

RESÍDUOS DE PESTICIDAS CLORADOS EM LEITE CONSUMIDO EM SÃO PAULO ⁽¹⁾

CHLORINATED PESTICIDE RESIDUES IN FLUID MILK CONSUMED IN SÃO PAULO, BRAZIL

MARIA ELISA WOHLERS DE ALMEIDA ⁽²⁾
HELOISA HELENA CORBE BARRETTO ⁽³⁾

SUMMARY

Gas liquid chromatography with electron capture detector was applied for the qualitative and quantitative analysis of fluid milk consumed in the city of São Paulo, Brazil.

The pesticides were extracted according to the Mili's procedure. Peak identifications were accomplished by comparison with the retention time of the standards and by the addition of the supposed pesticide to the samples.

BHC isomers were identified in all samples. The total BHC content in the samples varied from 0.007 to 0.055 ppm and the different isomers: alpha-BHC from 0.001 to 0.046 ppm; beta plus gama-BHC from 0.001 to 0.028 ppm; delta-BHC from 0.000 to 0.005 ppm.

Four samples of cheese type "Parmegiani" were also analysed with the following results: alpha-BHC from 0.115 to 1.300 ppm; beta plus gama-BHC from 0.145 to 1.350 ppm; delta-BHC from traces to 0.650 ppm, in the fat.

INTRODUÇÃO

O emprêgo cada vez mais difundido de pesticidas na agricultura para combater pragas e doenças de vegetais e para a proteção de grãos armazenados, como também na pecuária para controlar os ectoparasitas do gado, trouxe para a Saúde Pública mais um problema toxicológico resultante da contaminação de alimentos com resíduos destes defensivos agropecuários.

Até cerca de 1940, os agricultores contavam com poucas substâncias químicas para combater algumas das pragas existentes. Entretanto, atualmente, mais de cem mil toneladas de formulações de inseticidas são utilizadas por ano, no Brasil, além de outros pesticidas como acaricidas, fungicidas, ervicidas e moluscocidas.

Após sua aplicação, resíduos destas substâncias tóxicas permanecem nas folhas, frutos e grãos. A absorção freqüente de resíduos de pesticidas pode conduzir ao estabele-

cimento de intoxicações crônicas, se estes estiverem presentes nos alimentos, acima dos limites de tolerância.

O limite máximo de tolerância de pesticidas em produtos alimentícios está regulamentado por lei, no Brasil, e a matéria é revista, periódicamente, pela Comissão Nacional de Normas e Padrões para Alimentos, com a finalidade de manter atualizados esses limites de tolerância.

Entretanto, resíduos de pesticidas presentes nas pastagens, forragens e rações de gado são transferidos para a carne e para o leite destes animais; são estes os chamados resíduos não intencionais. Por outro lado, a aplicação eventual de medicamentos tópicos e de banhos carrapaticidas contendo pesticidas, que são absorvidos por via cutânea, também contribuem para o aparecimento destes pesticidas tanto no leite como na carne.

(1) Trabalho apresentado ao 18.º Congresso Brasileiro de Higiene, realizado em S. Paulo de 26 a 31 de outubro de 1970.
(2) Do Instituto Adolfo Lutz.
(3) Do Fundo de Pesquisa do Instituto Adolfo Lutz.

Ainda, a persistência de inseticidas clorados em solos cujas culturas anteriores foram tratadas com êsses pesticidas também contribue para a contaminação de pastagens e forragens. Resíduos de lindana, DDT, aldrin, dieldrin, clordana e heptacloro já foram encontrados em solos vários anos após sua aplicação (EDWARDS⁵).

A determinação do teor de pesticidas em alimentos tem sido solicitada pela FAO (Food Agricultural Organization) a todos os países membros das Nações Unidas, com a finalidade de permitir uma avaliação real da quantidade de resíduos de diferentes pesticidas ingeridos por populações locais. Êstes estudos permitiriam verificar se está ou não sendo excedida a dose diária aceitável para o homem.

Com a finalidade de avaliar o grau de contaminação do leite, foram analisadas diferentes amostras de leite consumido na cidade de São Paulo.

