

Organofosforados e carbamatos no leite produzido em quatro regiões leiteiras no Brasil: ocorrência e ação sobre *Listeria monocytogenes* e *Salmonella* spp.

Organophosphates and carbamates in milk produced in four milk producing regions from Brazil: occurrence and activity against *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* spp.

Luís Augusto NERO^{1,2*}, Marcos Rodrigues de MATTOS³, Vanerli BELOTI³, Márcia Aguiar Ferreira BARROS³, Daisy PONTES NETTO³, Bernadette Dora Gombossy de Melo FRANCO^{2*}

Resumo

Organofosforados e carbamatos são compostos utilizados no controle de parasitas em animais e podem gerar resíduos nos produtos alimentícios derivados, representando um risco para o consumidor. O presente estudo objetivou pesquisar a presença de resíduos de organofosforados e carbamatos em leite cru produzido em quatro regiões leiteiras no Brasil e verificar se a presença desses compostos teria alguma relação com a ausência de *Listeria monocytogenes* e *Salmonella* spp., anteriormente observada nessas amostras. Entre 209 amostras analisadas, a presença de ao menos um desses compostos foi detectada em 196 (93,8%). Para a avaliação da sua interferência na detecção de *L. monocytogenes* e *Salmonella* spp., 28 amostras de leite positivas e negativas para esses compostos foram submetidas à fervura por 10 minutos e adicionadas desses patógenos, monitorando-se sua multiplicação durante armazenamento a 4 °C e a 25 °C. Não houve diferença significativa ($p \leq 0,05$) entre as taxas médias de multiplicação de *L. monocytogenes* e *Salmonella* spp. nas amostras de leite com diferentes resultados para resíduos de organofosforados ou carbamatos, indicando que esses patógenos não foram afetados pela presença desses resíduos. Entretanto, a alta frequência de amostras de leite cru positivas para esses compostos é preocupante devido ao grande risco que representam para os consumidores, mesmo após o beneficiamento por tratamento térmico.

Palavras-chave: leite; pesticidas; organofosforados; carbamatos; *Listeria monocytogenes*; *Salmonella* spp..

Abstract

Chemical residues may be present in foods due to contamination in early stages of production, posing a potential risk to consumers. Organophosphates and carbamates are used in the control of parasites in animals and may generate residues in foods derived from these animals, like milk. This study aimed to survey the presence of these two pesticides in raw milk samples collected in four important milk-producing regions in Brazil and observe any possible relationship between presence of these compounds and the previously reported absence of *Listeria monocytogenes* e *Salmonella* spp. in the same milk samples. Organophosphates and/or carbamates were detected in 196 (93.8%) out of 209 samples. For evaluation of the interference of these products on detection of *L. monocytogenes* and *Salmonella* spp., 28 milk samples containing these pesticides were boiled for 10 minutes, added of the pathogens, and their multiplication was monitored during storage at 4 °C and 25 °C. No significant differences ($p \leq 0.05$) were observed in the growth of these pathogens in the milk samples when compared to negative controls, indicating absence of interference of the compounds on the detection of *L. monocytogenes* or *Salmonella* spp. However, the high frequency of raw milk samples containing organophosphates and/or carbamates poses a potential health problem to the consumers, even after heat treatment of the milk.

Keywords: milk; pesticides; organophosphates; carbamates; *Listeria monocytogenes*; *Salmonella* spp..

1 Introdução

Organofosforados e carbamatos são compostos químicos amplamente utilizados em agropecuária como inseticidas, no controle de pragas em plantações e de parasitas em animais. O Brasil é um dos maiores consumidores desses produtos no mundo, tendo participado com 7% no consumo mundial em 1995⁶. Ambos compostos são tóxicos para o ser humano e apresentam mecanismo comum de ação baseado na inibição da acetilcolinesterase, causando um acúmulo de acetilcolina nas sinapses nervosas⁸. Esses compostos são potencialmente tóxicos ao homem, podendo causar efeitos adversos ao sistema nervoso central e periférico, ter ação imunodepressora ou ser cancerígeno, entre outros. Especificamente esses pesticidas não

se acumulam no organismo, porém seus efeitos são acumulativos^{6,8,16}. Os organofosforados e carbamatos são responsáveis pelo maior número de intoxicações no meio rural. Segundo dados da Organização Mundial de Saúde, cerca de 300.000 casos de intoxicação por defensivos agrícolas foram reportados no Brasil em 1993⁶.

