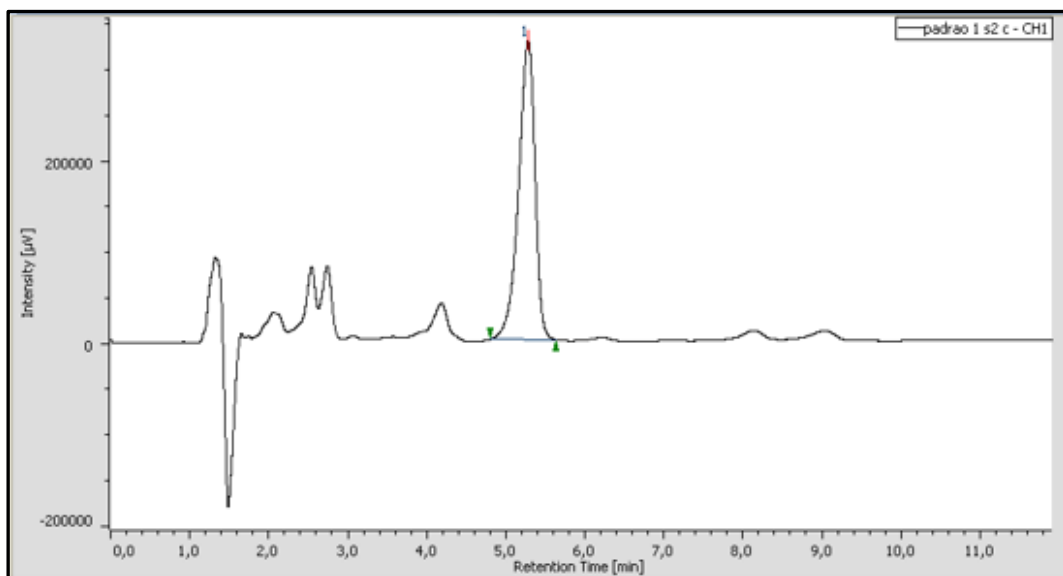


Figura 15. Cromatograma do padrão de pterosina B.

5.2.1. Linearidade

A curva analítica do padrão de pterosina B está representada abaixo (Figura 16). O cálculo dos coeficientes de regressão da curva analítica foi analisado com precaução para que todos estivessem dentro da faixa linear. O valor encontrado para o coeficiente de determinação (R^2) foi de 0,991 e para o coeficiente de correlação (r) foi de 0,996.



Figura 16. Linearidade da curva do padrão de pterosina B.

5.2.3. Limite de detecção e quantificação

Os limites de detecção e de quantificação do padrão Pterosina B foram calculados 0,04 mmol/L e 0,16 mmol/L respectivamente.

5.3. Quantificação de ptaquilosídeo e pterosina B em espécies de samambaias

Na tabela 3 estão representados os resultados das determinações das concentrações de ptaquilosídeo e pterosina B nas folhas maduras *P. arachnoideum* de diferentes regiões do Brasil e nas figuras 17-19 estão representados os cromatogramas respectivos. Não foram verificadas diferenças significantes entre os níveis de ptaquilosídeo e de pterosina B nas folhas maduras coletadas nas diferentes cidades e estados.

Tabela 3. Valores médios \pm SM de ptaquilosídeo e pterosina B (mg/g) em folhas maduras de *P. arachnoideum* de diferentes regiões do Brasil

Origem	Ptaquilosídeo	Pterosina B	n
Conselheiro Lafaiete	2,486 \pm 0,439	0,860 \pm 0,091	4
Esmeraldas	2,753 \pm 0,844	0,684 \pm 0,152	5
Ouro Branco	2,661 \pm 0,442	0,885 \pm 0,197	8
Minas Gerais (todas)	2,647\pm0,556	0,820\pm0,180	17
Canela	2,511 \pm 0,378	0,823 \pm 0,048	5
Nova Petrópolis	2,685 \pm 0,270	0,747 \pm 0,126	6
Rio Grande do Sul (todas)	2,606\pm0,319	0,782\pm0,102	11
Todas regiões	2,631\pm0,471	0,805\pm0,153	28

Na tabela 4 estão representados os resultados das determinações de ptaquilosídeo e pterosina B em brotos de *P. arachnoideum* de diferentes regiões do Brasil e na figura 20-22 estão representados os cromatogramas respectivos. Os níveis de ptaquilosídeo nos brotos também não apresentaram diferença significativa entre as localidades, mas os níveis de pterosina B diferiram entre os dois estados e entre os municípios de Esmeralda (MG) e Canela (RS).

Tabela 4. Valores médios \pm SM de ptaquilosídeo e pterosina B (mg/g) em brotos de *P. arachnoideum* de diferentes regiões do Brasil

Origem	Ptaquilosídeo	Pterosina B	n
Conselheiro Lafaiete	18,809 \pm 2,338	8,141 \pm 0,362	4
Esmeraldas	16,385 \pm 2,438	4,026 \pm 0,982 a	8
Ouro Branco	16,510 \pm 3,543	6,860 \pm 2,141	5
Minas Gerais (todas)	16,992\pm2,801	5,828\pm2,210 A	17
Canela	17,373 \pm 2,689	10,424 \pm 0,233 b	6
Nova Petrópolis	12,472 \pm 5,620	8,370 \pm 1,714	6
Rio Grande do Sul (todas)	14,922\pm4,919	9,397\pm1,585 B	12
Todas regiões	16,136\pm3,881	7,305\pm2,642	29

a,b Teste de Kruskal-Wallis seguido pelo teste de Dunn's

A,B Teste de Mann-Whitney

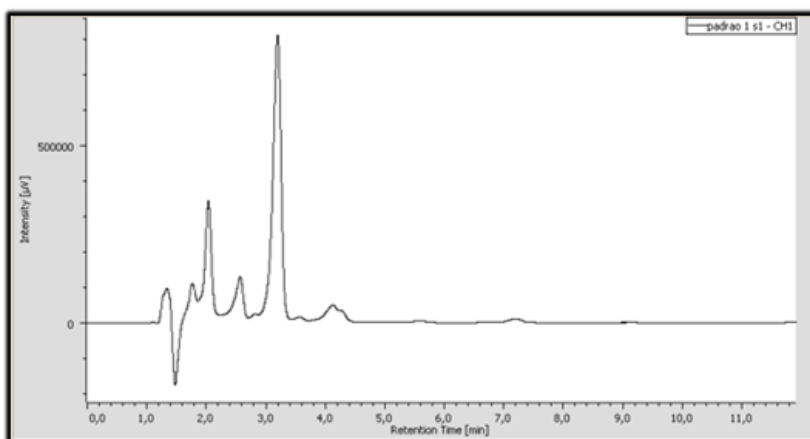


Figura 17. Cromatograma do padrão de Pterocystina B.

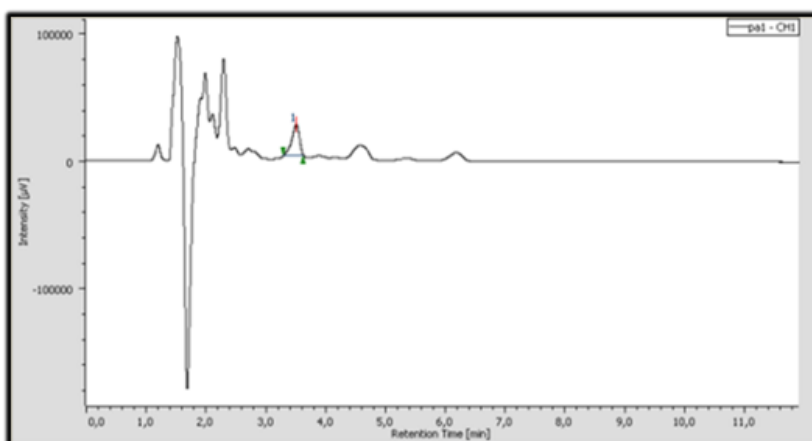


Figura 18. Cromatograma da extração de folhas maduras de *P. arachnoideum* da região de Esmeraldas/MG para determinação de ptaquilosídeo.

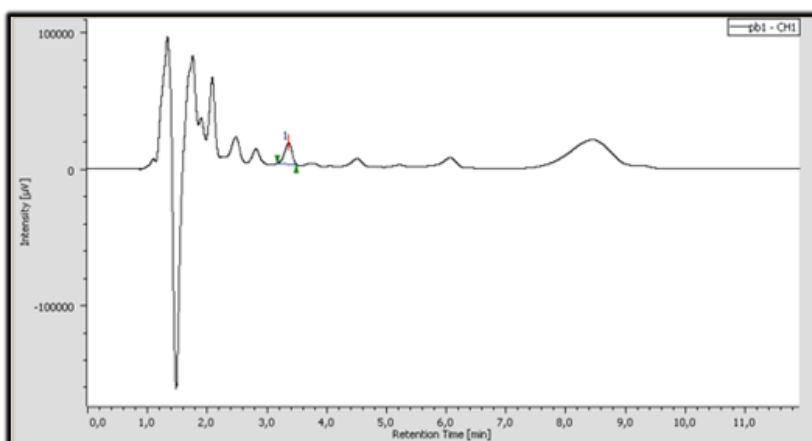


Figura 19. Cromatograma da extração de folhas maduras de *P. arachnoideum* da região de Esmeraldas/MG para determinação de pterocystina B.

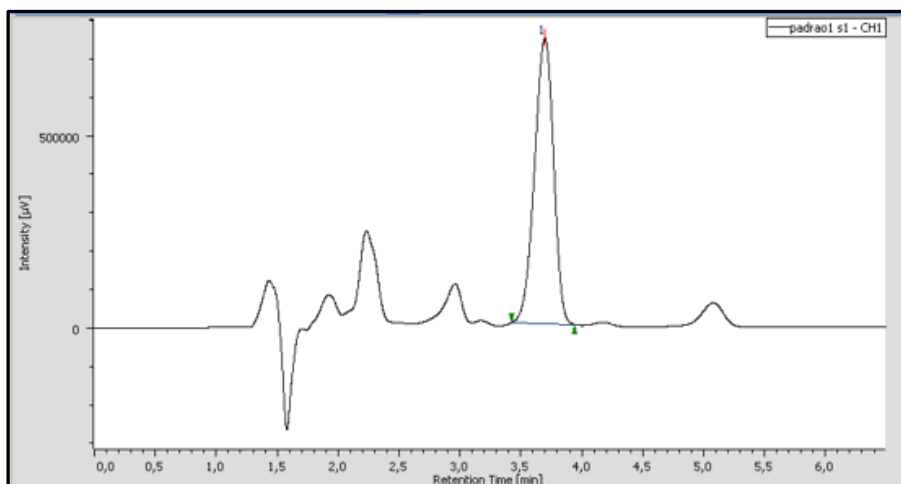


Figura 20. Cromatograma do padrão de Pterocarpina B.

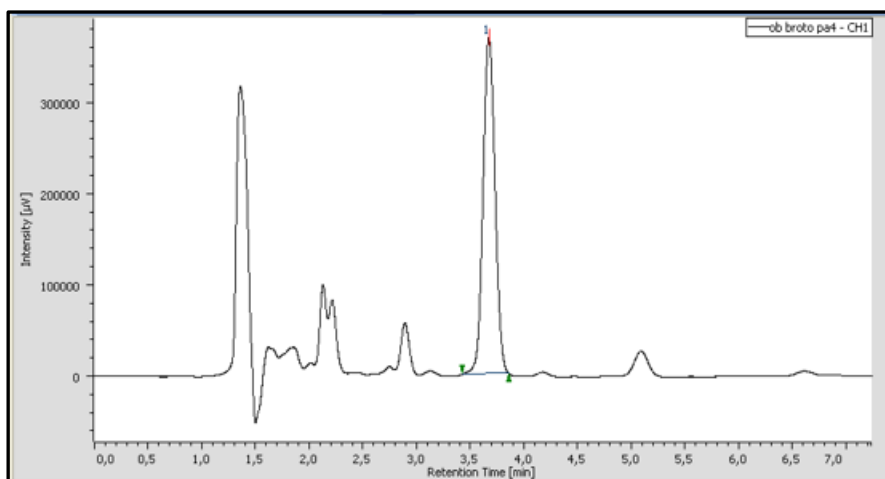


Figura 21. Cromatograma da extração de brotos de *P. arachnoideum* da região de Ouro Branco/MG para determinação de ptaquilosídeo.