MATERIAL E METODOS

Analisamos 17 amostras de leite de quatro marcas normalmente existentes no comércio de S. Paulo, sendo 14 amostras do tipo B e 3 do tipo C. As diferentes amostras foram adquiridas no comércio durante os meses de julho, agosto e setembro de 1970. Foram também analisadas 4 amostras de queijo tipo "parmeção", proveniente de 4 partidas diferentes de um mesmo fabricante.

O método seguido foi o indicado em "Guide to the Analysis of Pesticide Residues"² baseado em trabalhos de MILLS⁷ e ONLEY⁸. O processo compreende as seguintes fases:

a) *Extração da gordura e dos pesticidas dissolvidos na gordura*

Transfira 100 g de leite para um frasco de centrífuga de 500 ml. Adicione 1 g de oxalato de potássio p.a., 100 ml de metanol p.a. e agite com cuidado. Adicione 50 ml de éter etílico e agite o frasco vigorosamente. Adicione 50 ml de éter de petróleo p.a. (p.e. 30 a 60°C) e agite o frasco de novo, vigorosamente. Centrifugue a 1500 rpm durante 10 minutos. Com o auxílio de uma pipeta de 50 ml munida de pera de borracha, transfira a camada superior (contendo dissolvidos gordura e pesticidas) para um funil de separação de 1 litro contendo 500 a 600

ml de água. Adicione ao resíduo remanescente no frasco da centrífuga, 50 ml de uma mistura de éter de petróleo e éter etílico (1+1), agite, centrifugue e transfira a camada superior para o mesmo funil de separação. Repita mais uma vez esta última extração. Agite cuidadosamente para misturar as 2 fases, evitando a formação de emulsão permanente; deixe em repouso até a separação das camadas e despreze a camada inferior aquosa. Lave o extrato etéreo com 2 porções de 100 ml de água. Passe o extrato etéreo através de 1 coluna de sulfato de sódio anidro, granulado (aproximadamente 5 cm de altura por 2 cm de diâmetro) para retirar a umidade e receba em um bequer de 400 ml. Lave a coluna várias vezes, com pequenas porções de éter de petróleo. Evapore o extrato etéreo da seguinte maneira: Coloque o béquer em um banho de água a 50°C (não ultrapasse essa temperatura) e evapore o éter sob uma corrente de nitrogênio ou ar seco. (Tanto o ar como o nitrogênio devem passar, previamente, por uma pequena coluna de sulfato de sódio anidro ou sílica gel. Toda a evaporação deve ser efetuada em capela com boa tiragem). Neste ponto, a análise pode ser interrompida por toda a noite; guarde o bequer coberto com uma folha de alumínio.

b) *Separação dos pesticidas da gordura por partição em acetonitrila-éter de petróleo*

Dissolva a gordura acima obtida com pequenas porções de éter de petróleo (redesilado, com p.e. 30-60°C) e transfira para um funil de separação de 125 ml com rôlha de teflon. Lave o bequer com éter de petróleo (o volume total da solução etérea deverá ser aproximadamente de 25 ml). Coloque no funil 25 ml de acetonitrila saturada com éter de petróleo. Agite bem o funil; deixe as fases separarem e transfira a camada inferior de acetonitrila para um funil de separação de um litro contendo 500 a 600 ml de água. Repita a extração mais 3 vezes, usando de cada vez 25 ml de acetonitrila saturada com éter de petróleo. Adicione, então, 100 ml de éter de petróleo aos extratos reunidos no funil de 1 000 ml e agite, cuidadosamente, a fim de evitar formação de emulsão. Depois da separação das 2 fases, a camada inferior aquosa é retirada. Lave a camada etérea com mais 2 porções de 100 ml de água. Passe a camada de éter de petróleo por uma coluna de sulfato de sódio anidro, como no processo.

anterior de extração, lave a coluna com 3 porções de 10 ml de éter de petróleo e recolha em um bequer de 400 ml. Evapore o éter, observando os mesmos cuidados do processo anterior, até reduzir o volume a 5 ml.

