

UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ
DEPARTAMENTO ACADÊMICO DE QUÍMICA E BIOLOGIA
BACHARELADO EM QUÍMICA

LANA ANDRESSA TOTH FERNANDES

**EXTRAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DO BRODIFACOUM EM
RATICIDA COMERCIAL**

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

CURITIBA

2015

LANA ANDRESSA TOTH FERNANDES

**EXTRAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DO BRODIFACOUM EM
RATICIDA COMERCIAL**

Trabalho de Conclusão de Curso de graduação do Curso Superior de Química da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Câmpus Curitiba, como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel em Química.

Orientador: Prof. Edson Luiz Seibert

Co-orientadora: Mariana Ulysea

CURITIBA

2015

LANA ANDRESSA TOTH FERNANDES

**EXTRAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DO BRODIFACOUM EM
RATICIDA COMERCIAL**

Trabalho de Conclusão de Curso **aprovado** como requisito parcial à obtenção do grau de BACHAREL EM QUÍMICA pelo Departamento Acadêmico de Química e Biologia (DAQBI), do Câmpus Curitiba, da Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR), pela seguinte banca examinadora:

Membro 1 – Prof. Dr. Marcus Vinícius de Liz
Departamento Acadêmico de Química e Biologia (UTFPR)

Membro 2 – Profa. Dra. Cristiane Pilissão
Departamento Acadêmico de Química e Biologia (UTFPR)

Orientador – Prof. Dr. Edson Luiz Seibert
Departamento Acadêmico de Química e Biologia (UTFPR)

Coordenadora de Curso – Profa. Dra. Danielle Caroline Schnitzler

Curitiba, 03 de dezembro de 2015

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, gostaria de agradecer a Deus por ter me dado forças para superar os desafios e obstáculos no caminho até aqui.

Agradeço aos professores Marcus Liz e Cristiane Pilissão que me deram uma direção e me ajudaram a melhorar a qualidade do meu trabalho.

Ao meu orientador Edson Luiz Seibert por ter aceitado me orientar, se pondo a disposição para o que eu precisasse.

À minha coorientadora Mariana Ulyssea do Instituto de Criminalística do Paraná e ao Dr. José Escorsin Neto do Instituto Médico-Legal que me receberam tão bem e confiaram em mim. Sei que eles estavam tão ansiosos quanto eu pra que tudo desse certo.

Aos meus amigos que me apoiaram, especialmente ao Uriel Andreazza que me ajudou tanto no começo do projeto a saber como expressar melhor minhas ideias e a Camila Ribeiro Lemos por sua preocupação comigo e simplesmente estar lá por mim.

À minha família que acreditou em mim e não duvidou nenhum momento que eu iria conseguir. E gostaria de expressar a minha profunda gratidão pelo meu namorado Elcio Lipi Borges que esteve do meu lado quando as coisas andavam difíceis, me deu forças pra continuar e me ajudou no que pôde. Agradeço muito seu apoio, suas orações e sua compreensão pelas vezes que me ausentei.

E obrigada a todos que de alguma maneira tornaram este trabalho possível.

“Failure is only the opportunity more
intelligently to begin again.”
(Henry Ford, 1922)

“O insucesso é apenas uma
oportunidade para recomeçar de novo
com mais inteligência.”
(Henry Ford, 1922)

RESUMO

FERNANDES, Lana A. T. **Extração e caracterização do brodifacoum em raticida comercial**. 2015. 40 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) – Curso Superior de Química, Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Curitiba, 2015.

Pedaços e farelos dos pellets de raticidas comercializados chegam ao laboratório do instituto de criminalística do Paraná tirados de alimentos como café e chá. Portanto, métodos de determinação dos seus princípios ativos, que são principalmente derivados cumarínicos, são indispensáveis em investigações forenses. Porém, os produtos comercializados apresentam uma baixa concentração desses compostos em sua composição o que torna sua análise difícil. Desta forma, o objetivo deste trabalho foi desenvolver um método para extrair o cumarínico brodifacoum de amostras comerciais e determina-lo através de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) com detector de arranjo de diodos (DAD). A extração foi feita na Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR) sede Ecoville e o restante da análise no laboratório de ciências químicas e biológicas do instituto médico-legal (IML) de Curitiba. Foi apresentada uma metodologia para determinação do brodifacoum em iscas peletizadas do raticida comercial que requer menos de 10 mg de amostra. O método para extração envolve banho de ultrassom e análise por CLAE-DAD. Foi possível determinar o composto sem precisar de extensas etapas de limpeza. Foram estimados limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) em 0,153 e 0,510 mg L⁻¹ respectivamente e recuperação de 51, 61 e 62% para 3 diferentes marcas de raticida.

Palavras-chave: Extração. Raticidas. Brodifacoum. Cromatografia líquida de alta eficiência. Detector de arranjo de diodos.

ABSTRACT

FERNANDES, Lana A. T. **Extraction and characterization of brodifacoum in commercial rodenticide**. 2015. 40 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) – Curso Superior de Química, Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Curitiba, 2015.

Many pieces and crumbles of wheat-based commercial rodenticides arrive at Paraná's criminal institute laboratory being extracted from liquids such as coffee and tea. Therefore, it is essential the use of analysis methods to determine the existence of their active ingredients, mainly consisted of coumarin derivatives, in forensic investigations; however, the products sold contain low levels of these compounds which makes the analysis difficult. The objective of this report was to develop an extraction method capable to extract the brodifacoum coumarin from commercial samples and determine it by high-performance liquid chromatography (HPLC) with a diode array detector (DAD). The extraction was done at Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR) Ecoville campus and the rest of the analysis was done at the city medical examiner's office laboratory. A brodifacoum determination method was introduced to analyze wheat-based commercial rodenticide that requires samples of less than 10 mg. The method of extraction involves sonicating the sample and analyzing by HPLC-DAD. Through this method, it was possible to extract the compound without an extensive sample clean up. The estimated limits of detection (LOD) and quantification (LOQ) were 0,153 and 0,510 mg L⁻¹ respectively and the recoveries were 51, 61 and 62% for three different commercial brands.

Keywords: Extraction. Rodenticides. Brodifacoum. High-performance liquid chromatography. Diode array detector.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Derivados da 4-hidroxicumarina.....	18
Figura 2 - Estrutura do brodifacoum	19
Figura 3 - Estrutura do brodifacoum com numeração dos átomos	20
Figura 4 - Gráfico 3D do padrão de brodifacoum (10 mg L^{-1}) obtido por DAD com varredura entre 190 a 400 nm	27
Figura 5 - Cromatograma da injeção de 35 μL do padrão por DAD no comprimento de onda de 266 nm.	27
Figura 6 - Espectro de absorção ($t_R = 20,7 \text{ min}$) para o isômero 1 obtido por DAD com varredura entre 190 a 400 nm	28
Figura 7 - Gráficos 3D dos extratos das marcas X, Y e Z obtidos por DAD com varredura entre 190 a 400 nm	29
Figura 8 - Cromatogramas da injeção de 35 μL dos extratos das marca X, Y e Z por DAD no comprimento de onda de 267 nm.	30
Figura 9 - Espectros de absorção para o isômero 1 ($t_R = 20,68 \text{ min}$) e isômero 2 ($t_R = 22,04 \text{ min}$) da marca X obtido por DAD com varredura entre 190 a 400 nm.....	31
Figura 10 - Curva de calibração do isômero 1	32
Figura 11 - Curva de calibração do isômero 2.....	33

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Valores de LD ₅₀ para os diastereoisômeros do brodifacoum.....	20
Tabela 2 - Massas pesadas dos pellets (Massa P), massas teóricas injetadas de brodifacoum (Massa B) e concentração final teórica de brodifacoum (Concentração B) para X, Y e Z.....	26
Tabela 3 - Áreas dos picos para a terceira amostra de cada marca.....	29
Tabela 4 - Concentrações dos isômeros para confecção das curvas de calibração.....	32
Tabela 5 - Concentração detectada do brodifacoum e porcentagens dos isômeros 1 e 2 para as amostras X, Y e Z.....	34
Tabela 6 - Recuperação do brodifacoum de raticidas comerciais contendo 50 µg g ⁻¹	35

LISTA DE SIGLAS

CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
DAD	Detector de arranjo de diodos
ICI	Chemicals Incorporated
ICP	Instituto de Criminalística do Paraná
IML	Instituto Médico-Legal
LD ₅₀	Dose letal mediana
LD	Limite de detecção
LQ	Limite de quantificação

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	14
2.1 RATOS E DOENÇAS	15
2.2 RATICIDAS	16
2.2.1 Histórico.....	16
2.2.2 Anticoagulantes	17
2.3 RATICIDAS CUMARÍNICOS	17
2.3.1 Brodifacoum	18
2.4 DETERMINAÇÃO DO BRODIFACOUM EM ISCAS.....	21
2.4.1 Revisão dos Métodos	21
3 METODOLOGIA	24
3.1 PREPARAÇÃO E EXTRAÇÃO.....	24
3.2 ANÁLISE POR CLAE	24
3.3 PADRÃO	25
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	26
4.1 CONCENTRAÇÃO TEÓRICA DO BRODIFACOUM	26
4.2 DETECÇÃO.....	27
4.3 CURVA DE CALIBRAÇÃO	32
4.4 DETERMINAÇÃO DO BRODIFACOUM.....	34
5 CONCLUSÃO	37
6 REFERÊNCIAS	38

1 INTRODUÇÃO

A população de roedores, como ratos e camundongos, em áreas urbanas é um problema devido às doenças que esses animais podem transmitir. Uma delas é a leptospirose, zoonose mais propagada no mundo, causada pela bactéria leptospiras que é transmitida, normalmente, pela urina dos ratos (DESVARIS; CARDINALE; MICHAULT, 2011). Por esse motivo a população de roedores deve ser controlada e isso pode ser feito reduzindo o acesso desses animais ao abrigo e alimento. Porém só isso não é suficiente e se faz necessário o uso de venenos, neste caso os raticidas ou rodenticidas. Para que o roedor ingira esse composto este precisa estar em forma de uma isca que seja atrativa para o animal. Essas iscas devem conter uma dose mínima de raticida para que esta não seja percebida pelo alvo, assim como a forma da morte não deve causar nenhuma dúvida da parte dos indivíduos que ainda sobrevivem. O problema é que um composto que seja tóxico para um roedor eventualmente será tóxico para humanos (PELFRENE; KRIEGER; KRIEGER, 2001).

