

UM PROCEDIMENTO RÁPIDO PARA A ANÁLISE DE PESTICIDAS ORGANOCLORIDOS EM CREME DE LEITE

Maria Lúcia RIBEIRO*
José Luiz MONFARDINI*
Aeroválido DEL'ACQUA*

RESUMO: A análise de resíduos de pesticidas organoclorados em alimentos e outras matrizes complexas, por cromatografia em fase gasosa, geralmente envolve a extração dos pesticidas e a purificação dos extratos obtidos. Estas operações podem ser realizadas numa única etapa quando se emprega ácido sulfúrico, dispensando, inclusive, o isolamento da gordura das amostras. A viabilidade de aplicação do método para creme de leite foi estudada, efetuando-se análise de recuperação, pela adição às amostras de solução padrão em concentração equivalente a 0,2 µg/g para α - e γ -HCH e 0,4 µg/g para p,p'-DDE e o,p'-DDT. A partir dos resultados preliminares, o procedimento foi ajustado até obtenção de recuperação mínima de 70%; a metodologia foi aplicada a amostras de creme de leite comercial sendo detectados α - e γ -HCH, heptacloro, heptacloro epóxido e p,p'-DDE.

UNITERMOS: Determinação de resíduos; pesticidas organoclorados; creme de leite; clean-up; cromatografia em fase gasosa.

INTRODUÇÃO

O emprego de pesticidas organoclorados no combate às pragas da agricultura vem sendo restringido desde a década de 70 em diversos países e, mais recentemente, também no Brasil. Entretanto, DDT e HCH ainda são empregados no combate a vetores da malária e da Doença de Chagas^{1,2}. Para eliminar formiga saúva e cupim das plantações de cana estão liberados mirex e heptacloro, respectivamente.

* Departamento de Química Orgânica - Instituto de Química - UNESP - 14800 - ARARAQUARA - SP.

Não apenas pelo fato de alguns pesticidas desta classe estarem ainda liberados, mas também pela ausência de um controle rigoroso de comercialização – como ocorreria se o receituário agrônômico fosse uma prática adotada em todo o país – é preciso manter vigilância quanto à presença destes compostos nos alimentos.

Os pesticidas organoclorados possuem caráter acumulativo e, alguns deles, vida média elevada no meio ambiente, o que justifica a preocupação dos pesquisadores em desenvolver métodos e efetuar levantamento de dados para monitorá-los nos alimentos e no meio ambiente, mesmo que um dia sejam totalmente banidos.

Uma discussão ampla e crítica, a nível de Brasil, sobre alterações comportamentais produzidas pela intoxicação aguda ou prolongada por praguicidas foi recentemente publicada³. Os autores questionam, entre outros, alguns problemas importantes, tais como:

- os riscos que representa para a saúde a existência de resíduos de praguicidas nos alimentos;
- o custo elevado dos laboratórios para a análise de resíduos, não só pelo equipamento como por sua manutenção;
- a inexistência no Brasil de monitoramento de alimentos contaminados por praguicidas.

A presença de pesticidas organoclorados em leite e seus derivados tem sido objeto de um número elevadíssimo de trabalhos. A busca de desenvolvimento de metodologia mais simples do que a oficial está refletida em muitos deles^{4 a 12}; em outros, o objetivo principal é a determinação dos teores de contaminantes em leite e produtos lácteos, principalmente queijo e manteiga, com a finalidade de levantamento de dados^{13 a 18}. A presença destas substâncias a nível de resíduos em leite materno^{19 a 22} e leite materno artificial²³ torna o problema ainda mais relevante.

O número reduzido de publicações^{24, 25} que incluem amostras de creme de leite se deve, provavelmente, ao baixo consumo deste produto quando comparado a leite, queijo e manteiga. Nestes trabalhos, o objetivo principal é verificar a influência do processamento tecnológico sobre o teor de clorados na fabricação de produtos lácteos. As matrizes são previamente contaminadas com clorados e estuda-se a variação dos níveis destas substâncias, antes e após o processamento tecnológico.

