

**“ANÁLISE DO PESTICIDA AMITRAZ EM GATOS POR
CROMATOGRÁFIA GASOSA”**

CLEIDEMAR MOURA MARAFON

**“ANÁLISE DO PESTICIDA AMITRAZ EM GATOS POR
CROMATOGRÁFIA GASOSA”**

CLEIDEMAR MOURA MARAFON

Dissertação apresentada a Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação, Universidade do Oeste Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal

Área de concentração: Fisiopatologia Animal.

Orientadora: Profa. Dra. Silvia M.C. Franco Andrade

543.089 Marafon, Cleidemar Moura
M298a Análise do pesticida amitraz em gatos por
 cromatografia gasosa / Cleidemar Moura Marafon
 . Presidente Prudente: [s.n.], 2008.
 34 f.: il.

 Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) –
 Universidade do Oeste Paulista – UNOESTE: Presidente
 Prudente – SP, 2008.
 Bibliografia.

 1. Amitraz. 2. Cromatografia de Gas. I. Título.

CLEIDEMAR MOURA MARAFON

**“ANÁLISE DO PESTICIDA AMITRAZ EM GATOS POR CROMATOGRAFIA
GASOSA”**

Dissertação apresentada a Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação, Universidade do Oeste Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal

Presidente Prudente, 28 de março de 2008

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Silvia M. C. Franco Andrade
Universidade do Oeste Paulista – UNOESTE

Profa. Dra. Rosa Maria Barilli Nogueira
Universidade do Oeste Paulista – UNOESTE

Profa. Dra Michiko Sakate
Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho – UNESP – Botucatu

DEDICATÓRIA

Este trabalho é dedicado a minha família, pelo estímulo e por compreenderem a minha ausência.

AGRADECIMENTOS

A Deus por ter-me iluminado e guiado esse longo caminho.

A professora e orientadora Silvia, pelo carinho e compreensão.

A professora Cláudia, pelo auxílio no desenvolvimento desse trabalho.

A aluna do 9^a termo do curso de Medicina Veterinária, Regiane Menotti, pela colaboração no desenvolvimento da pesquisa.

Aos meus amigos, Ana Cláudia, Carolina, e Alceu, que embora distantes, sempre farão parte da minha vida.

Aos professores do Mestrado em Ciência Animal, pelos ensinamentos.

As professoras Doutoras Rosa e Cecília, que fizeram parte da banca examinadora na minha qualificação.

Aos colegas mestrandos, Aparecida, Fernando, Nice, Luciana, Sandro, pelas horas de descontração e risos.

Ao Laboratório de Toxicologia da Universidade do Oeste Paulista (UNOESTE), onde foram realizadas as análises.

À Pós-graduação da Universidade do Oeste Paulista (UNOESTE) pelo auxílio financeiro.

Ao meu esposo Pedro, minhas filhas Natália e Talita pelo amor e compreensão.

“Embora sozinho, continue a caminhada. Se todos o abandonarem, prossiga a jornada. Se as trevas crescerem a seu redor, mais uma razão para que você mantenha acesa a pequenina chama da fé. Não deixe que sua luz se apague, para que você mesmo não fique nas trevas. Ilumine com sua luz, as trevas que o circundam”.

C. TORRES PATORINO

RESUMO

Análise do pesticida amitraz em gatos por cromatografia gasosa

O objetivo foi validar um método analítico simples, rápido e de baixo custo para determinação da concentração de amitraz no plasma de gatos intoxicados experimentalmente através de banho, empregando-se a cromatografia gasosa com coluna capilar e detector termiônico específico (CG-DTE). O método mostrou-se linear na faixa entre 20 a 400 ng/mL com coeficiente de correlação igual a 0,9987 e o coeficiente de variação dos pontos da curva de calibração abaixo de 15%. Os limites de detecção e quantificação foram 10 ng/mL e 20 ng/mL respectivamente. A metodologia empregada se mostrou útil e eficiente para detecção do amitraz no plasma de gatos intoxicados com este produto.

Palavras-chave: Amitraz, Cromatografia Gasosa, Gato.

ABSTRACT

Analysis of the pesticide amitraz in cats by gas chromatography

The objective was to validate a sensitive, single, rapid and low cost analytical method is presented for determination of amitraz concentration in cat plasma samples using gas chromatography with capillary column and thermionic specific detector (GC-TSD). The method was linear between 20 to 400 ng ml⁻¹ with regression coefficients corresponding to 0.9987 and the coefficient of variation of the points of the calibration curve lower than 20%. The detection limits and quantification were 10 and 20 ng ml⁻¹ respectively. The proposed method was useful and efficient for detection of the amitraz in the plasma of cats intoxicated with this product in a dipping bath.

Keywords: Gas chromatography; Cat plasma; Amitraz.

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

FIGURA 1- Fórmula estrutural do Amitraz.....	11
FIGURA 2 - Animal intoxicado apresentando intensa midríase.....	13
FIGURA 3 - Animal intoxicado apresentando sedação e sialorréia.....	13
FIGURA 4 - Esquema do aparelho de cromatografia gasosa (CG)..... standard (I.S.) = nitrazepam.....	15

SUMÁRIO

1 REVISÃO DE LITERATURA.....	11
1.1 Amitraz.....	11
1.2 Cromatografia Gasosa.....	14
1.2.1 Validação do Método Analítico.....	16
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	18
2. ARTIGO.....	21

1 REVISÃO DE LITERATURA

1.1 Amitraz

O amitraz, [1,5 - di(2,4-dimetilfenil)-3-metil-1,3,5-triazapento-1,4-dieno], foi sintetizado na Inglaterra em 1969. É um pesticida do grupo das formamidinas, utilizado na agricultura como acaricida de frutas e vegetais no exterior, sendo bastante utilizado, inclusive no Brasil, na Medicina Veterinária como carrapaticida e acaricida para grandes e pequenos animais [1].

