

# DETERMINAÇÃO DE RESÍDUO DE CIPERMETRINA EM FÍGADO BOVINO POR MEIO DE CROMATOGRAFIA LÍQUIDA ACOPLADA À ESPECTROMETRIA DE MASSAS (LC-MS)

Marcus Vinicius Oliveria Rezende\*

Werner Okano\*\*

Flávio Antônio Barca Junior\*\*

Flavio Guiselli Lopes\*\*

Celso Koetz Junior\*\*

Elsa Helena Walter de Santana\*\*

Selwyn Arlington Headley\*\*

**RESUMO:** Com o objetivo de avaliar o período de carência da cipermetrina 5% *pour on* em fígado bovino, 16 animais, divididos em quatro grupos, foram submetidos à aplicação *pour on* de cipermetrina. Conforme recomendação do EMEA/MRL 403/98 o limite máximo de cipermetrina estabelecido para tecido hepático é de 20 $\mu$ g/Kg. As amostras foram analisadas através da cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (LC-MS) MS – *Masslynx*. Os bovinos foram abatidos nos dias 3, 7, 10 e 14 após a aplicação, com valores máximos mensurados de 25, 11, 12 e 11 $\mu$ g/Kg, respectivamente. Com base nos resultados pode-se afirmar que após sete dias da aplicação da cipermetrina 5% *pour on* os valores residuais estão abaixo dos recomendados, não trazendo riscos para o consumidor.

**PALAVRAS-CHAVE:** Cipermetrina; Cromatografia; Resíduo.

## DETERMINATION OF CYPERMETHRIN RESIDUE IN BOVINE LIVER BY LIQUID CHROMATOGRAPHY COUPLED TO MASS SPECTROMETRY (LC-MS)

**ABSTRACT:** Sixteen animals, divided into four groups, underwent pour-on application of cypermethrin so that cypermethrin 5% waiting period in bovine liver could be evaluated. According to recommendations by EMEA/MRL 403/98, maximum limit

\* Médico Veterinário; Mestrando no Programa de Pós-Graduação Associado em Saúde e Produção de Ruminantes pela Universidade Norte do Paraná – UNOPAR e Universidade Estadual de Londrina – UEL, Londrina, PR; E-mail: [vetmarcus@hotmail.com](mailto:vetmarcus@hotmail.com)

\*\* Docentes de Medicina Veterinária da Universidade Norte do Paraná – UNOPAR do PPG Saúde e Produção de Ruminantes da UNOPAR/UEL.

for cypermethrin for liver tissue is 20 $\mu$ g/Kg. Samples were analyzed by liquid chromatography with mass spectrometry (LC-MS) MS – *Masslynx*. Bulls were finished after 3, 7, 10 and 14 days after application, with maximum rates at 25, 11, 12 and 11 $\mu$ g/Kg, respectively. Results demonstrate that, after seven day posterior to cypermethrin 5% pour-on application, the residual rates were lower than recommended, without any risk for the consumer's health.

**KEY WORDS:** Cypermethrin; Chromatography; Residues.

## INTRODUÇÃO

A bovinocultura de corte tem se destacado na economia nacional e vem assumindo posição de liderança no mercado mundial de carnes. O Brasil possui hoje o maior rebanho comercial do mundo; é o segundo maior produtor mundial de carne bovina, e a partir de 2003, passou a ser o primeiro exportador mundial, com destaque tanto no comércio de carnes frescas como industrializadas. A previsão para 2011 da produção de carne bovina foi de 8,536 milhões de toneladas (CONAB, 2011), sendo o aumento da taxa de exportação anual estimada em 2,6% (BRASIL, 2011).

As iniciativas de rastreamento da carne bovina destinada à exportação, especialmente para a União Europeia, têm contribuído de maneira significativa para o atendimento das expectativas dos consumidores internacionais quanto à segurança dos alimentos (CONAB, 2011).

Segundo Pane, Nogueira e Brondi (2007), um dos fatores que pode comprometer a qualidade da carne é quando está sujeita à contaminação química por carrapaticidas. Fator este que pode eliminar o Brasil de mercados com maior controle e exigência tais como o americano e o europeu (OJIMA; BEZERRA, 2005). A Instrução Normativa 42 do MAPA, anexo II trata sobre o Programa de Controle de Resíduos em Carnes (BRASIL, 1999) visando evitar a violação dos níveis de segurança alimentar. A instrução normativa nº 9 de 2007 estabelece os Limites Máximos de Resíduos para Agrotóxicos (BRASIL, 2007).