Os compostos inorgânicos, tais como o arsênio e o fósforo, ainda são úteis para o controle de roedores em algumas áreas, mas seu uso amplo não é mais utilizado devido ao alto índice de morte de não alvos por envenenamento, em razão de serem extremamente tóxicos. Em vez disso, são utilizados os raticidas anticoagulantes, compostos orgânicos, que oferecem mais segurança. (PELFRENE; KRIEGER; KRIEGER, 2001).

Os raticidas anticoagulantes mais comuns são os derivados da hidroxicumarina e os derivados da indandiona. Eles são divididos em compostos de primeira geração, como a varfarina e a clorofacinona, e de segunda geração, como o brodifacoum e a bromadiolona. Esses últimos são mais tóxicos, encontram-se em baixas concentrações nas iscas e uma única ingestão desta é suficientemente letal para animais. Já os compostos de primeira geração precisam estar em concentrações maiores nas iscas e serem ingeridas em mais de uma dose (GALLOCCCHIO *et al.*, 2014). A dose letal para ratos varia de 0,24 mg para brodifacoum até 1,8 mg para difenacoum por kg de massa corporal enquanto que para a varfarina varia de 50 a 100 mg kg⁻¹ (HAO *et al.*, 2014).

Rodenticidas foram feitos para matar roedores, porém eles não são prejudiciais apenas para esses animais. Esses compostos podem ser letais para

humanos e animais domésticos. Com a crescente incidência de casos, seja por acidente ou em caráter intencional, nos quais houve exposição de não alvos por esse tipo de composto em alimentos e bebidas, analisar uma alternativa viável para a extração do raticida com base em cumarína se faz necessária na realidade do Instituto de Criminalística do Paraná (ICP). O fato de haver uma disponibilidade comercial considerável desse tipo de produto, o qual pode ser adquirido em muitos estabelecimentos, é uma das justificativas de os derivados cumarínicos estarem entre os venenos mais utilizados em casos de homicídio ou tentativa de homicídio.

O Laboratório de Ciências Químicas e Biológicas do instituto vem recebendo amostras alimentícias contaminadas com um farelo que baseado em características de aparência e cor, e devido a sua insolubilidade em água, suspeita-se que seja farelo da isca peletizada do raticida contendo brodifacoum vendido comercialmente. Para que essa suspeita possa ser confirmada deve se ter desenvolvido um método de extração e determinação do anticoagulante no pellet do veneno.

Dois fatores principais tornam a extração de derivados cumarínicos em pellets comerciais algo complicado: a baixa concentração do princípio ativo e o veículo comumente utilizado (farelo de cereais como trigo, soja, milho e arroz). Portanto um método de extração eficiente traria grandes benefícios para o instituto de criminalística, visto que poderiam tratar esses casos, que hoje se apresentam em grande quantidade comparada com outros venenos, de maneira eficiente.

Portanto, neste trabalho foi apresentada uma metodologia para a determinação do brodifacoum em iscas peletizadas de raticidas de três marcas que foram chamadas de marcas X, Y e Z. Nesse método uma pequena quantidade das iscas rosa, amarela e azul são extraídas com um baixo volume de uma mistura de ácido metanoico e metanol sem qualquer etapa de limpeza.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo deste trabalho foi desenvolver uma metodologia de extração do anticoagulante brodifacoum nos pellets de raticidas comerciais e determina-lo por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) com detector de arranjo de diodos (DAD).

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Extrair o brodifacoum dos pellets comerciais de 3 marcas;
- Obter uma porcentagem de recuperação do cumarínico acima de 50%;
- Método envolvendo baixa quantidade de amostra e reagentes e sem etapa de limpeza;
- Metodologia viável de ser utilizada pelo Instituto de Criminalística (IC).

3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

3.1 RATOS E DOENÇAS

N.G. Gratz, antigo membro da Organização Mundial de Saúde, publicou uma lista de cinquenta e cinco doenças infecciosas derivadas direta ou indiretamente de roedores. Uma delas é a famosa peste negra, assim chamada por causa das manchas escuras que aparecem na pele. Outra é a leptospirose ou doença de Weil. Durante a guerra do Vietnã, nos anos 1960 e 70, foi a principal causa de febre aguda entre os soldados americanos. É considerada a mais prevalente das doenças transmitidas por roedores (BARNETT, 2002).

A leptospirose, zoonose bacteriana mais comum, é um problema de saúde pública de nível global. Os organismos causadores dessa doença são bactérias do gênero *Leptospira* pertencentes ao filo das Spirochaetas (KO; GOARANT; PICARDEAU, 2009). Possuem aproximadamente 0,1 mm de diâmetro e de 6 a 20 mm de comprimento (DESVARS; CARDINALE; MICHAULT, 2011). Há oito espécies patogênicas que são excretadas na urina de espécies de mamíferos que servem como reservatórios. Esses patógenos são mantidos em ambientes silvestres e domésticos pela transmissão entre espécies de roedores. Nesses animais reservatórios, ou também chamados de hospedeiros primários ou de manutenção, a infecção é assintomática (KO; GOARANT; PICARDEAU, 2009).

A leptospirose é transmitida para os seres humanos pelo contato direto com esses animais ou pela exposição à água e ao solo contaminado. As leptospiras penetram na pele machucada ou nas mucosas, entram na corrente sanguínea e se espalham pelo corpo levando a infecção que pode causar manifestações graves como insuficiência renal aguda e síndrome de hemorragia pulmonar. Os seres humanos são hospedeiros acidentais e não servem como reservatórios para transmissão (KO; GOARANT; PICARDEAU, 2009).

Um dos valores mais elevados de infecção de roedores foi relatado no Colorado, EUA, onde 66 por cento dos ratos selvagens noruegueses foram infectados com *Leptospira interrogans*. Entre os roedores que vivem em estado selvagem a infecção é mantida sem intervenção humana e, muitas vezes parece ser inofensivo. O problema é um exemplo típico das funções da saúde pública: a

prevenção requer se livrar de ratos, melhorar a higiene entre outras precauções óbvias. No entanto, essas medidas nem sempre foram óbvias: no ano de 2000, no leste da Tailândia, durante uma epidemia alarmante de leptospirose, os cidadãos ameaçados foram encorajados a pegar e comer os portadores (provavelmente ratos-toupeira ou ratos pretos). Os métodos de captura de roedores, e receitas para cozinha-los, foram emitidos pelas autoridades (BARNETT, 2002).

3.2 RATICIDAS

Os raticidas, também chamados de rodenticidas, são usados para matar ratos, toupeiras e outros pequenos animais. Na maioria deles são adicionadas iscas que são desagradáveis para o homem. Os rodenticidas podem ser classificados em compostos inorgânicos, onde estão incluídos o arsênio, o tálio, o fósforo, o carbonato de bário e o fosfeto de zinco, e compostos orgânicos, incluindo fluoroacetato de sódio, alfa-naftil-tioureia, anticoagulantes, e estriçnina (MEULENBELT; DESCOTES, 1996).

3.2.1 Histórico

Na década de 40, uma pequena empresa farmacêutica britânica sugeriu que dicumarol poderia ter propriedades rodenticidas. Ensaio confirmaram a ideia e começou a era dos raticidas anticoagulantes. A varfarina foi o primeiro raticida anticoagulante introduzido no mercado logo após a Segunda Guerra Mundial e se tornou amplamente utilizado em muitos países. Outros compostos anticoagulantes com uma potência semelhante à da varfarina foram também sintetizados. Estes raticidas anticoagulantes primeiramente têm sido muitas vezes chamados de "raticidas anticoagulantes de primeira geração." Estes compostos de primeira geração geralmente têm toxicidade moderada, mas muitas vezes é necessária a exposição contínua à isca para o controle de roedores (MURPHY; GUPTA, 2007).

3.2.2 Anticoagulantes

Os derivados da 4-hidroxicumarina e da indandiona são os constituintes ativos dos raticidas anticoagulantes. Estes são classificados ou como anticoagulantes de primeira geração como a clorofacinona, o cumatetralil e a varfarina ou como anticoagulantes de segunda geração como o brodifacoum, a bromadiolona, o difenacoum, a difetialona e a flocumafena (VANDENBROUCKE *et al.*, 2008).

Os compostos de primeira geração exibem uma toxicidade moderada para roedores e precisa de uma exposição repetida à isca para exercer um efeito letal, além disso, devido à sua meia-vida relativamente curta no sangue e no fígado, e uma capacidade de bioacumulação inferior, uma resistência generalizada foi desenvolvida para os anticoagulantes de primeira geração. Por conseguinte, raticidas anticoagulantes de segunda geração foram desenvolvidos com aumento da toxicidade e maior bioacumulação. No entanto, a sua meia-vida é longa e a persistência nos tecidos dos animais é elevada e constitui um grande risco de intoxicação crônica secundária de animais selvagens (SHIMSHONI *et al.*, 2013).