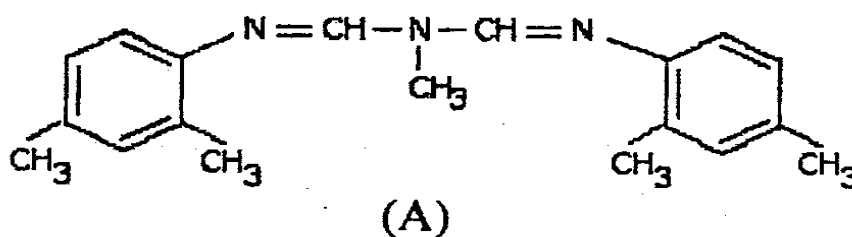


FIGURA 1- Fórmula estrutural do amitraz
 FONTE: Hsu et al, 1986.

O amitraz é a única formamidina aprovada para uso em animal, assim, até hoje, é o princípio ativo deste grupo mais utilizado mundialmente para esta finalidade [2]. O modo de ação do amitraz consiste na inibição da enzima monoaminoxidase (MAO) [3] e principalmente na interação com agonista α_2 -adrenoreceptores [4].

A enzima MAO é encontrada nas mitocôndrias das terminações nervosas simpáticas com a função de controlar o teor de dopamina e noradrenalina, sendo que, o estoque de noradrenalina aumenta quando a enzima é inibida. A MAO ocorre em duas formas, MAO-A e MAO-B, que diferem em relação à sua distribuição regional, à especificidade de substrato e à susceptibilidade à inibição por drogas [5].

A inibição da MAO eleva os níveis intraneuronais de noradrenalina. A hipótese mais recente sustenta a inibição no cérebro da MAO resulta em níveis

centrais aumentados de noradrenalina, levando a um efeito inibidor (*feedback* negativo) sobre o fluxo simpático, similar à ação da clonidina, agonista α -adrenérgico [6].

O amitraz é uma base fraca, relativamente estável em pH alcalino, porém, é instável em meio ácido e sofre degradação quando exposto à luz e/ou à temperatura elevada [7]. Em pôneis e ovelhas, o amitraz é rapidamente absorvido, distribuído, metabolizado e eliminado primariamente por via urinária [8].

Os produtos degradados presentes na urina incluem *N'*-(2,4-dimetilfenil)-*N*-metilformamidina (BTS 27271), 2,4-dimetilformanilida, 4-formamido-3-ácido metilbenzóico, 4-amino-3-ácido metilbenzóico, e muitos metabólitos desconhecidos. O BTS 27271 é o metabólito ativo mais potente do amitraz [8].

Em cães, o amitraz é utilizado topicamente para o tratamento de demodicose [9], e no controle de carrapatos [10]. É um composto altamente lipossolúvel rapidamente absorvido pela pele e mucosas, o que o torna potencialmente perigoso para seres humanos e animais [11].

Além da importância da intoxicação por amitraz em grandes animais causando perdas econômicas, há também a preocupação com os níveis de resíduos encontrados deste acaricida nos tecidos de animais destinados para consumo humano. Junqueira (2002) [12] estudaram, a absorção dérmica do amitraz e verificaram que os níveis de resíduos encontrados no sangue e tecidos no 1^o, 3^o e 15^o dia após a aplicação de dose única do produto. Os valores médios obtidos em $\mu\text{g}/\text{kg}$ foram: 14,01 no sangue (1^o dia), 5,80 no cérebro (3^o dia), 4,81 no rim (3^o dia), 6,40 no fígado (15^o dia), 5,55 na gordura (15^o dia), 5,37 na musculatura esquelética (15^o dia) e 4,15 na musculatura cardíaca (15^o dia).

O Limite de Resíduo Máximo (LRM) preestabelecidos pela organização Mundial de Saúde (WHO) e pela Organização de Alimentos e Agricultura (FAO) para o amitraz na carne é de 0,05 mg/kg. Desta maneira, neste estudo, os valores residuais do amitraz encontrados no sangue e tecidos estavam abaixo dos valores de LRM.

Em recente estudo retrospectivo sobre as causas mais comuns das intoxicações em cães e gatos atendidos no Hospital Veterinário da Universidade de São Paulo entre 1998 a 2000, 13,9% foram causados por pesticidas, dentre eles, 39,3% por organofosforados, 35,7% por carbamatos e 25% por amitraz [13].

Portanto, é uma intoxicação de incidência importante na clínica de pequenos animais. Na literatura, há vários casos de intoxicação por amitraz citados em cães [11,14,15], gatos [16,17], cavalos [18] e seres humanos [19,20].

Andrade et al. [16] descreveram, no estudo realizado com gatos intoxicados experimentalmente com amitraz, por via IV, que os sinais clínicos observados foram principalmente, sedação, perda dos reflexos, hipotermia, bradicardia, arritmia cardíaca, hipotensão, hiperglicemia transitória, midríase, vômitos, e em alguns casos, diurese, aumento do apetite e sialorréia.