O uso incorreto de carrapaticidas permite o desenvolvimento mais rápi-

do da resistência a produtos químicos e o aparecimento de resíduos químicos em produtos de origem animal (BULLMAN; MUÑOS CABENAS; AMBRÚSTULO, 1996). Segundo Murphy (1980) os piretróides podem ser usados em aspersão ou imersão controlando moscas, carrapatos, pulgas ou piolhos. O uso excessivo e a lipossolubilidade podem levar à intoxicação do animal ou do próprio aplicador, assim como possível contaminação do meio ambiente. A cipermetrina é classificada como um produto piretróide contendo componente alfa-yano em sua estrutura molecular (OSWEILER, 1998).

O fígado é um órgão vital para o metabolismo do animal; anatomicamente 78% do fluxo sanguíneo ao órgão ocorre através da veia porta. Dentre as funções hepáticas estão a biotransformação e o acúmulo de metabólitos, neutralizando e eliminando as substâncias tóxicas (CUNNINGHAM; KLEIN, 2008). O uso incorreto e indiscriminado dos piretróides tem acelerado o processo de seleção de resistência (CASIDA, 2009). E quando usado em excesso pode levar à intoxicação, dada sua alta lipossolubilidade (MURPHY, 1980).

Os piretróides são biotransformados rapidamente no organismo de mamíferos, principalmente no parênquima hepático. A reação inicial de destoxificação é a hidrólise da ligação éster, seguida por reações de hidroxilação através do sistema enzimático Citocromo P450 e reações de conjugação. A biotransformação resulta na formação de compostos mais polares, o que facilita sua excreção pela urina (SANTOS; AREAS; REYES, 2007).

O objetivo deste trabalho foi avaliar o período de carência da cipermetrina 5% *pour on* no fígado de bovinos através de cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (LC-MS) MS – Masslynx.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi realizado no Município de Arapongas – PR, latitude 23°28'55,3" e longitude 51°26'07,4", com início em 05/08/2008 e término em 19/08/2008. O produto utilizado foi a cipermetrina 5% *pour on*. Nos 60 dias que antecederam o experimento os bovinos não receberam nenhum tipo de medicamento ou produto químico. As pastagens ou alimento fornecido de forma suplementar não

receberam ou passaram por tratamento químico ou de adubação. Os animais foram mantidos em pastagem de *Brachiaria brizantha* CV MG4, *Brachiaria brizantha* CV MG5 e capim estrela (*Cynodon* sp), além de receber suplementação de cana tritura-da no cocho. O sal mineral foi fornecido *ad libitum*.

Os 16 bovinos, machos, todos meio sangue Nelore/Angus, com 2 anos de idade, foram divididos, após randomização, em 4 grupos de quatro animais cada recebendo 10mL de cipermetrina 5% *pour on* para cada 100Kg de peso vivo. O grupo 1 (G1) foi abatido três dias após a aplicação da cipermetrina; o grupo 2 (G2) sete dias após a aplicação; o grupo 3 (G3), com 10 dias; e o grupo 4 (G4) aos 14 dias após o recebimento da aplicação *pour on* do produto.

Os animais foram encaminhados ao abate em frigorífico sob Serviço de Inspeção Federal (SIF 1771). Respeitados os exames de inspeção *post mortem* da linha E (conforme RIISPOA), colhia-se um fragmento de aproximadamente 400 gramas do fígado.

As amostras colhidas foram embaladas, etiquetadas e conservadas sob congelamento a -20°C, e encaminhadas ao laboratório Quimiplan Análises e Consultoria Ltda., situado em Vila Velha no Estado do Espírito Santo.

Para o processamento da amostra do fígado foi extraído um fragmento de seis gramas, este foi homogeneizado em processador de carnes passado por extração com acetonitrila, seguida da adição de sulfato de magnésio, cloreto de sódio e tampão citrato, pH 5,5 com centrifugação para separação de fases. A fase orgânica foi submetida a um *clean up* do tipo SPE empregando os sais PSA, GCB e C18, todos a granel, com nova adição de sulfato de magnésio para remoção da água residual e centrifugação para separação do extrato purificado. Uma alíquota do extrato purificado foi evaporado à secura e o volume final, retomado com solução metanol/água (50:50) para ser injetado em sistema LC/MS MS.