O anticoagulante de segunda geração brodifacoum tem uma potência cerca de 200 vezes maior e um tempo de meia-vida de 10 a 20 vezes maior do que a do anticoagulante de primeira geração varfarina, que é de 2 a 5 dias (MEULENBELT; DESCOTES, 1996).

3.3 RATICIDAS CUMARÍNICOS

O grupo das hidroxicumarinas tem um anel de 4-hidroxicumarina com diferentes substituintes na cadeia lateral, na posição 3 (Figura 1). Rodenticidas anticoagulantes comumente usados neste grupo são bromadiolona, brodifacoum, coumafuril, cumatetralil, difenacoum e varfarina (MURPHY; GUPTA, 2007).

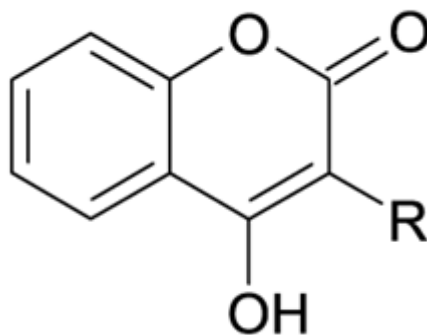


Figura 1 - Derivados da 4-hidroxycumarina
 Fonte: GALLOCCHIO *et al.* (2014, p. 64)

Compostos anticoagulantes quebram o ciclo da vitamina K bloqueando a enzima vitamina K 2,3-epoxi redutase e também a enzima vitamina K redutase (ANDRE *et al.*, 2005). Conseqüentemente, os derivados cumarínicos reduzem a taxa da síntese dos fatores de coagulação dependentes da vitamina K, fator II (Protrombina), VII, IX e X e seus níveis no plasma diminuem. Essa redução torna o processo de coagulação deficiente e aumenta a tendência de sangramentos que será mais grave quanto maior for a inibição na síntese dos fatores de coagulação no fígado (VAN SITTERT; TUINMAN, 1994).

Após sua absorção, cada molécula de vitamina K pode ser utilizada apenas uma vez de modo que seu fornecimento endógeno é rapidamente esgotado. São necessárias, então, doses bastante elevadas da vitamina K para assegurar a carboxilação normal dos fatores de coagulação (CRACIUN *et al.*, 1998). Os efeitos de anticoagulantes de segunda geração podem persistir por mais de 2 anos devido a sua longa meia-vida biológica (VAN SITTERT; TUINMAN, 1994).

3.3.1 Brodifacoum

O 3-[3'-(4'''-Bromobifenil-4''-il)-1',2',3',4'-tetrahidro-1'-naftil]-4-hidroxycumarina (brodifacoum) é um ingrediente comumente usado em raticidas e possui uma dose letal (DL_{50}), de 3 mg kg^{-1} para ratos (MESMER; SATZGER, 1995). Ele é formulado em iscas prontas de baixa concentração (20 a 50 mg/kg), tem fórmula empírica $C_{31}H_{23}BrO_3$ e peso molecular 523,4. Uma única ingestão é geralmente suficiente para matar (PELFRENE; KRIEGER; KRIEGER, 2001). A sua estrutura encontra-se na Figura 2.

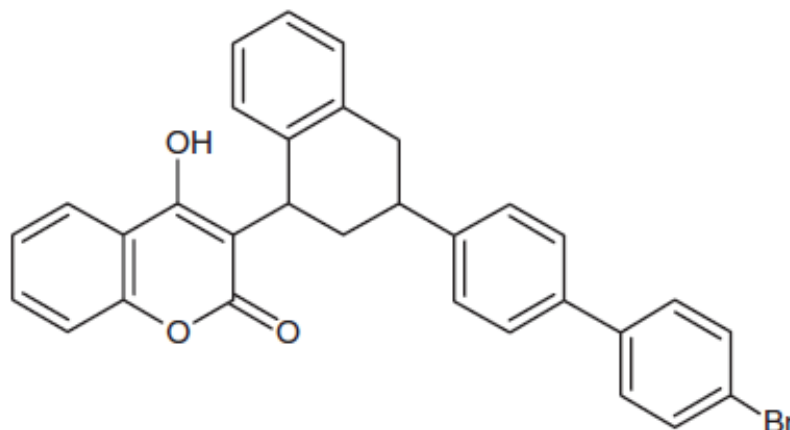


Figura 2 - Estrutura do brodifacoum
Fonte: MURPHY e GUPTA (2007, p. 527)

Brodifacoum é um dos anticoagulantes mais recentes e o mais potente da segunda geração de rodenticidas. Foi introduzido em 1977 por Sorex Ltd. de Londres, e em seguida, desenvolvido pela Chemicals Incorporated (ICI), Divisão de Proteção de Plantas Imperial. Ele tem sido comercializado em vários países para o controle de uma vasta gama de espécies de pragas de roedores. Está disponível em pellets com 0,005% para o controle do rato de casa, em pellets com menos de 0,001% para o controle de roedores de campo, e em blocos de cera com 29 g para o controle de rato de esgoto. É o único raticida anticoagulante encontrado capaz de produzir 100% de mortalidade na maioria das espécies de roedores, após uma dose única em 24 h (MURPHY; GUPTA, 2007).

Brodifacoum é um pó esbranquiçado para castanho claro, tem solubilidade muito baixa em água, é ligeiramente solúvel em álcoois e benzeno e é solúvel em acetona (PELFRENE; KRIEGER; KRIEGER, 2001). É muito estável a temperatura ambiente e não possui nenhuma perda após 30 dias de exposição à luz solar direta (MURPHY; GUPTA, 2007).

Brodifacoum é um composto orgânico com duas formas diastereoisômeras. Os carbonos 1' e 3' (Figura 3) são centros estereogênicos, portanto há quatro estereoisômeros: Um par de enantiômeros onde as configurações nos carbonos 1' e 3' são ambas R ou ambas S e os substituintes nessa posição no anel do tetrahidronaftaleno (tetralina) são *trans* em relação ao outro, e outro par de enantiômeros onde a configuração nos carbonos 1' e 3' são R e S, ou vice e versa, e

os substituintes são *cis* em relação ao outro. Os estereoisômeros *trans* e *cis* são diastereoisômeros e tem diferentes propriedades físicas e químicas. O brodifacoum é sintetizado como uma mistura desses diastereoisômeros (CORT; ALPERIN; CHO, 2012). Testes de toxicidade em ratos feitos por VAN HEERDEN, BEZUIDENHOUDT, e FERREIRA (1997) mostraram que os quatro isômeros exibem valores de dose letal mediana (LD₅₀) semelhantes (Tabela 1).

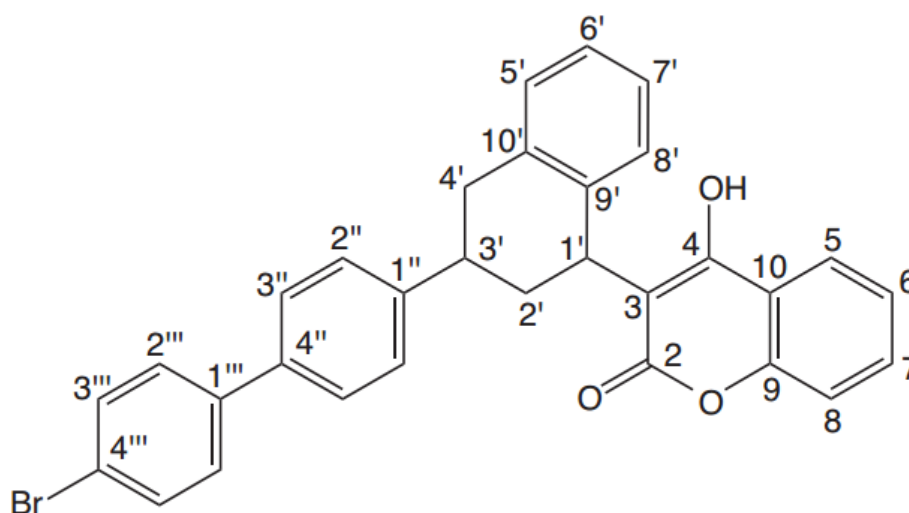


Figura 3 – Estrutura do brodifacoum com numeração dos átomos
Fonte: CORT, ALPERIN e CHO (2012, p. 179)

Tabela 1 – Valores de LD₅₀ para os diastereoisômeros do brodifacoum

	Isômero do brodifacoum	LD ₅₀ (mg L ⁻¹)
<i>Trans</i>	1'R, 3'R	0,5 – 0,8
	1'S, 3'S	0,4 – 0,9
<i>Cis</i>	1'S, 3'R	0,4 – 0,9
	1'R, 3'S	0,5 – 0,8

Fonte: VAN HEERDEN, BEZUIDENHOUDT e FERREIRA (1997, p. 6050)

3.4 DETERMINAÇÃO DO BRODIFACOU M EM ISCAS

3.4.1 Revisão dos Métodos

YUEN (1978) descreveu um método específico para análises de iscas de 0,005% de brodifacou m e também difenacou m com menos de 10% de erro. O método envolve 50 g, da amostra macerada, em 250 mL de uma mistura 50:1 de metanol e ácido fórmico e uma etapa de limpeza por cromatografia em coluna de Florisil - sílica gel. A determinação dos raticidas foi feita por cromatografia líquida de fase reversa com detector de ultravioleta fixado em 254 nm. 1,3,5-trifenilbenzeno foi usado como padrão interno e a fase móvel foi composta por uma mistura 90:10:0,8 de metanol, água e ácido acético glacial. Difenacou m e brodifacou m não puderam ser determinados satisfatoriamente por cromatografia gasosa devido à pronunciada degradação térmica deles na coluna cromatográfica.