c) *Purificação (Clean-up) em coluna de Florisil*

Preparo do Florisil e dos solventes

Florisil — Ativação: Florisil, adquirido já ativado a 650°C, deve ser distribuído em frascos menores com tampa de rêsca e conservado ao abrigo da luz. Antes de usar, deve ser novamente ativado aquecendo a 130°C, durante 5 horas, no mínimo. Deve ser conservado a 130°C em frascos de vidro, fechados, ou então pode ser conservado em dessecador, no escuro, à temperatura ambiente, mas é necessário reaquecê-lo a 130°C, cada 2 dias.

Caso o florisil não tenha sido tratado previamente, coloque-o em uma cápsula de porcelana e aqueça em mufla a 650°C durante 2 horas. (A mufla deve ser ligada, no mínimo 2 horas antes, para que a temperatura seja adequadamente elevada). Coloque a cápsula de porcelana no fundo da mufla. Depois de 2 horas de ativação, transfira a cápsula para uma estufa a 130°C, até que a cápsula alcance a temperatura da estufa (cerca de 30 minutos). O florisil é então transferido para frascos de vidros e conservado como descrito acima.

Éter etílico — Transfira um volume adequado de éter etílico, isento de peróxidos, para um funil de separação e lave 2 vezes com uma quantidade de água igual à metade do volume do éter. Adicione ao éter lavado 100 ml de uma solução saturada de cloreto de sódio; agite e retire a camada aquosa de solução de NaCl. Transfira o éter para um frasco com rêsca esmerilhada, contendo um grande excesso de sulfato de sódio anidro. Agite vigorosamente o frasco durante 15 a 30 minutos para remover toda a água.

Separe para cada análise aproximadamente 50 ml do éter etílico acima preparado e adicione álcool etílico a 95% em quantidade necessária para obter uma solução álcool-éter contendo 2% de álcool v/v.

Éter a 6%

Dilua 12 ml da solução éter-álcool a 2% com éter de petróleo redestilado até o volume de 200 ml; adicione de 2 a 5 g de Na₂SO₄ anidro e agite bem.

Éter a 15%

Dilua 30 ml da solução éter-álcool a 2% com éter de petróleo redestilado até o volume de 200 ml; adicione de 2 a 5 g de Na₂SO₄ anidro e agite bem.

Prepare uma coluna com florisil usando uma coluna cromatográfica de vidro de 25 mm de diâmetro interno e 30 cm de altura, com rêsca de teflon e placa filtrante, de porosidade média. Adicione o florisil aos poucos, batendo de leve na coluna para haver sedimentação uniforme, até a coluna alcançar 10 cm de altura. Sobre o florisil, adicione sulfato de sódio anidro, granulado (não use em pó) até uma altura de 2,5 cm. Passe pela coluna 40 ml de éter de petróleo e coloque sob a coluna um frasco Erlenmeyer de 500 ml. Assim que o menisco superior alcançar a superfície do sulfato de sódio, transfira para a coluna os 5 ml de éter de petróleo contendo os pesticidas obtidos no processo anterior. A solução deve percolar através da coluna na velocidade de 5 ml por minuto. Lave o bequer com 2 porções de 5 ml de éter de petróleo. Lave, também, as paredes da coluna com pequenas porções de éter de petróleo. Quando o menisco superior alcançar a superfície do sulfato de sódio, comece a passar pela coluna 200 ml do éter a 6% na mesma velocidade de 5 ml/min. Quando as últimas porções do solvente alcançarem a superfície do sulfato de sódio, troque o frasco Erlenmeyer por outro e comece a passar pela coluna 200 ml do éter a 15%. Na fração A (éter a 6%) são eluídos os seguintes pesticidas clorados: aldrin, BHC, clorbenside, clordana, DDE, DDT, heptaclor, heptaclor epóxido, keltana, lindana, metoxiclor, pertana, strobana, TDE e toxafeno. Na fração B (éter a 15%) são eluídos: dieldrin, endrin e endosulfan I.