Quando aplicados de forma inadequada na lavoura, essas substâncias podem contaminar cursos de água, além de gerar resíduos em produtos agrícolas. Animais que ingerem água ou alimentos contendo essas substâncias podem depositá-las na gordura e músculos, podendo ser encontradas também no leite¹⁵. A aplicação de pesticidas em animais deve obedecer a prazos de carência específicos, que quando não são respeitados geram resíduos nos alimentos produzidos, como carne e leite¹⁵. Especificamente em leite, a contaminação dessas substâncias ocorre principalmente nas fases iniciais de produção. A presença de resíduos de pesticidas nesse produto e em seus derivados é muito comum em todo mundo, sendo esses compostos considerados potenciais perigos à saúde pública^{3,10,11,12}.

Apesar da importância de pesticidas em leite e derivados, microrganismos patogênicos ainda são considerados como os

Recebido para publicação em 8/8/2006

Aceito para publicação em 24/1/2007 (001810)

¹ Universidade Federal de Viçosa, Departamento de Veterinária, Campus Universitário, Av. P. H. Rolfs, s/n, Centro, CEP 36570-000, Viçosa - MG, Brasil, E-mail: nero@ufv.br, bfranco@usp.br

² Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo - USP

³ Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, Universidade Estadual de Londrina - UEL

*A quem a correspondência deve ser enviada

perigos mais importantes relacionados a esses alimentos, em especial *Listeria monocytogenes* e *Salmonella* spp.^{4,9,13}. Entretanto, em recente estudo realizado no Brasil com leite cru, obtido em propriedades localizadas em quatro importantes regiões leiteiras do País apresentando diferentes graus de tecnificação (ordenha mecânica, em sistema fechado ou semi-fechado, ou ordenha manual), verificou-se que esses patógenos não foram detectados em nenhuma das amostras analisadas¹⁴. Considerando que organofosforados e carbamatos são amplamente utilizados na agropecuária brasileira, esse estudo objetivou avaliar a ocorrência desses compostos em amostras de leite obtidas nessas mesmas regiões de produção. O estudo objetivou também avaliar o potencial dessas substâncias em interferir na detecção de *Listeria monocytogenes* e de *Salmonella* spp. em leite cru, uma vez que, mesmo sem ação antimicrobiana comprovada, os pesticidas poderiam causar um estresse sobre as bactérias ou interferir no funcionamento dos meios de cultura utilizados para o isolamento desses patógenos, o que poderia explicar os resultados negativos obtidos.

2 Material e métodos

2.1 Prevalência de organofosforados e carbamatos em leite cru

Duzentas e nove amostras de leite cru foram coletadas em propriedades leiteiras localizadas em quatro Estados do Brasil (Figura 1), assim distribuídas: a) 47 propriedades na região de Viçosa (MG), sendo 36 com ordenha manual, nove com ordenha mecânica em sistema semi-fechado e duas com ordenha mecânica em sistema fechado; b) 50 propriedades na região de Pelotas (RS), sendo 31 com ordenha mecânica em sistema semi-fechado e 19 com ordenha manual; c) 63 propriedades na região de Londrina (PR), sendo 9 com ordenha mecânica em sistema semi-fechado e 43 com ordenha manual; e d) 49 propriedades na região de Botucatu (SP), sendo 14 com ordenha em sistema semi-fechado e 35 com ordenha manual. Todas as amostras foram coletadas dos tanques resfriadores das propriedades, acondicionados em frascos estéreis e imediatamente congeladas, sendo posteriormente submetidas a análises laboratoriais.