FIGURA 2- Animal apresentando intensa midríase.
FONTE: Silvia Franco Andrade



FIGURA 3 - Animal apresentando sedação e sialorréia.
FONTE: Silvia Franco Andrade

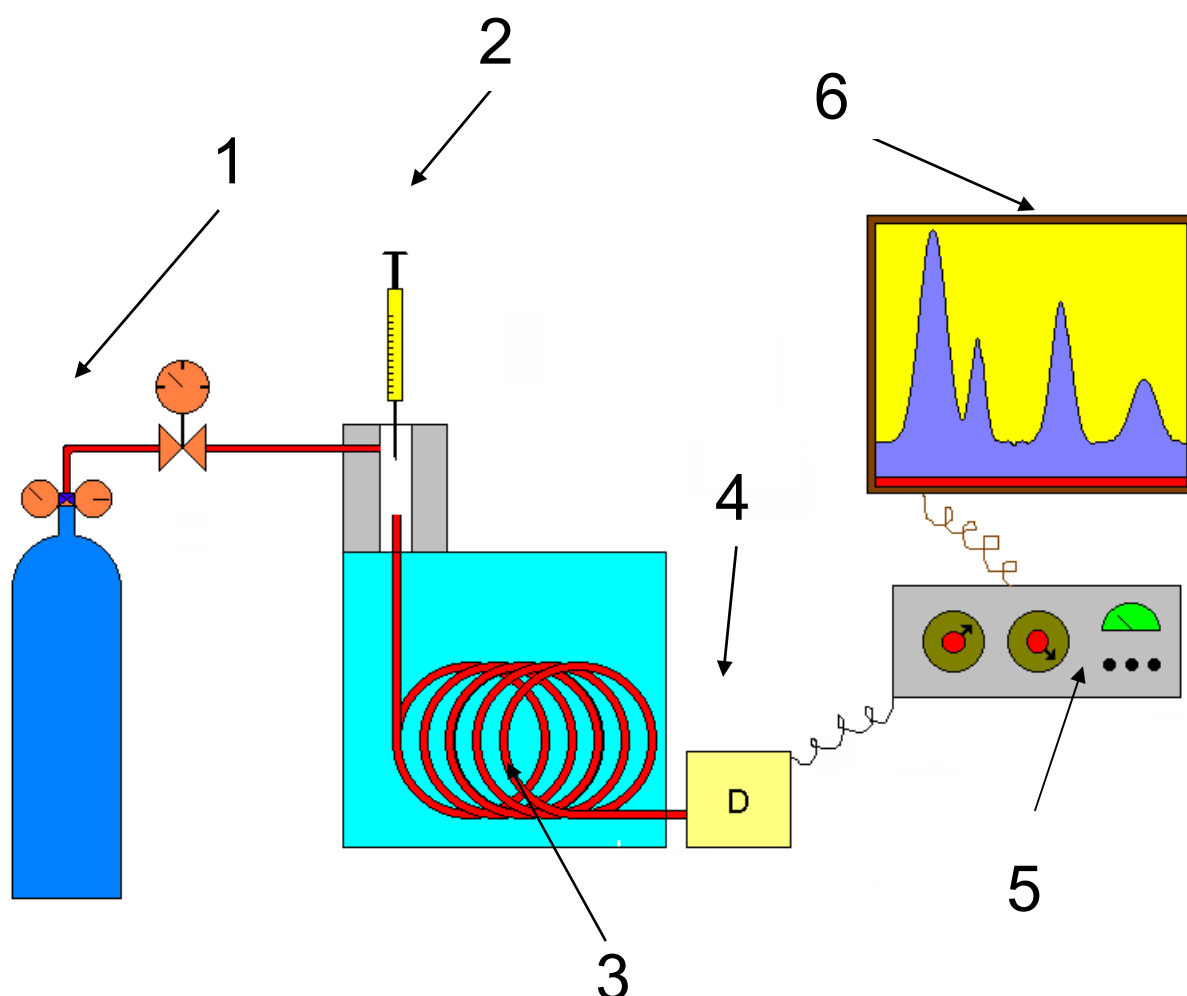
Recentemente, alguns trabalhos avaliaram em gatos a segurança do amitraz por via tópica, por meio de banho, em concentração terapêutica de 0,05% [21] e em concentrações de 0,2 e 0,4% [17]. Nesses estudos, foram demonstrados que erros na diluição do produto, acima da concentração terapêutica de 0,05%, provocam efeitos colaterais característicos do amitraz, que podem ser fatais, principalmente se utilizado em animais hipotérmicos, diabéticos ou com problemas cardíacos.

1.2 Cromatografia Gasosa – CG

A cromatografia a gasosa (GC) é uma das técnicas analíticas mais empregadas para análise de substâncias químicas, tais como, medicamentos, poluentes e pesticidas. A cromatografia gasosa é uma técnica com poder de resolução excelente, possibilitando análise de várias substâncias em uma mesma amostra [22].

Segundo Collins et al. 1993 [23], é essencialmente um método físico de separação em que os componentes a serem separados são distribuídos entre duas fases, uma das quais estacionária e outra móvel (gás inerte), e ocorre como resultado de processos repetidos de adsorção e desorção durante o movimento dos componentes da amostra ao longo da fase estacionária, e a separação é devida à diferença de constantes de distribuição de cada um dos componentes da amostra.

Se a fase estacionária é um líquido tem-se a cromatografia gás-líquido ou cromatografia de partição, se a fase estacionária é um sólido temos a cromatografia gás-sólido ou cromatografia de adsorção. Em qualquer dos casos, a coluna pode ser de empacotamento ou capilar aberto de sílica fundida. A escolha do gás de arraste depende do tipo de detector que é utilizado e dos componentes a serem



LEGENDA: 1- Reservatório de Gás e Controles de Vazão / Pressão.
 2 - Injetor (Vaporizador) de Amostra.
 3 - Coluna Cromatográfica e Forno da Coluna.
 4 - Detector.
 5 - Eletrônica de Tratamento (Amplificação) de Sinal.
 6 - Registro de Sinal (Registrador ou Computador).

