

Avaliação da presença de resíduos em leite de vacas tratadas com diflubenzurom

Determination of pesticide residues presence in milk from cows treated with diflubenzuron

RIALA6/1132

Silvia A.V. TFOUNI¹*, Regina P.Z. FURLANI¹, Jefferson D.ARAÚJO², Rosália M. SOUZA²

*Endereço para correspondência: ¹Centro de Química de Alimentos e Nutrição Aplicada, Instituto de Tecnologia de Alimentos – ITAL, Av Brasil, 2880, CEP 13070-178, Campinas/SP, Brasil. Fax: (19) 3242-4585, e-mail: tfouni@ital.sp.gov.br.

²Champion Farmoquímico Ltda, Av. Principal, Lote 12, DAIA, Anápolis, GO/Brasil. CEP: 75133-600

Recebido: 07/05/2007 – Aceito para publicação: 03/01/2008

RESUMO

O diflubenzurom é um pesticida que pode ser utilizado na pecuária como regulador do crescimento de insetos, entre eles a mosca-do-chifre. Esse composto é usualmente administrado oralmente ao gado e é efetivo contra larvas de Díptera que crescem no estrume. O objetivo do presente estudo foi de avaliar a presença de diflubenzurom em amostras de leite cru coletadas de seis vacas leiteiras da raça Girolanda tratadas com uma marca comercial de diflubenzurom em pó. A determinação dos resíduos envolveu a extração do composto com acetato de etila, remoção da gordura com hexano e análise cromatográfica por CLAE com detector UV-Visível (254nm). O princípio ativo diflubenzurom não foi detectado nas seis amostras analisadas (<0,01mg/kg). Dessa forma, os resultados fornecem indicativos de que a utilização do princípio ativo, em níveis suficientes para se obter o efeito inseticida desejado, pode resultar em um leite considerado seguro para o consumo em termos da presença de resíduos de diflubenzurom.

Palavras-chave. diflubenzurom, pesticida, mosca-do-chifre, girolanda, leite, 1-(4-chlorofenil)-3-(2,6-difluorobenzoi)uréia.

ABSTRACT

Diflubenzuron has been a pesticide that can be used in cattle breeding as insect growth regulator, and the horn fly has been an insect that can be controlled by the use of this compound. Diflubenzuron has usually been orally administered to cows, and it has been effective against Diptera larvae growing in manure. The objective of the present study was to evaluate the occurrence of diflubenzuron in milk samples collected from six Girolanda dairy cows treated with a commercial brand of diflubenzuron powder. The pesticide residues determination included the compound extraction with ethyl acetate, fat removal with hexane, and chromatography analysis by HPLC with UV detection (254nm). Diflubenzuron was not detected (<0.01 mg/kg) in any of the six analysed samples. These data indicate that the use of this compound, in adequate doses for achieving a proper insecticide effect, may result in milk considered safe regarding to the presence of diflubenzuron residues.

Key words. diflubenzuron, pesticide, horn fly, girolanda, milk, 1-(4-chlorophenyl)-3-(2,6-difluorobenzoyl)urea.

INTRODUÇÃO

O Brasil é o sétimo maior produtor mundial de leite tendo produzido 23.320 milhões de litros em 2005 e ordenhado em torno de 20.820 mil cabeças de vacas leiteiras¹.

A mosca-do-chifre (*Haematobia irritans*) é um inseto hematófago que se alimenta do sangue de animais através de picadas constantes e doloridas, resultando em um desconforto do animal que passa a apresentar dificuldades para dormir e se alimentar adequadamente. Como consequência, as vacas leiteiras podem apresentar uma queda de até 50% na produção de leite².

A mosca-do-chifre pode ser controlada com o uso de diflubenzurom (1-(4-chlorofenil)-3-(2,6-difluorobenzoil) uréia), um pesticida que é utilizado como regulador do crescimento de insetos, atuando na interrupção da síntese e deposição da quitina^{3,4}. Esse princípio ativo é usualmente administrado por via oral ao gado e é efetivo contra larvas de Díptera que crescem no estrume. O composto, após a administração oral, permanece no estômago dos animais tratados prevenindo que larvas de insetos cresçam no estrume.