A presença de organofosforados e carbamatos nas amostras de leite cru foi pesquisada pela técnica de Cromatografia em Camada Delgada, conforme metodologia AOAC². Para extração, 5 mL de cada amostra foram adicionados de 2 mL de Ácido Fórmico (85%), 2 mL de Sulfato de Sódio Anidro (30%) e 30 mL de Acetona (99,5%) P. A., com agitação por 10 minutos seguida de centrifugação por 10 minutos a 2000 RPM. O sobrenadante foi separado e transferido para um funil de decantação, no qual se adicionaram 40 mL de Éter de Petróleo P. A. O novo sobrenadante foi filtrado (papel filtro com 5 g de Sulfato de Sódio Anidro) e mantido em capela de exaustão para secagem completa, e o sedimento resultante diluído em 2 mL de Éter de Petróleo P. A. e aplicado à placa de Sílica Gel 60 (13% gesso, 0,25 mm de espessura). A fase móvel utilizada foi de Clorofórmio P. A. (70 mL) e Acetona P. A. (30 mL). Para a revelação de organofosforados, foi utilizado Rodamina B P. A. e para carbamatos, p-Nitroalanina e Nitrito de Sódio. Em

todas as placas utilizou-se um padrão (controle positivo). A sensibilidade dessa metodologia é de 0,1 mg.L⁻¹, tanto para organofosforados como para carbamatos.



Figura 1. Mapa mostrando os cinco principais Estados produtores de leite no Brasil (em cinza: Minas Gerais - MG, Goiás - GO, São Paulo - SP, Paraná - PR e Rio Grande do Sul - RS) e a localização das quatro áreas de estudo avaliadas.

2.2 Avaliação da interferência da presença de organofosforados e carbamatos na detecção de *Listeria monocytogenes* e *Salmonella Enteritidis* em leite cru

Culturas de *Listeria monocytogenes* ATCC 7644 e *Salmonella* Enteritidis ATCC 13076, mantidas a 4 °C em ágar Trypticase de Soja acrescido de 0,6% de Extrato de Levedura (TSA-YE) (Oxoid Ltd., Basingstoke, England), foram reativadas em placas com TSA-YE adicionado de sangue de carneiro desfibrinado 7%, incubadas por 24 horas a 30 °C e 35 °C para *L. monocytogenes* e *S. Enteritidis*, respectivamente. Após a incubação, algumas colônias de cada microrganismo foram semeadas em caldo Trypticase de Soja adicionado de Extrato de Levedura (0,6%) (TSB-YE) (Oxoid) e incubadas nas mesmas temperaturas usadas inicialmente. Após turvação do TSB-YE semeado (cerca de 18 horas), retirou-se uma alíquota para medida da absorbância em $\lambda = 660$ nm (espectrofotômetro Cintra 5). Outra alíquota foi submetida a diluições decimais em TSB-YE que foram semeadas em placas Petrifilm™ AC (3M Microbiology, St. Paul, MN, EUA), incubadas a 35 °C. Determinou-se assim o número de UFC.mL⁻¹ correspondente à absorbância da cultura.

Nessa fase da pesquisa, 28 novas amostras de leite cru foram coletadas na região de Londrina, PR e submetidas à fervura por 10 minutos, separando-se uma porção de 50 mL para pesquisa de organofosforados e carbamatos e quatro porções de 100 mL para as análises microbiológicas. Até o momento do uso, a porção de 50 mL foi mantida congelada e as de 100 mL refrigeradas. A esterilidade das amostras fervidas foi verificada através da semeadura em placas Petrifilm™ AC, com incubação

a 35 °C por 24 horas. As porções de 50 mL foram submetidas à detecção de resíduos de organofosforados e carbamatos, conforme metodologia já descrita. De acordo com os resultados para esses resíduos, as amostras de leite foram classificadas em quatro categorias: a: positivas para ambos os pesticidas; b: positivas para organofosforados apenas; c: positivas para carbamatos apenas e d: negativas para os dois pesticidas.