A solução estoque de cipermetrina a 365,24 µg/mL foi preparada dissolvendo 9,27mg de padrão em 25mL de metanol. Foi gerada uma curva de calibração, com a respectiva equação da reta resultante, pelo próprio software do sistema LC/MSMS (Masslynx), analisando-se padrões diluídos no extrato da matriz, proveniente da extração seguida conforme metodologia aplicada para todas as amostras, de uma matriz isenta de cipermetrina.

Foram plotadas as concentrações dos padrões e as áreas dos picos correspondentes, com valores médios de três repetições para cada uma das sete concentrações empregadas, para em seguida serem determinados o coeficiente angular, o coeficiente linear e o índice de correlação linear da reta (0,9951).

Para identificação e quantificação do analito, foi usada a técnica LC/MS/MS, onde o analito não foi separado de seus interferentes, no extrato da amostra, levando-se em conta apenas as diferentes interações por polaridade com a fase estacionária e fase móvel, mas também foi identificado, confirmado e quantificado por detecção massa-massa. Neste processo, o analito foi ionizado formando um íon precursor com uma razão  $m/z$  (massa/carga) específica e dois íons “filhos” formados a partir da fragmentação do íon precursor com suas respectivas razões  $m/z$ . Com os três íons formados teremos duas transições que serão monitoradas, sendo que o íon filho de maior intensidade será utilizado para quantificação do analito junto com a segunda transição, que será usada para confirmação, eliminando assim a possibilidade de interferências e tornando a técnica bastante específica, levando em conta além dos tempos de retenção, mais duas transições eletrônicas e as proporções em que as duas transições aparecem.

A curva de calibração foi realizada com os resultados obtidos nas análises de oito diferentes concentrações do analito, fortificando a matriz biológica isenta do fármaco em estudo, para o fígado, sendo gerada a curva. Para cada concentração foram analisadas triplicatas. O intervalo de concentração compreendeu valores entre 0,000  $\mu\text{g/mL}$ , até 0,700  $\mu\text{g/mL}$ . Todos os pontos da curva apresentaram desvio menor do que 15% em relação à concentração nominal.

Os picos de cipermetrina foram identificados e quantificados dentro de um limite mínimo e máximo de validação de 10  $\mu\text{g/kg}$  ( $L_{\text{mínV}}$ ) e 570  $\mu\text{g/kg}$  ( $L_{\text{máxV}}$ ), com uma concentração intermediária testada a 220  $\mu\text{g/kg}$  para fígado.

Para obtenção dos extratos, alíquotas de seis gramas de amostras isentas (controle) foram fortificadas nas concentrações a serem testadas e submetidas ao método de análise, onde 6g de amostra são extraídas com 6mL de acetonitrila e do extrato orgânico purificado, com concentração de aproximadamente 1g de amostra/mL; uma porção de 3mL foi evaporada e o volume retomado com 1mL de metanol/água (50:50) no caso do LIQ a 10  $\mu\text{g/kg}$ . Para as recuperações de 220  $\mu\text{g/kg}$  e 570  $\mu\text{g/kg}$

kg, uma porção de 1mL foi evaporada e o volume retomado com 1mL de metanol/água (50:50 para ser injetada no sistema com uma concentração dentro do intervalo linear da curva de calibração).

A repetibilidade e a exatidão do método foram testadas em três diferentes concentrações (baixa, média e alta) com sete determinações por concentração e os coeficientes de variação foram inferiores a 15% para as três concentrações. Estabeleceu-se por meio da análise de cada um dos tecidos (amostra controle), contendo concentrações decrescentes de cipermetrina até o menor nível quantificável, que foi 0,010 mg/Kg com precisão e exatidão aceitáveis.

Foi estabelecido por meio da análise de soluções com concentração conhecida e decrescente de cipermetrina até o menor nível detectado e que contenha, dentro do intervalo de tempo de retenção especificado para a cipermetrina, as transições monitoradas: 432,9 – 190,7 para quantificação e 432,9 – 126,7 para confirmação, com limite de detecção de 0,005 mg/Kg.