O diflubenzurom apresenta baixa toxicidade oral aguda e baixa toxicidade para mamíferos, sendo que o FAO/WHO *Joint Meeting on Pesticide Residues* (JMPR) avaliou o diflubenzurom em 2001 e a IDA (ingestão diária aceitável) de 0,02mg/kg de peso corpóreo estabelecida previamente em 1985 foi mantida⁵.

A administração para o gado de produtos que apresentam o diflubenzurom como princípio ativo são permitidos no Brasil pelo Ministério da Agricultura e foram recentemente introduzidos no mercado nacional. Na legislação brasileira não há LMR (limite máximo de resíduo) estabelecido para diflubenzurom em leite e o *Codex Alimentarius* por sua vez estabelece um LMR de 0,02mg/kg⁶.

Apesar de o diflubenzurom ter seu uso aprovado e ser largamente empregado nos EUA e na Europa, não existem muitos dados disponíveis na literatura relativos à sua presença em leite. Corley et al.⁷ verificaram que não houve detecção de resíduos (<0,1mg/kg) em cinco amostras de leite coletadas de uma vaca leiteira tratada com 1mg/kg de peso corpóreo do princípio ativo. IVIE⁸ estudou o destino de diflubenzurom com marcador após administração de uma única dose oral de 10 mg/kg de peso corpóreo. O estudo foi realizado com uma vaca leiteira e o autor sugere que o uso de diflubenzurom para controle de insetos não resulta em contaminação apreciável do leite. Miller et al.⁹, por sua vez, detectaram resíduos de 0,02mg/kg de diflubenzurom em leite de vaca tratada por três meses com 16mg/kg de peso corpóreo. Com exceção de Ivie⁸, que utilizou um animal da raça Jersey, os outros autores não discriminam a raça empregada no estudo.

Desta forma, apesar da utilização de baixas doses do princípio ativo não apresentar preocupação aparente em relação à presença de seus resíduos em leite, os animais utilizados no Brasil para produção de leite podem ser de raças diferentes daquelas utilizadas nos estudos citados anteriormente, assim

como o clima e a alimentação dos animais são também distintas. Adicionalmente, esse pesticida foi recentemente introduzido no mercado nacional para utilização no controle de insetos na pecuária. Assim sendo, torna-se importante realizar um estudo quanto à possibilidade da presença de resíduo de diflubenzurom em amostras de leite provenientes de vacas leiteiras brasileiras tratadas com esse princípio ativo.

Os objetivos do presente estudo foram adaptar e validar uma metodologia para análise de diflubenzurom em leite e avaliar a sua presença em amostras de leite coletadas de vacas leiteiras da raça Girolanda tratadas de modo a verificar se os níveis encontrados estão de acordo com o LMR estabelecido pelo *Codex Alimentarius*.

MATERIAIS E MÉTODOS

Padrões e reagentes

O padrão secundário de diflubenzurom utilizado foi validado com um padrão analítico do mesmo princípio ativo da *Chem Service*. Foram utilizados: acetato de etila, metanol e hexano (grau HPLC) da Malinckrodt; acetonitrila (grau HPLC) e sulfato de sódio anidro da J.T. Baker. A água foi obtida através de um sistema de purificação Milli-Q da Millipore.

Amostras

No presente estudo seis (6) vacas leiteiras foram tratadas com uma marca comercial de diflubenzurom em pó (Difly S3, Champion Farmoquímico Ltda.) que contém 3% do princípio ativo na formulação. O diflubenzurom foi adicionado ao sal mineral, na proporção de 20g do produto comercial por quilo de sal e fornecido às vacas diariamente por um período de sete (7) meses.

As vacas Girolanda (cruzamento entre Gir e Holstein) utilizadas eram provenientes do cerrado brasileiro e tinham entre 36 e 72 meses de idade e pesavam de 480 a 560kg. Ao final do sétimo mês de administração do composto aos animais, as amostras de leite foram coletadas de cada uma das vacas após cuidadosa higiene do úbere. As amostras de leite *in natura* foram congeladas e armazenadas até serem analisadas.