d) *Preparo da solução para ser injetada no cromatógrafo*

Transfira os 200 ml de éter a 6%, eluídos através da coluna, para um frasco de

evaporação Kuderna-Danish. Lave o frasco Erlenmeyer com 5 ml de éter a 6%. Adapte a coluna e coloque o conjunto em um banho de vapor, de maneira que, no mínimo, o terço inferior do frasco de ebulição fique mergulhado no vapor. (A evaporação deve ser feita em capela). Deixe evaporar até reduzir o volume a alguns ml. (Não evapore até a secagem). Retire o tubo receptor do aparelho Kuderna-Danish e complete a evaporação até a secagem sob uma leve corrente de nitrogênio ou ar sêco. Pare a evaporação assim que desaparecer a última gota do solvente (caso contrário haverá perda de pesticidas) e dissolva o resíduo, imediatamente, em 5 ml de benzeno p. a., redestilado.

Evapore a fração de éter a 15%, de maneira idêntica.

e) Cromatografia

Estas soluções foram injetadas em um cromatógrafo a gás da marca Varian, modelo

2.100, com detector de captura de elétrons. Foi utilizada uma coluna de vidro de 6 pés de comprimento e 1/4 de polegada de diâmetro interno com fase estacionária constituída por uma mistura de 2,5% de QF.1 e 2,5% de DC-200 em Aeropak. As condições de operação foram as seguintes: temperatura da coluna, 170°C; temperatura do injetor, 200°C; temperatura do detector, 200°C; gás de arraste, nitrogênio tipo U; fluxo, 30 ml/seg; sensibilidade, 4×10^{-9} .

Os pesticidas foram identificados por comparação dos tempos de retenção obtidos com os tempos de retenção de padrões injetados e, ainda, pela adição do pesticida esperado às amostras. Os pesticidas foram dosados com o auxílio de uma curva preparada com pesticidas padrões.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos estão reunidos nos quadros I e II e nas figuras 1 e 2.

QUADRO I

Teor de inseticidas clorados em leite consumido na cidade de São Paulo, 1970

Amostra n.º	α BHC (ppm)	$\beta + \gamma$ BHC (ppm)	δ BHC (ppm)	BHC total (ppm)	Composto não identificado
1	0,044	0,007	tr *	0,051	---
2	0,035	0,006	tr	0,041	---
3	0,007	0,028	0,004	0,039	a **
4	0,039	0,005	tr	0,044	---
5	0,046	0,006	tr	0,052	---
6	0,039	0,008	tr	0,047	---
7	0,007	0,013	0,001	0,021	---
8	0,003	0,019	0,005	0,027	---
9	0,002	0,021	0,004	0,027	---
10	0,001	0,021	0,004	0,026	---
11	0,047	0,008	---	0,055	---
12	0,004	0,018	0,001	0,023	---
13	0,002	0,011	0,004	0,017	---
14	0,028	0,006	0,001	0,035	---
15	0,006	0,006	0,001	0,013	a
16	0,006	0,001	---	0,007	---
17	0,025	0,004	---	0,029	---

* tr — Traços

** a — Composto com tempo de retenção de 31 min., na fração A.

QUADRO II

Teor* de inseticidas clorados em queijo tipo "parmeção", produzido no Estado de Minas Gerais, 1970.

Amostra n.º	α BHC (ppm)	$\beta + \gamma$ BHC (ppm)	δ BHC (ppm)	BHC total (ppm)
1	0,430	1,350	0,200	1,980
2	0,115	0,145	tr**	0,260
3	0,960	0,295	0,500	1,755
4	1,300	0,395	0,650	2,345

* calculado na gordura do queijo.

** tr = traços.

Em tôdas as amostras analisadas foram encontrados os isômeros de BHC.

O BHC empregado como inseticida é constituído por uma mistura de isômeros em proporção variável, porém todos os produtos são padronizados de modo a conter 12 a 30% do gama isômero (lindana) que é o único isômero ativo com propriedades inseticidas. A partir dêste BHC técnico é que são preparadas as formulações e diluições.