Este trabalho pretende dar uma contribuição para a análise de resíduos de pesticidas organoclorados em um derivado de leite, pela adaptação de um procedimento já testado em nosso laboratório para matrizes de leite²⁶ e de queijo parmesão²⁷. Foram necessárias algumas modificações experimentais na etapa da fortificação das amostras, uma vez que os resultados de recuperação não indicavam a viabilidade do procedimento. Neste sentido, é necessário ressaltar que, ao se efetuar a transposição de uma técnica de *clean up* de uma matriz para outra, todos os parâmetros experimentais devem ser testados e otimizados, principalmente no que tange aos dados de recuperação, para que o procedimento proposto forneça resultados reprodutíveis e que possam ser usados em levantamento de dados.

EXPERIMENTAL

1. Materiais, reagentes e equipamento

No processo de extração e purificação dos extratos foram utilizados os seguintes materiais:

- éter de petróleo p.a.; metanol p.a.; isooctano p.a. e acetona grau pesticida. O éter de petróleo foi purificado como previamente descrito²⁸ e os demais solventes p.a. por destilação fracionada.
- A pureza dos solventes foi acompanhada por controle cromatográfico, antes e após concentração adequada.
- os padrões de pesticidas organoclorados foram fornecidos pela Environmental Protection Agency (EPA) e suas soluções preparadas em isooctano.
- ácido sulfúrico p.a., 95–97%, dens. 1,84g/cm³.
- funil de separação, 1000 ml, com torneira soprada.
- concentrador Kuderna Danish.

Todo o material de vidro foi lavado, seco e armazenado seguindo as recomendações descritas anteriormente²⁸.

A análise cromatográfica foi efetuada empregando-se um cromatógrafo a gás CG, modelo 35370, munido de detector de captura de elétrons com fonte de trítio e coluna cromatográfica de níquel de 6 pés comprimento vs. 1/8" diâmetro empacotada com 1,5% OV-17 e 1,95% QF-1, sobre Chromosorb WHP, sob as seguintes condições: 1º coluna 180 a 190°C, 2º injetor 200 a 210°C, 3º detector 200 a 210°C, fluxo de nitrogênio 40 a 45ml/min., atenuação 3 nA (amostras testemunhas) e 10 nA (amostras fortificadas).

2. Método

2.1. Determinação da Porcentagem de Gordura das Amostras

O teor de gordura das amostras foi determinado pelo método do lactobutírometro de Gerber²⁹, introduzidas algumas modificações: 11,0 ml de uma suspensão aquosa de creme de leite a 20% (p/v) foi transferida lentamente para o lactobutírometro contendo 10,0 ml de ácido sulfúrico; 1,0 ml de álcool n-amílico foi adicionado; a solução foi homogeneizada, colocada em banho a 70°C durante 15-20

minutos e efetuada a leitura. O teor de gordura no creme de leite foi obtido multiplicando-se o valor experimental por cinco.

2.2. Preparação das Amostras

Amostras Testemunhas: Estas amostras foram preparadas pesando-se 25,00 g de uma solução aquosa a 20% (p/v) de creme de leite (correspondente a 1,0 g de gordura), adicionando-se 10 ml de metanol e agitando-se manualmente por 5 minutos (sol. A).

Amostras Fortificadas: O estudo de recuperação foi realizado em amostras preparadas como as testemunhas, às quais foram adicionados 0,5 ml de uma solução padrão em acetona de α - e γ -HCH (400 pg/ μ l) e p.p'-DDE e o.p'-DDT (800 pg/ μ l) (sol. A').

2.3. Extração e Purificação

A solução A (ou A') foi transferida quantitativamente para um funil de separação; com o funil na posição horizontal, 20 ml de ácido sulfúrico concentrado foram adicionados lentamente; durante esta adição o funil foi submetido a movimentos rotatórios suaves até não se observar mais partículas de leite coagulado. O sistema foi mantido em repouso até alcançar a t° ambiente e, então, 40 ml de éter de petróleo foram adicionados; efetuou-se a extração (agitação suave por 3 minutos), aguardou-se 15-30 minutos e descartou-se a fase ácida. O extrato etéreo foi tratado com 1 ml de ácido sulfúrico (como indicado anteriormente) desprezando-se a fase ácida. Este procedimento foi repetido até obtenção de extrato etéreo incolor; a fase etérea foi transferida para um sistema Kuderna-Danish, concentrada até 5,0 ml e 5,0 μ l foram injetados no cromatógrafo.