Extração e limpeza

A metodologia para extração e limpeza da amostra foi baseada no método descrito por Corley et al.⁷.

Após a homogeneização da amostra no laboratório, 5g foram pesados e secos com adição de sulfato de sódio anidro. As amostras foram extraídas em agitador orbital, por 30 minutos, sucessivamente com três alíquotas de acetato de etila (50, 30 e 30mL). As soluções foram filtradas em papel de filtro e os filtrados foram combinados e concentrados em evaporador rotativo a 40°C até aproximadamente 4mL e secos sob fluxo de nitrogênio. O resíduo foi dissolvido em 20mL de acetonitrila e transferido para um funil de separação onde duas alíquotas de 20mL de hexano foram usadas para extração da gordura. A solução de acetonitrila foi concentrada em evaporador

rotativo a 40°C e depois seca sob fluxo de nitrogênio. O resíduo foi dissolvido em 1mL de acetonitrila e filtrado em filtro com porosidade de 0,45µm (PVDF Millex-HV, Millipore) antes da injeção. Todas as amostras foram analisadas em duplicata.

Cromatografia líquida (CLAE)

As análises foram realizadas utilizando-se um sistema cromatográfico equipado com uma bomba Varian modelo 9002 e detector UV-Visível Varian modelo 9050 (comprimento de onda de detecção de 254nm). Para a separação foi utilizada uma coluna analítica C18 (Vydac 201 TP54, 250 x 4,6mm, partículas de 5µm) estável a 30°C e fase móvel composta de 50% água, 25% acetonitrila e 25% metanol (v/v/v) a uma vazão de 1mL/min. O volume de injeção foi de 20µL. Os picos nas amostras foram identificados através de comparação com o tempo de retenção das soluções padrão (16,5min) e através da adição do padrão de diflubenzurom aos extratos para confirmação (co-cromatografia).

Quantificação

A quantificação foi feita por padronização externa. Para a construção da curva analítica foram realizadas injeções de 20µL, em duplicata, das soluções padrão de diflubenzurom em 6 diferentes concentrações (0,05 a 0,52µg/mL). O limite de quantificação foi estimado tomando como base o desvio padrão calculado de sete replicatas de uma mesma amostra de leite de vaca não tratada adicionada de padrão de diflubenzurom no nível de 0,02mg/kg^{10, 11}.

Recuperação

O estudo de recuperação foi realizado adicionando-se quantidades conhecidas de diflubenzurom em amostra de leite,

coletada de uma vaca não tratada, em três diferentes concentrações variando de 0,02 a 0,1mg/kg. As análises das amostras fortificadas, assim como as controles, foram feitas em duplicata. As recuperações foram calculadas pela diferença entre a concentração do composto nas amostras fortificadas e não-fortificadas.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos na validação da metodologia, como recuperação e o limite de quantificação para diflubenzurom em leite estão apresentados na Tabela 1. O coeficiente de variação médio entre as injeções dos pontos da curva analítica foi de 6,5% e coeficiente de correlação (r²) foi igual a 0,9809.

Os valores de recuperação obtidos ficaram entre 78,3% e 83,67%, esses resultados são considerados satisfatórios para determinações em níveis de mg/kg¹² e indicam que os procedimentos de extração e análise empregados são adequados para a matriz analisada.

A Tabela 2 apresenta o consumo médio mensal de diflubenzurom pelas 6 vacas leiteiras utilizadas no estudo. Conforme apresentado na tabela, pode-se verificar que a ingestão média do composto foi de 60,2mg/dia. De acordo com a dosagem indicada pelo fabricante do produto comercial Difly S3, o animal deve consumir em torno de 30mg/dia do princípio ativo para se obter o efeito inseticida desejado. Assim sendo, o consumo médio registrado pelas vacas utilizadas no estudo foi duas vezes maior do que o recomendado, gerando uma margem de segurança quando da avaliação da presença de resíduos no leite.

Tabela 1. Parâmetros obtidos na validação da metodologia para a determinação de diflubenzurom em leite: limite de quantificação (LQ), recuperação (R) e desvio padrão (DP).