A coluna utilizada no cromatógrafo a gás não permitiu a separação dos isômeros beta e gama, porque êstes isômeros apresentam os mesmos tempos de retenção.

Comparando os teores encontrados para os diferentes isômeros do BHC, observamos que o delta-BHC sempre apareceu em pequenas quantidades, variando de traços ou não aparecimento a 0,005 ppm.

Ao contrário, o isômero alfa-BHC foi encontrado em níveis bem maiores, variando de 0,001 a 0,046 ppm, sendo que em 8 amostras o teor encontrado foi acima de 0,025 ppm.

Lindana, ou melhor, a soma dos isômeros beta e gama variou de 0,001 a 0,028 ppm.

Quanto ao BHC total, isto é, a soma das quantidades encontradas para cada isômero, o teor variou de 0,007 a 0,055 ppm, sendo que as amostras de leite de marca x, correspondente às 6 primeiras amostras do quadro I, apresentaram um teor mais elevado de BHC em relação às outras 3 marcas de leite analisadas.

Nas amostras n.ºs 3 e 15 apareceu na fração A (éter a 6%) um pico com o tempo de retenção de 31 minutos, que não foi pos-

sível identificar por não corresponder a nenhum dos seguintes padrões disponíveis: α -clordana, γ -clordana, heptaclor, heptaclor epóxido, aldrin, DDT.

Na fração B (éter a 15%) de 2 amostras foi encontrado um pico amplo, com um tempo de retenção de 30 minutos. Devido à magnitude do pico, essas frações foram evaporadas e os resíduos foram identificados por espectrofotometria no infra-vermelho, como sendo lípidios. Tal ocorrência pode acontecer quando há transferência de alguma porção de gordura por ocasião da extração dos pesticidas.

As 4 amostras de queijo tipo "parmeção" revelaram a presença dos isômeros alfa, beta + gama e delta-BHC; não foram encontrados outros pesticidas. Essas amostras de queijo foram analisadas em março de 1970 e correspondem, portanto, a queijos preparados com leite produzido alguns meses antes; é de interesse, por isso, salientar que a presença de BHC em leite está sendo constante e vem de longa data.

RUZICKA *et alii*¹⁰, na Grã-Bretanha, desquisaram resíduos de pesticidas organoclorados em diversos alimentos e, em 18 amostras de leite, acharam os seguintes teores de BHC: alfa-BHC, de 0,0009 a 0,0068 ppm; beta-BHC, de 0,0005 a 0,0035 ppm e gama-BHC, de 0,0007 a 0,0024 ppm, valores êstes bem menores do que os teores por nós encontrados.

DUGGAN⁴ realizou, nos Estados Unidos, um levantamento de resíduos de pesticidas clorados em leite, nos anos de 1964, 1965 e 1966 e encontrou uma média de 0,007 ppm para BHC total e de 0,004 ppm para lindana.

Estes teores encontrados são significativamente menores que os valores por nós referidos.

KAWAR *et alii*⁶, no Líbano, aplicaram BHC em vacas leiteiras para controle de ectoparasitas e, 3 semanas após a pulverização, encontraram de 0,006 a 0,016 ppm de BHC

total no leite desses animais. Os valores mínimos por nós obtidos são comparáveis ao mínimo citado; entretanto, os valores máximos por nós encontrados são cerca de 3,5 vezes maiores do que os referidos por Kawar *et alii*.

DICKES & NICHOLAS⁸, em 1968 pesquisaram, na Inglaterra, diferentes pesticidas em vários alimentos e, em 17 amostras de leite, não encontraram resíduos de gama-BHC (lindana); não fazem menção aos outros isômeros do BHC.