2.4. Análise Quantitativa

A análise quantitativa foi efetuada através da comparação dos tempos de retenção e da área (ou altura) entre os picos de cromatogramas de extratos e padrões, analisados sucessivamente.

2.5. Análise de Recuperação

Os dados de recuperação do método proposto foram obtidos efetuando-se análises paralelas, de amostras testemunhas e fortificadas; deste modo, os valores

percentuais de recuperação para os pesticidas adicionados foram calculados por diferença dos resultados.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Das publicações indicadas pela literatura foi selecionado, para desenvolver este trabalho, o método sugerido por VEIEROV & AHARONSON²⁰, já adaptado em nosso laboratório para análise de leite²⁶ e queijo²⁷; esta escolha foi fundamentada no fato de suas características atenderem aos nossos objetivos gerais: procedimento rápido e econômico, adequado para análise de varredura. A aplicação desta técnica, via ácido sulfúrico concentrado, permite que se efetue a extração dos pesticidas e o *clean up* das amostras em uma única etapa, sem o isolamento prévio da gordura, o que reduz o tempo de análise e evita a contaminação do extrato final, com um teor de gordura residual que possa prejudicar a determinação cromatográfica.

A aplicação com sucesso de um procedimento para análise de resíduos em amostras ricas em lipídios depende, essencialmente, da extração de resíduos não polares do glóbulo de gordura⁴. SUZUKI *et alii*⁸ relacionam a eficiência de recuperação do método à ruptura da membrana do glóbulo de gordura, no qual o pesticida será incorporado. A eficiência é melhorada quando se adiciona ao sistema um solvente como acetoneitrila ou álcool.

BEROZA & BOWMAN³¹, por sua vez, além de discutirem esta mesma relação, consideram a distribuição dos pesticidas nas amostras: pesticidas não polares adicionados ao leite são absorvidos na fase cremosa, não penetrando totalmente no glóbulo de gordura. Como consequência, baixas recuperações são observadas pela incorporação dos pesticidas na fase aquosa do sistema. A adição de metanol ou etanol contorna este problema.

Ao serem obtidos os resultados preliminares de recuperação, verificou-se que os dados não eram semelhantes aos comunicados pelos autores em análise de leite³⁰, os baixos valores de recuperação obtidos, entre 54 e 65% (Tabela 1), sugeriram que a ineficiência da recuperação poderia estar relacionada com a incorporação dos pesticidas adicionados às matrizes, como abordado por SUZUKI & BEROZA³¹. Uma outra modificação foi então introduzida no procedimento original: a adição de um volume adequado de metanol às amostras, antes de efetuar o *clean up*, forneceu resultados de recuperação entre 80 e 103% para os pesticidas estudados (Tabela 1), compatíveis com aqueles descritos por SINGH & CHAWLA⁸, VEIEROV & AHARONSON²⁰ e ADACHI *et alii*⁹ em análise de leite (Tabela 2). Os resultados dos dois primeiros autores se referem a métodos de análise que empregam ácido sulfúrico.

TABELA 1 - Resultados Percentuais de Recuperação de Creme de Leite

Padrões	Nível de Fortificação (µg/g)*		Porcentagem de Recuperação	
	Sem Adição de Metanol**	Com Adição de Metanol*	Sem Adição de Metanol**	Com Adição de Metanol*
α-HCH	0,2	80	56	80
γ-HCH	0,2	92	55	92
p,p'-DDE	0,4	88	54	88
o,p'-DDT	0,4	103	65	103

* cálculo em termos de gordura

** média de 4 análises

TABELA 2 - Comparação do Estudo de Recuperação entre Quatro Métodos

Padrões	Método Proposto		Singh ⁸		Veierov ³⁰		Adachi ⁵	
	A	B	A	B	A	B	A	B
α-HCH	0,2	80	0,02	74	0,5	93	0,4	98
γ-HCH	0,2	92	0,02	94	0,5	96	0,4	91
p,p'-DDE	0,4	82	0,02	79	0,5	98	0,5	89
o,p'-DDT	0,4	103	0,05	93

A = nível de fortificação (mg/g)

B = recuperação (%)

O procedimento pode ser então aplicado a algumas amostras de creme de leite de uma única marca.