FIGURA 4 - Esquema do aparelho de Cromatografia Gasosa (CG)
 FONTE: Collins et al, 1993.

Os gases de arraste para cromatógrafos devem ser de alta pureza e quimicamente inertes, como por exemplo, hélio (He), argônio (Ar), nitrogênio (N₂) e hidrogênio (H₂). Existem vários tipos de detectores, que são dispositivos que transformam as variações do gás de arraste em sinais elétricos, fornecendo informações estruturais sobre as substâncias eluídas.

1.2.1 Validação do método analítico

Validação do método analítico é a confirmação por exame e fornecimento de evidência objetiva de que os requisitos específicos para um determinado uso pretendido são atendidos [24].

De acordo com a Resolução RE nº 899, de 29 de maio de 2003 - ANVISA do "Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos", durante a validação, as características do desempenho do método investigadas no processo de validação, são: especificidade, exatidão, precisão, limite de detecção, limite de quantificação, linearidade, e recuperação.

Especificidade: É a capacidade que o método possui de medir exatamente um composto em presença de outros componentes tais como impurezas, produtos de degradação e componentes da matriz.

Linearidade: É a capacidade de uma metodologia analítica de demonstrar que os resultados obtidos são diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra, dentro de um intervalo especificado.

Precisão: A precisão é a avaliação da proximidade dos resultados obtidos em uma série de medidas de uma amostragem múltipla de uma mesma amostra.

Exatidão: A exatidão de um método analítico é a proximidade dos resultados obtidos pelo método em estudo em relação ao valor verdadeiro.

Limite de Detecção: Limite de detecção é a menor quantidade do analito presente em uma amostra que pode ser detectado, porém não necessariamente quantificado, sob as condições experimentais estabelecidas.

Limite de Quantificação: É a menor quantidade do analito em uma amostra que pode ser determinada com precisão e exatidão aceitáveis sob as condições experimentais estabelecidas.

Recuperação: É um parâmetro que mede a eficiência do procedimento de extração de um método analítico.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] SAKATE, M.; FLÓRIO, J.C.; PALERMO-NETO, Efeitos tóxicos do praguicida amintraz: uma revisão. **J. Comum. Cient. Fac. Med. Vet.Zootec. USP**, v. 116, p. 45-51, 1992.
- [2] SARTOR, I. F.; BICUDO, P.L. **Farmacologia aplicada à medicina veterinária**. 2.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999.
- [3] FLÓRIO, J. C.; SAKATE, M.; PALERMO-NETO. Effects of amitraz on the arterial blood pressure and rectal body temperature of rats. **J. Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.** v. 32, p. 160-164, 1995.
- [4] HSU W. H.; LU Z, X.; HEMBROUGF, B. H. Effect of amitraz on heart rate and aortic blood pressure in conscious dogs: Influence of atropina, prazosin, tolazoline, and yohimbine. **Toxicol. Appl. Pharmacol.**, v. 2, p. 418, 1986.
- [5] RANG, H. P.; DALE, M. M.; RITTER, J. M. **Farmacologia**. 3.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1997.
- [6] FLATTERY, K. V. In: KALANT, H.; ROSCHLAU, W. H. E. **Princípios de farmacologia médica**. 5.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1991.
- [7] GUNARATNAN, P.; WILKINSON, G. T.; SEAWRIGHT, A. A. A study of amitraz toxicity in cats. **Aust. Vet. J.**, v. 60, p. 278, 1983.
- [8] PASS, M. A.; MOGG, T. D Pharmacokinetics and metabolism of amitraz in ponies and sheep. **J.Vet. Pharmacol. Ther.**, v. 18, p. 210-215, 1995.
- [9] LARSSON, E.; GONÇALVES, M. A. Aspectos clínicos da terapia da demodicose canina generalizada com diamidina (amitraz). **Cães e Gatos**, v. 1, p. 6-10, 1996.
- [10] HUGNET, C. et al. Toxicity and kinetic of amitraz in dogs. **Am. J. Vet. Res.**, v. 7, p. 1506, 1996.
- [11] HSU, W. H.; SCHAFFER, D. D. Effects of topical application of amitraz on plasma glucose and insulin concentrations in dogs. **Am.J. Vet. Res.**, v. 49, p. 130, 1988.

[12] JUNQUEIRA, M. C. **Avaliação dos resíduos de piretróides sintéticos e amitraz no sangue e nos tecidos de bovinos.** 2002. p. 116. Dissertação (Mestrado em Vigilância Sanitária) - Faculdade de Medicina Veterinária/Universidade Estadual Paulista, Botucatu.

[13] XAVIER, F.G.; KOGIKA F.G. M. M.; SPINOSA, H. S.. Common causes of poisoning in dogs and cats in a Brazilian Veterinary Teaching Hospital from 1998 to 2000. **Veterinary and Human Toxicology**, v. 44, p.115-116, 2002.

[14] ANDRADE, S. F.; SANCHEZ, O., TOSTES, R. A. Relato de 3 casos incomuns de intoxicação por amitraz em cães. **Clin Vet.**, v. 53, p. 38-40, 2004.

[15] ANDRADE, S. F.; SAKATE, M. The comparative efficacy of yohimbine and atipamezole to treat amitraz intoxication in dogs. **Veterinary and Human Toxicology**, v. 45, p. 124-126, 2003.