Das porções de 100 mL, duas foram experimentalmente inoculadas com 1 mL da cultura de *L. monocytogenes*, e duas com a cultura de *S. Enteritidis*, de forma a atingirem a concentração final aproximada de 10^3 UFC.mL⁻¹. Para cada microrganismo inoculado, uma das alíquotas foi mantida em refrigeração (4 °C) e a outra em temperatura ambiente (25 °C), simulando as condições de armazenamento empregadas nas propriedades leiteiras. Os patógenos foram enumerados após 0, 24 e 48 horas nas amostras refrigeradas e após 0, 4 e 8 horas nas amostras mantidas em temperatura ambiente, empregando-se diluições decimais seriadas em solução salina 0,85% e semeadura em placas Petrifilm™ AC, com incubação a 35 °C por 48 horas. A influência dos resíduos de pesticidas na sobrevivência de *L. monocytogenes* e *S. Enteritidis* nas amostras mantidas a 4 °C foi determinada correlacionando-se as contagens após 24 e 48 horas com a contagem no tempo zero, ou seja, T_{24h}/T_{0h} e T_{48h}/T_{0h} , respectivamente. Nas amostras mantidas a 25 °C, essas relações foram calculadas para as contagens após 4 e 8 horas (T_{4h}/T_{0h} e T_{8h}/T_{0h}). A significância das diferenças das relações obtidas para *L. monocytogenes* e *S. Enteritidis* a 4 °C (T_{24h}/T_{0h} e T_{48h}/T_{0h}) e 25 °C (T_{4h}/T_{0h} e T_{8h}/T_{0h}) foi avaliada pelo teste de Tukey ($p < 0,05$), utilizando o programa Statistica 6.0.

3 Resultados e discussão

Conforme pode ser observado na Figura 2, 196 (93,8%) amostras de leite cru foram positivas para organofosforados e/ou carbamatos e apenas 13 (6,2%) não continham esses pesticidas. Especial atenção deve ser dada às amostras de leite obtidas na região de Pelotas, RS, que foram todas positivas para pelo menos um desses compostos. Embora a concentração dos compostos nas amostras de leite não tenha sido determinada, a sensibilidade da metodologia utilizada sugere níveis elevados, bastante acima dos Limites Máximos de Resíduos (LMRs) especificados pelo Codex Alimentarius (Tabela 1)⁷. A alta frequência desses resíduos nas amostras de leite cru analisadas, independente da região de produção, evidencia a necessidade de um controle mais eficiente no seu emprego na produção agropecuária brasileira, já que essas substâncias permanecem no produto após o beneficiamento por pasteurização ou esterilização.

A presença de resíduos químicos no leite é um problema mundial. Em estudo realizado na Grécia, detectaram-se resíduos de pesticidas em 28,9% das amostras de leite cru avaliadas, mas os níveis de contaminação foram considerados seguros pela FAO/WHO¹¹. Na Espanha, estudos realizados com leite pasteurizado e leite cru apresentaram resultados diferentes. Enquanto MARTÍNEZ et al.¹² observaram que 95% das amostras de leite pasteurizado analisadas possuíam resíduos de organoclorados e que 12,9% das amostras excediam os limites

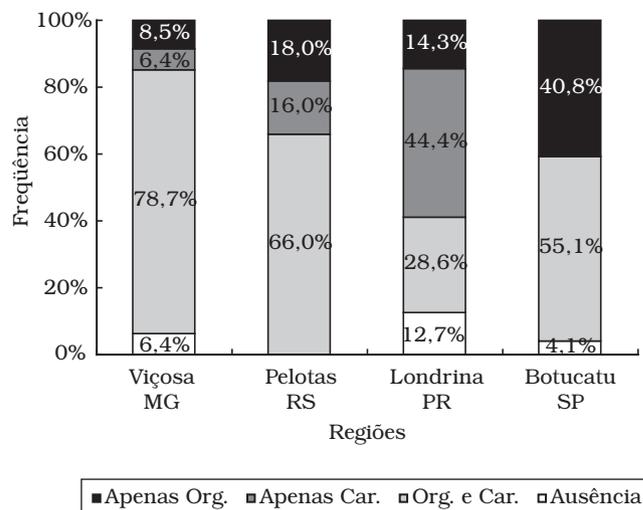


Figura 2. Distribuição das 209 amostras de leite cru coletadas nas 4 regiões estudadas de acordo com os resultados positivos e negativos para resíduos de organofosforados e carbamatos (Org. = organofosforados; e Car. = carbamatos).

Tabela 1. Relação de alguns organofosforados e carbamatos e seus respectivos Limites Máximos de Resíduos (LMR) em leite.

