

Resíduos de Pesticidas Organoclorados em Alimentos Gordos

– revisão da metodologia analítica

I. Extracção

Celeste de Matos Lino^a

Maria Irene Noronha da Silveira^a

Os autores apresentam uma panorâmica dos métodos usualmente empregues na extracção de resíduos de insecticidas organoclorados em alimentos gordos (>2%), uma vez que a natureza lipofílica daqueles resíduos conduz à sua acumulação na fracção lipídica.

Introdução

O advento dos insecticidas organoclorados surgiu com a descoberta das propriedades insecticidas do DDT por Paul Müller em 1939. Os seus efeitos surpreendentes a nível da saúde pública com a irradicação do tifo, malária e encefalite [23] e do aumento da produtividade agrícola levaram a indústria química à produção de novos compostos com efeitos similares: aldrina, dieldrina, endrina, heptacloro, clordano, endossulfão, lindano, tetradifão, dicofol, etc.

Nessa época, as implicações toxicológicas e os efeitos ambientais provocados por estes produtos químicos eram desconhecidos [4a]. No início dos anos sessenta começou a observar-se a tendência para estes compostos lipossolúveis manifestarem bioacumulação. Este fenómeno tornou-se evidente quando estudiosos em distintos pontos de globo, ao determinarem os níveis de resíduos em certos predadores, verificaram que estes níveis eram consideravelmente superiores aos das suas presas [31].

Mais recentemente, sobretudo nas duas últimas décadas, investigações profundas têm sido levadas a cabo no sentido de estudar as características dos compostos orgânicos que apresentam maior tendência para a bioacumulação. Entre estes, situam-se os hidrocarbonetos clorados que têm um alto nível de estabilidade nos organismos vivos [9]. Tal facto deve-se:

- à alta proporção de ligações químicas não polares que lhes conferem uma estabilidade excepcional;
- ao valor de log Kow, compreendido entre 2 e 5 [22];
- à baixa solubilidade na água: 18 a 0,002 mol m⁻³;
- ao peso molecular inferior a 300;
- à sua presença na forma não ionizada ou apenas ligeiramente ionizada, quando em presença da água.

Estas características conferem aos insecticidas organoclorados uma elevada persistência em diferentes fases do ambiente: água, ar, solo e biota e um carácter cumulativo no tecido adiposo dos distintos seres vivos.

Os alimentos, sobretudo de características gordas, constituem um forte veículo de contaminação para o Homem, dado que contribuem com mais de 90% para a absorção diária dos pesticidas [29].

Os efeitos da ingestão repetida destes resíduos na saúde do Homem ainda não são conhecidos de forma precisa.

Durante anos e anos o mundo assistiu à utilização massiva destes compostos, originando alguns deles compostos de mais elevada toxicidade como são o caso da aldrina e a heptacloro que originam dieldrina e heptacloro epóxido, respectivamente. Muitos países, preocupados com a problemática levantada pela presença destes resíduos, lançaram restrições e, em muitos casos, baniram definitivamente o seu uso. Em Portugal, só muito recentemente foram proibidos pela Portaria n.º 660/88 de 30 de Setembro, os seguintes compostos organoclorados persistentes: aldrina, clordano, dieldrina, DDT, endrina, HCH, heptacloro, hexaclorobenzeno, toxafeno.

Nesta primeira parte do trabalho de revisão da metodologia que envolve as distintas etapas de uma análise de resíduos de hidrocarbonetos clorados persistentes em alimentos, dá-se especial relevo aos processos de extracção mais correntemente empregues em alimentos cujo teor em gordura excede os 2% não apenas pelas razões anteriores expostas, mas porque a generalidade destes substractos pressupõe um isolamento prévio da gordura e a subsequente extracção dos resíduos de organoclorados nela contidos.