[16] ANDRADE, S. F. et al. Yohimbine and Atipamezole on the Treatment of Experimentally Induced Amitraz Intoxication in Cats.. **Int J Appl Res Vet Med.**, v. 4, p. 38-40, 2006.

[17] ANDRADE, S. F. et al. Uso tópico do amitraz em concentração terapêutica em gatos. **Ciência Rural**, v. 37, p. 1027-1029, 2007.

[18] WESTERMANN, C. M., R.A., BOERMA, S. **Amitraz intoxications in the horse: cases and backgrounds.** **Nieuwstad, Tijdschr Diergeneeskd**, v. 129, p. 438-441, 2004.

[19] ELINAV, E. et al. Amitraz poisoning in children. **Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.**, v. 97, p. 185-187, 2005.

[20] AVSAROGULLARI, L. et al. Acute amitraz poisoning in adults: clinical features, laboratory findings, and management. **Clin. Toxicol.**, v. 44, p. 19-23, 2006.

[21] ANDRADE, S. F. Estudo da segurança do uso tópico do amitraz em várias concentrações em gatos. **Acta Sci. Vet.**, v. 35, 724, 2007.

[22] PERES, T. B. Validação de métodos analíticos. **Biológico**, São Paulo, v. 64, p. 224-229, 2002.

[23] COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L.; BONATO, P. S. **Introdução a Métodos Cromatográficos**. 5.ed. Campinas:Ed da Unicamp, 1993.

[24] NBR ISO/IEC 17025. **Requisitos Gerais para a Competência de Laboratórios de Calibração e de Ensaios**. Rio de Janeiro: ABNT, 2001.

2 ARTIGO

Analysis of the pesticide amitraz in cats by gas chromatography

C. M. Marafon^a, C. I. G. Delfim^b, C. A. A. Valadão^c, R. Menotti^d, S. F. Andrade^{e,*}

^aPost-Graduate in Animal Science, University of Oeste Paulista (UNOESTE), Presidente Prudente, SP, Brazil

^bDepartment of Toxicology of Faculty of Pharmacy and Biochemistry of University of Oeste Paulista (UNOESTE), Presidente Prudente, SP, Brazil

^cFaculty of Agricultural and Veterinary Science, UNESP- Jaboticabal, SP, Brazil

^dFaculty of Veterinary Medicine of the University of Oeste Paulista, Presidente Prudente, SP, Brazil

^eDepartment of Small Animal Medicine of Veterinary Hospital of the University of Oeste Paulista (UNOESTE), Rodovia Raposo Tavares, km 572, CEP 19001-970, Presidente Prudente, SP, Brazil

*Corresponding author: Fax:+55-18-32292036
e-mail address:silviafranco@unoeste.br; silviavet@terra.com.br (S.F. Andrade)

Abstract

A sensitive, simple, rapid and low cost analytical method is presented for the determination of amitraz concentration in cat serum samples using capillary column gas chromatography with thermionic specific detection (GC-TSD). The method was linear between 20 and 400 ng ml⁻¹, with a regression coefficient of 0.9987. The coefficient of variation for points on the calibration curve was lower than 15%. The detection limits and quantification were 10 and 20 ng ml⁻¹, respectively. The proposed

method was useful and efficient for the detection of serum amitraz levels in cats intoxicated via a dipping bath.

Keywords: Gas chromatography; Cat serum; Amitraz.

1. Introduction

Amitraz is a formamidine pesticide group used often in veterinary medicine as an acaricide and tickicide [1]. The mechanism of action of amitraz consists of interaction with α_2 -adrenergic receptors and inhibition of the enzyme monoamine oxidase (MAO) [2] [3].

Amitraz is a highly liposoluble compound quickly absorbed by the skin and mucous membranes. As such, potentially dangerous intoxication can occur in humans and animals [4]. There are several cases of amitraz toxicity in dogs [5,6,7], cats [6,8], horses [9] and humans [10,11] mentioned in the literature.

In cats, the use of the amitraz is not recommended, but, due to its accessibility, low cost and efficiency as an acaricide, it continues to be used in the treatment of feline scabies and demodicose [6] [12].

Recent work has evaluated amitraz toxicity in cats, with amitraz given intravenously [13] and topically, via a dipping bath, in concentrations of 0.05, 0.2 and 0.4% [14] [15]. In these studies, the authors demonstrated that, when given intravenously or at concentrations above the therapeutic concentration of 0.05%, amitraz causes characteristic side effects, including sedation, loss of reflexes, decreased motor coordination, bradycardia, hypothermia, polyuria, hyperglycemia, emesis, sialorrhea and mydriasis [13] [14] [15].

For some animal species, standardized analytical methods to determine amitraz concentration already exist and have been validated. Ameno et al. [16]

described an analytical method for the quantification of amitraz in dog plasma via gas chromatography with nitrogen-phosphorus detection (GC-NPD) and demonstrated that the method is useful in evaluating the pharmacokinetics of a single intravenous (IV) dose of amitraz in dogs. Queiroz et al. [17] determined the concentration of amitraz in canine plasma samples, using solid-phase microextraction (SPME) and gas chromatography with thermionic specific detection (GC-TSD), and demonstrated this simple method to be a useful and low cost option for use in toxicity studies in dogs.

There are no current accounts in the literature of a standardized, analytical method to determine amitraz concentrations in cats. Given this, the present study aimed to standardize and validate an analytical method to determine amitraz concentrations in cats experimentally intoxicated with 0.4% amitraz via a dipping bath. Capillary column gas chromatography (GC) with a thermionic specific detector (GC-TSD) was used, with the goal of establishing an important diagnostic tool that is useful in cases of amitraz toxicity in this species.