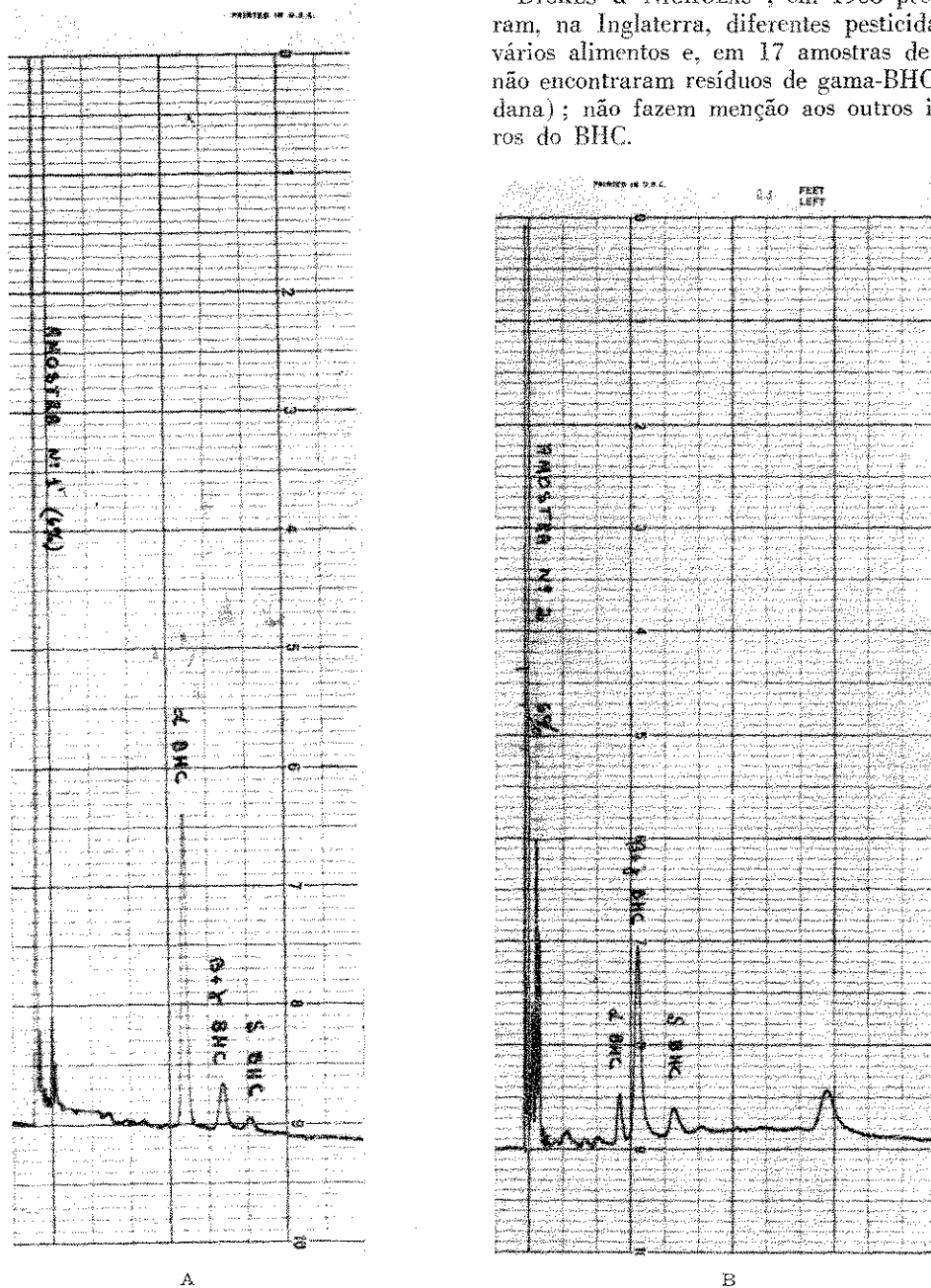


Fig. 1 — Cromatogramas de pesticidas clorados presentes em leite (São Paulo — 1970).
A — Amostra com alto teor de alfa-BHC.
B — Amostra com alto teor de beta+gama-BHC, apresentando também um pico não identificado.