A principal desvantagem do método de YUEN (1978) é a complexa e demorada extração e etapa de limpeza. Então, PEREZ (1982) desenvolveu um método para análise de rotina do brodifacou m em iscas com base de trigo. O método envolve a extração do brodifacou m do trigo por soxhlet com metanol seguido de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) de fase reversa com detector de ultravioleta fixado em 260 nm. O método, que evita qualquer etapa de limpeza, permitiu uma recuperação média de 98,8% para iscas contendo de 5 a 7 ppm de brodifacou m.

No entanto, os métodos acima exigem uma quantidade muito grande de amostra (50 g) e de solvente (250 mL) de modo que MESMER e SATZGER (1995) descreveram um método simples para a determinação de brodifacou m em iscas com base de trigo envolvendo 50 mg de amostra sonicada em 2 mL de uma mistura de 2% v/v de ácido fórmico em metanol por 15 min e analisada por CLAE com detector de fluorescência com comprimentos de onda de excitação e emissão fixados em 210 nm e 396 nm respectivamente. O limite de detecção estimado foi de 4 pg de brodifacou m, permitindo o uso da metodologia para quantidades tão pequenas quanto 2 mg de amostra. A recuperação foi de 86 e 99% para duas diferentes marcas de raticida. A seletiva e sensível natureza do detector de fluorescência faz com que seja possível determinar o brodifacou m sem uma extensiva etapa de limpeza e pré-concentração (MESMER; SATZGER, 1995).

Recentemente, como os métodos analíticos até então não apresentavam uma validação completa para todos os anticoagulantes que causavam envenenamento, ARMENTANO *et al.* (2012) validaram e aplicaram um método para a determinação simultânea de 8 raticidas anticoagulantes, incluindo o brodifacoum, em iscas e também em fígados de animais usando CLAE com detector de fluorescência com comprimentos de onda de excitação e emissão fixados em 310 nm e 390 nm respectivamente. O método, com um mínimo de mudanças, para o procedimento de extração usado foi previamente descrito por BROWN *et al.* (1996) para amostras de tecidos do fígado, e a separação cromatográfica foi otimizada para a detecção dos 8 raticidas anticoagulantes. Foi obtida uma linearidade (R^2) de 0,992 e uma recuperação de 109.1% para o brodifacoum considerando 18 experimentos.

Em razão do aumento no número de amostras sendo enviadas para ensaios toxicológicos na Itália, GALLOCCHIO *et al.* (2014) desenvolveram um método qualitativo para identificar 11 raticidas anticoagulantes, entre eles o brodifacoum, por CLAE com detector de arranjo de diodos, realizada nos comprimentos de onda 260, 265, 280, 286, 330 nm, e fluorescência apenas para os derivados da hidroxicumarina fixados nos comprimentos de onda de excitação e emissão de 263 nm e 398 nm respectivamente. Para isso, no período de 2012-2013 561 amostras suspeitas diferentes, variando de iscas, fígados e conteúdos estomacais, foram coletadas do Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie (Laboratório de referência oficial para as regiões do nordeste da Itália) para análise dos raticidas anticoagulantes.

O procedimento de extração foi baseado na modificação do método descrito por BERNY, BURONFOSSE e LORGUE (1995) para fígado e plasma e envolve 2 g de amostra (isca, fígado e conteúdo estomacal) extraídos 2 vezes com 5 mL de acetona por banho de ultrassom. Das 561 amostras suspeitas 79 deram positivo para a contaminação (14%), desses, 54.6% (42 amostras) eram iscas. Bromadiolona e brodifacoum foram os compostos mais frequentemente encontrados com uma porcentagem de 76,7% (59 amostras).

O uso combinado do DAD e fluorescência permite a criação de um método que faz com que seja possível detectar simultaneamente diferentes tipos de raticidas anticoagulantes com estruturas químicas diferentes, ao contrário do método proposto por ARMENTANO *et al.* (2012). O fato de que os raticidas anticoagulantes não ocorrem naturalmente em organismos de mamíferos, ou outra biota, garante o

desenvolvimento de um método mais qualitativo do que quantitativo que continua a ser eficaz e apto para o efeito (GALLOCCCHIO *et al.*, 2014).

Em virtude dessas pesquisas recentes estudarem a determinação simultânea de vários compostos em diferentes matrizes além da isca, as etapas de limpeza voltam a ser usadas e as metodologias se tornam mais extensas e complexas, o que exige mais tempo e estudos. Como os raticidas com ação anticoagulante são formulados contendo apenas um tipo de ingrediente ativo e o foco deste trabalho é a extração e determinação apenas do brodifacoum em pellets com 0,005% do anticoagulante, a etapa de limpeza e uso de maiores quantidades de amostra e solvente, necessários para determinar diferentes raticidas tanto em iscas como em amostras chamadas biológicas (sangue, órgãos, etc.), não são necessários.

4 METODOLOGIA

4.1 PREPARAÇÃO E EXTRAÇÃO

O procedimento de extração foi baseado no método de Mesmes e Satzger (1995). Pellets de raticidas comerciais, das marcas X (de cor rosa), Y (de cor amarela) e Z (de cor azul), contendo $50 \mu\text{g.g}^{-1}$ (0,005%) de brodifacoum cada uma (de acordo com o rótulo do produto), foram macerados usando gral e pistilo. Aproximadamente 50 mg de cada amostra macerada foram misturadas com 2 mL do solvente extrator (composto por 2% v/v de ácido metanoico P.A em metanol grau HPLC). A mistura foi sonicada por 15 minutos em banho de ultrassom e foi então centrifugada por 3 minutos a 2400 rpm. Uma alíquota de 1 mL de cada sobrenadante foi separada e levada ao laboratório de ciências químicas e biológicas do Instituto Médico-Legal (IML) de Curitiba para análise por CLAE-DAD. Essa metodologia foi realizada em 5 replicatas de cada amostra.

No laboratório do IML foi seguida uma metodologia já usada no instituto que consiste na evaporação da solução em banho-maria até secura e sua reconstituição com 0,1 mL da fase móvel (63% acetonitrila e 37% tampão fosfato, pH 2,3) usando-se um insert.

4.2 ANÁLISE POR CLAE

Foi usada a cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa com detector de arranjo de diodos (DAD) (Merck Hitashi, modelo LaChrom, detectores: arranjo de diodos e fluorescência). As condições cromatográficas foram as já empregadas no IML para a determinação do brodifacoum puro ou extraído de amostras de sangue e órgãos. Foram injetados 35 μL da solução de cada amostra em uma coluna LiChrospher 100 RP-8e (Fase reversa C8 encapada). Esta possui dimensões de 250 x 4,0 mm, tamanho de partícula de 5 μm . A fase móvel, consistida de 63% acetonitrila e 37% tampão fosfato (pH 2,3), foi eluída isocraticamente em uma vazão de 1 mL min^{-1} e temperatura de 30 °C. O intervalo utilizado para

varredura com o DAD foi de 190 a 400 nm. O comprimento de onda escolhido para os cromatogramas foi de 267 nm.

4.3 PADRÃO

Foi preparada uma solução padrão estoque na concentração de 1000 mg L⁻¹ do Brodifacoum (Padrão da Riedel de Háën, 97,2% puro) dissolvendo 10 mg do pó em 10 mL de acetonitrila grau HPLC. Soluções padrões de trabalho inicialmente nas concentrações de 0,5; 2,5; 5,0; 10,0; 15,0 e 20,0 mg L⁻¹, para a curva de calibração, foram preparadas pela diluição da solução estoque na fase móvel.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 CONCENTRAÇÃO TEÓRICA DO BRODIFACOUM

Para os cálculos foi considerada a proporção de brodifacoum por massa de pellet dada pelo rótulo dos produtos que é de $50 \mu\text{g.g}^{-1}$, devido a dificuldade de conseguir um padrão externo com a mesma composição (matriz) do raticida comercial, considerando que esta composição não é dada a conhecer pelo consumidor.

Uma vez conhecida essa proporção é possível saber quanto do composto de interesse seria injetado no cromatógrafo, assim como sua concentração, se houvesse 100% de recuperação após a extração. Para isso foram pesadas as massas de pellet que se encontram na Tabela 2 para as marcas X, Y e Z. A partir das massas pesadas calculou-se a quantidade final do composto brodifacoum que estaria presente nos $35 \mu\text{L}$ injetados e sua relativa concentração final.

Tabela 2 - Massas pesadas dos pellets (Massa P), massas teóricas injetadas de brodifacoum (Massa B) e concentração final teórica de brodifacoum (Concentração B) para X, Y e Z

Amostra	Massa P / mg			Massa B / μg			Concentração B / mg L^{-1}		
	X	Y	Z	X	Y	Z	X	Y	Z
1	51,1	51,3	49,6	0,447	0,449	0,434	12,8	12,8	12,4
2	50,5	51,1	49,4	0,442	0,447	0,432	12,6	12,8	12,4
3	50,8	50,7	51,0	0,445	0,444	0,446	12,7	12,7	12,8
4	49,8	51,0	51,0	0,436	0,446	0,446	12,5	12,8	12,8
5	51,1	49,4	50,5	0,447	0,432	0,442	12,8	12,4	12,6
Média*	$50,7 \pm 0,5$	$50,7 \pm 0,8$	$50,3 \pm 0,8$	$0,443 \pm 0,005$	$0,444 \pm 0,007$	$0,440 \pm 0,007$	$12,7 \pm 0,1$	$12,7 \pm 0,2$	$12,6 \pm 0,2$

* Massa P $\pm \sigma$, massa B $\pm \sigma$, concentração B $\pm \sigma$

A massa dos pellets e os dados calculados e dispostos acima serão úteis na confecção da curva de calibração. A concentração calculada será considerada como ponto intermediário da curva, considerando que este valor se refere a soma dos dois isômeros.