Extracção

A extracção de resíduos de insecticidas organoclorados em produtos alimentares com teores de gordura superiores a 2% requer o isolamento da fracção lipídica por meio de um sistema solvente e a posterior extracção dos pesticidas retidos nessa fracção através de uma participação líquido-líquido adequada. O sistema solvente a utilizar deverá efectuar uma extracção eficaz dos resíduos evitando a co-extracção de grandes teores de material gordo, o que pressupõe a escolha de um solvente com uma solubilidade adequada face ao solvente a usar na fase posterior de partição e, simultaneamente, apresentar a mesma característica em relação aos hidrocarbonetos clorados.

Para além destes parâmetros, o analista deverá atender à natureza tóxica dos solventes, ao seu custo e a interferências que possam provocar face ao detetor de captura electrónica. Da análise dos Quadros I, II, III e V podemos observar a aplicação de diferentes solventes na extracção da parte lipídica para substractos idênticos.

^a Laboratório de Bromatologia – Faculdade de Farmácia, Universidade de Coimbra.

QUADRO I

Métodos de extracção aplicados à análise de resíduos de pesticidas OCs em amostras de leite e queijo

AUTOR	AMOSTRA (ml)	EXTRACÇÃO (ml)
Mills [25]	100	Alc. Isoprol. - 100
de Faubert Maunder [10]	40	Act-Hex. (1+1) - 160
Johnson [17]	100 g	E.E.-E.P. (1+1) - 3x50
Beroza; Bowman, [5]	100	Hex.-E.E. (1+1) - 3x100
Ang; Dugan [3]	100	Hex.-E.E. (1+1) - 3x100 E.P.
Braun; Lobb [6]	100 g	E.E.-E.P. (1+1)
AOAC [28]	100	ACN - 150
Matsumoto [24]	100	E.E.-E.P. (1+1) - 3x50
Dogheim [11]	10	Hex. - 3x50
Suzuki [34]	10	Hex.-ACN-EtOH-20+5+1 Hex. - 2x20
Gabica [15]	5	Hex.-ACN-EtOH-20+5+1 Hex.-2x20
Luke; Doose [21]	50	EtOH-E.E.-Hex.-5-2,5-2,5 Óxi. Alumínio-Ág. dest. -ACN (20 g-25-280)
Adachi [1]	50	ACN - 100
Bush [7]	30 g ou 2 g (pó)	ACN - Água (70+30)-2x30 Hex.-(Soxhlet 6 ciclos/h)

Os solventes propostos para a extracção lipídica do *leite* e *queijo* têm sido variados.

O álcool isopropílico foi proposto por Mills [25]; de Faubert Maunder e colaboradores preferiram a acetona-hexano (1+1) [10].

O sistema solvente éter etílico-éter de petróleo (1+1) foi proposto inicialmente por Johnson [17], experimentado por Ang e Dugan [3] e, posteriormente adoptado como método oficial da AOAC [28]. Embora este sistema, segundo estudos efectuados por Ang e Dugan [3] em amostras de leite fortificado com dieldrina, apresente recuperações de lípidos ligeiramente mais altas, a concentração do mesmo resíduo relativamente à totalidade de lípidos extraídos apresenta-se mais elevada no sistema hexano-éter etílico (1+1), proposto anteriormente por Beroza e Bowman [5]. Gabica e colaboradores [15] utilizaram o mesmo sistema extractivo.

QUADRO II

Processos de extracção aplicados ao estudo de resíduos de OCs em tecidos animais

AUTOR	AMOSTRA (g)	EXTRACÇÃO (ml)
Mills [25]		E.P.-100; 2x50
Johnson [17]		E.P.-100; 2x50
Porter [30]	25-50	E.P.-150; 2x100
Erney [12]	20	Coluna: E.P.-25; 200
AOAC [28]	25-50	E.P.-150; 2x100; 3x25
Al-Omar [2]	25-100	E.P.-50
Matsumoto [24]		E.E.-E.P. (1+1)-2x50
Dogheim [11]	100	Hex.-100; 2x50
Ballschmitter [4]	20-30	ACN Coluna: Hex.-Act (2+1)
Ernst [13]	2-4	Coluna: Hex.-Act (2+1)-110
Suzuki [35]	10	ACN-4x20
Zell; Ballschmitter [38]	5-20	Coluna: Hex.-Act (2+1)

