

Desenvolvimento de metodologia analítica para determinação de resíduos de medicamentos veterinários em carne bovina

Pane, Juliana S.¹; Nogueira, Ana R. A.²; Brondi, Silvia H. G.²

¹Universidade Federal de São Carlos – São Carlos/SP/Brasil – E-mail: julianapane@yahoo.com.Br

²Embrapa pecuária Sudeste – São Carlos/SP/Brasil – E-mail: shgb@uol.com.Br

Introdução

A carne bovina é um alimento altamente consumido pela população, sendo fonte de proteína e de importantes vitaminas tais como, tiamina, niacina, riboflavina, vitaminas B6 e B12, além de minerais como o ferro e o zinco (Ferraz & Machado, 1999). A qualidade da carne consumida pela população deve apresentar valor nutritivo e estar isenta de qualquer substância que possa gerar problemas de saúde aos consumidores. É um dos principais produtos da balança comercial do agronegócio brasileiro, destacando o Brasil numa situação favorável em relação à produção e exportação de alimentos de origem animal em nível mundial, com um plantel de aproximadamente 185 milhões de cabeças de gado, dados de 2004 (fonte: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento – MAPA), destacando como o maior exportador de carne bovina em volume, possuindo o maior rebanho comercial do mundo. Para manter posição de destaque na exportação, o Brasil precisa investir em segurança alimentar, podendo a falta da mesma eliminar o país de mercados mais exigentes como o americano e europeu (Ojima & Bezerra, 2005). A carne pode estar comprometida quando exposta a contaminações químicas, como por exemplo os medicamentos veterinários, destacando os carrapaticidas utilizados durante o processo de produção, no combate ao carrapato (*Boophilus microplus*) e mosca-dos-chifres (*Haematobia irritans*). De acordo com a Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos - USEPA (2004), resíduos de drogas veterinárias são armazenados na gordura e no tecido do animal, podendo causar problemas de saúde nos consumidores que utilizam o alimento contaminado. Tendo em vista o pequeno número de trabalhos na literatura que visam detectar resíduos de medicamentos veterinários em matrizes biológicas, destacando a carne bovina, e que tanto o mercado interno quanto externo começam a exigir cada vez mais alimentos saudáveis, ou seja, livre de substâncias tóxicas, no presente estudo desenvolveu-se uma metodologia analítica para analisar resíduos de carrapaticidas em carne bovina, a qual apresentou-se satisfatória, com valores de recuperação e desvio padrão relativo dentro do intervalo proposto pelo EPA.

Objetivo

Desenvolver e validar uma metodologia analítica, empregando a dispersão da matriz em fase sólida (DMFS), seguida pela cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC-MS), na análise de resíduos de medicamentos veterinários (carrapaticidas), clorfenvinfos, fipronil e cipermetrina, os quais são aplicados no rebanho bovino, utilizando como matriz de estudo a carne bovina.

Material e métodos

Princípios ativos analisados: Foram analisados os princípios ativos fipronil, clorfenvinfos e cipermetrina, com pureza superior a 96,7% (Sigma, Alemanha).

Matriz de estudo: a matriz de estudo foi a carne bovina, procedente de animais criados na Embrapa Pecuária Sudeste.

Metodologia analítica: aplicou-se a dispersão da matriz em fase sólida (DMFS) na extração dos carrapaticidas da matriz carne e “clean-up” da amostra para retirada de constituintes da matriz, e a cromatografia gasosa de alta resolução acoplada à espectrometria de massas (HRGC/MS), como técnica analítica, na separação, quantificação e identificação dos analitos. No desenvolvimento da metodologia analítica, amostras de carne foram fortificadas com os padrões analíticos de clorfenvinfos, fipronil e cipermetrina, sendo em seguida homogeneizadas com 1 g de C18 -octadecilsilano quimicamente ligado à sílica (J. T. Baker, USA) e 1 g de sulfato de sódio anidro (Synth, Brasil). A mistura foi transferida para um cartucho de polietileno, contendo 1 g de florisil (J. T. Baker, USA) pré-ativado com 5 mL de acetonitrila grau HPLC (Mallinckrodt, USA). Os carrapaticidas foram eluídos com 10 mL de solvente acetonitrila, sendo o extrato concentrado para 1 mL em rotaevaporador e analisado por GC/MS, volume injetado de 1 µL. As análises foram realizadas em cromatógrafo a gás, marca Shimadzu, equipado com detector de massas, coluna capilar de sílica fundida, temperaturas do injetor, fonte de íons e interface de 250 °C, temperatura do forno: 145 °C – 4 °C/min – 190 °C – 32 °C/min – 270 °C (5min) – 10 °C/min – 290 °C (10min), sendo o detector de massas operado no modo SIM, monitorando três íons para cada analito em estudo: clorfenvinfos – 170, 267, 323; fipronil – 367, 351, 420; cipermetrina – 163, 165, 181. **Validação da metodologia analítica:** otimizada a técnica de extração e análise cromatográfica, a metodologia foi validada segundo métodos estatísticos tradicionais: desvio padrão, coeficiente de variação, coeficiente de correlação, linearidade, limite de detecção, limite de quantificação e recuperação (Leite, 1996 e Chasin et al., 1998).