Foi testada a estabilidade do fármaco após ciclos de congelamento e descongelamento, utilizando-se três amostras fortificadas com cipermetrina, nas concentrações baixa e alta, nas seguintes condições: as amostras foram congeladas à temperatura de  $-20^{\circ}\text{C}$  e mantidas por 24 horas, sendo então submetidas ao descongelamento à temperatura ambiente. Quando completamente descongeladas, as amostras foram novamente congeladas à temperatura indicada para o armazenamento por 24 horas e assim sucessivamente, até contemplar os três ciclos, quantificando-se o fármaco nas amostras após o terceiro ciclo. Os resultados foram comparados com aqueles obtidos na análise das amostras recém-preparadas.

Para verificação dessa estabilidade foram utilizadas três amostras das concentrações baixa e alta, sendo que cada uma delas permaneceu à temperatura ambiente durante 12 horas antes de serem analisadas. Os resultados foram comparados com aqueles obtidos na análise das amostras recém-preparadas.

Para o caso da utilização do sistema automático de amostragem/injeção do UPLC/MSMS, a estabilidade do fármaco foi avaliada submetendo a amostra processada para análise à temperatura de  $10^{\circ}\text{C}$  por um período de 18 horas.

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na presente pesquisa, trabalhou-se com 6 gramas de amostra hepática, enquanto que Silva (2008) conseguiu mensurar resíduos de cipermetrina em 4 gramas de fígado. Os valores mensurados na análise de cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (LC-MS) de tecido hepático encontram-se na Tabela 1.

**Tabela 1.** Valores residuais de cipermetrina encontrados na análise cromatográfica líquida de espectrometria de massas (LC-MS) de tecido hepático bovino.

Tabela 1	
Controle	< 10 $\mu\text{g/Kg}$
G1	12 – 25 $\mu\text{g/Kg}$
G2	11 $\mu\text{g/Kg}$
G3	11 – 12 $\mu\text{g/Kg}$
G4	11 $\mu\text{g/Kg}$

Fonte: Dados da pesquisa

Segundo dados do EMEA (2003) o limite residual permitido para cipermetrina em fígado de bovinos é de 20  $\mu\text{g/Kg}$ . Exceto no G1, cujo abate dos animais ocorreu três dias após a aplicação da cipermetrina *pour on*, os demais grupos apresentaram resíduo de cipermetrina abaixo do valor recomendado pelo EMEA (2003), conferindo assim um alimento dentro dos padrões aceitos pela legislação atual.

A utilização de um cromatógrafo acoplado a um espectrofotômetro de massas traz as vantagens da cromatografia, alta seletividade e eficiência de separação além das vantagens do espectrofotômetro (informação estrutural, massa molar e aumento da seletividade) (VEKEY, 2001).

Diferentemente do encontrado na presente pesquisa, Bissacot (1995) estudando a permanência de piretróides no sangue e leite de bovinos, cujos animais foram pulverizados com cipermetrina, constatou que mesmo após o 28º dia da aplicação, os piretróides estudados ainda estavam presentes em ambos os meios. A autora recomenda que uma nova aplicação do produto não deve ser realizada antes de 28 dias, o que geralmente não ocorre nas propriedades agropecuárias,

demonstrando o desperdício, mau uso dos defensivos e resistência aos princípios ativos no campo.

Na ingestão da dose única, a maioria dos piretróides é rapidamente excretada pela urina e fezes. Geralmente, em mamíferos, mais de 90% da dose é excretada no período de uma semana após exposição (SODERLUND et al., 2002). O presente trabalho demonstra que a partir de sete dias houve avaliação residual dentro dos limites previstos pelos órgãos regulatórios.

Resíduos de medicamentos veterinários podem trazer prejuízos à saúde quando acumulados na gordura e em outros tecidos do animal (USEPA, 2004). Faz-se necessário o uso correto dos medicamentos veterinários para evitar a contaminação de seres humanos assim como do meio ambiente. Segundo Brasil (2006), a determinação de resíduos de pesticidas desempenha um papel importante para a estimativa da exposição humana e do meio ambiente a estes medicamentos veterinários.