2. Experimental

2.1. Reagents and analytical standards

Standard amitraz was purchased from USP[®] (Rockville, USA), with purity greater than 97%. Stock solutions of 10 ng ml⁻¹ and 1 ng ml⁻¹ amitraz in acetone were prepared and stored at 4 °C. The internal standard nitrazepam was purchased from Cerilliant[®] (Texas, USA), with purity greater than 97%. A stock solution of 20 ng ml⁻¹ was prepared and stored at 4 °C. The reagents (analytical reagent grade) were purchased from Sigma (Steinheim, Germany).

2.2. Instrumentation

CG analysis was performed on a Varian 3800 gas chromatograph equipped with a thermionic specific detector. Compounds were separated on DB-5 columns from J & W Scientific (Varian, São Paulo, Brazil) (30 m x 0.53 mm I.D. X 1.5 μm film). The injector port and detector were 250 °C and 300 °C, respectively. The column initial temperature was 210 °C. The column temperature was increased from 210 °C to 230 °C at 12 °C min^{-1} , from 230 °C to 250 °C at 7 °C min^{-1} , and from 250 °C to 300 °C at 12 °C min^{-1} . The column temperature then remained at 300 °C for 11.5 min.

2.3. Optimization of the GC-TSD conditions

The GC was determined for the analysis of samples of bovine serum (used as blank) enriched with amitraz at concentrations ranging from 20 to 400 ng ml^{-1} (Fig. 1).

Into a 15 ml glass tube containing 1 ml of bovine serum, standards containing known concentrations of amitraz were added, along with 7 ml of n-hexane. The extraction was carried out under agitation for 10 minutes. An aliquot of 5 ml was transferred to another test tube to allow for the evaporation of the organic phase under nitrogen flow at room temperature. The residue was reconstituted in 25 μl of acetone containing an internal standard (nitrazepam, 20 $\mu\text{g ml}^{-1}$). Two microliters of this extract was injected into the gas chromatograph.

2.4. Intoxication of cats

These experiments were approved by the Ethical Committee of UNOESTE (protocol n. 012/06). Using the report from Queiroz et al. [17] that standardized the detection of amitraz in the plasma of two dogs using GC-TSD as a guide, this experiment used three mixed-breed adult cats (2 males and 1 female), 2 to 5 years of age, mean weight 4.9 ± 1.0 kg, obtained from the UNOESTE cat pound. Cats were

subjected to physical exams, and only those with normal values for the following physiological parameters were used: temperature (T), respiratory rate (RR), heart rate (HR), systolic arterial pressure (SAP), electrocardiogram (ECG), pupil diameter (PD), red (RBC) and white (WBC) blood cell count, urea, creatinine, alanine aminotransferase (ALT), and aspartate aminotransferase (AST). Blood samples were collected by jugular puncture. One day prior to the start of the experiment, the cats were socially isolated and held in individual stainless steel cages under a 12:12 artificial light-dark cycle at room temperature and fed ad libitum.

Intoxication of the cats via an amitraz dipping bath, at a concentration of 0.4%, was in agreement with the conditions used in a study performed by Andrade et al. [15].

Blood samples were collected by jugular vein puncture at 5, 30, 120, 240 and 480 min after the cats were dipped in the amitraz bath. The blood was immediately placed in heparinized tubes. Serum samples were obtained by centrifugation and 2 ml of serum was added to a solution of borate buffer (pH 12, 0.01M) at a proportion of 1:1. Serum samples were stored at -20°C until the time of analysis.

The following parameters were measured at the same time that blood samples were collected: T, RR, HR, SAP, ECG, PD and sedation degree (SED). Statistical analysis was accomplished by Student T test [18]. A significance level of $P < 0.05$ was adopted.

3. Results and Discussion

3.1. Validation of the method

The linearity of the assay was determined using bovine serum enriched with amitraz added to the internal standard after evaporation. The interval evaluated (20

to 400 ng ml⁻¹) was linear, with a correlation coefficient of 0.998 and a linear regression equation of $y = 0.0036x + 0.1663$. The detection limit was 10 ng ml⁻¹ of amitraz by the method of progressive dilution. The limit of quantification (LOQ) of amitraz was of 20 ng ml⁻¹, and the coefficients of variation (C.V.) used to prepare the calibration curve were all below 15%.

Precision was determined by the percent coefficient of variation of within- and between-day variations of three different concentrations (Table 1). The within-day variation ranged from 10.24 to 18.76%, and the between-day variation ranged from 4.24 to 6.63% (statistical analysis performed using ANOVA). The study of absolute recovery was performed by comparing the relative area of the amitraz added to the extract that had not undergone the extraction process to the relative areas obtained for substances that had undergone the extraction process. Under the best conditions, this was between 76.9 and 82%. The selectivity of the method was demonstrated by the satisfactory separation of the components without interfering peaks in the chromatograms of drug-free serum from cats (Fig. 2).

3.2. Determination of amitraz concentrations in feline plasma samples

The calibration graphs for the determination of serum amitraz concentrations were based on peak area ratios (area amitraz/area nitrazepam) versus the concentration in serum standards spiked with amitraz in linear intervals from 20 to 400 ng ml⁻¹.

The amitraz concentrations in the feline samples were between 15.68 and 96.20 ng ml⁻¹ (Table 2). Figure 2 demonstrates a chromatogram of the extract from cat number 2, generated using capillary column gas chromatography with a thermionic

specific detector. The serum amitraz level after 120 min in the 0.4% amitraz dipping bath was 31.24 ng ml⁻¹.