Composto químico	LMR em leite (mg.L ⁻¹)
Carbamatos	
Aldicarb	0,010
Carbaril	0,050
Carbofuran	0,050
Methomil	0,020
Oxamil	0,020
Organofosforados	
Clorpirifós	0,020
Diclorvos	0,020
Fenitrothion	0,002
Metamidopós	0,020

Fonte: Codex Alimentarius⁷.

permitidos pela União Européia, LOSADA et al.¹⁰ observaram uma grande variação na presença desses compostos em leite cru (0 a 66,67%), mas sempre abaixo dos limites. Na Índia, a presença de resíduos de pesticidas, principalmente lindane, foi detectada em leite e manteiga. Outros pesticidas pesquisados apresentaram menor incidência, em relação a levantamentos anteriores realizados no mesmo país³.

De forma geral, não foram observadas diferenças significativas ($p < 0,05$) nas taxas de multiplicação de *L. monocytogenes* e *S. Enteritidis* nas 28 amostras de leite estudadas, independentemente da temperatura de manutenção (Tabela 2). Os comportamentos dos dois patógenos nas situações simuladas foram similares aos obtidos em outros estudos^{1,5}. Esses resultados indicam que a interferência dos resíduos de pesticidas, se existente, foi mínima, e não pôde ser detectada nas condições em que foi avaliada.

4 Conclusões

A presença de organofosforados e carbamatos em leite cru produzido no Brasil é comum, alertando para a necessidade de

Tabela 2. Taxas médias de multiplicação (\pm desvio padrão) de *Listeria monocytogenes* ATCC 7644 e *Salmonella* Enteritidis ATCC 13076 em amostras de leite positivas ou não para resíduos de pesticidas, mantidas a 4 °C e 25 °C.

Categorias*	n	<i>Listeria monocytogenes</i>				<i>Salmonella</i> Enteritidis			
		4 °C		25 °C		4 °C		25 °C	
		T_{24h}/T_{0h}	T_{48h}/T_{0h}	T_{4h}/T_{0h}	T_{8h}/T_{0h}	T_{24h}/T_{0h}	T_{48h}/T_{0h}	T_{4h}/T_{0h}	T_{8h}/T_{0h}
a	12	0,96 \pm 0,29 ^{a,b}	1,32 \pm 1,27 ^a	1,65 \pm 1,23 ^b	26,14 \pm 19,33 ^a	1,16 \pm 0,61 ^a	1,50 \pm 0,70 ^a	2,88 \pm 1,35 ^a	164,34 \pm 97,13 ^a
b	06	0,67 \pm 0,33 ^b	1,51 \pm 0,89 ^a	5,10 \pm 3,16 ^a	33,50 \pm 18,61 ^a	0,57 \pm 0,50 ^a	0,61 \pm 0,58 ^a	7,04 \pm 1,62 ^a	148,38 \pm 46,04 ^a
c	02	1,80 \pm 0,77 ^a	2,20 \pm 1,13 ^a	1,83 \pm 1,18 ^{a,b}	20,00 \pm 0,00 ^a	0,80 \pm 0,10 ^a	0,80 \pm 0,20 ^a	1,91 \pm 0,20 ^a	175,50 \pm 14,12 ^a
d	08	1,05 \pm 0,22 ^{a,b}	1,91 \pm 1,45 ^a	2,34 \pm 1,26 ^{a,b}	34,06 \pm 15,49 ^a	2,58 \pm 5,71 ^a	5,86 \pm 13,59 ^a	6,00 \pm 5,48 ^a	167,96 \pm 136,99 ^a

Médias com letras iguais na mesma coluna não apresentaram diferença estatisticamente significativa (teste Tukey, $p < 0,05$); e * a = positivos para resíduos de organofosforados e carbamatos simultaneamente, b = positivos apenas para resíduos de organofosforados, c = positivos apenas para resíduos de carbamatos, d = negativos para resíduos de organofosforados e carbamatos.

quantificar essas substâncias para determinação dos riscos que elas podem representar aos consumidores. A presença desses compostos no leite cru não interfere na detecção laboratorial de *Listeria monocytogenes* e *Salmonella* Enteritidis, eventualmente presentes no leite.