#### 4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Pode-se afirmar que após sete dias da aplicação da cipermetrina 5% *pour on* os resíduos existentes no tecido hepático bovino apresentaram-se dentro dos padrões determinados pela legislação brasileira atual, permitindo assim o consumo do produto de origem dos animais tratados.

#### REFERÊNCIA

BISSACOT, D. Z. **Determinação de resíduos de inseticidas piretróides sintéticos em leite e sangue de bovinos**. 1995. 113f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Botucatu, 1995.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes. **Instrução normativa 42 de 20 de dezembro de 1999**. Brasília: MAPA, 1999.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resíduos de agrotóxicos em alimentos. **Revista de Saúde Pública**, v. 40, n. 2, p. 361-363, 2006.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Instrução normativa nº 9 de 30 de março de 2007**. Brasília: MAPA, 2007.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Assessoria de Gestão Estratégica. **Brasil projeções do agronegócio 2010/2011 a 2020/2021**. Brasília: MAPA, 2011. 59 p.

BULLMAN, G. M.; MUÑOS CABENAS, M. E.; AMBRÚSTOLO, R. R. El impacto ecológico de las lactonas macrocíclicas (endectocidas): una actualización comprensiva y comparativa. **Veterinaria Argentina**, v. 8, n. 127, p. 3-15, 1996.

CASIDA, J. E. PEST TOXICOLOGY: THE PRIMARY MECHANISMS OF PESTICIDES ACTION. **CHEMICAL RESEARCH IN TOXICOLOGY**, V. 22, N. 4, P. 609-619, 2009.

CONAB – Companhia Nacional de Abastecimento. **Previsão e acompanhamento de safras**. Disponível em: <<http://www.conab.gov.br>>. Acesso em: 04 dez 2011.

CUNNINGHAM, J. G.; KLEIN, B. G. **Tratado de fisiologia veterinária**. 4. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2008, 710 p.

EMEA. **The European Agency for the Evaluation of Medicinal Products Veterinary Medicines and Inspections**. 2003. Disponível em: <[http://www.emea.europa.eu/docs/en\\_GB/document\\_library/Maximum\\_Residue\\_Limits\\_-\\_Report/2009/11/WC500013078.pdf](http://www.emea.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Maximum_Residue_Limits_-_Report/2009/11/WC500013078.pdf)>. Acesso em: 13 dez 2011.

MURPHY, S. D. Pesticides: In: DOULL, J. K.; AMDUR, M. O. **Casarett and doull's Toxicology: the basic Science of poisoning**. 2. ed. New York: McGraw Hill; Medical Publishing Division, 1980. p. 357-480.

PANE, J. S.; NOGUEIRA, A. R. A.; BRONDI, S. H. G. Desenvolvimento de tecnologia analítica para determinação de resíduos de medicamentos veterinários em carne bovina. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE CARNES, 4, 2007, Campinas. **Anais...** Campinas: [s.n.], 2007.

OJIMA, A. L. R. O.; BEZERRA, L. M. C. Segurança alimentar e logística: o papel na cadeia de carne bovina. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ADMINISTRAÇÃO RURAL, 5, 2005, Campinas. **Anais...** Campinas: [s.n.], 2005.

OSWEILER, G. D. **Toxicologia veterinária**. Porto Alegre: Artes Médicas, 1998. 526p.

SANTOS, M. A. T.; AREAS, M. A.; REYES, F. G. R. Piretróides: uma revisão geral. **Alimentos e Nutrição**, v. 18, n. 3, p. 339-349, 2007.

SILVA, E. P. **Validação de método de extração e análise multirresíduo de agrotóxicos em carne bovina por cromatografia gasosa**. 2008. 119f. Dissertação (Mestrado em agroquímica) - Universidade Federal de Viçosa, 2008.

SODERLUND, D. M.; CLARK, J. M.; SHEETS, L. P. et al. Mechanisms of pyrethroid neurotoxicity: implications for cumulative risk assessment. **Toxicology**, v. 171, n. 1, p.3-59, 2002.

USEPA. United States Environmental Protection Agency. **Pesticides. The EPA and Food Security**, 2004.

VEKEY, K. J. **A Chromatography**, [S.l.; s.n.], 2001.

*Recebido em: 29 de maio de 2012*

*Aceito em: 08 de novembro de 2012*