5.2 DETECÇÃO

Na Figura 4 encontra-se o gráfico 3D para o padrão do brodifacoum na concentração de 10 mg L^{-1} . Percebe-se que houve a separação dos isômeros cujos perfis já podem ser visualizados. O primeiro foi chamado de isômero 1 e o segundo de isômero 2 pois não se pode dizer com certeza qual é o isômero *cis* e qual é o *trans*.

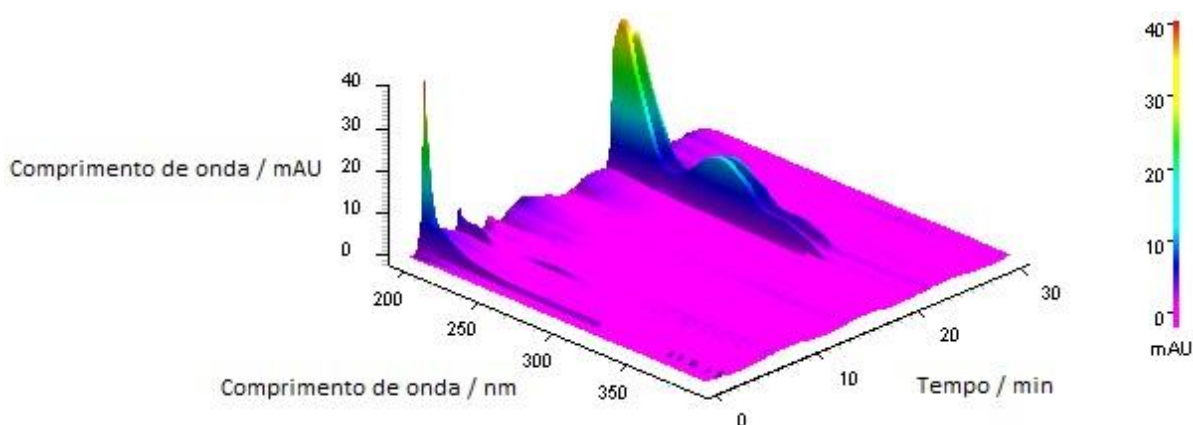


Figura 4 – Gráfico 3D do padrão de brodifacoum (10 mg L^{-1}) obtido por DAD com varredura entre 190 a 400 nm

Na figura 5 está apresentado o cromatograma do padrão no comprimento de onda de 266 nm. Os tempos de retenção (t_R) foram de 20,773 min para o isômero 1 e 20,080 min para o isômero 2.

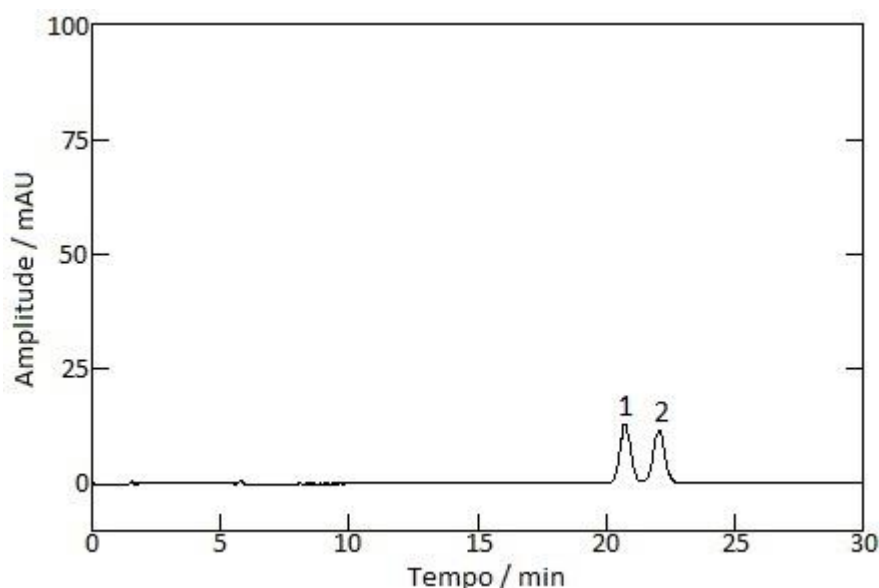


Figura 5 - Cromatograma da injeção de $35 \mu\text{L}$ do padrão por DAD no comprimento de onda de 266 nm.

E o espectro de absorção do isômero 1 que possui o mesmo perfil que o isômero 2 encontra-se na Figura 6.

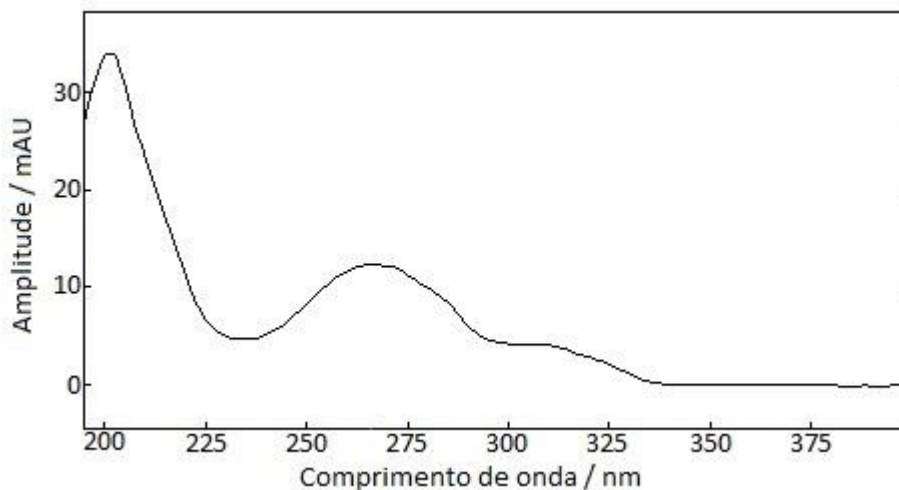


Figura 6 - Espectro de absorção ($t_R = 20,7$ min) para o isômero 1 obtido por DAD com varredura entre 190 a 400 nm

Os gráficos 3D para os extratos das marcas X, Y e Z (3ª amostra de cada) encontram-se na Figura 7.

Nos gráficos 3D e nos cromatogramas (Figura 8) visualizam-se os dois isômeros do brodifacoum assim como foi observado no padrão. Percebe-se também que há diferenças na matriz dos pellets de uma marca para outra e notam-se diferenças nas amplitudes dos isômeros. Essas diferenças são confirmadas através da Tabela 3 que contém as áreas de cada pico mostrando que as proporções dos isômeros para cada marca são bem diferentes.