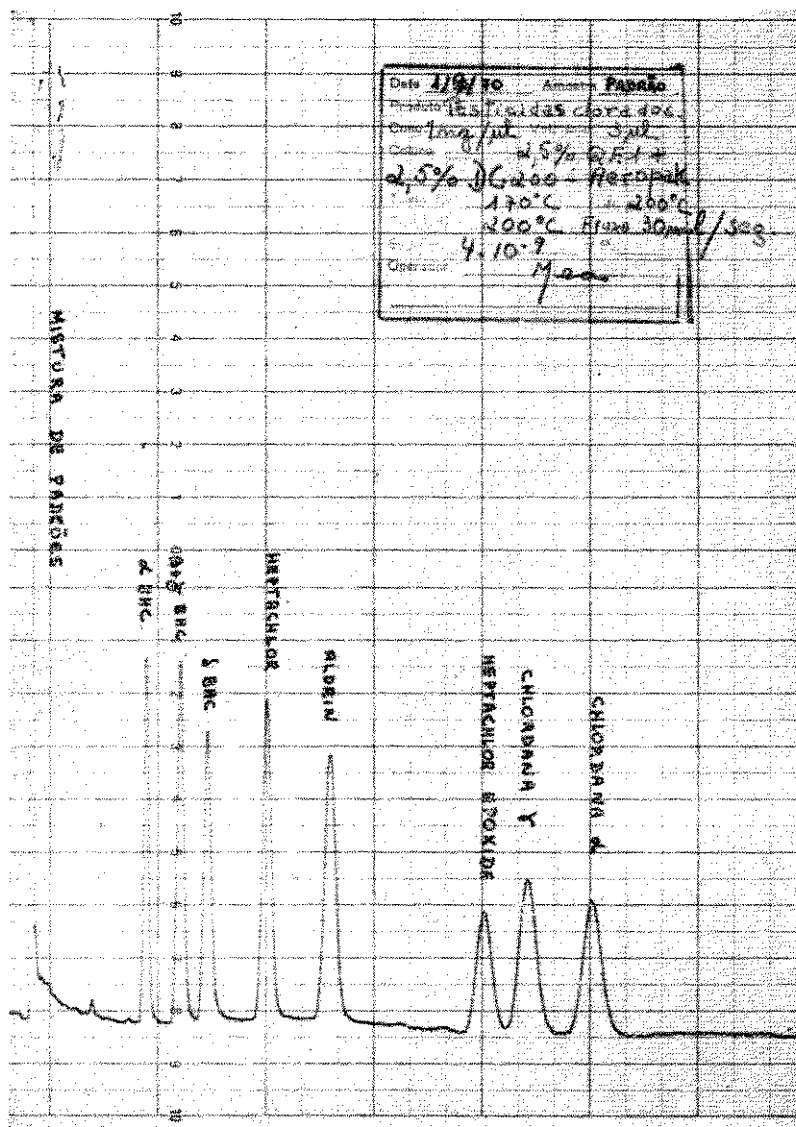


Fig. 2 — Cromatograma de mistura de alguns pesticidas padrões.

CONCLUSÃO

Os teores máximos de BHC por nós obtidos são bem mais elevados do que os referidos na literatura ao nosso alcance; isto indica um grau de contaminação do produto bem maior do que nas regiões citadas.

A legislação brasileira específica para tolerância de resíduos de pesticidas em alimentos ¹ não permite resíduos de BHC em leite e seus derivados.

Entretanto, queremos lembrar que a Comissão de Resíduos de Pesticidas da FAO/

OMS ² aprovou, em 1968, tolerâncias de 0,004 ppm de lindana para o leite e 0,1 ppm para derivados do leite, calculado, neste último caso, no conteúdo de gordura. A referida Comissão não propôs nenhuma tolerância para os demais isômeros do BHC, em virtude da grande variabilidade dos estereoisômeros na composição do produto técnico, não sendo portanto possível a determinação de uma dose diária aceitável para homem.