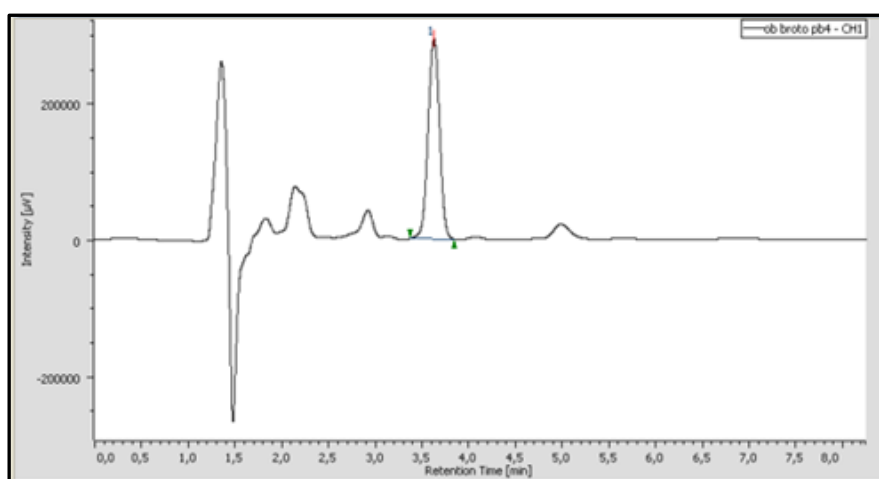


Figura 22. Cromatograma da extração de brotos de *P. arachnoideum* da região de Ouro Branco/MG para determinação de pterocarpina B.

O teste de correlação de Pearson revelou correlação significativa entre as concentrações de ptaquilosídeo e de pterosina B nas folhas maduras de *P. arachnoideum* ($R=0,4704$, $R^2=0,2213$, intervalo de confiança 95%: 0,1181 a 0,7176) (Figura 23). Por outro lado, não houve correlação entre os valores obtidos nos brotos desta espécie ($R=0,2213$, $R^2=0,04899$, intervalo de confiança 95%: 0,1580 a 0,5437) (Figura 24).

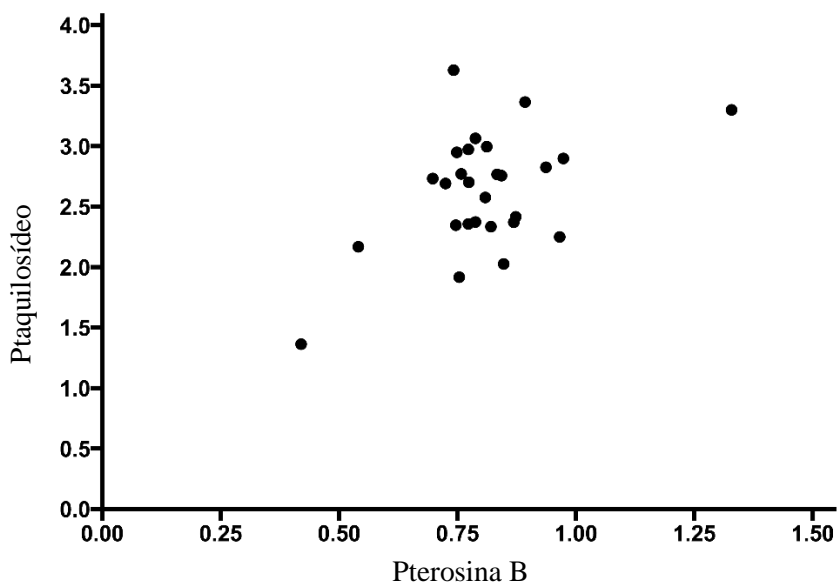


Figura 23. Correlação entre as concentrações de ptaquilosídeo e de pterosina B nas folhas maduras de *P. arachnoideum*. Teste de correlação de Pearson.

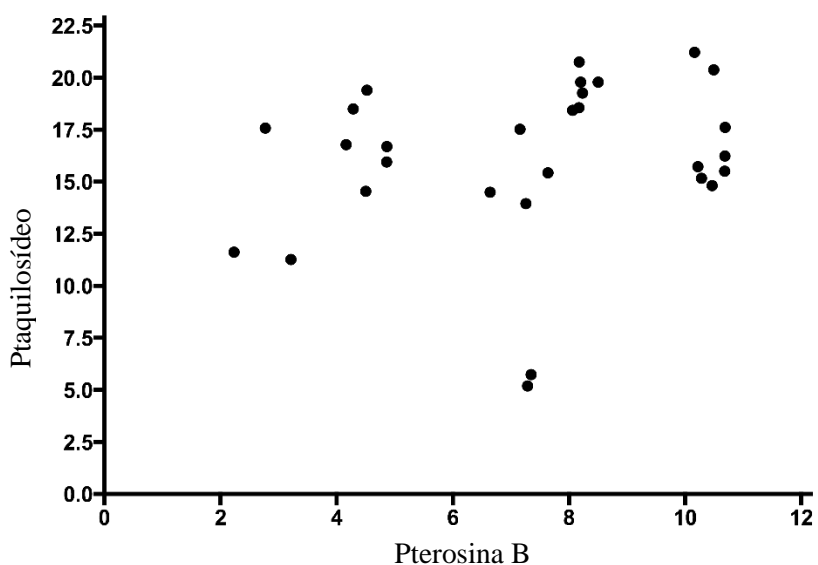


Figura 24. Correlação entre as concentrações de ptaquilosídeo e de pterosina B nos brotos de *P. arachnoideum*. Teste de correlação de Pearson.

Na tabela 5 e figura 25-27 estão representados os resultados das determinações de ptaquilosídeo e pterosina B nas folhas maduras de duas espécies de samambaias responsáveis por surtos de hematúria enzoótica bovina em duas propriedades na região noroeste da Argentina.

Tabela 5. Concentração média de ptaquilosídeo e pterosina B (mg/g) em duas espécies de samambaias responsáveis por surtos de hematúria enzoótica bovina em duas propriedades na região noroeste da Argentina

Espécie	Ptaquilosídeo	Pterosina B
<i>Pteris deflexa</i> (propriedade 1)	3,235	1,543
<i>Pteris deflexa</i> (propriedade 2)	2,424	0,740
<i>Pteris plumula</i> (propriedade 2)	2,540	0,727

Na tabela 6 estão representados os resultados das determinações de ptaquilosídeo e pterosina B em folhas maduras das samambaias *Sticherus lanuginosus*, *Dicranoptris flexuosa* e *Gleichenella pectinata*, coletadas no estado de Minas Gerais. As dosagens foram realizadas em duplicada e os valores estão apresentados como média seguida pelo respectivo desvio-padrão.

Tabela 6. Valores médios \pm SM de ptaquilosídeo e pterosina B (mg/g) em samambaias coletadas no estado de Minas Gerais

Espécie	Ptaquilosídeo	Pterosina B	n
<i>Sticherus lanuginosus</i>	2,466 \pm 0,173	1,572 \pm 0,166	3
<i>Dicranoptris flexuosa</i>	0,892 \pm 0,215	0,466 \pm 0,083	3
<i>Gleichenella pectinata</i>	n.d.	n.d.	4

n.d.: não detectado

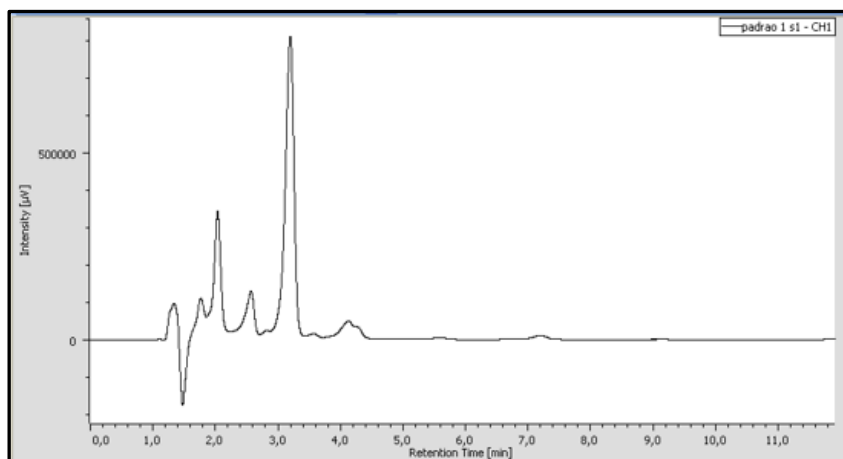


Figura 25. Cromatograma do padrão de Pterocarpina B.

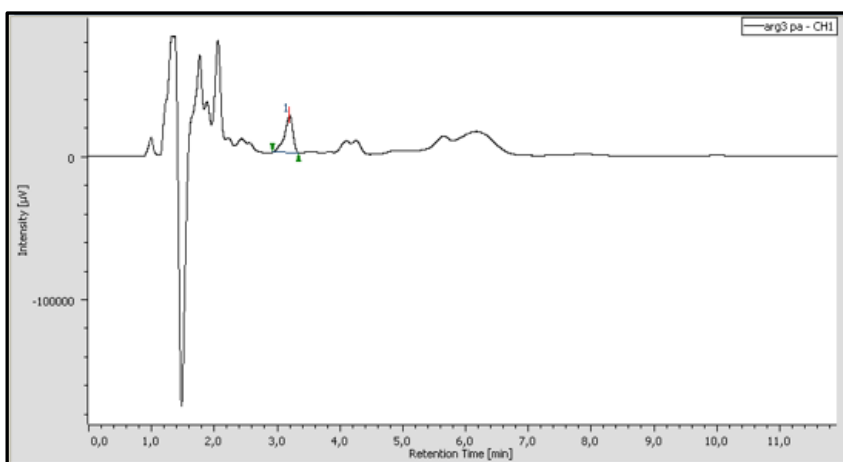


Figura 26. Cromatograma da extração de *Pteris deflexa* da região de Orán/Argentina para determinação de ptaquilosídeo.

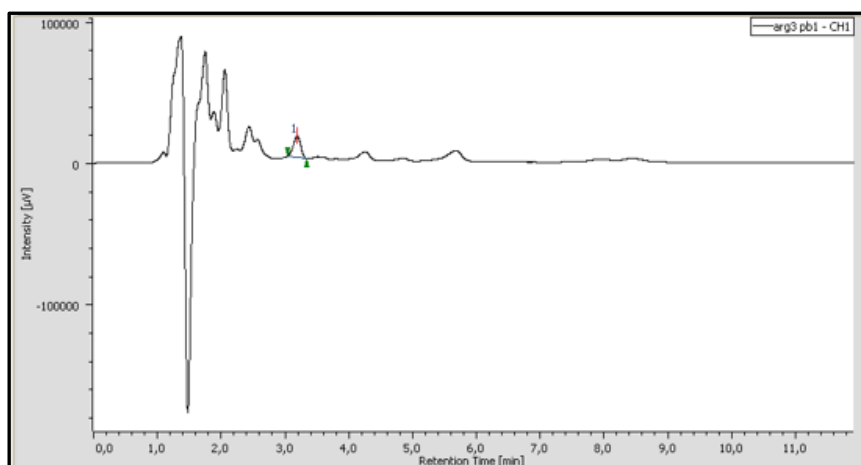


Figura 27. Cromatograma da extração de *Pteris deflexa* da região de Orán/Argentina para determinação de pterocarpina B.