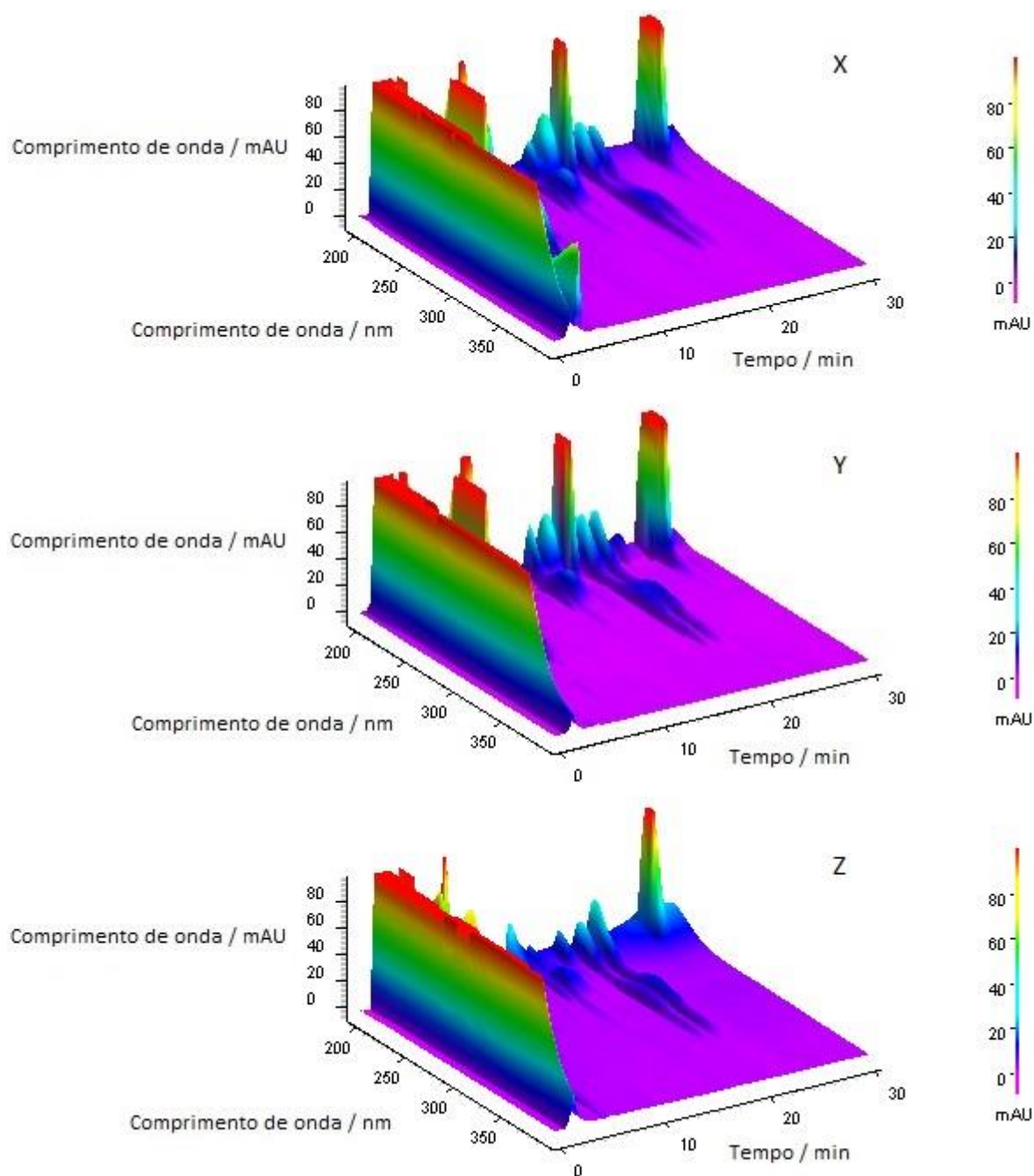


Figura 7 - Gráficos 3D dos extratos das marcas X, Y e Z obtidos por DAD com varredura entre 190 a 400 nm

Tabela 3 – Áreas dos picos para a terceira amostra de cada marca

Marca	Área / mAU	
	Isômero 1	Isômero 2
X	1354,326	886,728
Y	1789,394	1741,95
Z	1119,781	1910,782

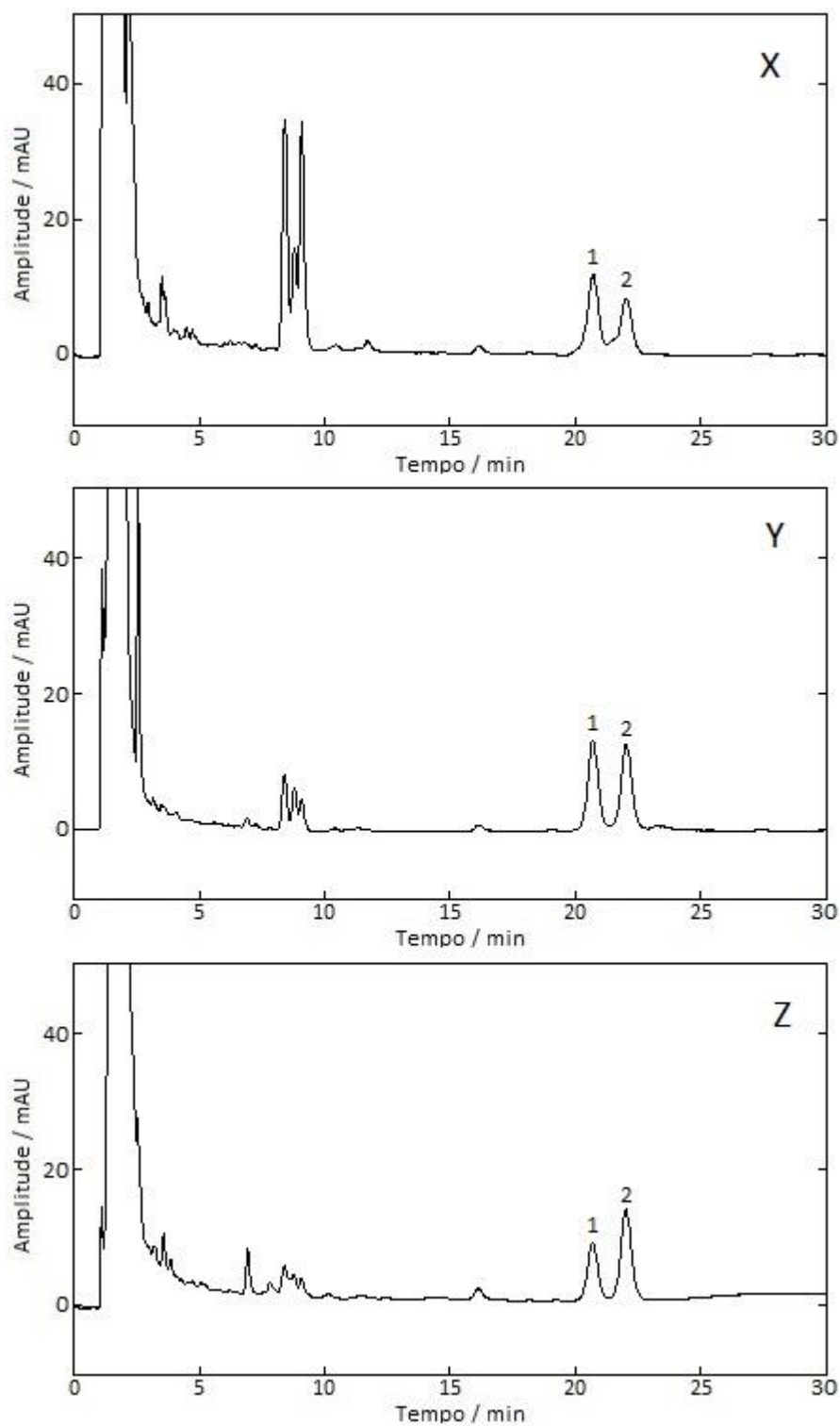


Figura 8 - Cromatogramas da injeção de 35 μ L dos extratos das marca X, Y e Z por DAD no comprimento de onda de 267 nm.

Os tempos de retenção foram 20,68 min para o isômero 1 e 22,04 min para o isômero 2.

Na Figura 9 é possível visualizar os espectros de absorção dos isômeros 1 e 2 da marca X com um perfil similar ao do padrão e percebe-se que não há diferenças visíveis nos perfis dos dois isômeros como dito anteriormente. Os espectros das outras duas marcas são semelhantes ao da Figura 9 e diferem apenas na amplitude. Essa forma característica já pode ser visualizada inclusive na Figura 7 através dos gráficos 3D.

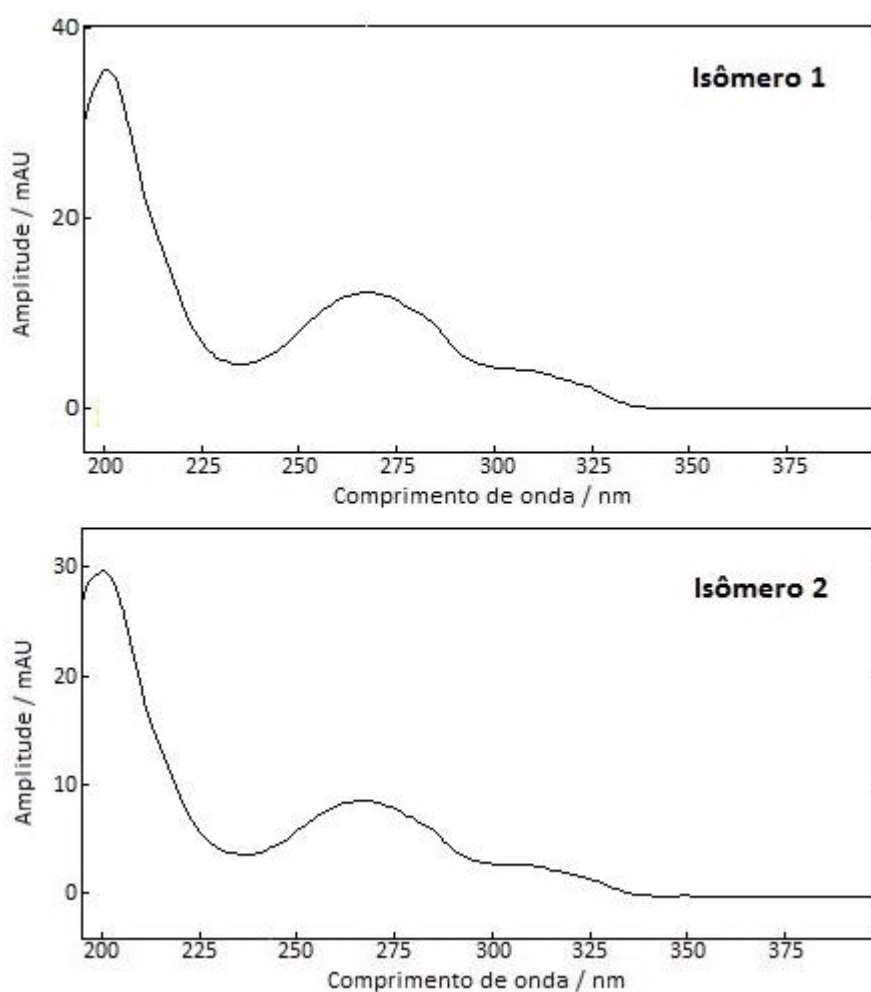


Figura 9 - Espectros de absorção para o isômero 1 ($t_R = 20,68$ min) e isômero 2 ($t_R = 22,04$ min) da marca X obtido por DAD com varredura entre 190 a 400 nm

A análise por CLAE-DAD proveu picos cromatográficos com boas formas e um tempo de retenção menor que 30 min. Não foi notado nenhum pico de interferência próximo ao t_R dos analitos nas matrizes investigadas. Apesar da baixa concentração do princípio ativo nos pellets e toda sua complexa matriz foi possível obter cromatogramas limpos mesmo com uma preparação de amostra simples e sem etapa de limpeza anterior a injeção da amostra.