Face aos resultados encontrados, todo o leite consumido em São Paulo, quanto a resíduos de BHC, está contaminado e em de-

sacôrdio com a legislação vigente¹. O problema, agora, embora pertença à Saúde Pública não é de resolução fácil nem imediata, pois seria impraticável e impossível uma condenação em massa do leite exposto à venda. Necessariamente, questão de tal gravidade e importância tem que ser enfrentada e resolvida com o entrosamento entre organismos da Saúde e da Agricultura, no sentido de uma fiscalização enérgica para a aplicação correta dos pesticidas na lavoura, a fim de ser evitada a contaminação de pastagens, forragens e grãos destinados à alimentação do gado, como também de um controle severo quanto à pulverização e aplicações tóxicas com BHC em vacas leiteiras.

RESUMO

Com a finalidade de avaliar o grau de contaminação do leite consumido na cidade de São Paulo, quanto a resíduos de pesticidas organoclorados, foram analisadas amostras de leite de diversas marcas.

Os pesticidas foram extraídos da gordura do leite de acordo com a técnica de Mills e depois identificados e dosados por cromatografia em fase gasosa, em aparelho com detector de captura de elétrons.

Em todas as amostras analisadas foram encontrados lindana e demais isômeros do BHC. O teor total de BHC variou de 0,007 a 0,055 ppm e os diferentes isômeros: alfa-BHC, de 0,001 a 0,047 ppm; beta mais gama-BHC, de 0,001 a 0,028 ppm; delta-BHC, de 0,000 a 0,005 ppm.

Foram também analisadas 4 amostras de queijo com os resultados: alfa-BHC, de 0,115 a 1,300 ppm; beta + gama-BHC, de 0,145 a 1,350 ppm; delta-BHC, de traços a 0,650 ppm, teores calculados na gordura.

Em decorrência dos resultados obtidos, destaca-se a urgência de um entrosamento entre os serviços de Saúde Pública e da Agricultura, no sentido de uma aplicação adequada e correta de pesticidas a fim de se evitar contaminação não intencional de alimentos tais como carne, leite e derivados do leite.

Agradecimentos — Agradecemos à Sra. Mickiko Y. Takahashi a valiosa colaboração na parte de extração dos pesticidas.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. BRASIL. Comissão Permanente de Aditivos para Alimentos. Resolução n.º 23/66. Diário Oficial da União, Rio de Janeiro, ano 105(36): 2193, 22 fev. 1967.
2. BURCHFIELD, H. P.; DONALD, J. E. & STORRS, E. S. — Guide to the analysis of pesticide residues. 2. ed. Washington, D.C., U.S. Department of Health, Education and Welfare, 1965. v. 1, p. IIA.4.b.(1); IIB.1.a.(1); IIC.2.b.(1); IVA.2.a.(1).
3. DICKES, G. J. & NICHOLAS, P. V. — A survey of selected foodstuffs for certain pesticide residues. *J. Ass. Publ. Analysts* 7:14-21, 1969.
4. DUGGAN, R. E. — Chlorinated pesticide residues in fluid milk and other dairy products in the United States. *Pestic. Monit. J.* 1:2-8, 1967.
5. EDWARDS, C. A. — Inseticide residues in soils. *Residue Rev.*, 13:83-132, 1966.
6. KAWAR, N. S.; BOSTANIAN, N. J. & BADAWEI, S. M. — Inseticide residues in milk of dairy cows treated for control of ectoparasites. *J. Dairy Sci.* 51: 1023-5, 1968.
7. MILLS, P. A. — Collaborative study of certain chlorinated organic pesticides in dairy products. *J. Ass. Off. Agric. Chem.* 44:171-7, 1961.
8. ONLEY, H. J. — Rapid method for chlorinated pesticide residues in fluid milk. *J. Ass. Off. Agric. Chem.* 47:317-21, 1964.
9. ORGANISATION MONDIALE DE LA SANTE — Résidus de pesticides dans les produits alimentaires. Rapport de la réunion conjointe FAO/OMS tenue en 1968. Genève, O.M.S., 1969. Sér. Rapp. Tech. no. 417.
10. RUZICKA, J. H. A.; SIMMONS, J. H. & TATTON, J. O'G. — Pesticide residues in foodstuffs in Great Britain. IV. Organochlorine pesticide residues in welfare foods. *J. Sci. Fd. Agric.* 18:579-82, 1967.