5.2. Validação do método analítico por CLAE-UV para pesquisa de ptaquilosídeo e pterosina B no leite cru

5.2.1. Estudos de métodos de extração e *clean-up* para as amostras de leite cru

Foram comparados quatro métodos para extração e *clean-up* em amostras de leite cru. Durante o processo, foi observado que os métodos de extração A (Método de QuECHERS) e B não foram eficazes, pois não ocorreu a recuperação de pterosina B adicionada a amostras de leite na concentração de 1,0 mmol/L. Então, a partir do exposto desenvolvemos nosso próprio método de extração denominados de métodos C e D, as amostras de leite foram testadas em duplicata em ambos os métodos.

5.2.2. Linearidade

A curva analítica do extrato da matriz, leite, fortificada nas concentrações de 0,125 mmol/L, 0,5 mmol/L, 1,0 mmol/L está representada abaixo (Figura 28 e Tabela 10). O cálculo dos coeficientes de regressão da curva analítica foi analisado com precaução para que todos estivessem dentro da faixa linear. O valor encontrado para o coeficiente de determinação (R^2) foi de 0,988 e para o coeficiente de correlação (r) foi de 0,994.

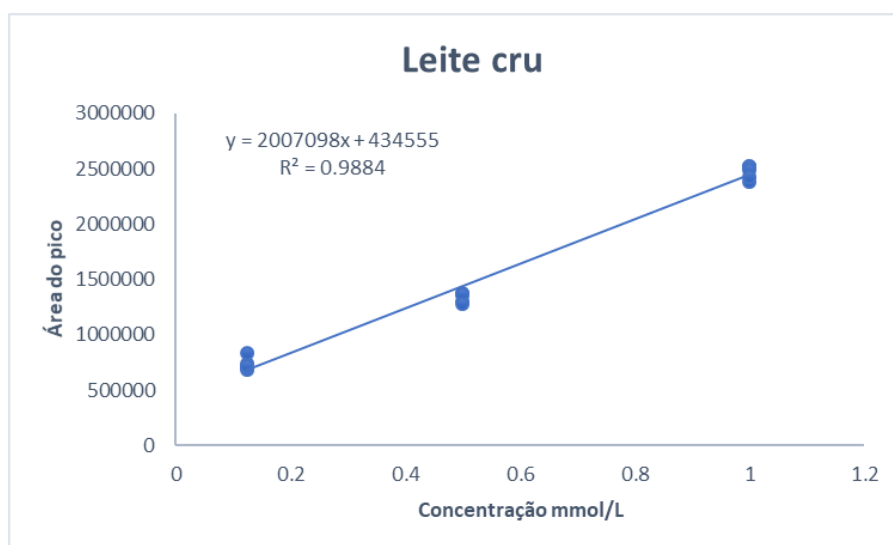


Figura 28. Linearidade da curva na matriz leite cru.

5.2.3. Seletividade

Os cromatogramas obtidos nas análises do padrão de pterosina B e da matriz (leite cru) em branco estão representados abaixo (Figura 29), mostrando boa seletividade para a detecção da pterosina B.

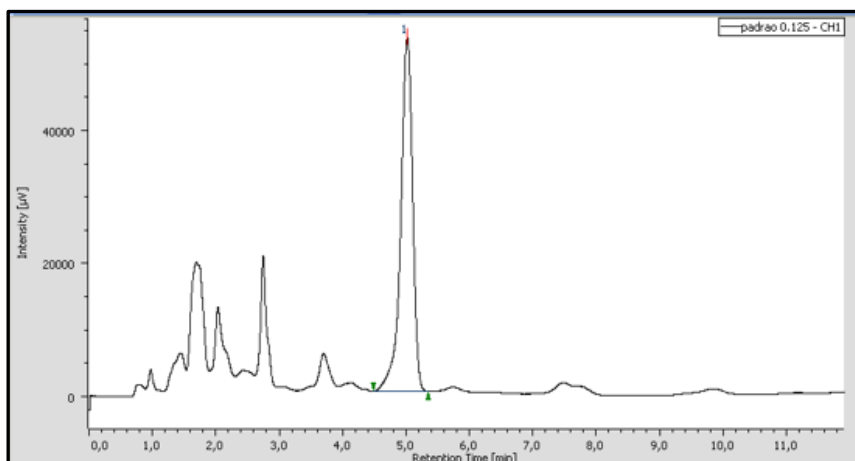


Figura 29. Cromatograma da solução padrão de Pterocina B no leite.

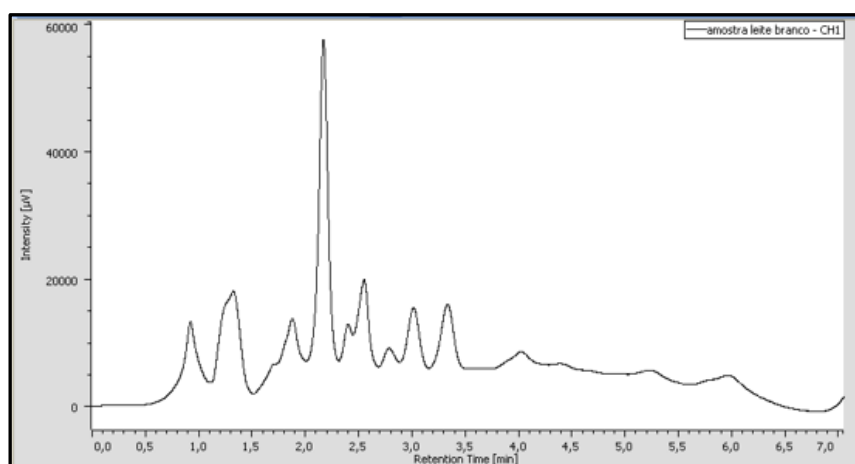


Figura 30. Cromatograma da extração no leite sem nenhum analito.

5.2.4. Exatidão e limites de detecção e de quantificação

O resultado mostrou que a matriz (leite) teve efeito sobre o analito (Pterocina B). A recuperação média na concentração de 1,0 mmol/L foi de 102,0%, variando de 94,4% a 106,5%. Os limites de detecção e de quantificação do padrão Pterocina B foram calculados 0,04 mmol/L e 0,125 mmol/L respectivamente.

5.3. Quantificação de ptaquilosídeo no leite cru

Para pesquisa de ptaquilosídeo em amostras de leite foram utilizadas 60 amostras de leite do Laboratório de Análise da Qualidade do Leite da Escola de Veterinária da UFMG (LabUFMG), 20 amostras de leite cru de pequenas propriedades da região de Ouro Branco/MG e 5 amostras da região de Esmeraldas/MG, foram realizadas em duplicada utilizando os métodos C e D. Não foi detectada a presença do ptaquilosídeo nas amostras de leite analisadas.

6. DISCUSSÃO

As técnicas disponíveis atualmente para determinação do ptaquilosídeo nas diferentes matrizes promovem sua conversão em pterosina B (Saito et al., 1989; Agnew e Lauren, 1991; Alonso-Amelot et al., 1992; Tobar et al., 2014a), mas sua utilização é limitada pela dificuldade na obtenção e estocagem de padrões de ptaquilosídeo. De fato, o ptaquilosídeo é substância de alta instabilidade química, seja pela ação da variação do pH da solução ou pela exposição a luz, calor e até a temperatura ambiente prolongada (Yamada et al., 2007). A solução é a utilização da pterosina B como padrão, pois se trata de uma substância estável que pode ser mensurada quantitativamente. No entanto, a limitação para o uso está na disponibilidade comercial deste composto. Assim, uma etapa do presente estudo foi desenvolver uma metodologia eficaz para a obtenção de pterosina B, para que possa ser utilizada como padrão analítico.

Para análises cromatográficas por meio de GC-MS/MS, alguns trabalhos fizeram a conversão do ptaquilosídeo em bromo-pterosina e utilizaram a forma deuterada deste composto como padrão (Bonadies et al., 2004; Miele et al., 2008; Francesco et al., 2011; Attya et al., 2012; Zacccone et al., 2014; Virgilio et al., 2015). O uso da bromo-pterosina e suas formas deuteradas não é viável para a cromatografia líquida, além de sua obtenção ser bastante complexa.

Na metodologia para obtenção da pterosina B proposta no presente projeto, o extrato de samambaia passa por etapa de limpeza inicial em resina, seguida por extração com diclorometano e precipitação com uma mistura de solventes (hexano e clorofórmio). Esta metodologia proporcionou uma concentração eficiente de pterosina B. A confirmação da identidade química desta substância foi feita inicialmente por meio de CCD com visualização por fluorescência e, definitivamente, por espectrometria de massas, com identificação da massa molecular exata.

As pterosinas já foram isoladas do extrato de todas as partes da samambaia, sendo encontradas nas folhas (Agnew e Lauren, 1991; Alonso-Amelot et al., 1992; Tobar et al. 2014a), rizomas (Rasmussen et al., 2003b; Rasmussen et al., 2005; Yamada et al., 2007) e brotos (Alonso-Amelot et al., 1992; Pinto et al., 2004; Yamada et al., 2007). Diversos tipos de pterosina estão presentes na planta, mas também são formadas após hidrólise do ptaquilosídeo (Yamada et al., 2007; Mohammad, 2016).

Segundo Alonso-Amelot et al. (1992), a amostra ideal de samambaia para realização do padrão ou até para as determinações em planta, deve ser realizada com amostra fresca, pois existe uma perda de 30% de ptaquilosídeo no processo de secagem em estufa a temperatura de 50 °C por 5 dias. Deste modo, utilizamos amostras de planta fresca triturada em liquidificador, e o método adotado para substituir o calor foi o tratamento do extrato aquoso de planta com uma solução alcalina de hidróxido de potássio a 0,04 M, com aquecimento à 40°C, por 2 horas só para acelerar a conversão.

A concentração de ptaquilosídeo presente nas amostras de folhas maduras de *P. arachnoideum* variou de 2,486±0,439 a 2,753±0,844 mg/g, e de pterosina B variou de 0,684±0,152 a 0,885±0,197 mg/g. Estes resultados foram semelhantes ao encontrado por Agnew e Lauren (1991), de 2,300 mg/g de ptaquilosídeo e 0,78 mg/g de pterosina B em folhas maduras de *P. esculentum* da Nova Zelândia. Também foi similar ao encontrado por Alonso-Amelot et al. (1992) em folhas maduras de *P. aquilinum* na Venezuela, com ptaquilosídeo variando de 1,78 a 1,96 mg/g e pterosina B de 0,54 a 0,79 mg/g.

Nossos resultados também corroboram com os estudos de Rasmussen et al. (2003a) com *P. aquilinum* na Dinamarca, que encontraram conteúdo de ptaquilosídeo em folhas variando entre 0,213 e 2,145 mg/g. Rasmussen et al. (2015), em folhas maduras de *P. aquilinum* na Escócia, relataram que a concentração de ptaquilosídeo variou 0,087 a 2,450 mg/g. Entretanto, nossos resultados demonstraram níveis mais elevados se compararmos com as determinações de *P. aquilinum* madura do distrito de Kullu na Índia, realizada por Rai et al. (2017), que encontraram $0,035 \pm 0,2$ mg/g de ptaquilosídeo, mas não foi detectada a presença de pterossina B.

Tobar et al. (2014a) encontraram diferença nas concentrações de ptaquilosídeo de *Pteridium arachnoideum* coletadas em três regiões diferentes do Equador. Em folhas jovens frescas o valor encontrado foi de 0,588 mg/g, mas nas mesmas folhas jovens secas, o valor aumentou para 2,140 mg/g. Em folhas maduras frescas o valor encontrado foi de 0,558 mg/g, mas nas mesmas folhas maduras secas, o valor aumentou para 1,827 mg/g. No entanto, estes autores não encontraram diferença estatística com relação as variáveis geográficas e estágio de crescimento. Os resultados encontrados no presente estudo para as concentrações de folhas maduras de *P. arachnoideum* corroboram com os resultados obtidos por Tobar et al. (2014a) em suas mensurações de amostras de folhas secas.