QUADRO III

Métodos de extracção destinados à análise de resíduos de pesticidas OCs em ovos

AUTOR	AMOSTRA (g)	EXTRACÇÃO (ml)
de Faubert Maunder [10]		Soxhlet/2h Act-Hex- (1+2)
Finsterwalder [14]	≤25	ACN-200
Matsumoto [24]		Hex.-100; 2x50
Wessel [36]	25	ACN-200 ACN-200; 100 ACN-2x150
Krynitsky [18]	3-5	Clorof.-Met. (1+1)-600 Coluna: E.E.-Hex. (6+94) ^a -150 Florasil *

O hexano foi utilizado por Matsumoto e colaboradores [24] como solvente ao estudar os níveis de ingestão diária dos pesticidas organoclorados fornecidos pela dieta, no Japão. Também Bush e colaboradores [7] o utilizaram em amostras de leite humano.

Alguns analistas preferem associar o hexano ao acetonitrilo (20+5) na extracção da gordura do leite [34] [11] promovendo assim melhorias na recuperação dos pesticidas sem aumentar o seu teor em substâncias gordas [34].

O acetonitrilo foi aplicado isoladamente à análise de resíduos de endossulfão [6] e em mistura com água (25 ml+280 ml ACN) [21] em amostras de leite.

QUADRO IV

Processos de dissolução da gordura em amostras de óleos e gorduras destinadas à análise de resíduos de pesticidas organoclorados

AUTOR	AMOSTRA (g)	EXTRACÇÃO (ml)
de Faubert Maunder [10]	manteiga-5 gord. carn. } sebo vaca } 2	Hex.-10; 3x5 Hex.-50
Rogers [32]	30	Micro Cel E-15g ACT-ACN (5+95)-250
Ballschmitter [4]	10	Hex.
Chiang [8]	5	Hex.-20
Liao [20]	10	Hex.-Hex. (8+92) 75; 50
Moats [26]	2	E.P.-30 a 40
Gillespie [16]	2	Alumina desactivada 16-19%-50g ACN-Água (80+20)-350

Em determinados tipos de substractos (leite, queijo, sementes oleaginosas) não é apenas suficiente a extracção da totalidade da gordura mas, é igualmente necessário efectuar a rotura dos glóbulos de gordura permitindo assim a libertação dos resíduos e evitando, simultaneamente, a formação de emulsão como os solventes usados. Para o efeito, a generalidade dos investigadores opta pelo etanol [3] [5] [11] [15] [24] [33] [34], outros usam indistintamente quer o metanol quer o etanol [17] [28], enquanto alguns preferem o metanol [27]. A preferência dos autores na extracção do material gordo de *tecidos animais (carne e peixe)* vai para o éter de petróleo [2] [17] [25] [28] [30]. Há autores que recorrem ao hexano [24]; outros preferem o acetonitrilo [11] [35].

Porém, certos investigadores em vez de procederem a uma extracção por mistura preferem executá-la em coluna cromatográfica na qual a amostra é acumulada e o solvente ao

QUADRO V

Métodos de extração aplicados à análise de resíduos de pesticidas OC's em sementes oleaginosas

AUTOR	AMOSTRA (g)	EXTRACÇÃO (ml)
Sawyer [33]	50	E.P.-200 E.E.-E.P. (1+1)-150
Luke [21]	2g gordura	Óxido Alumínio-20 g Água-ACN (20+80)-350

atravessá-la vai extraindo a gordura. Erney [12] recorreu ao éter de petróleo como solvente extractivo. Wood [37] utilizou um processo idêntico após mistura prévia das amostras (tecidos animais, óleos e gorduras, leite e derivados e ovos) com celite 545 e hexano e procedendo à extração dos resíduos com DMSO. Outros autores recorrem à extração de amostras de peixe e organismos marinhos por este processo de extração a frio com mistura de hexano-acetona (2+1) [4] [13] [38]. No entanto, este processo apresenta o inconveniente do consumo relativamente elevado de solventes quando em presença de quantidades apreciáveis de amostra.