3.3. Clinical signs of toxicity

The cats dipped in the 0.4% amitraz bath showed classic clinical signs of amitraz toxicity (Table 3), including hypothermia, decreased HR and SAP, sedation and mydriasis. All of these are in agreement with other reports in the literature [5,6,7]. No significant alterations were seen on the ECGs. However, one animal demonstrated sinus bradycardia 120 min after being subjected to the amitraz bath. There were no alterations in RR in any of the animals.

Clinical signs of toxicity occurred most frequently at 120 and 240 min after treatment, which coincides with the time at which serum amitraz levels reached their maximum (Table 2).

4. Conclusion

There are several advantages to the proposed methodology for evaluating serum amitraz levels in cats, including the speed, low cost and simplicity of the method. Based on this, the present analytical method of using GC-TSD should be considered a useful tool in the diagnosis of topically induced amitraz toxicity in cats, as well as a new methodology to study the pharmacokinetics of this acaricide in this species.

Acknowledgements

The authors thank the post-graduate program of UNOESTE for financial support.

References

- [1] A.T. Proudfoot, *Rev Toxicology*. 22 (2003) 71.
- [2] J. C. Flório, M. Sakate, J. Palermo-Neto, *Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.* 32 (1995) 160.
- [3] W. H. Hsu, Z.X. Lu, F.B. Hembrough. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 2 (1986) 418.
- [4] W. H. Hsu, D.D. Schaffer, *Am.J. Vet. Res.* 49 (1988) 130.
- [5] C. Hugnet, F. Buronrosse, X. Pineau, J.L. Cadore, G, Lorgue, P.J. Berny, *Am. J. Vet. Res.* 7(1996) 1506.
- [6] S.F. Andrade, O. Sanchez, R.A. Tostes, *Clin Vet.* 53 (2004) 38.
- [7] S.F. Andrade, M. & Sakate, *Veterinary and Human Toxicology*. 45 (2003) 124.
- [8] P. Gunaratnan, G.T. Wilkinson, A.A. Seawright. *Aust. Vet. J.* 60 (1983) 278.
- [9] C. M. Westermann, S.Boerma, R.A. Nieuwstad, *Tijdschr Diergeneeskd.* 129 (2004) 438.
- [10] E. Elinav, Y. Aspira, Y. Ofran, T. Hassin, I.Z. Ben-Dov, *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.* 97 (2005) 185.
- [11] L. Avsarogullari, I. Ikizceli, M. Sungur, E. Sozuer, O. Akdur, M. Yucei, *Clin. Toxicol.* 44 (2006) 19.
- [12] R.S. Muller, *Vet. Dermatol.* 15 (2004) 75.
- [13] S.F. Andrade, M. Sakate, C.B. Laposy, & Sangiorgio, *Int J Appl Res Vet Med.* 4 (2006) 38.

- [14] S.F. Andrade, Laposy.C.B, Cardoso. S.C, Sakamoto. K.P, Motta. Y.P, *Ciência Rural*. 37 (2007) 1027.
- [15] S.F. Andrade, Laposy.C.B, C. Michelin, J. P. Smerdel, V. Zamberlan, C. Salesse, K. Sakamoto, Y. P. Motta. *Acta Sci. Vet.* 35 (2007) 724.
- [16] K. Ameno, F.B. Fuke, S. Ameno, T. Shinohara, I. Ijiri, *J. Anal. Toxicol.* 15 (1991) 116.
- [17] M.E.C. Queiroz, C.A.A. Valadão, A. Farias, D. Carvalho, F.M. Lanças, *J. Chromatogr. B.* 794 (2003) 337.
- [18] R.G.B. STEEL, TORRIE J.H. *Principles and procedures of statistics*. 2 ed., New York, McGraw-Hill. (1980) 633p.
- [19] S.I. BISTNER, R.B. FORD. *Manual de procedimentos veterinários e tratamento emergencial*. 7. ed. São Paulo, Roca. (2002) 934p.

Table 1. Within- and between-day precision of the procedure, measured using serum samples spiked with amitraz.

Concentration (ng ml⁻¹)	Within-day (n=5) C.V. (%)	Between-day (n=5) C.V. (%)	Inaccuracy C.V. (%)
30	18.76	6.63	5.8
100	11.87	4.67	1.82
300	10.24	4.24	- 4.27

C.V. (coefficient of variation)

Table 2. Determination of amitraz in serum samples of cats (n=3) dipped in an amitraz solution (0.4%).

Collect time (min)	Plasma amitraz concentration (ng ml ⁻¹)		
	Cat n.1	Cat n.2	Cat n.3
5	20.47	29.75	19.48
30	51.03	34.13	26.09
120	66.54	31.24	50.21
240	96.20	19.18	94.07
480	37.89	15.68	31.79

Table 3. Means (\pm SD) of temperature (T), respiratory rate (RR), heart rate (HR), systolic arterial pressure (SAP). Medians (quartiles P25;P75) of pupil diameter (PD) and sedation degree (SED) of cats (n=3) intoxicated via a 0.4% amitraz bath.