A quantidade de ptaquilosídeo em folhas de *Pteridium* spp. é muito variável (Pathania et al., 2012; Mohammad, 2016). Rasmussen et al. (2015) demonstraram que a concentração de ptaquilosídeo diminuiu à medida que as folhas amadurecem. Sabe-se que o ptaquilosídeo atinge a maior concentração em brotos jovens, quando eles emergem no solo no início da brotação. Depois, com o crescimento, a concentração diminui, com perda estimada em 10 a 20% do nível máximo (Alonso-Amelot et al. 1998; Rasmussen et al., 2015, 2003b). Existe a hipótese que, ao final do crescimento da planta, parte do ptaquilosídeo seja transferida para o rizoma (Rasmussen et al., 2015). Segundo O'Driscoll et al. (2016), um fator relevante para morte da samambaia é a diminuição das concentrações de ptaquilosídeo nas folhas.

Além disso, Smith et al. (1994) e Pathania et al. (2012) observaram que a concentração de ptaquilosídeo varia muito na mesma espécie de planta que ocorre em localização diferente e de espécie para espécie de *Pteridium*. Experimentos nas folhas maduras com concentrações muito baixas de ptaquilosídeo sugerem perda da toxina durante o envelhecimento da planta ou até mesmo a senescência (Pathania et al., 2012). No entanto, são necessários mais estudos sazonais com a determinação padronizada da concentração de ptaquilosídeo e pterossina B em várias partes da planta em locais diferentes, nos locais com casos esporádicos de HEB e CVDS, para tentar estabelecer o risco real ao carcinógeno em que os animais e o ser humano estão expostos.

Com relação às determinações realizadas em brotos de *P. arachnoideum* obtivemos para ptaquilosídeo valores entre $12,472 \pm 5,620$ a $18,809 \pm 2,338$ mg/g e de pterossina B variou de $4,026 \pm 0,982$ a $10,424 \pm 0,233$ mg/g. Estes resultados diferem de Alonso-Amelot et al. (1992), que encontraram de 1,88 a 2,34 mg/g de ptaquilosídeo e de 0,69 a 0,80 mg/g de pterossina B em amostras de brotos de *P. aquilinum* na Venezuela. Também divergiram de Pinto et al. (2004), que encontraram valores de ptaquilosídeo de 3,795 a 6,526 mg/g em brotos de *P. aquilinum* em Portugal, mas não realizaram determinação da pterossina B. No entanto, nossos resultados corroboram com Smith et al. (1994), que encontraram uma variação de 12,945 a 20,0 mg/g de ptaquilosídeo em *Pteridium* spp. na Austrália.

A ingestão de outras espécies de samambaias, em áreas livre de *Pteridium* spp., foi relacionada à ocorrência de HEB. Estas espécies são a *Cheilanthes sieberi* na Austrália (Smith et al., 1989) e a

Onychium contiguum na Índia (Dawra et al., 2001; Somvanshi et al., 2006; Rai et al., 2017). Nestas espécies, o princípio tóxico destas plantas responsável pela HEB deve ser o ptaquilosídeo (Agnew e Lauren, 1991). De fato, Smith et al. (1989) isolaram o ptaquilosídeo em brotos de *C. sieberi*, em locais com ocorrência de HEB na Austrália, em concentrações de 0,388 a 0,448 mg/g.

Em parceria com pesquisadores argentinos, também quantificamos a presença de ptaquilosídeo e pterosina B de fazendas na região noroeste da Argentina, que não apresentavam samambaias do gênero *Pteridium*, mas com bovinos desenvolvendo HEB e carcinoma de bexiga. Nestas propriedades, foi observado que os bovinos consumiam as samambaias *Pteris deflexa* Link e *Pteris plumula* Desv. (*Pteris quadriaurita* Retz.), ambas da família Pteridaceae. Desta forma, foi realizada a pesquisa de ptaquilosídeo e pterosina B nestas plantas, para confirmar se estas espécies eram as responsáveis pela HEB. Os valores encontrados nas espécies *P. deflexa* e *P. plumula*, para ptaquilosídeo variou de 2,424 a 3,235 mg/g e para pterosina B 0,727 a 1,543 mg/g. Deste modo, foi confirmado que a ingestão destas duas espécies de samambaias por bovinos causa HEB. Uma busca na literatura revelou ser este o primeiro estudo que comprova HEB em bovinos ingerindo samambaias do gênero *Pteris*. É importante ressaltar que as espécies *P. deflexa* e *P. plumula* também estão presentes no Brasil (Prado e Windisch, 2000).

Em diversos estudos fitoquímicos, o ptaquilosídeo também foi encontrado em algumas outras espécies de samambaia, como *Diplazium esculentum*, *Polystichum squarrosum*, *Christella dentata*, *Cheilanthes farinosa* (Somvanshi et al., 2006), *Dryopteris cochleata*, *Hypodematium crenatum*, *Pseudocyclosorus canus* e *Pteris cretica* (Pathania et al., 2012), *Onychium japonicum*, *Dryopteris juxtaposita*, *Dryopteris nigropaleacea* (Rai et al., 2017). Deste modo, deveria ser feita a pesquisa de ptaquilosídeo nas diferentes espécies de samambaias do Brasil para se determinar o risco da intoxicação por cada uma delas.

Para avaliar a presença do ptaquilosídeo em diferentes espécies de samambaias no Brasil, foram avaliadas as espécies *Dicranopteris flexuosa* (Schrad.) Underw., *Gleichenella pectinata* (Willd.) Ching e *Sticherus lanuginosus* (Fée) Nakai, todas da família Gleicheniaceae. As espécies *S. lanuginosus* e *D. flexuosa* foram identificadas pela primeira vez como contendo ptaquilosídeo e pterosina B. *S. lanuginosus* apresentou níveis de ptaquilosídeo entre 2,466±0,173 mg/g e de pterosina B 1,572±0,166 mg/g, enquanto a *D. flexuosa* apresentou níveis de ptaquilosídeo entre 0,892±0,215 mg/g e de pterosina B 0,466±0,083 mg/g. Assim, estas espécies podem ser consideradas como potencialmente tóxicas para ruminantes, da mesma forma que *P. deflexa* e *P. plumula*. Por outro lado, não foi detectada a presença destes compostos nas amostras de *G. pectinata* do presente estudo.

O consumo das samambaias por vacas em lactação pode resultar na transferência de seu princípio tóxico cancerígeno, o ptaquilosídeo, para o leite, com potencial de afetar quem o consuma. No entanto, faltam estudos no Brasil visando determinar a presença do ptaquilosídeo no leite. Neste sentido, propomos realizar a determinação de ptaquilosídeo no leite cru de vacas de propriedades em Minas Gerais. É o primeiro estudo brasileiro que visa determinar a concentração de ptaquilosídeo em leite cru de vacas. Já existem estudos realizados mundialmente com intoxicações experimentais (Alonso-Amelot et al., 1998) e espontâneas (Tobar et al., 2014b; Francesco et al., 2011; Negrete, 2013; Aranha et al., 2014, Virgilio et al., 2015), utilizando diferentes metodologias. Para este estudo, desenvolvemos uma metodologia por cromatografia líquida, eficiente e adaptada à realidade brasileira.

Para a conversão do ptaquilosídeo e extração da pterossina B nas amostras de leite, foram comparadas quatro metodologias, visando comparar a eficiência na recuperação e no *clean-up*. A metodologia de extração A empregada para as amostras de leite foi eficiente na remoção da gordura, pois a utilização da acetronitrila possibilita a extração de uma menor quantidade de co-extrativos lipofílicos, combinado com a centrifugação da amostra, permitia a precipitação de proteína, para posterior descarte. Outra vantagem desta metodologia era a utilização do sulfato de magnésio, um sal eficiente na redução da fase aquosa da amostra e que promove um aquecimento da solução favorecendo a extração. No entanto, apesar de eficiente na limpeza, esta metodologia falhou na recuperação do padrão nos testes de fortificação. Observando as várias metodologias existentes que mensuraram o ptaquilosídeo no leite, todos os autores (Alonso-Amelot et al., 1998; Francesco et al., 2011; Negrete, 2013; Tobar et al., 2014 a,b) utilizaram em comum uma etapa de tratamento da fase aquosa com solução de hidróxido de sódio para alcalinizar o pH da solução com posterior conversão térmica do ptaquilosídeo em pterossina B.

A metodologia de extração B empregada para *clean-up* das amostras de leite também foi eficiente na limpeza da fração de gordura e proteínas provenientes da matriz, mas, como o método descrito acima, também falhou na recuperação do padrão nos testes de fortificação da matriz. Alonso-Amelot et al. (1998), Negrete (2013) e Tobar et al. (2014 a,b) utilizaram em suas metodologias de extração tanto a acetronitrila como o metanol, obtendo um bom resultado na etapa de limpeza e extração, seguido por alcalinização da solução e tratamento térmico. Nas metodologias testadas (Métodos A e B), foram utilizados estes solventes separadamente, mas o resultado foi ineficaz.

Para as metodologias de extração C e D empregadas para *clean-up* das amostras de leite, foi utilizado o solvente diclorometano para extração, seguido por etapas de congelamento e centrifugação para conseguir a eficaz separação da gordura e proteínas. Após estas etapas, as amostras foram tratadas com hidróxido de potássio para alcalinizar a solução aquosa, associado com tratamento térmico, para a conversão do ptaquilosídeo em pterossina B. A extração deste composto formado foi feita com diclorometano, e posterior etapa de limpeza realizada com sílica. As metodologias C e D desenvolvidas no presente projeto foram eficientes na limpeza da amostra e também na recuperação do padrão nos testes de fortificação.

No entanto, não foi detectada a presença de ptaquilosídeo nas amostras de leite cru de propriedades em Ouro Branco e Esmeraldas, MG, com histórico de HEB e que possuíam *P. arachnoideum* na pastagem. Estes animais podem não ter consumido a samambaia ou estar no período em que o ptaquilosídeo ainda não era secretado no leite.

Segundo Alonso-Amelot et al. (1998), o ptaquilosídeo começa a ser detectado no leite após 38 horas da ingestão das folhas da samambaia, e permanece mensurável por até 48 horas após o último consumo da planta. No mesmo estudo, a média de ptaquilosídeo excretada no leite por vacas às quais foi administrada a planta foi de $8,6 \pm 1,16\%$ do ptaquilosídeo total ingerido, em cinco dias de experimento. Segundo Tobar et al. (2014a), o método de extração da amostra desenvolvido em seu experimento mostrou adequada recuperação, confirmando que a quantificação por CLAE-UV foi um método confiável para altos níveis residuais de ptaquilosídeo.

7. CONCLUSÕES

O presente estudo desenvolveu uma metodologia para determinar a quantidade do carcinógeno ptaquilosídeo, por meio de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) com detecção por UV em plantas e leite, utilizando a pterosina B como padrão.

Em amostras de *Pteridium arachnoideum* coletadas no Brasil, os níveis de ptaquilosídeo e pterosina B foram maiores em brotos do que nas folhas maduras, da mesma forma como observado em outros países.

Não foi verificada variação nos níveis de ptaquilosídeo nas plantas coletadas em diferentes cidades dos estados de Minas Gerais e Rio Grande do Sul.

Foi confirmada a presença de ptaquilosídeo e pterosina B em *Pteris deflexa* e *Pteris plumula*, em quantidades equivalentes às encontradas em *P. arachnoideum*.

A mensuração dos níveis de ptaquilosídeo e pterosina B nas samambaias *Dicranoptris flexuosa* e *Sticherus lanuginosus* revelou que elas podem ser consideradas como potencialmente tóxicas para ruminantes, da mesma forma que *P. deflexa* e *P. plumula*.