	LQ (mg/kg)	Nível de fortificação (mg/kg)	R ± DP (%) ^a
Diflubenzurom		0,02	83,6 ± 20,9
	0,01	0,05	82,5 ± 3,3
		0,10	78,3 ± 13,0

^a Média de duplicata

Tabela 2. Ingestão média de diflubenzurom pelas vacas leiteiras utilizadas no estudo.

	Mês (ano de 2006)							
Ingestão de diflubenzurom (mg/vaca/dia)*	Jun	Jul	Ago	Set	Out	Nov	Dez	Média
	57,6	60,6	68,4	50,4	58,2	64,2	61,8	60,2

* Média da ingestão das 6 vacas.

Os resultados obtidos para as análises das seis amostras de leite coletadas das vacas leiteiras que receberam o princípio ativo mostraram que o diflubenzurom não foi detectado ($< LQ = 0,01 \text{ mg/kg}$) em nenhuma das amostras. Esses resultados estão de acordo com os encontrados em estudos realizados por Corley et al.⁷ e Ivie⁸, que também não detectaram resíduo nas amostras de leite proveniente de vacas que foram tratadas com o mesmo princípio ativo.

As amostras de leite analisadas estão de acordo com o LMR estabelecido pelo Codex para leite, ou seja, menor que $0,02 \text{ mg/kg}$.

Considerando-se que as doses de diflubenzurom consumidas pelos animais no estudo foram superiores à indicada pelo fabricante do produto, verificou-se por meio deste estudo que a utilização do princípio ativo, em níveis suficientes para se alcançar o efeito inseticida desejado, pode resultar na obtenção de leite com níveis de resíduo menores do que o máximo recomendado pela legislação internacional (*Codex Alimentarius*).

REFERÊNCIAS

1. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - EMBRAPA - Embrapa Gado de Leite. Classificação mundial dos principais produtores de leite – 2005. Disponível em: <http://www.cnpqgl.embrapa.br/producao/producao.php>. Acesso em 12 março 2007.
2. Bonafé VL, Carvalho MF. Mosca-do-chifre. CATI Responde, Campinas, n.5, 1996. Disponível em: <http://www.cati.sp.gov.br/novacati/tecnologias/catiresponde/catiresp.html>. Acesso em 12 março 2007.
3. Martins F, Silva IG. Avaliação da atividade inibidora do diflubenzuron na ecdiase das larvas de *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) (Diptera, Culicidae). *Rev Soc Bras Med Trop*. 2004; 37(2):135-8.
4. Silva JJ, Mendes J. Effect of diflubenzuron on immature stages of *Haematobia irritans* (L.) (Diptera: Muscidae) in Uberlândia, State of Minas Gerais, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2002; 97(5):679-82.
5. JMPR – Joint FAO/WHO Meetings on Pesticides Residues. Pesticides residues in food 2001. Part II - Toxicological. Geneva: WHO, 2001.
6. *Codex Alimentarius*. Pesticides Residues in Food (MRLs/EMRLs). Disponível em: http://www.codexalimentarius.net/mrls/pestdes/jsp/pest_q-e.jsp. Acesso em 12 março 2007.
7. Corley C, Miller RW, Hill KR. Determination of N-(4-chlorophenyl)-N'-(2,6-difluorobenzoyl)-urea in milk by high speed liquid chromatography. *JAOAC Int*. 1974;57(6):1269-71.
8. Ivie GW. Fate of diflubenzuron in cattle and sheep. *J Agric Food Chem*. 1978;26(1):81-8.
9. Miller RW, Corley C, Oehler DD, Pickens LG. Feeding TH-6040 to cattle: residues in tissues and milk and breakdown in manure. *J Agric Food Chem*. 1976; 24 (3): 687-8.
10. Taylor JK. Quality assurance of chemical measurements. 1ed. Chelsea: Lewis Publishers Inc. 1987.
11. Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial (INMETRO); Orientação sobre Validação de Métodos de Ensaio Químicos - Documento de caráter orientativo. DOQ-CGCRE-008, Revisão 02 - Junho/2007.
12. Horwitz W, Kamps LR, Boyer KW. Quality Assurance in the analyses of foods for trace constituents. *JAOAC Int*. 1980;63(6):1344-54.