Em todas as amostras analisadas foram detectados α- e γ-HCH, heptacloro, heptacloro epóxido e p,p'-DDE. Destes, apenas α-HCH e p,p'-DDE foram quantificados, em média 0,03 e 0,06 µg/g, respectivamente; estes valores estão expressos em termos de gordura do produto (Tabela 3). Para os demais pesticidas os níveis detectados foram inferiores ao limite de detecção do método (0,01 µg/g).

Mesmo considerando não significativo o número de amostras de creme de leite estudadas, está ilustrada na Tabela 3 uma comparação entre os dados quantitativos obtidos por este procedimento e por outros autores, para determinação de pesticidas comumente detectados em leite e/ou derivados. Os dados de LARA *et alii*¹⁷ e ALBERT³² foram

TABELA 3 - Teores de Pesticidas Organoclorados Detectados em Creme de Leite e em Produtos Lácteos (µg/g)

Pesticida	Método Proposto (Creme de Leite e Derivados)		Stein-Wandter ¹¹		Lara ¹⁷		Albert ³²	
	Leite	Derivados	(Leite)	(Leite)	(Leite)	(Leite)	(Leite)	(Leite)
α-HCH	0,03	0,084	0,020	0,020	0,05-0,30	0,04-0,07		
γ-HCH	tr	0,049	0,016	0,016	0,01-0,06	nd-tr		
heptacloro-heptacloro-epóxido	tr	-	-	-	-	-	tr-0,01	
p,p'-DDE	0,06	0,024	0,019	0,019	0,00-0,08	1,3-3,7		
p,p'-DDT	-	0,041	0,001	0,001	0,00-0,01	0,06-0,15		

obtidos em estudos efetuados no Brasil e México em 1981 e 1976 respectivamente; Lara, aplicando a metodologia oficial e Albert, métodos desenvolvidos no Canadá e Inglaterra. Os dados de SINGH⁸ foram incluídos porque é a mais recente proposta de uso de ácido sulfúrico na análise de clorados em leite e derivados registrada na literatura. O método de STEINWANDTER¹¹ é uma proposta moderna, onde as amostras de leite, após prévia homogeneização com sílica, são diretamente submetidas à purificação em coluna, também de sílica. Pode-se verificar que não há grande discrepância entre os resultados indicados na Tabela 3, mesmo quando são comparadas metodologias tão diferentes.

Uma análise global dos resultados permite concluir que o procedimento descrito pode ser aplicado em estudos de triagem na determinação de resíduos de pesticidas organoclorados, estáveis em ácido sulfúrico.

RIBEIRO, M. L. *et alii* - A rapid procedure for organochlorine pesticides analysis in milk cream. *Ecl. Quím.*, São Paulo, 13: 81-88, 1988.

ABSTRACT: Organochlorine pesticide residues analysis in food and other complex matrices by gas chromatography, is generally performed after pesticides extraction and clean up on the prepared extracts. These two procedures can be performed in a single step when sulfuric acid is employed without fat isolation of the sample. The viability of the method for milk cream was studied by recuperation analysis, adding to the samples the standard solutions at concentration levels of 0.2 µg/g for α- and γ-HCH and of 0.4 µg/g for p,p'-DDE and o,p'-DDT. From our preliminary results, the procedure was adjusted to 70% of minimum recovery. The methodology was applied to commercial milk cream samples and the α- and γ-HCH, heptachlor, heptachlor epoxide and p,p'-DDE were detected.