Não foi detectada a presença destas toxinas em *Gleichenella pectinata*.

Foi desenvolvida uma metodologia analítica utilizando CLAE-UV para a determinação das concentrações do ptaquilosídeo no leite bovino, baseada na conversão deste composto em pterosina B e posterior extração utilizando diclorometano.

Não foi detectada a presença de ptaquilosídeo nas amostras de leite cru de propriedades em Ouro Branco e Esmeraldas, MG, com histórico de HEB e que possuíam *P. arachnoideum* na pastagem.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGNEW, M.P.; LAUREN, D.R. Determination of ptaquiloside in bracken fern (*Pteridium esculentum*). *Journal of Chromatography*, v. 538, p. 462-468, 1991.

ALONSO-AMELOT, M.E.; AVENDANO, M. Humam carcinogenesis and bracken fern: A review of the evidence. *Current Medicinal Chemistry*, v. 9, n. 6, p. 675-686, 2002.

ALONSO-AMELOT, M.E.; CASTILLO, U.; SMITH, B.L.; LAUREN, D.R. Excretion, through milk, of ptaquiloside in bracken-fed cows. A quantitative assessment. *Lait*, v. 78, p. 413-423, 1998.

ALONSO-AMELOT, M.E.; CASTILLO, U.; SMITH, B.L.; LAUREN, D.R.; AMELOT, M.E. Bracken ptaquiloside in milk. *Nature*, v.382, p.587, 1996.

ALONSO-AMELOT, M.E.; PÉREZ-MENA, M.; CALCAGNO, M. P.; JAIMES-ESPINOZA, R. Quantitation of pterosins A and B, and ptaquiloside, the main carcinogen os *Pteridium aquilinum* (l. Kuhn), by high pressure liquid chromatography. *Phytochemical Analysis*, v.3, p.160-164, 1992.

ANASTASSIADES, M.; LEHOTAY, S. J.; STAJNBAHER, D.; SCHENCK, F. J. Fast and easy multiresiue method employing acetonitrile extraction/ partitioning and “dispersive solid-phase extraction” for the determination of pesticide residues in produce. *Journal of the Association of Official Analytical Chemists International*, v. 86, n. 2, p. 412-431, 2003.

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária, Relatório PAMVet, 2009. Disponível em: www.anvisa.gov.br, acessada em 24 de novembro 2017.

ANJOS, B.L.; IRIGOYEN, L.F.; FIGHERA, R.A.; GOMES, A.D.; KOMMERS, G.D.; BARROS, C.S.L. Intoxicação aguda por samambaia (*Pteridium aquilinum*) em bovinos na Região Central do Rio Grande do Sul. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v. 28, n.10, p. 501-507, 2008.

ARANHA, P.C.R.; HANSEN, H.C.B.; RASMUSSEN, L.H.; STROBEL, B.W.; FRIIS, C. Determination of ptaquiloside and pterosin B derived from bracken (*Pteridium aquilinum*) in cattle plasma, urine and milk. *Journal of Chromatography B*, v. 951-952, p. 44-51, 2014.

ASSIS, F. C.; SALINO, A. Dennstaedtiaceae (Polypodiopsida) no estado de Minas Gerais, Brasil. *Rodriguésia*, v. 62, n. 1, p. 11-33, 2011.

ATTYA, M.; NARDI, M.; TAGARELLI, A.; SINDONA, G. A New facile synthesis of D4-pterodin B and D4-bromopterodin, deuterated analogues of ptaquiloside. *Molecules*, v. 17, n. 5, p. 5795-5802, 2012.

BANDEIRA, D. D., MUNARETTO, J. S., RIZZETTI, T. M., FERRONATO, G., PRESTES, O. D., MARTINS, M. L., ZANELLA, R., ADAIME, M. B. Determinação de resíduos de agrotóxicos em leite bovino empregando método QuEChERS modificado e GC-MS/MS, *Química Nova*, v. 37, n. 5, p. 900-907, 2014.

BARBOSA, R.R.; RIBEIRO FILHO, M.R.; SILVA, I.P.; SOTO-BLANCO, B. Plantas tóxicas de interesse pecuário: importância e formas de estudo. *Acta Veterinaria Brasílica*, v.1, n.1, p.1-7, 2007.

BARROS, C. S. L.; GRAÇA, D. L.; SANTOS, M. N.; BARROS S. S. Intoxicação aguda por samambaia (*Pteridium aquilinum*) em bovinos no Rio Grande do Sul. *A Hora Veterinária*, v. 7, n. 37, p. 33-39, 1987.

BONADIES, F.; BORZACCHIELLO, G.; DEZZI, S.; NICOLETTI, R.; ROPERTO, S. Mass spectrometric analysis of ptaquiloside, the toxic sesquiterpene from bracken fern. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, v. 18, n. 7, p. 825-828, 2004.

BORZACCHIELLO, G.; AMBROSIO, V.; GALATI, P.; POGGIALI, A.; VENUTI, A.; ROPERTO, F. The pagetoid variant of urothelial carcinoma *in situ* of urinary bladder in a cow. *Veterinary Pathology*, v. 38, n. 1, p. 113-116, 2003.

BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Manual de garantia da qualidade analítica. / Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. – Brasília: MAPA/ACS, p. 227, 2011.

BRASIL. Ministério do Trabalho e Emprego. Portaria Interministerial nº 9, 07 de outubro de 2014. Publica a lista Nacional de Agentes Cancerígenos para Humanos (LINACH), como referência para formulação política públicas. *Diário Oficial da União*, seção 1, n. 194, p. 142, 08 de outubro de 2014.

BRISCOE, C. J., CLARKE, W., HAGE, D. S. *in*: Affinity Mass Spectrometry. Handbook of Affinity Chromatography (Second Edition), Taylor & Francis Group, LLC, p. 737-741, 2006.
BRUZZONITI, M. C.; SARZANINI, C.; MENTASTI, E. Preconcentration of contaminants in water analysis. *Journal of Chromatography*, v. 902, p. 289, 2000.

CALDAS, S.S., GONÇALVES, F.F., PRIMEL, E. G., PRESTES, O. D., MARTINS, M.L., ZANELLA, R. Principais técnicas de preparo de amostra para a determinação de resíduos de agrotóxicos em água por cromatografia líquida com detecção por arranjo de diodos e por espectrometria de massas. *Química Nova*, v. 34, n. 9, p.1604-1617, 2011.

CÂMARA, A. C. L.; DALCIN, L.; SOTO-BLANCO, B. Patogênese, sinais clínicos e epidemiologia das intoxicações por plantas cianogênicas no nordeste brasileiro. *Semina. Ciências Agrárias*, v. 35, n. 4, p. 1961-1972, 2014.

CAMPO, M. S. Animal models of papillomavirus pathogenesis. *Virus Research*, v. 89, n. 2, p. 249-261, 2002.

CAMPO, M. S.; BENISTON, R. G.; CONNOLLY, J. A.; GRINDLEY, G. J. Synergism between papillomavirus and bracken fern in carcinogenesis of the upper gastrointestinal tract in cattle and humans: quercetin and cell transformation. *In*: TAYLOR, J.; SMITH, R. T. *Bracken Fern: Toxicity, Biology and Control*. Manchester: International Bracken Group Special Publication, n. 4, p. 116-122, 1999.

CAMPO, M. S.; JARRETT, W. F.; BARRON, R.; O'NEIL, B. W.; SMITH, K. T. Association of bovine papillomavirus type 2 and bracken fern with bladder cancer in cattle. *Cancer Research*, v. 52, n. 24, p. 6898-6904, 1992.

CASSIANO, N.M.; BARREIRO, J.C.; MARTINS, L.R.R.; OLIVEIRA, R.V.; CASS, Q.B. Validação em métodos cromatográficos para análises de pequenas moléculas em matrizes biológicas. *Química Nova*, v. 32, n. 4, p. 1021-1030, 2009.

CHIARADIA, M. C., COLLINS, C. H., JARDIM, I. C. S. F., O estado da arte da cromatografia associada à espectrometria de massas acoplada à espectrometria de massas na análise de compostos tóxicos em alimentos. *Química Nova*, v. 31, n. 3, 623-636, 2008.

CLAUSON-KAAS, F.; HANSEN, H.C.B.; STROBEL, B.W. UPLC-MS/MS determination of ptaquiloside and pterosin B in preserved natural water. *Anal Bioanal Chem*, n. 408, p. 7981–7990, 2016.

COLLINS, C. H., Separações em colunas abertas: cromatografia por exclusão e por bioafinidade, *Scientia Chromatographica*, v. 3, n. 2, p.107-114, 2011.

COMPANYÓ, R.; GRANADOS, M.; GUITERAS, J.; et al. Antibiotics in food: legislation and validation of analytical methods. *Anal. Bioanal. Chem.*, v. 395, p. 877-891, 2009.

CRUZ, G. D.; BRACARENSE, A. P. F. R. L. Toxicidade da samambaia (*Pteridium aquilinum* (L.) Kuhn) para a saúde animal e humana. *Semina. Ciências Agrárias*, v. 25, n. 3, p. 249-258, 2004.

DAWRA, R. K.; SHARMA, O. P.; SOMVANSI, R. A preliminary study on the carcinogenicity of the common fern *Onychium contiguum*. *Veterinary Research Communications*, v. 25, n. 5, p. 413-420, 2001.

DE HOFFMANN, E.; STROOBANT, V. Mass Spectrometry Principles and Applications. 3 ed. West Sussex: John Wiley & Sons Ltd, p.489, 2007.

DER, J. P.; THOMSON, J. A.; STRATFORD, J. K.; WOLF, P. G. Global chloroplast phylogeny and biogeography of bracken (*Pteridium*; Dennstaedtiaceae). *American Journal of Botany*, v. 96, n. 5, p. 1041-1049, 2009.

DIAS, H. J., MELO, N. I., CROTTI, A. E. M. Electrospray ionization tandem mass spectrometry as a tool for the structural elucidation and dereplication of natural products: an overview. In: PRASAIN, J. K. *Tandem Mass Spectrometry - Applications and Principles*. Rijeka: InTech, 2012. p.595-600.

DIBAI, W. L. S., Desenvolvimento e validação de método para determinação simultânea de carbadox e olaquinox em ração para aves por cromatografia líquida de alta eficiência com confirmação em espectrometria de massas. Dissertação apresentada à Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais, 49 f., 2012.