Parameters	Time (min)				
	5	30	120	240	480
T ($^{\circ}$ C)	37.9 \pm 0.2	37.1 \pm 0.5	36.1 \pm 0.5*	36.0 \pm 0.5*	35.2 \pm 0.6*
RR (rpm)	49.3 \pm 10.1	46.7 \pm 26.6	44.0 \pm 14.4	40.7 \pm 7.0	43.3 \pm 1.2
HR (bpm)	226.0 \pm 11.5	193.0 \pm 30.6	176.7 \pm 20.8*	183.3 \pm 15.3*	193.3 \pm 23.1
SAP (mmHg)	175.3 \pm 11.7	168.2 \pm 32.7	144.7 \pm 43.9*	156.7 \pm 30.6*	163.3 \pm 23.1
DP^a	1(1;1)	2 (2;2)*	2 (2;2)*	2 (2;2)*	2 (1;2)*
SED^b	0 (0;0)	0 (0;1)	1(1;2)*	2 (1;2)*	2 (1;2)*

*significant difference ($p < 0.05$) in relation to the 5 min time point

^apupil diameter: (1) normal; (2) mydriasis; (3) myosis

^bsedation degree: (0) without; (1) light; (2) moderate; (3) high

Normal Values: T: 38.1 – 39.2 $^{\circ}$ C; FC: 120 – 240 bpm; FR: 20 – 50 mpm; PAS: 120 – 170 mmHg [19]

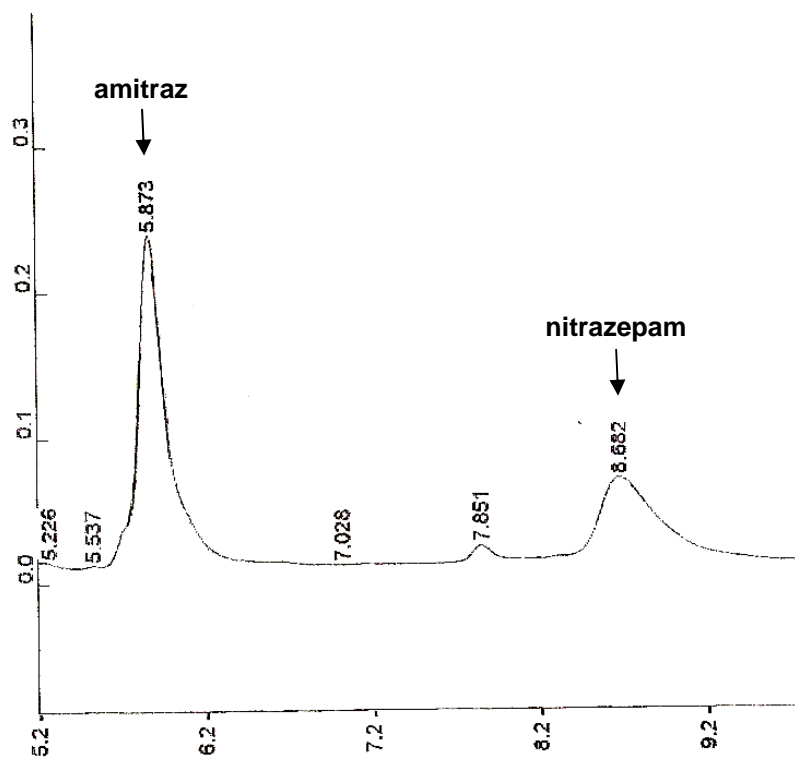


Fig. 1. Gas chromatogram of the injection of 2 μl of standard amitraz in 300 $\text{ng } \mu\text{l}^{-1}$ acetone and 20 $\text{ng } \mu\text{l}^{-1}$ nitrazepam.

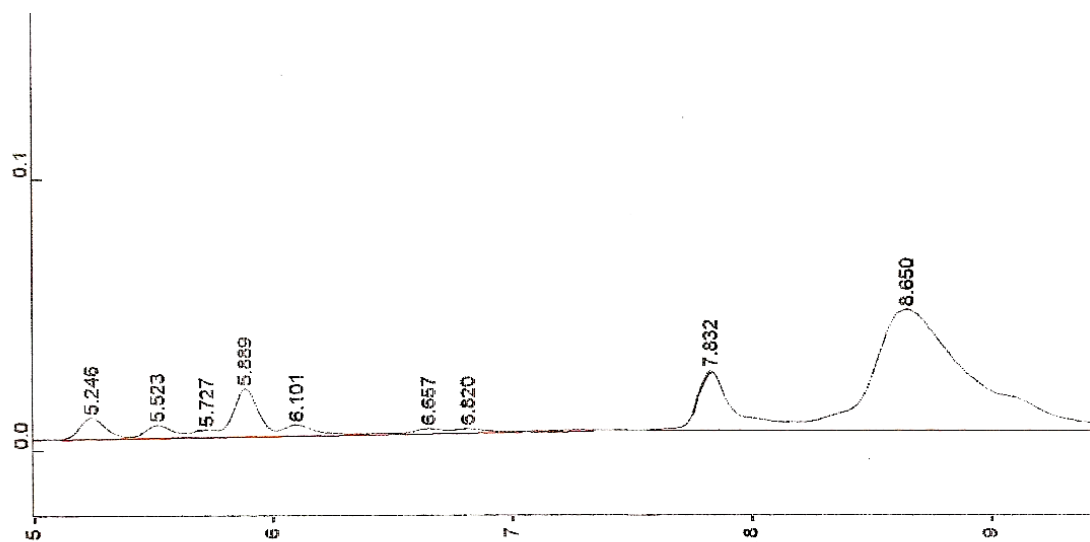


Fig. 2. Gas chromatogram of serum from cat number 2 after being dipped in a 0.4% amitraz bath. The resulting serum amitraz level was 31.24 ng ml^{-1} . Internal standard (I.S.) = nitrazepam.