Agradecimentos

Os autores agradecem à FAPESP pela concessão da Bolsa de Doutorado para o autor L. A. Nero (Processo 01/13076-8) e à 3M do Brasil pela doação das placas Petrifilm™ AC usadas no estudo.

Referências bibliográficas

- ABUSHELAIBI, A. A. et al. Survival and growth of *Salmonella* in reconstituted infant cereal hydrated with water, milk or apple juice and stored at 4 °C, 15 °C and 25 °C. **Food Microbiology**, London, v. 20, n. 1, p. 17-25, feb. 2003.
- AOAC. **Official Methods of Analysis of AOAC International**. 17 ed. Gaithersburg: AOAC International, 2003. 141 p.
- BATTU, R. S.; SINGH, B.; KANG, B. K. Contamination of liquid milk and butter with pesticide residues in the Ludhiana district of Punjab state, India. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, Orlando, v. 59, n. 3, p. 324-331, nov. 2004.
- BOOR, K. J. Pathogenic microorganisms of concern to the dairy industry. **Dairy, Food and Environmental Sanitation**, Ames, v. 17, n. 11, p. 714-717, nov. 1997.
- BOVILL, R. et al. Predictions of growth for *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* during fluctuating temperature. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 59, n. 3, p. 157-165, sep. 2000.
- BRASIL, Ministério da Saúde - Fundação Nacional da Saúde. Intoxicações por agrotóxicos. In: BRASIL, Ministério da Saúde - Fundação Nacional da Saúde. **Guia de Vigilância Epidemiológica**. 4 ed. Brasília: FUNASA, 1998, p. 1-17.
- CODEX ALIMENTARIUS. **Pesticide Residues in Food**. Disponível em <http://www.codexalimentarius.net/mrls/pestdes/jsp/pest_q-e.jsp>. Acesso em: 01 julho 2006.
- ESCÁMEZ, J. C.; RUBÍ, J. C. M.; RODRÍGUEZ, F. Y. Intoxicación por Organoclorados, Carbamatos y Herbicidas. In: CEBRIÁN, J. G. et al. **Principios de Urgencias, Emergencias y Cuidados Críticos**. Disponível em <<http://umeet.uninet.edu/tratado/c1006i.html>>. Acesso em 01 julho 2006.
- JAY, J. M., LOESSNER, M. J.; GOLDEN, D. A. **Modern Food Microbiology**. 7 ed. Berkely: SPRINGER Publishers, 2005. 790 p.
- LOSADA, A. et al. Organochlorine pesticides residues in bovine milk from Léon (Spain). **Science of the Total Environment**, Amsterdam, v. 181, n. 2, p. 133-135, mar. 1996.
- MALLATOU, H. et al. Pesticide residues in milk and cheeses from Greece. **Science of the Total Environment**, Amsterdam, v. 196, n. 2, p. 111-117, mar. 1997.
- MARTINEZ, M. P. et al. Organochlorine pesticides in pasteurized milk and associated health risks. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 35, n. 6, p. 621- 624, jun. 1997.
- McLAUCHLIN, J. et al. *Listeria monocytogenes* and listeriosis: a review of hazard characterisation for use in microbiological risk assessment of foods. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 92, n. 1, p. 15-33, apr. 2004.
- NERO, L. A. et al. Hazards in non-pasteurized milk on retail sale in Brazil: prevalence of *Salmonella* spp, *Listeria monocytogenes* and chemical residues. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 35, n. 3, p. 211-215, jul./sep. 2004.
- ROTHWELL, J. T. et al. Residues of zeta-cypermethrin in bovine tissues and milk following pour-on and spray application. **Pest Management Science**, West Sussex, v. 57, n. 11, p. 993-999, nov. 2001.
- RUBÍ, J. C. M. et al. Intoxicaciones por organofosforados. In: CEBRIÁN, J. G. et al. **Principios de Urgencias, Emergencias y Cuidados Críticos**. Disponível em <<http://umeet.uninet.edu/tratado/c1005i.html>>. Acesso em 01 julho 2006.