- DINIZ, J. M. F.; BASILE, J. R. Intoxicação natural de asininos por *Pteridium aquilinum* (L.) Kühn no Brasil. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v. 36, n. 5, p. 515-522, 1984.
- DÖBEREINER, J.; TOKARNIA, C. H.; CANELLA, C. F. C. Ocorrência de hematúria enzoótica e de carcinomas epidermóides no trato digestivo superior em bovinos no Brasil. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v. 2, n. 1, p. 489-504, 1967.
- DURÃO, J. F. C.; FERREIRA, M. L.; CABRAL, A.; PELETEIRO, M. C.; AFONSO, F.; CORREIA, J. Aspectos anatomopatológicos e clínicos da hematúria enzoótica dos bovinos. *Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias*, v. 5, n. 1, p. 11-20, 1995.
- EKMAN, R.; SILBERRING, J.; WESTMAN-BRINKMALM, A.; KRAJ, A. *Mass Spectrometry: Instrumentation, interpretation and applications*. 3 ed. Jhon Wiley & Sons, p. 388, 2009.
- EURACHEM. *The fitness for purpose of analytical methods: A laboratory guide to method validation and related topics*. Teddington: LGC, 2. ed., p.70, 2014.
- EURACHEM. *The fitness for purpose of analytical methods: A laboratory guide to method validation*. Teddington: LGC, p.62, 1998.
- EVANS, W. C. Effects of bracken rhizomas on the pig. *Journal of Comparative Pathology Therapy*, v. 73, n. 3, p. 229-243, 1963.
- EVANS, W. C. Bracken poisoning of farm animals. *Veterinary Record*, v. 76, n. 13, p. 365-372, 1964.
- EVANS, I. A. Bracken carcinogenicity. In: SEARLE, C. E. *Chemical Carcinogens*. ACS Monograph 182. Washington: American Chemical Society, p. 1171-1204, 1984.
- EVANS, I. A. The carcinogenic, mutagenic and teratogenic toxicity of bracken. In: SMITH, R. T.; TAYLOR, J. A. *Bracken: Ecology, Land Use and Control Technology*. Carnforth: Parthenon Publishing Group, p. 139-146, 1986.
- EVANS, W. C.; EVANS, E. T. R. The effects of the inclusion of bracken (*Pteris aquilina*) in the diet of rats, and the problem of poisoning in farm animals. *British Veterinary Journal*, v. 105, p. 175-186, 1949.
- EVANS, I. A.; MASON, J. Carcinogenic activity of bracken. *Nature*, v. 208, n. 5013, p. 913-914, 1965.
- EVANS, W. C.; EVANS, E. T.; ROBERTS, H. E. Studies on bracken poisoning in the horse. *British Veterinary Journal*, v. 107, n. 9/10, p. 364-371, 399-411, 1951.
- EVANS, W. C.; EVANS, E. T.; HUGHES, L. E. Studies on bracken fern in cattle. Part II. Bracken fern experiments (Lluest farm). *The British Veterinary Journal*, v. 110, p. 365-380, 1954.
- EVANS, W. C., WIDDOP, B.; HARDING, J. D. J. Experimental poisoning by bracken rhizomes in pigs. *Veterinary Record*, v. 90, n. 17, p. 471-475, 1972.

- EVANS, W. C.; EVANS, I. A., HUMPHREYS, D. J., LEWIN, B.; DAVIES, W. E. J. Induction of thiamine deficiency in sheep, with lesions similar to those of cerebrocortical necrosis. *Journal of Comparative Pathology*, v. 85, n. 2, p. 253-267, 1975.
- FENWICK, G. R. Bracken (*Pteridium aquilinum*) - Toxin effects and toxic constituents. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, v. 46, n. 2, p. 147-173, 1988.
- FERNANDES, W. R.; GARCIA, R. C. M.; MEDEIROS, L. M. A.; BIRGEL, E. H. Intoxicação experimental de equinos por *Pteridium aquilinum*. *Arquivos da Escola de Medicina Veterinária da UFBA*, v. 13, n. 1, p. 112-124, 1990.
- FRANÇA, T. N.; TOKARNIA, C. H.; PEIXOTO, P. V. Enfermidades determinadas pelo princípio radiomimético de *Pteridium aquilinum* (Polypodiaceae). *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v. 22, n. 3, p. 85-96, 2002.
- FRANCESCO, B.; GIORGIO, B.; ROSARIO, N.; SAVERIO, R. F.; DE GIOVANNI, F.; ROMANO, M.; ADRIANO S.; CINZIA, R.; ANTONIO, T.; FRANCO, R.; VALERIA, R.; SANTE, R. A new, very sensitive method of assessment of ptaquiloside, the major bracken carcinogen in the milk of farm animals. *Food Chemistry*, v. 124, n. 2, p. 660-665, 2011.
- FREITAS, R. N.; BRASILEIRO-FILHO, G.; SILVA, M. E.; PENA, S. D. Bracken fern induced malignant tumors in rats: absence of mutation in p53, *H-ras* and *K-ras* and no microsatellite instability. *Mutation Research*, v. 499, n. 2, p. 189-196, 2002.
- FREITAS, R. N.; O'CONNOR, P. J.; PRAKASH, A. S.; SHAHIN, M.; POVEY, A. C. Bracken (*Pteridium aquilinum*)-induced DNA adducts in mouse tissues are different from the adduct induced by the activated form of the Bracken carcinogen ptaquiloside. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 281, n. 2, p. 589-594, 2001.
- FURLAN, F.H.; MENDES, E.R.S.; DUCATTI, K.R.; MARCON, G.C.; DOMBROSKY, T.; AMORIM, T.M.; RIET-CORREA, F. Intoxicação aguda por *Pteridium arachnoideum* e *Pteridium caudatum* em bovinos e distribuição das plantas em Mato Grosso. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v.34, n.4, p. 343-348, 2014.
- GABRIEL, A.L. Aspectos epidemiológicos, clínicos e lesões vesicais da intoxicação crônica espontânea por *Pteridium aquilinum* em bovinos. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 104 f., 2008.
- GALLI, A.; Souza, D.; GARBELLINI, G. S.; COUTINHO, C. F. B.; MAZO, L. H.; AVACA L. A.; MACHADO, S. A. S. Utilização de técnicas eletroanalíticas na determinação de pesticidas em alimentos, *Química Nova*, 29, p.105, 2006.
- GAVA, A.; SILVA NEVES, D.; GAVA, D.; MOURA, S. T.; SCHILD, A. L.; RIET-CORREA, F. Bracken fern (*Pteridium aquilinum*) poisoning in cattle in Southern Brazil. *Veterinary and Human Toxicology*, v. 44, n. 6, p. 362-365, 2002.

GIL DA COSTA, R. M.; BASTOS, M. M.; OLIVEIRA, P. A.; LOPES, C. Bracken-associated human and animal health hazards: chemical, biological and pathological evidence. *Journal of Hazardous Materials*, v. 203-204, p. 1-12, 2012.

GLESSON, L. N. Suspected bracken poisoning. *Veterinary Record*, v. 56, n. 41, p. 374-375, 1944.

GOMES, R.C.; FEIJÓ, G.D.F.; CHIARI, L. Evolução e Qualidade da Pecuária Brasileira. Documentos / Embrapa Gado de Corte, ISSN 1517-3747. Campo Grande, MS: Embrapa Gado de Corte, p. 1-4, 2017.

GOMES, J.; MICHEL, A. M.; MICHEL, V.; AMADO, I. F.; ARANHA, P.; OVESEN, R. G.; HASEN, H. C. B.; GARTNER, F.; REIS, C. A.; TOUATI, E. *Pteridium aquilinum* and Its Ptaquiloside Toxin Induce DNA Damage Response in Gastric Epithelial Cells, a Link with Gastric Carcinogenesis. *Toxicological Sciences*, v. 126(1), p. 60–71, 2012.

HAO, C., MARCH, E., CROLEY, T. R., SMITH, J. C., RAFFERTY, S. P., Electrospray ionization tandem mass spectrometric study of salt cluster ions. Part 1- Investigations of alkali metal chloride and sodium salt cluster ions. *Journal of mass spectrometry*, 36, p. 79–96, 2001.

HILKER, D. M.; SOMOGYI, J. C. Antithiamins of plant origin: their chemical nature and mode of action. *Annals of the New York Academy of Sciences*, v. 378, p. 137-145, 1982.

HIRONO, I.; SHIBUYA, C.; SHIMIZU, M.; FUSHIMI, K. Carcinogenic activity of processed bracken used as human food. *Journal of the National Cancer Institute*, v. 48, n. 4, p. 1245-1250, 1972.

HIRONO, I.; FUSHIMI, K.; MATSUBARA, N. Carcinogenicity test of shikimic acid in rats. *Toxicology Letters*, v. 1, n. 1, p. 9-10, 1977.

HIRONO, I.; USHIMARU, Y.; KATO, K.; MORI, H.; SASAOKA, I. Carcinogenicity of boiling water extract of bracken, *Pteridium aquilinum*. *GANN Japanese Journal of Cancer Research*, v. 69, n. 3, p. 383-388, 1978.

HIRONO, I.; AISO, S.; YAMAJI, T.; MORI, H.; YAMADA, K.; NIWA, H.; OJIKAWA, M.; WAKAMATSU, K.; KIGOSHI, H.; NIYAMA, K.; UOSAKI, Y. Carcinogenicity in rat of ptaquiloside isolated from bracken. *GANN Japanese Journal of Cancer Research*, v. 75, n. 10, p. 833-836, 1984.

HIRONO, I.; ITO, M.; YAGYU, S.; HAGA, M.; WAKAMATSU, K.; KISHIKAWA, T.; NISHIKAWA, O.; YAMADA, K.; OJIKAWA, M.; KIGOSHI, H. Reproduction of progressive retinal degeneration (bright blindness) in sheep by administration of ptaquiloside contained in bracken. *Journal of Veterinary Medical Science*, v. 55, n. 6, p. 979-983, 1993.

HOJO-SOUZA, N. S.; CARNEIRO, C. M.; SANTOS, R. C. *Pteridium aquilinum*: o que sabemos e o que ainda falta saber. *Bioscience Journal*, v. 26, n. 5, p. 798-808, 2010.

IARC - International Agency for Research on Cancer, Bracken fern (*Pteridium aquilinum*) and some of its constituents, Some Naturally Occurring and Synthetic food Components, Furocoumarins and Ultraviolet Radiation, IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic

Risks to Humans, vol. 40, supplement 7, International Agency for Research on Cancer, Lyon, p.135, 1986.

IARC - International Agency for Research on Cancer (IARC). Report of an Ad-Hoc IARC Monographs Advisory Group on Priorities for Future Evaluations; IARC Internal Report 03/001. IARC: Lyon, France, p. 11–14, 2003

IBGE 2016 Produção da pecuária municipal / IBGE. - v.1 - Rio de Janeiro: IBGE, 2016.

INMETRO, Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial. 2010. Orientações sobre validação de métodos analíticos. DOQ-CGCRE-008. Revisão: 04, julho/2011, p.20, 2011.

INMETRO, Instituto Nacional de Metrologia. Orientação sobre validação de métodos analíticos. DOQ-CGCRE-008. Revisão: 03, fev/2010, p.20, 2010.

JENSEN, P.H.; JACOBSEN, O.S.; HANSEN, H.C.B.; JUHLER, R. Quantification of ptaquiloside and pterosin B in soil and groundwater using liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.56, n. 21, p. 9848-9854, 2008.

JUBB, K. V. F.; HUXTABLE, C. R. The nervous system: thiamine deficiency. In: JUBB, K. V. F.; KENNEDY, P. C.; PALMER, N. *Pathology of Domestic Animals*. 4. ed. San Diego: Academic Press, 1993. p. 343-344.

KAUFMANN, A.; BUTCHER, P.; MADEN, K.; *et al.* Quantitative multiresidue method for about 100 veterinary drugs in different meat matrices by sub 2- μ m particulate high-performance liquid chromatography coupled to time of flight mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, v. 1194, p. 66-79, 2008.

KENTEN, R. H. The partial purification of properties of a thiaminase from bracken [*Pteridium aquilinum* (L.) Kuhn]. *Biochemical Journal*, v. 67, n. 1, p. 25-33, 1957.

KINSELLA, B.; O'MAHONY, MALONE, E.; MALONEY, M.; *et al.* Current trends in sample preparation for growth promoter and veterinary drug residue analysis. *Journal of Chromatography*, v. 1216, p. 7977-8015, 2009.

LANÇAS, M.F.A Cromatografia líquida moderna e a espectrometria de massas: finalmente "compatíveis"? *Scientia Chromatographica*. v. 1, n. 2, p. 1-29, 2009.

LORIA, A.; PIANTEDOSI, D.; CORTESE, L.; ROPERTO, S.; URRARO, C.; PACIELLO, O.; GUCCIONE, J.; BRITTI, D.; CIARAMELLA, P. Clotting profile in cattle showing chronic enzootic haematuria (CEH) and bladder neoplasms. *Research in Veterinary Science*, v. 93, n. 1, p. 331-335, 2012.

MARTINS, I. Validação analítica. In: MOREAU, R.L.M.; SIQUEIRA, M.E.P.B. (Eds.) *Toxicologia Analítica*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p.20-39, 2008.