A extração da gordura em ovos tem sido efectuada por alguns autores com acetonitrilo. Wessel [36] ao comparar diferentes métodos de extração, neste alimento, com acetonitrilo verificou que este solvente apresentava uma eficácia idêntica à extração exaustiva com clorofórmio-metanol (1+1), em Soxhlet durante 24 h, na remoção dos distintos resíduos de organoclorados, Finsterwalder [14] apresentando um estudo colaborativo entre distintos laboratórios que optaram pela extração com o mesmo solvente em ovos, revela as boas recuperações obtidas para resíduos de lindano, dieldrina, heptacloro epóxido e p,p' - DDE.

Outros autores preferem o n-hexano para a análise deste substracto [24] enquanto, no passado outros autores recorreram à extração exaustiva em Soxhlet com acetona-hexano (1+2) durante 2 horas [10]. Com esta técnica de extração a quente ocorre com frequência, após arrefecimento, o aparecimento de um pequeno precipitado resultante da fracção lipídica, conduzindo à perda de alguns resíduos.

Autores há que recorrem a um processo simultâneo de extração e purificação em coluna (ver partição em coluna-contínua no próximo trabalho).

Substractos que provocam graves problemas de extração são as sementes oleaginosas (e produtos relacionados de alto conteúdo em gordura e baixo teor em humidade). Sawyer [33] ensaiou vários sistemas solventes (extração tripla com E.P.; extração tripla com E.E.-E.P. (1+1); E.P. (2x), água e acetonitrilo; E.P. (2x); acetonitrilo; E.P., E.E.-E.P. (1+1) e etanol) na extração de resíduos aprisionados de endrina na soja. O sistema solvente que revelou maior eficácia era constituído por éter de petróleo, éter etílico-éter de petróleo (1+1) e etanol. No sentido de favorecer a acção deste solvente extractivo, o autor recorreu a uma moagem e a uma homogeneização a altas velocidades para reduzir a amostra a partículas de tamanho adequado e assim expor, mais facilmente, os resíduos aprisionados à acção do sistema solvente. Luke e Doose [21] utilizaram, como solvente extractivo para este tipo de substracto, água-acetonitrilo (20+80). A quantidade de água usada por estes analistas permite a extração da quantidade adequada de gordura.

Os óleos e gorduras constituem um tipo de substracto que, em regra, não requer a extração prévia da fracção lipídica. Ao analisarmos o Quadro IV podemos observar que uns analistas [4] [8] [10] preferem o hexano para a dissolução da gordura da manteiga, gordura de carneiro, sebo de vaca e tecido adiposo de bovino, outros [20] utilizaram uma mistura de benzeno-hexano (8+92) para o tecido adiposo humano e de bovino e alguns [26] recorrem ao éter de petróleo.