5.3 CURVA DE CALIBRAÇÃO

Visto que houve a separação dos dois isômeros, foram feitas duas curvas de calibração em triplicata considerando suas respectivas porcentagens (Figuras 10 e 11). De acordo com o fabricante o padrão de brodifacoum utilizado é uma mistura contendo 51,64% do isômero 1 e 48,36% do isômero 2. Considerando isso e a pureza de 97,2% do padrão de brodifacoum, as concentrações consideradas para a curva de calibração foram as apresentadas na Tabela 4.

Tabela 4 – Concentrações dos isômeros para confecção das curvas de calibração

	Concentração / mg L ⁻¹					
isômero 1	0,251	1,255	2,510	5,019	7,529	10,039
isômero 2	0,235	1,175	2,350	4,701	7,051	9,401

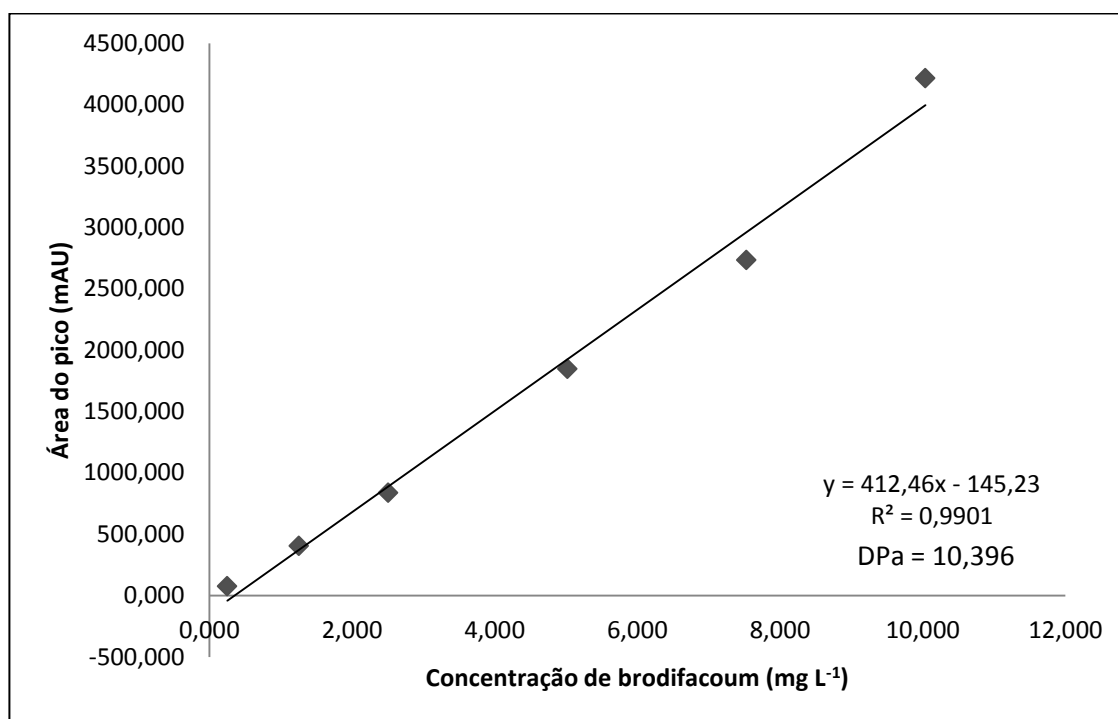


Figura 10 – Curva de calibração do isômero 1

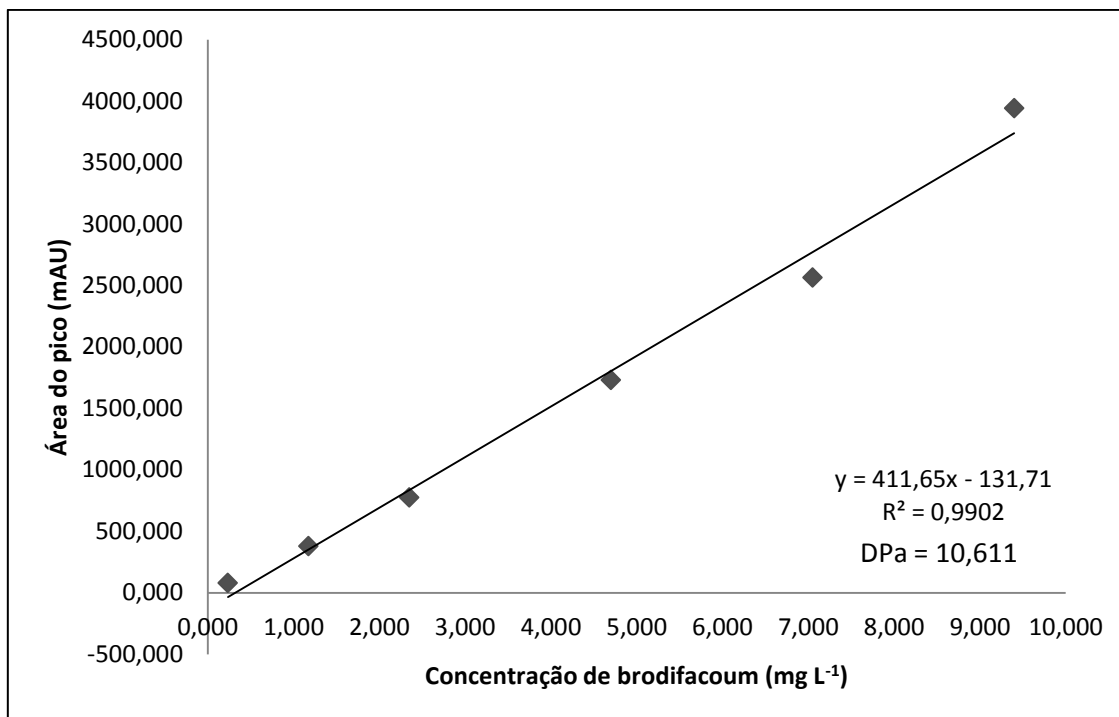


Figura 11 – Curva de calibração do isômero 2

Os coeficientes de correlação linear (R^2) para as curvas de calibração dos isômeros 1 e 2 foram 0,9901 e 0,9902 respectivamente.

A estimativa do limite de detecção (LD) foi de 0,077 mg L⁻¹ e do limite de quantificação (LQ) foi de 0,238 mg L⁻¹ de brodifacoum considerando um isômero e a estimativa do LD foi de 0,153 mg L⁻¹ e LQ foi de 0,510 mg L⁻¹ considerando os dois isômeros. O LD foi calculado com base na relação de 3 vezes o ruído da linha de base e foi determinado pela Equação 1 e o LQ foi estabelecido com base na relação de 10 vezes o sinal do ruído e foi expresso pela Equação 2.

$$LD = \frac{DPa \times 3}{IC} \quad \text{Equação 1}$$

$$LQ = \frac{DPa \times 10}{IC} \quad \text{Equação 2}$$

Sendo Dpa o desvio padrão do intercepto com o eixo y calculado em triplicata e IC a inclinação da curva de calibração.

5.4 DETERMINAÇÃO DO BRODIFACOUM

Dispondo das curvas de calibração e suas correspondentes equações (Equação 3 e 4), pôde-se calcular a concentração de brodifacoum que foi detectada e assim conhecer a porcentagem de recuperação para cada marca. A Equação 3 é a equação da reta para o isômero 1 e a Equação 4 apresenta a equação da reta para o isômero 2.

$$y = 412,46x - 145,23 \quad \text{Equação 3}$$

$$y = 411,65x - 131,71 \quad \text{Equação 4}$$

Através dessas equações foram calculadas as concentrações finais de brodifacoum somando-se os dois resultados e também a porcentagem de cada isômero encontrada nas marcas X, Y e Z (Tabela 5).

Tabela 5 – Concentração detectada do brodifacoum e porcentagens dos isômeros 1 e 2 para as amostras X, Y e Z

Marca	Concentração detectada / mg L ⁻¹			Proporção (%)	
	Total	Isômero 1	Isômero 2	Isômero 1	Isômero 2
X	6,4 ± 0,4	3,9 ± 0,2	2,6 ± 0,3	60 ± 4	40 ± 4
Y	7,7 ± 1,0	3,9 ± 0,7	3,8 ± 0,7	51 ± 11	49 ± 11
Z	7,8 ± 0,4	3,1 ± 0,4	4,8 ± 0,2	39 ± 3	61 ± 3

Os resultados de concentração detectada da Tabela acima, podem ser comparados aos valores teóricos apresentados na Tabela 2 e, de antemão, observar uma recuperação bem abaixo de 100%. Dados como as porcentagens dos isômeros 1 e 2 em cada amostra poderiam ser úteis na determinação da marca utilizada do raticida, bem como o aspecto de cada gráfico que poderia num estudo mais abrangente servir como diferencial na identificação.

Na Tabela 6 estão apresentadas as massas encontradas de brodifacoum por grama de pellet e a partir da concentração referida na embalagem de cada marca (50 µg g⁻¹) foram calculadas as porcentagens de recuperação.