- MARTINI-SANTOS, B. J. Aspectos clínicos e patológicos da intoxicação experimental por *Pteridium arachnoideum* (Dennstatiaceae) em equinos. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2010.
- MALDANER, L., JARDIM, I. C. S. F. O estado da arte da cromatografia líquida de ultra eficiência. *Química Nova*, v. 32, n. 1, 214-222, 2009.
- MASUDA, E. K. Patogênese dos carcinomas de células escamosas alimentares associados ao consumo de *Pteridium aquilinum* em bovinos. Tese de Doutorado (Doutorado em Medicina Veterinária), Universidade Federal de Santa Maria, 2010.
- MATUMOTO, P. Y.; ALCÂNTARA, F. C. Estudo comparativo entre técnicas de cromatografia líquida utilizadas para otimização de metodologia analítica de citrato de sildenafil. *Revista Acadêmica Oswaldo Cruz*, ano 1, n.2, p. 1-9, 2014.
- MCKENZIE, R. A. Bovine enzootic haematuria in Queensland. *Australian Veterinary Journal*, v. 54, n. 2, p. 61-64, 1978.
- MICHELOUD, J. F.; COLQUE-CARO, L. A.; MARTINEZ, O.G.; GIMENO, E. J.; RIBEIRO, D. S. F. R.; SOTO-BLANCO, B. Bovine enzootic haematuria from consumption of *Pteris deflexa* and *Pteris plumula* in northwestern Argentina. *Toxicon*, v. 134, p. 26-29, 2017.
- MELLO, G.W.S.; OLIVEIRA, D.M.; CARVALHO, C.J.S.; PIRES, L.V., COSTA, F.A.L.; RIET-CORREA, F.; SILVA, S.M.M. Plantas tóxicas para ruminantes e eqüídeos no Norte Piauiense. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v. 30, n. 1, p. 1-9, 2010.
- MEYER, P. Thiaminase activities and thiamine content of *Pteridium aquilinum*, *Equisetum ramosissimum*, *Malva parviflora*, *Pennisetum clandestinum* and *Medicago sativa*. *Onderstepoort Journal of Veterinary Research*, v. 56, n. 2, p. 145-146, 1989.
- MIELE, G.; COSTI, R.; BONADIES, F.; NICOLETTI, R. Simple synthesis of deuterated pterosines. *Synthetic Communications*, v. 38, n. 10, p. 1553-1559, 2008.
- MOHAMMAD, R. H. Pterosins and Pterosides in Bracken (*Pteridium aquilinum* (L.) Kuhn). Tese apresentada à Escola de Química da Universidade Bangor, Reino Unido, 340 f., 2016.
- MORAES, M. C. B.; LAGO, C. L. Espectrometria de massas com ionização por "electrospray" aplicada ao estudo de espécies inorgânicas e organometálicas. *Química Nova*, v. 26 n. 4, p. 556-563, 2003.
- NAFTALIN, J. M.; CUSHNIE, G. H. The experimental bracken fern poisoning in calves. *Journal Comparative Pathology*, v. 64, n. 1, p. 75-86, 1954.
- NEGRETE, D. M. R. Extracción, identificación, cuantificación de Ptaquilósido en leche de ganado vacuno que pastorea en zonas donde crece *Pteridium arachnoideum*. Tese apresentada à Escola de Química da Universidade Central Del Equador, Equador, 110 f., 2013.
- NIESSEN, W. M. A. Liquid Chromatography – Mass Spectrometry. 3 ed. Nova York: Taylor & Francis Group, p.543, 2006.

NIWA, H.; OJIKI, M.; WAKAMATSU, K.; YAMADA, K.; HIRONO, I., MATSUSHITA, K. Ptaquiloside, a novel norsesquiterpene glucoside from bracken, *Pteridium aquilinum* var. *latiusculum*. *Tetrahedron Letters*, v. 24, n. 38, p. 4117-4120, 1983.

O'DRISCOLL, C.; RAMWELL, C.; HARHEN, B.; MORRISON, L.; CLAUSON-KAAS, F.; HANSEN, H. C. B.; CAMPBELL, G.; SHEAHAN, J.; MISSTEAR, B.; XIAO, L. Ptaquiloside in Irish Bracken Ferns and Receiving Waters, with Implications for Land Managers. *Molecules*, v. 21, n. 543, p. 1-16, 2016.

OELRICHS, P.B.; NG, J.C.; BARTLEY, J. Purification of ptaquiloside, a carcinogen from *Pteridiu, aquilinum*. *Phytochemistry*, v. 40, n. 1, p. 53-56, 1995.

OLIVEIRA, F. A. S.; MELO, M. M. Panorama da análise de resíduos de agrotóxicos em leite, *Eclética Química*, v. 36, n. 4, p. 34-45, 2011.

OLIVEIRA, F. A. S. Validação de um método multirresíduos e multiclasses para determinação e quantificação de 140 resíduos de agrotóxicos em leite através da técnica LC-MS/MS. Dissertação apresentada à Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 142 f., 2011.

OLIVEIRA, P. A.; COLAÇO, A.; CHAVES, R.; GUEDES-PINTO, H.; DE-LA-CRUZ, L. F.; LOPES, C. Chemical carcinogenesis. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, v. 79, n. 4, p. 593-616, 2007.

PACHECO-SILVA, E; SOUZA, J.R.; CALDAS, E.D. Resíduos de medicamentos veterinários em leite e ovos. *Química Nova*, v. 37, n. 1, p. 111-122, 2014.

PAMUKCU, A. M.; YALCINER, S.; HATCHER, J. F.; BRYAN, G. T. Quercetin, a rat intestinal and bladder carcinogen present in bracken fern (*Pteridium aquilinum*). *Cancer Research*, v. 40, n. 10, p. 3468-3472, 1980.

PANTER, K. E. Natural toxins of plant origin. In: DABROWSKI, W. M.; SIKORSKI, Z. E. (Eds.). *Toxins in Food*. Boca Raton: CRC Press, p. 11-63, 2004.

PARKER, W. H.; MCCREA, C.T. Bracken (*Pteris aquilina*) poisoning of sheep in the North York moors. *Veterinary Record*, v. 77, p. 861-866, 1965.

PAVIA, D. L., GARY, M. L., GEORGE, S. K., RANDALL, G. E. *Introduction to Organic Laboratory Techniques : A Microscale Approach*, 4a ed. Pacific Grove: Thomson Brooks/Cole, p. 797-817, 2006.

PASCHOAL, J.A.R.; RATH, S. Validação de métodos cromatográficos para a determinação de resíduos de medicamentos veterinários em alimentos. *Química Nova*, v. 31, p. 1190-1198, 2008.

PATHANIA, S.; KUMAR, P.; SINGH, S.; KHATOON, S.; RAWAT, A. K. S.; PUNETHA, N.; JENSEN, D. J.; LAUREN, D. R.; SOMVANSHI, R. Detection of ptaquiloside and quercetin in certain Indian ferns. *Current Science*, v. 102, n. 12, p. 1683-1691, 2012.

- PEIXOTO, P. V.; FRANÇA, T. N.; BARROS, C. S. L.; TOKARNIA, C. H. Histopathological aspects of bovine enzootic hematuria in Brazil. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v. 23, n. 2, p. 65-81, 2003.
- PESSOA, C.R.M.; MEDEIROS, R.M.T.; RIET-CORREA, F. Importância econômica, epidemiologia e controle das intoxicações por plantas no Brasil. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v.33, n.6, p.752-758, 2013.
- PICHON, V.; Solid-phase extraction for multiresidue analysis of organic contaminants in water. *Journal of Chromatography*, 885, p.195, 2000.
- PINTO, C.; JANUARIO, T.; GERALDES, M.; MACHADO, J.; LAUREN, D.R.; SMITH, B.L.; ROBINSON, R.C. in *Poisonous Plants and Related Toxins*, ed. T. Acamovic, C. S. Stewart and T.W. Pennycott, CABI Publishing, Wallingford, v. 85, p. 564–574, 2004.
- POLACK, E.W. Toxicidade da *Pteridium aquilinum* no Estado do Paraná, Curitiba, 1990. 102 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) - Universidade Federal do Paraná.
- POTTER, D. M.; BAIRD, M. S. Carcinogenic effects of ptaquiloside in bracken fern and related compounds. *British Journal of Cancer*, v. 83, n. 7, p. 914-920, 2000.
- PRADO, J.; WINDISCH, P. G. The genus *Pteris* L. (Pteridaceae) in Brazil. *Boletim do Instituto de Botânica*, v. 13, p. 103-199, 2000.
- PRAKASH, A.S., PEREIRAB, T.N., SMITHG, L., SHAWAN, D.A., SEAWRIGH, A. Mechanism of bracken fern carcinogenesis: evidence for H-ras activation via initial adenine alkylation by ptaquiloside. *Natural Toxins*, v. 4, n. 5, p. 221-227, 1996.
- PRESTES, O. D., ADAIME, M. B., ZANELLA, R. QuEChERS: possibilidades e tendências no preparo de amostra para determinação multirresíduo de pesticidas em alimentos. *Scientia Chromatographica*, v.3, n.1, p. 51-64, 2011.
- RAI, S. K.; SHARMA, R.; KUMARI, A.; RASMUSSEN, L. H.; PATIL, R. D.; BHAR, R. Survey of ferns and clinico-pathological studies on the field cases of Enzootic bovine haematuria in Himachal Pradesh, a north-western Himalayan state of India. *Toxicon*, v. 138, p. 31-36, 2017.
- RASMUSSEN, L.H., JENSEN, L.S., HANSEN, H.C.B. Distribution of the carcinogenic terpene ptaquiloside in bracken fronds, rhizomes (*Pteridium aquilinum*), and litter in Denmark. *J. Chem. Ecol.*, v. 29, n.3, p. 771-778, 2003a.
- RASMUSSEN, L.; KROGHSBO, S.; FRISVAD, J. C.; HANSEN, H.C.B. Occurrence of the carcinogenic Bracken constituent ptaquiloside in fronds, topsoils and organic soil layers in Denmark. *Chemosphere*, v.51, p.117–127, 2003b.
- RASMUSSEN, L.H., LAUREN, D.R., HANSEN, H.C.B. Sorption, degradation and mobility of ptaquiloside, a carcinogenic bracken (*Pteridium sp.*) constituent, in the soil environment. *Chemosphere* 58 (6), 823e835, 2005.

RASMUSSEN, L.H.; LAUREN, D.R.; SMITH, B.L.; HANSEN, H.C.B. Variation in ptaquiloside content in bracken (*Pteridium esculentum* (Forst. f) Cockayne) in New Zealand. *New Zealand Veterinary Journal*, v.56, n.6, p. 304-309, 2008.

RASMUSSEN, L. H.; DONNELLY, E.; STROBEL, B.W.; HOLM, P.E.; HANSEN, H.C.B. Land management of bracken needs to account for bracken carcinogens - A case study from Britain. *Journal of Environmental Management*, v.151, p. 258-266, 2015.

RESENDES, A. R.; ROPERTO, S.; TRAPANI, F.; URRARO, C.; RODRIGUES, A.; ROPERTO, F.; BORZACCHIELLO, G. Association of bovine papillomavirus type 2 (BPV-2) and urinary bladder tumours in cattle from the Azores archipelago. *Research in Veterinary Science*, v. 90, n. 3, p. 526-529, 2011.

RIBANI, M.; BOTTOLI, C. B. G.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F.; MELO, L. F. C. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. *Química Nova*. v. 27, p. 771-780, 2004.

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

RODRÍGUEZ DE LA CRUZ, D.; SÁNCHEZ REYES, E.; SÁNCHEZ SÁNCHEZ, J. Effects of meteorological factors on airborne bracken (*Pteridium aquilinum* (L.) Kuhn.) spores in Salamanca (middle-west Spain). *International Journal of Biometeorology*, v. 53, n. 3, p. 231-237, 2009.