Resultados e discussão

A técnica de extração DMFS foi desenvolvida seguindo a metodologia descrita em Lehotay & Mastovská (2005) e Schenk & Wagner (1995). Na DMFS a escolha do suporte-adsorvente recai na polaridade do analito e na natureza da matriz (Barker, 1998). O isolamento de analitos mais polares é realizado com suportes sólidos polares e os analitos menos polares com suportes menos polares. A Figura 1 apresenta o cromatograma do extrato, obtido após aplicar a metodologia analítica DMFS – GC/MS, na concentração de 0,10 mg/kg.

O analito cipermetrina é composto por oito isômeros, apenas quatro detectados no sistema GC/MS – QP2010, sendo os resultados apresentados no presente estudo, referentes à cromatografia das áreas dos quatro picos.

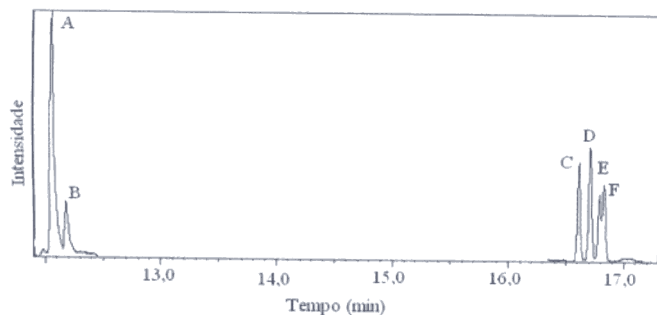


Figura 1. Cromatograma do extrato, após aplicar a metodologia analítica DMFS – GC/MS, fortificação na concentração de 0,10 mg/kg. Coluna capilar de sílica fundida DB-5 (30m x 0,25mm x 0,1µm). A = clorfenvinfos, B = Fipronil, C, D, E, F = isômeros da cipermetrina.

Segundo Lehotay & Mastovská (2005), os alimentos são classificados em não gordurosos (<2% de gordura), pouco gordurosos (2-20%) e altamente gordurosos (>20%), com conteúdo de gordura calculado com base no peso seco. Acetonitrila é um solvente de extração apropriado para matrizes pouco gordurosas, como é o caso da carne estudada (5,0% de gordura), proporcionando altas recuperações, para uma ampla faixa de polaridades de pesticidas, não dissolvendo gorduras com baixa polaridade, proteínas muito polares, sais e açúcares, comuns nos alimentos. A recuperação mede a eficiência do processo de isolamento do analito de interesse da matriz na qual se encontra presente, podendo variar em concentrações baixas. Valores aceitáveis de recuperação foram obtidos ao aplicar a metodologia analítica DMFS – GC/MS para os três analitos estudados, nas concentrações de 0,50; 0,25 e 0,10 mg/kg (Quadro 1), estando dentro do intervalo proposto pelo EPA (Environmental Protection Agency), que é de 70 a 130%, com desvio padrão menor ou igual a 30% (Tolosa et al., 1996).

Quadro 1. Valores de recuperação para os padrões analíticos clorfenvinfos, fipronil e cipermetrina, nas concentrações de 0,5; 0,25 e 0,1 mg/kg, aplicando a técnica de extração por dispersão da matriz em fase sólida e posterior análise dos extratos por GC/MS, na matriz carne.