KEY-WORDS: Residues determination; organochlorine pesticides; milk cream; clean up; gas chromatography.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ALMEIDA, W. F. - *Tese de Doutorado, Universidade de São Paulo*, São Paulo, 1972.
2. LARA, W.; BARRETO, H. H. C. & GARCIA, M. V. - *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, **41**, 9 (1981).
3. PALERMO NETO, J.; BERNARDI, M. M. & SPINOSA, H. S. - *Ciênc. e Cult.*, **39**, 1017 (1987).
4. LUKE, M. A. & DOOSE, G. M. - *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, **32**, 651 (1984).
5. ADACHI, K.; OHOKUNI, N.; MITSUHASHI, T. & YOSHIDA, M. - *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **66**, 1315 (1983).
6. VENANT, A.; BORREL, S. & RICHOU-BAC, L. - *Analusis*, **10**, 333 (1982).
7. VENANT, A.; CUMONT, G. & RICHOU-BAC, L. - *Analusis*, **12**, 266 (1984).
8. SINGH, P. P. & CHAWLA, R. P. - *Talanta*, **29**, 231 (1982).
9. SUZUKI, T.; ISHIKAWA, K.; SATO, N. & SAKAI, K. I. - *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **62**, 681 (1979).
10. TESSARI, I. D. & SAVAGE, E. P. - *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **63**, 736 (1980).
11. STEINWANDTNER, H. - *Fresenius Z. Anal. Chem.*, **312**, 342 (1982).
12. VENANT, A. & BORREL, S. - *Analusis*, **15**, 145 (1987).
13. BLÜTHGEN, A.; HEESCHEN, W. & NYHUIS, H. - *Spec. Pub. R. Soc. Chem.*, **49**, 206 (1984).
14. WEDBERG, J. L.; MOORE III, S.; AMORE, F. J. & MC AVOY, H. - *Pestic. Monit. J.*, **11**, 161 (1978).
15. POZO LORA, R.; HERRERA MARTEACHE, A.; POLO VILLAR, L. M.; LÓPEZ GIMÉNEZ, R.; JODRAL VILLAREJO, M. & IGLESÍAS PÉREZ, J. - *Anal. Bromatol.*, **XXIX**, 305 (1977).
16. LARA, W. A.; BARRETO, H. H. C. & INOMATA, O. N. K. - *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, **40**, 65 (1980).
17. LARA, W. H.; BARRETO, H. H. C. & INOMATA, O. N. K. - *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, **45**, 43 (1985).
18. ALBERT, L.; VEGA, P. & NAVA, E. - *Biotica*, **7**, 473 (1982).
19. ALBERT, L.; VEGA, P. & PORTALES, A. - *Pestic. Monit. J.*, **15**, 135 (1981).
20. ALBERT, L. - *Bol. Of Sanit. Panam.*, **91**, 15 (1981).
21. FOOKEN, C. & WERNER, B. - *Chemosphere*, **16**, 1301 (1987). Apud C.A., **107**, 128782b (1987).
22. SABBAGH, S.; JEMARA, Z. & BOUGUERRA, M. L. - *Analusis*, **15**, 399 (1987).
23. LI, C. F.; JR. BRADLEY, R. L. & SCHULTZ, L. H. - *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **53**, 127 (1970).
24. POZO LORA, R.; HERRERA MARTEACHE, A.; POLO VILLAR, L. M.; JODRAL VILLAREJO, M. & LÓPEZ GIMÉNEZ, R. - *Rev. Española Pediatría*, **XXXV**, 189, (1979).
25. VAN RENTERGHEM, R. - *Le Lait*, **573-4**, 141 (1978).
26. DEL'ACQUA, A.; RIBEIRO, M. L.; TREVISAN, L. M. V. & CERQUEIRA, M. - *Ecl. Quím.*, **7**, 49 (1982).
27. RIBEIRO, M. L.; SCHIAVON, M. & DEL'ACQUA, A. - *Ecl. Quím.*, **11/12**, 47 (1986/1987).
28. RIBEIRO, M. L.; DEL'ACQUA, A.; MONFARDINI, J. L. & DAVID, J. M. - *Ecl. Quím.*, **8**, 21 (1983).
29. INSTITUTO ADOLFO LUTZ - *Normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz: Métodos Químicos e Físicos para Análise de Alimentos*, 2. ed., São Paulo, 1976, V. 1, p. 175.
30. VEIEROV, D. & AHARONSON, N. - *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **63**, 532 (1980).
31. BEROZA, M. & BOWMAN, N. C. - *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **49**, 1007 (1966).
32. ALBERT, L. A. - In: MIYAMOTO, J. et alii (ed) - *IUPAC Pesticide Chemistry: Human Welfare and the Environment*, Pergamon, Oxford, 1983, p. 153.

Recebido em 14/06/88