ROSENBERGER, G.; HEESCHEN, W. Adlerfarn (*Pteris aquilina*) - die Ursache des sog. Stallrottes der Rinder (Haematuria vesicalis bovis chronica). *Deutsche Tierärztliche Wochenschrift*, v. 67, n. 8, p. 201-208, 1960.

ROUSSEAC, F.; ROUSSEAC, A. Chemical Analysis Modern Instrumentation Methods and Techniques, University of Le Mans, France, 2007.

RUCKER, R.B., MORRIS, J.G. The vitamins. In: KANEKO, J.J., HARVEY, J.W., BRUSS, M.L. Clinical biochemistry of domestic animals. 5aed. San Diego: Academic Press, 1997. Cap.24, p.703-739.

SAITO, K.; NAGAO, T.; MATOBA, M.; KOYAMA, K.; NATORI, S.; MURAKAMI, T.; SAIKI, Y. Chemical assay of ptaquiloside, the carcinogen of *Pteridium aquilinum*, and the distribution of related compounds in the Pteridaceae. *Phytochemistry*, 28, 1605-1611, 1989.

SANTOS, R. C.; BRASILEIRO, F. G.; SILVA, M. E. Tumorigenicity of boiling water extract of bracken fern (*Pteridium aquilinum* (L.) Kuhn). *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 12, n. 1, p. 72-76, 1992.

SCHULZ, D. F. Avaliação da utilização da Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência acoplada à Espectrometria de Massas de Alta Resolução como ferramenta para análise de alimentos. Tese (Doutorado em Ciências) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Química, Programa de Pós-Graduação em Química, Rio de Janeiro, 179 f., 2014.

SCHWARTSBURD, P. B. Dennstaedtiaceae. In: Jardim Botânico do Rio de Janeiro. *Lista de Espécies da Flora do Brasil*. Rio de Janeiro: Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 2015. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB90941>>.

SHAHIN, M.; SEAWRIGHT, A. A.; SMITH, B. L.; PRAKASH, A. S. Molecular mechanism of bracken carcinogenesis. In: TAYLOR, J. A.; SMITH, R. T. *Bracken Fern: toxicity, biology and control*. Aberystwyth: International Bracken Group (special publication n° 4), p. 91-95, 2000.

SHAHIN, M.; SMITH, B. L.; PRAKASH, A. S. Bracken carcinogens in human diet. *Mutation Research*, v. 443, n. 1/2, p. 69-79, 1999.

SKALSKI, J.; DITTRICH, J. R.; KARACH, G. M.; CARVALHO, J. P. G.; TONIN, V. R.; PATRICIO, M. A. C. Ingestão voluntária de *Marsilea ancylopoda* por equinos em área de pastagem. *Revista Acadêmica Ciência Animal*, v. 14, p. 13-18, 2016.

SMITH, B. L.; EMBLING, P. P.; LAUREN, D. R.; AGNEW, M. P.; ROSS, A. D.; GREENTREE, P. L. Carcinogen in rock fern (*Cheilanthes sieberi*) from New Zealand and Australia. *Australian Veterinary Journal*, v. 66, n. 5, p. 154-155, 1989.

SMITH, B.L.; SEAWRIGHT, A.A.; NG, J.C.; HERTLE, A.T.; THOMSON, J.A.; BOSTOCK, P.D. Concentration of ptaquiloside, a major carcinogen in bracken fern (*Pteridium* spp.), from eastern Australia and from a cultivated worldwide collection held in Sydney, Australia. *Natural Toxins*, v. 2, n.6, p.347–353, 1994.

SOMVANSHI, R.; LAUREN, D.R.; SMITH, B.L.; DAWRA, R.K.; SHARMA, P.P.; SHARMA, V.K.; SINGH, A.K.; GANGWAR, N.K. Estimation of the fern toxin, ptaquiloside, in certain Indian ferns other than bracken. *Current Science*, v. 91, n. 11, p. 1547-1552, 2006.

SOUTO, M. A. M.; KOMMERS, G. D.; BARROS, C. S. L.; PIAZER, J. V. M.; RECH, R. R.; RIET-CORREA, F.; SCHILD, A. L. Neoplasias do trato alimentar superior de bovinos associadas ao consumo espontâneo de samambaia (*Pteridium aquilinum*). *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v. 26, n. 2, p. 112-122, 2006a.

SOUTO, M. A. M.; KOMMERS, G. D.; BARROS, C. S. L.; RECH, R. R.; PIAZER, J. V. M. Neoplasmas da bexiga associados à hematuria enzoótica bovina. *Ciência Rural*, v. 36, n. 5, p. 1647-1650, 2006b.

SUGIMURA, T. Nutrition and dietary carcinogens. *Carcinogenesis*, v.21, n.3, p.387-395, 2000.
SNYDER, L.R., KIRKLAND, J.J. Introduction to Modern Liquid Chromatography (Second Edition), JOHN WILEY & SONS, INC., p.126-166, 1979.

SUNDERMAN, F. M. Bracken poisoning in sheep. *Australian Veterinary Journal*, v. 64, n. 1, p. 25-26, 1987.

SWARTZ, M. HPLC detectors: a brief review. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, 33, p.1130–1150, 2010.

SWARTZ, M. E., KRULL, I. S. Handbook of Analytical Validation, Taylor & Francis Group, p.270-274, 604-607, 2012.

- THOMAS, B.; WALKER, H. F. The inactivation of thiamin by bracken (*Pteris aquilina*). *Journal of the Society of Chemical Industry*, v. 68, n. 1, p. 6-9, 1949.
- THOMSON, J. A. Morphological and genomic diversity in the genus *Pteridium* (Dennstaedtiaceae). *Annals of Botany*, v. 85, supl. B, p. 77-99, 2000.
- THOMPSON, M.; ELLISON, S.L.R.; WOOD, R. Harmonized guidelines for single laboratory validation of methods of analysis. *Pure Applied Chemistry*, v. 74, n. 5, p. 835-855, 2002.
- TOBAR, A.C.; SÁNCHEZ, A.J.; SÁNCHEZ, L.M.; DORVIGNY, P.B.M.; FAZ, E.M. Risk by Human Health for Invasion of *Pteridium arachnoideum*, in Bolívar, Ecuador Ptaquiloside'S Content in Fronds and in Milk. *International Journal of Applied Science and Technology*, v. 4, n. 6, p. 84-94, 2014a.
- TOBAR, A.C.; SÁNCHEZ, L.M.; MANCEBO, B.; MARRERO, E.; CHIRIBOGA, X.; SILVA, J. Residualidad del ptaquilósido en la leche procedente de granjas bovinas em tres cantones de la provincia Bolívar, Ecuador. *Rev. Salud Anim.*, v. 36, n.1, p. 19-27, 2014b.
- TOKARNIA, C. H.; DÖBEREINER, J.; CANELLA, C. F. C. Ocorrência de hematúria enzoótica e de carcinomas epidermóides no trato digestivo superior em bovinos no Brasil II. Estudos complementares. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v. 4, n. 1, p. 209-224, 1969.
- TOKARNIA, C. H.; BRITO, M. F.; BARBOSA, J. D.; PEIXOTO, P. V.; DÖBEREINER, J. *Plantas Tóxicas do Brasil*. 2ª ed. Rio de Janeiro: Editora Helianthus, p. 566, 2012.
- TOKARNIA, C. H.; DÖBEREINER, J.; PEIXOTO, P. V. Poisonous plants affecting livestock in Brazil. *Toxicon*, v. 40, n. 12, p. 1635-1660, 2002.
- TOURCHI-ROUDSARI, M. Multiple effects of bracken fern under in vivo and in vitro conditions. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, v. 15, n. 18, p. 7505-7513, 2014.
- TRYON, R. M. A revision of the genus *Pteridium*. *Rhodora*, v. 43, p. 1-31, 37-67, 1941.
- TRYON, R. M.; TRYON, A. F. *Fern and Allied Plants, with special reference to tropical America*. New York: Springer Verlag, 1982.
- VALLI, V. E. O. Hematopoietic system. In: MAXIE, M. G. *Jubb, Kennedy, and Palmer's - Pathology of Domestic Animals*. 5 ed. Philadelphia: Elsevier, 2007. v. 3, p. 107-324.
- VAN DER HOEVEN, J. C. M.; LAGERWEIJ, W. J.; POSTHUMUS, M. A.; VAN VELDHUIZEN, A.; HOLTERMAN, H. A. J. Aquilide A, a new mutagen compound isolated from bracken fern (*Pteridium aquilinum* L. Kuhn). *Carcinogenesis*, Oxford, v. 4, n. 12, p. 1587-1590, 1983.
- VIRGILIO, A.; SINISI, A.; RUSSO, V.; GERARDO, S.; SANTORO, A.; GALEONE, A.; TAGLIALATELA-SCAFATI, O.; ROPERTO, F. Ptaquiloside, the major carcinogen of bracken fern, in the pooled raw milk of healthy sheep and goats: an underestimated, global concern of food safety. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 63, n. 19, p. 4886-4892, 2015.

WATSON, W. A.; BARNETT, K. C.; TERLECKI, S. Progressive retinal degeneration (Bright blindness) in sheep: a review. *Veterinary Record*, v. 91, n. 27, p. 665-670, 1972.

WATSON, W. A.; BARLOW, R. M.; BARNETT, K. C. Bright blindness, a condition prevalent in Yorkshire hill sheep. *Veterinary Record*, v. 77, n. 37, p. 1060-1069, 1965.

VETTER, J. A biological hazard of our age: Bracken fern [*Pteridium aquilinum* (L.) Kuhn] – A review. *Acta Veterinaria Hungarica*, v. 57, n. 1, p. 183-196, 2009.

VIRGILIO, A.; SINISI, A.; RUSSO, V.; GERARDO, S.; SANTORO, A.; GALEONE, A.; TAGLIALATELA-SCAFATI, O.; ROPERTO, F. Ptaquiloside, the Major Carcinogen of Bracken Fern, in the Pooled Raw Milk of Healthy Sheep and Goats: An Underestimated, Global Concern of Food Safety. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 63, p. 4886-4892, 2015.

YAMADA, K.; OJIKI, M.; KIGOSHI, H. Ptaquiloside, the major toxin of bracken, and related terpene glycosides: chemistry, biology and ecology. *Natural Products Report*, v. 24, n. 4, p. 798-813, 2007.

YAMANE, O.; HAYASHI, T.; SAKU, S. Studies on blood coagulation disorders in domestic animals. Thrombelastograms of normal cattle and cattle affected with bracken poisoning. *Japanese Journal of Veterinary Science*, v. 37, n. 6, p. 577- 583, 1975.

YANEZ, A.; MARQUEZ, G. J.; MORBELLI, M. A. Palynological analysis of Dennstaedtiaceae taxa from the paranaense phytogeographic province that produce trilete spores II: *Microlepidia speluncae* and *Pteridium arachnoideum*. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, v. 88, n. 2, p.877-890, 2016.

ZACCONE, C.; CAVOSKI, I.; COSTI, R.; SARAIS, G.; CABONI, P.; TRAVERSA, A.; MIANO, T.M. Ptaquiloside in *Pteridium aquilinum* subsp. *aquilinum* and corresponding soils from the South of Italy: influence of physical and chemical features of soils on its occurrence. *Science of the Total Environment*, v. 496, p. 365-372, 2014.

9. ANEXOS

Anexo 1.

MICHELOUD, J. F.; COLQUE-CARO, L. A.; MARTINEZ, O.G.; GIMENO, E. J.; **RIBEIRO, D. S. F. R.**; SOTO-BLANCO, B. Bovine enzootic haematuria from consumption of *Pteris deflexa* and *Pteris plumula* in northwestern Argentina. *Toxicon*, v. 134, p. 26-29, 2017.