Tabela 6 – Recuperação do brodifacoum de raticidas comerciais contendo 50 µg g⁻¹

Raticida	Quantidade encontrada (µg g ⁻¹)	Recuperação (%)
Marca X		
Amostra 1	27	55
Amostra 2	26	52
Amostra 3	24	48
Amostra 4	23	45
Amostra 5	27	54
Média*	25 ± 2	51 ± 4
Marca Y		
Amostra 1	25	50
Amostra 2	33	65
Amostra 3	36	73
Amostra 4	33	67
Amostra 5	24	48
Média*	30 ± 5	61 ± 11
Marca Z		
Amostra 1	32	65
Amostra 2	32	65
Amostra 3	31	63
Amostra 4	32	64
Amostra 5	28	56
Média*	31 ± 1	62 ± 4

* Quantidade encontrada ± σ

Observa-se que houve uma menor recuperação do composto na marca X (51 %) e uma maior incerteza nos valores da marca Y devido a uma maior variação nas áreas dos picos entre os 5 experimentos. As porcentagens de recuperação do cumarínico foram abaixo do relatado na literatura por PEREZ (1982), MESMER e SATZGER (1995) e ARMENTANO *et al.* (2012). Isso pode ser devido ao fato de não ter sido utilizado a acetona como solvente de extração na qual o brodifacoum tem alta solubilidade, em vez disso foi utilizado um álcool onde o composto apresenta solubilidade moderada.

Optou-se mesmo assim pela não utilização da acetona. Segundo CORT, ALPERIN e CHO (2012) a acetona degrada o brodifacoum, principalmente o isômero *trans*, se a análise não for feita rapidamente o que não podia ser garantido já que as análises dependiam da disponibilidade do equipamento no IML o que levava dias ou semanas. Além disso, esse solvente dissolve muitos compostos, o que deixa os gráficos poluídos, principalmente em matrizes como a dos pellets. Mesmo assim, alguns testes foram feitos utilizando-se o mesmo método com a acetona e os resultados mostraram-se negativos.

Todavia, MESMER e SATZGER (1995) obtiveram recuperações altas mesmo não utilizando acetona. Isso pode ser explicado por diferenças na metodologia, como a etapa de evaporação da solução contendo o brodifacoum para posterior reconstituição na fase móvel, etapa essa que não existe no método acima citado. Contudo, para se fazer o mesmo nesse trabalho precisaria utilizar outra fase móvel o que não compensa para a rotina do IML. Além disso, as recuperações conseguidas são porcentagens consideráveis na detecção de cumarínicos em amostras complexas como as comerciais.

Nota-se que cada marca apresentou uma diferente mistura dos isômeros, confirmando o que foi visto nos gráficos e áreas. Mais estudos poderiam indicar melhor se essa proporção é uma característica de todos os lotes e se ela se mantém sem muita variação, podendo assim relacionar essas porcentagens as marcas com essa característica. Isso e outras informações espectrais sobre a matriz do pellet podem ser algo a ser usado para saber a origem usada para contaminar um alimento ou bebida, como mencionado anteriormente.

O método proposto nesse trabalho possibilita a utilização de 2 mg do pellet em análises com fins qualitativos e 5 mg em análises com fins quantitativos, considerando-se as porcentagens de recuperação deste trabalho. Esse cálculo foi feito com base no LD e LQ. Se considerar as concentrações limites como a concentração final pode-se retroceder os cálculos que foram feitos para se calcular a concentração final de brodifacoum na Tabela 2. Porém, em vez de considerar 100% de recuperação foi utilizada a menor porcentagem de recuperação obtida (45%). Os valores encontrados foram 1,3 e 4,4 mg que foram arredondados para 2 e 5 mg.

6 CONCLUSÃO

Através da metodologia proposta neste trabalho pôde-se realizar a extração do brodifacoum dos pellets comerciais, o que foi evidenciado após sua detecção por CLAE-DAD. Foi possível a determinação do cumarínico com uma porcentagem de recuperação em torno de 60% utilizando-se de uma metodologia envolvendo baixa quantidade de amostra (abaixo de 10 mg) e de reagentes (2 mL). O procedimento mostrou-se passível de ser utilizado pelo laboratório do Instituto de Criminalística do Paraná em suas análises rotineiras envolvendo amostras de pellets ou resíduos provindos de bebidas, como chá e café, suspeitas de conter brodifacoum, principalmente em razão do maior interesse qualitativo da análise.

7 REFERÊNCIAS

ANDRE, C.; PING, L.; THOMASSIN, M.; ROBERT, J. F.; GUILLAUME, Y. C. Modelling of the association mechanism of a series of rodenticide molecules with lipid membrane investigated by computational chemistry and biochromatography. **Analytica Chimica Acta**, v. 542, n. 2, p. 199-206, 2005.

ARMENTANO, A.; IAMMARINO, M.; MAGRO, S. L.; MUSCARELLA, M. Validation and application of multi-residue analysis of eight anticoagulant rodenticides by high-performance liquid chromatography with fluorimetric detection. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 24, n. 2, p. 307-311, 2012.

BARNETT, S. A. **The Story of Rats, Their Impact On Us And Our Impact On Them**, Allen & Unwin, 2002.

BERNY, P. J.; BURONFOSSE, T.; LORGUE, G. Anticoagulant poisoning in animals – a simple new high-performance thin-layer chromatographic (HPTLC) method for the simultaneous determination of 8 anticoagulant rodenticides in liver samples. **Journal of Analytical Toxicology**, v. 19, n. 7, p. 576-580, 1995.

BROWN, P.; CHARLTON, A.; CUTHBERT, M.; BARNETT, L.; ROSS, L.; GREEN, M.; GILLIES, L.; SHAW, K.; FLETCHER, M. Identification of pesticide poisoning in wildlife. **Journal of Chromatography A**, v. 754, n. 1-2, p. 463-478, 1996.

CORT, J. R.; ALPERIN, P. J.; CHO, H. Measurement and analysis of diastereomer ratios for forensic characterization of brodifacoum. **Forensic Science International**, v. 214, n. 1-3, p. 178-181, 2012.

CRACIUN, A. M.; GROENEN-VAN DOOREN, M. M. C. L.; THIJSEN, H. H. W.; VERMEER, C. Induction of prothrombin synthesis by K-vitamins compared in vitamin K-deficient and in brodifacoum-treated rats. **Biochimica Et Biophysica Acta-General Subjects**, v. 1380, n. 1, p. 75-81, 1998.

DESVARS, A.; CARDINALE, E.; MICHAULT, A. Animal leptospirosis in small tropical areas. **Epidemiology and Infection**, v. 139, n. 2, p. 167-188, 2011.

GALLOCCCHIO, F.; BASILICATA, L.; BENETTI, C.; ANGELETTI, R.; BINATO, G. Multi-residue determination of eleven anticoagulant rodenticides by high-performance liquid chromatography with diode array/fluorimetric detection: Investigation of suspected animal poisoning in the period 2012–2013 in north-eastern Italy. **Forensic Science International**, v. 244, n. 0, p. 63-69, 2014.

HAO, Y.; DONG, X.; LIANG, S.; SUN, H. Analysis of four anticoagulants rodenticides in foodstuff and body fluids by high-performance liquid chromatography with photodiode-array detector. **Analytical Methods**, v. 6, n. 7, p. 2356-2362, 2014.

KO, A. I.; GOARANT, C.; PICARDEAU, M. Leptospira: the dawn of the molecular genetics era for an emerging zoonotic pathogen. **Nature Reviews Microbiology**, v. 7, n. 10, p. 736-747, 2009.

MESMER, M. Z.; SATZGER, R. D. Determination of Brodifacoum in commercial rodenticides by using high-performance liquid-chromatography with fluorescence detection. **Analyst**, v. 120, n. 8, p. 2195-2197, 1995.

MEULENBELT, J.; DESCOTES, J. 22 - Fumigants, fungicides and rodenticides. In: (Ed.). **Human Toxicology**. Amsterdam: Elsevier Science B.V. p.561-576, 1996.

MURPHY, M. J.; GUPTA, R. C. Chapter 48 - Anticoagulant rodenticides. In: (Ed.). **Veterinary Toxicology**. Oxford: Academic Press. p.525-547, 2007.

PELFRENE, A. F.; KRIEGER, R. I.; KRIEGER, W. C. Chapter 83 - Rodenticides. In: (Ed.). **Handbook of Pesticide Toxicology (Second Edition)**. San Diego: Academic Press. p.1793-1836, 2001.

PEREZ, R. L. Simplified extraction procedure for the determination of brodifacoum in wheat baits by high-performance liquid-chromatography. **Analyst**, v. 107, n. 1277, p. 968-971, 1982.

SHIMSHONI, J. A.; SOBACK, S.; CUNEAH, O.; SHLOSBERG, A.; BRITZI, M. New validated multiresidue analysis of six 4-hydroxy-coumarin anticoagulant rodenticides in hen eggs. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 25, n. 6, p. 736-743, 2013.

VAN HEERDEN, P. S.; BEZUIDENHOUDT, B. C. B.; FERREIRA, D. Efficient asymmetric synthesis of the four diastereomers of diphenacoum and brodifacoum. **Tetrahedron**, v. 53, n. 17, p. 6045-6056, 1997.

VAN SITTERT, N. J.; TUINMAN, C. P. Chapter 10 Coumarin derivatives (rodenticides). **Toxicology**, v. 91, n. 1, p. 71-76, 1994.

VANDENBROUCKE, V.; BOUSQUET-MELOU, A.; DE BACKER, P.; CROUBELS, S. Pharmacokinetics of eight anticoagulant rodenticides in mice after single oral administration. **Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics**, v. 31, n. 5, p. 437-445, 2008.

YUEN, S. H. Determination of rodenticides difenacoum and brodifacoumin finished baits by reversed-phase liquid-chromatography. **Analyst**, v. 103, n. 1229, p. 842-850, 1978.6