Acaricidas	Recuperação (%) ± DPR (%)		
	0,5 mg/kg	0,25 mg/kg	0,1 mg/kg
clorfenvinfos	110,0 ± 5,8	120 ± 5,0	117,0 ± 8,0
fipronil	80,0 ± 7,0	85,0 ± 12,0	91,0 ± 9,2
cipermetrina	92,0 ± 4,3	113,5 ± 15,3	115,0 ± 5,3

Para concentrações inferiores, os valores de recuperação estiveram fora da faixa de aceite estabelecida pela legislação, provavelmente por ser a carne uma matriz biológica complexa, composta por proteínas, lipídios, vitaminas, sais minerais, etc, interferentes que não foram removidos na etapa de preparo da amostra, destacando os lipídios, interferiram na sensibilidade das análises e repetibilidade dos resultados. Constantes limpezas no GC/MS foram necessárias durante

as análises, incluindo liner, coluna cromatográfica e fonte de íons, devido à presença de contaminantes que ficaram retidos. O método desenvolvido, DMFS – GC/MS, mostrou-se linear nas concentrações analíticas analisadas, com coeficiente de correlação superior a 0,98 (Quadro 2), demonstrando que o detector de massas responde bem às concentrações injetadas, com limite de detecção inferior a 0,10 mg/kg para os três analitos analisados.

Quadro 2. Valores da equação da reta e coeficiente de correlação para os padrões analíticos clorfenvinfos, fipronil e cipermetrina, aplicando a metodologia analítica desenvolvida: DMFS –GC/MS.

Arrapaticidas	Equação da Reta	Coefficiente Correlação (R ²)
	$Y = 41643x + 2705,4$	0,9866
	$Z = 2709,8x + 963,22$	0,9898
	$Y = 71735x - 405,89$	1

Conclusões

A metodologia analítica desenvolvida: DMFS–GC/MS, mostrou-se apropriada para analisar resíduos de clorfenvinfos, fipronil e cipermetrina em carne bovina, com resultados de recuperação variando de 80,0 a 120,0% e valores de desvio padrão relativo inferiores a 30%, avaliando as concentrações de 0,50; 0,25 e 0,1 mg/kg. Pequena quantidade de amostra, pouco consumo de solventes orgânicos, poucas etapas envolvidas, simplicidade do método e rapidez, tornam a DMFS atrativa quando comparada com técnicas de extração convencionais.

Agradecimentos

Os autores agradecem a FAPESP pelo auxílio financeiro ao projeto.

Referências

- BARKER, S. A. Matrix solid-phase dispersion. LC-GC, Supplement: S37-S40, 1998.
- CHASIN, A. A. M.; NASCIMENTO, E. S.; RIBEIRO-NETO, L. M.; SIQUEIRA, M. E. P. B.; ANDRAUS, M. H.; SALVADORI, M. C.; FERNÍCOLA, N. A. G.; GORNI, R.; SALCEDO, S. Validação de métodos em análises toxicológicas: uma abordagem geral. Rev. Bras. Toxicol., 11: 1-6, 1998.
- FERRAZ, E.; MACHADO, F. M. Alimentos em questão. Disponível em: <http://www.planetaorganico.com.br/carne&leite1.htm> Acesso em: 20 mai. 2006.
- LEHOTAY, S.; MASTOVSKA, K. Evaluation of two fast and easy methods for pesticide residue analysis in fatty food matrices. J. AOAC Int., 88: 630-638, 2005.
- LEITE, F. Validação em análise química. Campinas, editora átomo Ltda, 1996. 64p.
- OJIMA, A. L. R. O.; BEZERRA, L. M. C. Segurança alimentar e logística: o papel na cadeia de carne bovina. V Congresso Brasileiro de Administração Rural. Campinas, 14 a 17 de agosto de 2005.
- SCHENCK, F. J.; WAGNER, R. Isolation of OC and OP pesticide residues in milk (MSPD). Food Addit. Contam., 12: 535-541, 1995.
- TOLOSA, I.; READMAN, J. W.; MEE, L. D. Comparison of the performance of solid-phase extraction techniques in recovering organophosphorus and organochlorine compounds from water. J. Chromatogr. A, 725: 93-106, 1996.
- JSEPA (Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos). Pesticides - The EPA and Food Security, 2004.