Referências

- [1] Adachi, K. et al. «J. Assoc. Off. Anal. Chem.», 66 (6), 1983, p. 1315-1318.
- [2] Al-Omar, M.A. et al. «Bull. Environ. Contam. Toxicol.», 36, 1986, p. 109-113.
- [3] Ang, C.J.W.; Dugan, L.R. «J. Assoc. Off. Anal. Chem.», 56 (3), 1973, p. 718-720.
- [4] Ballschmitter, K. et al. «Fresenius Z. Anal. Chem.», 306, 1981, p. 323-339
- [4a] Barros, M. C. «Sep. Prob. Amb. Agrário», 1977, p. 63-77.
- [5] Beroza, M.; Bowman, M.C. «J. Assoc. Off. Anal. Chem.», 49 (5), 1966, p. 1007-1012.
- [6] Braun, H.E.; Lobb, B.T. «Can. J. Anim. Sci.», 56, 1976, p. 373-376.
- [7] Bush, B. et al. «J. Assoc. Off. Anal. Chem.», 66 (2), 1983, p. 248-255.
- [8] Chiang, T.C.H. et al. «J. Assoc. Off. Anal. Chem.», 70 (1), 1987, p. 100-102.
- [9] Connell, D.W. «Rev. Environ. Contam. Toxicol.», 102, 1988, p. 117-154.
- [10] de Faubert Maunder, M.J. et al. «Analyst», 89, 1964, p. 168-174.
- [11] Dogheim, S.M. et al. «J. Assoc. Off. Anal. Chem.», 71 (5), 1988, p. 872-874.
- [12] Erney, R.D. «J. Assoc. Off. Anal. Chem.», 57 (3), 1974, p. 576-579.
- [13] Ernst, W. et al. «Fresenius Z. Anal. Chem.», 272, 1974, p. 358-363.
- [14] Finsterwalder, C.E. «J. Assoc. Off. Anal. Chem.», 59 (1), 1976, p. 169-171.
- [15] Gabica, J. et al. «J. Assoc. Off. Anal. Chem.», 57 (1), 1974, p. 173-175.
- [16] Gillespie, A.M.; Walters, S.M. «J. Assoc. Off. Anal. Chem.», 67 (2), 1984, p. 290-294.
- [17] Johnson, L.Y. «J. Assoc. Off. Anal. Chem.», 48 (3), 1965, p. 668-675.
- [18] Krynskiy, A.J. et al. «J. Assoc. Off. Anal. Chem.», 71 (3), 1988, p. 539-542.
- [19] Langlois, B.E. et al. «J. Agric. Food Chem.», 12 (3), 1964, p. 243-245.
- [20] Liao, W. et al. «J. Assoc. Off. Anal. Chem.», 71 (4), 1988, p. 742-747.
- [21] Luke, M.A.; Doose, G.M. «Bull. Environ. Contam. Toxicol.», 32, 1984, p. 651-656.
- [22] Mackay, D. «Environ. Sci. Technol.», 16, 1982, p. 274-276.
- [23] Masters, G.M. «Introduction to Environmental Science and Technology», John Wiley, New York, 1974, Cap. 3, p. 65-73.
- [24] Matsumoto, H. et al. «Bull. Environ. Contam. Toxicol.», 38, 1987, p. 954-958.
- [25] Mills, P.A. «J. Assoc. Off. Anal. Chem.», 42 (4), 1959, p. 734-740.
- [26] Moats, W.A. «J. Assoc. Off. Anal. Chem.», 46 (2), 1963, p. 172-176.
- [27] Nash, R.G.; Beall, Jr., M.L. «J. Assoc. Anal. Chem.», 53 (5), 1970, p. 1058-1059.
- [28] Official Methods of Analysis of the AOAC, Washington, D.C. 14th Ed., 1984, p. 537-538.
- [29] Oliveira, J.M.B. et al. «Rev. Farm. Bioq. UFMG», 8 (1/2), 1987, p. 79-86.
- [30] Porter, M.L. et al. «J. Assoc. Off. Anal. Chem.», 53 (6), 1970, p. 1300-1303.
- [31] Robinson, J. et al. «Nature» (Lond.), 214, 1967, p. 1307-1311.
- [32] Rogers, W.M. «J. Assoc. Off. Anal. Chem.», 55 (5), 1972, p. 1053-1057.
- [33] Sawyer, L.D. «J. Assoc. Off. Anal. Chem.», 65 (5), 1982, p. 1122-1128.
- [34] Suzuki, T. et al. «J. Assoc. Off. Anal. Chem.», 62 (3), 1979, p. 681-684.
- [35] Suzuki, T. et al. «J. Assoc. Off. Anal. Chem.», 62 (3), 1979, p. 689-694.
- [36] Wessel, J.R. «J. Assoc. Off. Anal. Chem.», 52 (1), 1969, p. 172-175.
- [37] Wood, N.F. «Analyst», 94, 1969, p. 399-405.
- [38] Zell, M.; Ballschmitter, K. «Fresen. Z. Anal. Chem.», 300, 1980, p. 387-402.

Abreviaturas:

ACN - Acetonitrilo	E.E. - éter etílico
ACT - acetona	E.P. - éter petróleo
Benz. - benzeno	Hex. - hexano
Clorof. - Clorofórmio	Kow - Coeficiente de partilha octanol-água
DMSO - dimetilsulfóxido	Met. - metanol

A Universidade Portuguesa tem 700 anos

As instituições de Cultura em Portugal iniciaram-se com a criação do Estudo Geral, no reinado de D. Dinis



Num documento datado de 13 de Novembro de 1288 um numeroso grupo de eclesiásticos portugueses (superiores de mosteiros e igrejas de que o rei de Portugal era o padroeiro) dirige-se ao Papa e diz que, «havido plenária deliberação no caso», decidiram criar um estudo geral de ciências «por vermos que, à falta dele, muitos desejosos de estudar e de entrar no estado clerical, atalhados com a falta de despesas, e incómodos dos longos caminhos e ainda dos perigos da vida, não ousam e temem ir estudar a outras partes remotas, de que resulta [...] ficar no estado secular contra vontade». Para isso falaram com o rei D. Dinis, que concordou; os signatários, também com o consentimento do rei, decidiram que os salários dos mestres e doutores fossem pagos pelas rendas das suas igrejas e mosteiros. Pedem ao Papa que confirme obra tão pia e louvável.

Por uma bula de 9 de Agosto de 1290, o Papa Nicolau IV, dirigindo-se aos «dilectis universitati magistrorum et scholarum ulisbon», começa por lhes dizer que só deseja que, retirados certos impedimentos, se observe em Portugal o culto divino.. Diz depois ter conhecimento de que, por intervenção do rei, foi implantado o Estudo Geral de Lisboa e foram estabelecidos salários pelos abades, priores e reitores de algumas igrejas. Dá o seu acordo a tudo quanto nesta matéria está feito,

recomenda ao rei que, com o seu poder, obrigue os cidadãos de Lisboa a arrendarem aos estudantes casas por preços justos e autoriza o pagamento aos mestres, incluindo os não verdadeiros (*etiam si personatus*). O bispo de Lisboa fica com competência para conceder as licenciaturas aos que concluíssem os cursos em Artes, Cânones, Leis e Medicina.

O estudo Geral de Lisboa teve vida agitada. O rei esforçou-se por protegê-lo. Um alvará de 1300 revela que antes dessa data se apoderou de um campo e de uma vinha que pertenciam ao cabido da Sé de Lisboa para lá mandar fazer o edifício da universidade mas em 1303 aforou o edifício – a que chama «as casas novas da Pedreira as quais foram escolas» – a D. Judá Navarro, rabi-mor dos judeus de Lisboa, e a outros membros da sua família. Em 1307 já o rei tinha pedido ao Papa a confirmação dos privilégios concedidos ao Estudo de Lisboa, que passou a funcionar em Coimbra em 1308. Mas em 1338 D. Afonso IV voltou a instalar a universidade em Lisboa, com o argumento de que o rei costumava passar o Inverno em Coimbra e precisava de casas para aposentar a gente da corte. Foi ainda D. Afonso IV quem, em 1354, voltou a instalar a universidade em Coimbra, sem que desta vez explicasse os motivos. Mas as coisas não corriam bem. Por uma carta de D. Pedro I, de 1357, sabemos que nem os professores davam aulas, nem, se as davam, os alunos acorriam a escutá-las. Nas Cortes de Elvas, de 1361, os homens-bons de Coimbra queixavam-se dos abusos dos escolares, que gozavam dos privilégios vindos do tempo de D. Dinis para extorquirem e oprimirem os moradores, e em especial os que vendiam géneros alimentícios. E, ao longo de todo o século XIV, há notícia da presença de alunos portugueses em universidades estrangeiras. A classe intelectual era, em Portugal, em grande parte judaica, e os judeus não eram admitidos a ensinar na Universidade, instituição canónica. Isso ajuda a explicar que só depois do encerramento das sinagogas, com a conversão forçada de 1498, a Universidade portuguesa tenha alcançado sair da obscuridade em que até então vegetou.

J. Hermano Saraiva,
«História de Portugal»