

COMPARAÇÃO ENTRE MÉTODOS PARA PESQUISA DE SUJIDADES E VERIFICAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE HIGIENE DAS MASSAS ALIMENTÍCIAS POR MICROSCOPIA*

Claydes de Quadros ZAMBONI**
Márcia Bittar ATUI**

RIALA6/652

ZAMBONI, C.Q. & ATUI, M.B. — Comparação entre métodos para pesquisa de sujidades e verificação das condições de higiene das massas alimentícias por microscopia. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 49 (1): 11-17, 1989.

RESUMO: Foram analisadas 150 amostras de macarrão, sendo 50 com ovos, 50 comum e 50 de sêmola, de agosto de 1985 a novembro de 1987. Foram utilizados dois métodos de extração de sujidades leves, o da digestão com pancreatina e o da hidrólise ácida, a fim de verificar a eficiência destes quanto à recuperação de sujidades, ao menor tempo na execução do método, à facilidade de processamento, e às condições higiênicas do macarrão. Pelo método da hidrólise ácida, foram condenadas 48% das amostras de macarrão com ovos, 80% das de macarrão comum e 58% das do macarrão de sêmola. Pelo método da hidrólise enzimática, foram condenadas 36% das amostras de macarrão com ovos, 50% das de macarrão comum e 40% das de macarrão de sêmola de trigo. Concluiu-se que o método da hidrólise ácida é mais eficiente, além de ocupar o analista em tempo menor e utilizar reagentes de mais fácil aquisição e menos dispendiosos; ainda, que o macarrão comum apresentou a pior qualidade, quando se usou como parâmetro o número de fragmentos de insetos e o de outras sujidades leves. Sugere-se que seja mantida a legislação atual, que exige ausência de pelos de roedor, ácaros vivos e/ou mortos, insetos vivos e/ou mortos e larvas de insetos vivos e/ou mortos, e que sejam tolerados 30 fragmentos de insetos em 225 g de macarrão, visto que 50% do total das 150 amostras estava no limite proposto, quando analisadas pelo método da hidrólise ácida.

DESCRITORES: macarrão, impurezas de origem biológica em, detecção microscópica; macarrão, impurezas de origem biológica em, extração; métodos, hidrólise enzimática, hidrólise ácida.

INTRODUÇÃO

As massas alimentícias ou macarrão, que têm como principal matéria-prima a farinha ou sêmola de trigo, podem apresentar contaminação biológica causada pelos próprios ingredientes, ou adquirida na sua elaboração.

Os principais contaminantes encontrados em massas alimentícias são fragmentos de insetos originários do trigo, contaminado por pragas do campo ou nos armazéns, empregado na sua fabricação; pela manipulação ou estocagem de farinha em condições higiênicas insatisfatórias, e pelos insetos que atacam o macarrão durante a sua

elaboração. Os insetos envolvidos neste processo pertencem principalmente aos gêneros *Sitophilus*, *Oryzaephilus*, *Tribolium*, *Rhizopertha* e *Ephestia*. São encontrados, também, outros contaminantes, como pelos de roedor, que são provenientes dos excrementos deixados por ratos ou camundongos no trigo ou na farinha estocada. Além disso, se a estocagem do trigo, da farinha ou do macarrão for inadequada, em ambiente com umidade relativa superior a 68% e temperatura elevada, condições favoráveis ao desenvolvimento de fungos, e não for executada limpeza do ambiente, há probabilidade do desenvolvimento de ácaros naqueles produtos.

* Realizado na Seção de Microscopia Alimentar do Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, SP. Apresentado no 1º Congresso Brasileiro de Produtos Farmacêuticos, Cosméticos e Afins e 6º Congresso Paulista de Farmacêuticos, São Paulo, SP, 1987.

** Do Instituto Adolfo Lutz.

Os defensivos agrícolas ou ambientais podem reduzir, mas não eliminam totalmente os insetos do campo ou dos produtos armazenados; na impossibilidade de se evitar tais contaminações, pode-se concordar em tolerar a presença dessas sujidades, na forma de fragmentos, desde que a quantidade seja reduzida.

A legislação em vigor tolera até 30 fragmentos de insetos em 100 g de amostra de massas alimentícias, padrão esse a que a indústria do setor alega não ser possível obedecer, sugerindo uma tolerância de até 60 fragmentos de insetos em 100 gramas do referido produto. Nos resultados das pesquisas efetuadas, separamos o número de fragmentos de insetos, encontrados nas análises, de 0 a 30, de 31 a 60 e mais de 60, para verificar a situação atual com relação a esses parâmetros^{4,5,8}.

Tendo em vista o problema sanitário, devemos levar em conta dois aspectos relacionados com a presença de insetos, fragmentos de insetos, ácaros, excrementos e pelos de roedor em um alimento: o da degradação dos nutrientes causada pela espécie que se desenvolveu no alimento e o da contaminação com produtos do metabolismo dessa praga, como excrementos, exúvias, secreções, larvas, ovos, espécimes mortos.

Pesquisas realizadas nos últimos anos em vários países, tendo como objetivo verificar a relação que alimentos contaminados com insetos e ácaros têm com a saúde do homem, mostraram haver uma atividade alérgica crescente, seja pelo contato com a pele e as vias respiratórias ou através da ingestão desses alimentos⁹. As baratas, ratos, moscas, formigas, camundongos, que são pragas oportunistas, são importantes como vetores, porque estão sempre em contato com fontes de bactérias patogênicas como esgoto, esterco, solo, fezes e outros.

A importância da pesquisa desse material estranho de origem biológica é cada vez mais compreendida, havendo necessidade do emprego de métodos mais precisos e que demandem menos tempo, a fim de se obter uma visão das condições de higiene dos produtos alimentares.

O objetivo deste trabalho é o de analisar massas alimentícias para verificar as condições higiênicas das mesmas, levando em conta a presença de insetos, fragmentos de insetos, ácaros e pelos de roedor, utilizando dois métodos de extração de sujidades leves, em paralelo: um, que usa como agente de digestão, a pancreatina, e de extração, o querosene; outro, em que é utilizada a hidrólise ácida em autoclave, e como agente extrator, óleo mineral.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram analisados 150 amostras de massas alimentícias, assim distribuídas: 50 amostras de macarrão com ovos, 50 de macarrão comum e 50 amostras de macarrão de sêmola, de diferentes marcas, adquiridas em vários supermercados e mercearias da Capital e do Interior do Estado de São Paulo, além de algumas enviadas para o laboratório por indústrias a fim de serem submetidas à análise de orientação, de agosto de 1985 a novembro de 1987.

Simultaneamente, foram contaminadas no laboratório amostras-padrão de massas alimentícias com 10 élitros, 10 coleópteros adultos, 20 pelos de camundongos e 10 larvas de insetos. A contaminação foi efetuada segundo as técnicas descritas por BRICKEY et alii⁶.

Para a extração de sujidades leves, foram utilizados dois métodos:

Método da digestão com pancreatina

Foi utilizado um tamis nº 140 para remover a contaminação que ocorreu antes da moagem e os elementos histológicos dos vegetais. A seguir, foi feita extração no frasco armadilha de Wildman, usando querosene. Foram feitas algumas adaptações às condições do laboratório, já descritas em trabalhos anteriores^{11,12}.

Método da hidrólise ácida

Foi utilizado um tamis nº 230 para remover a contaminação e os elementos histológicos. A seguir, foi feita extração com óleo mineral, em percolador, segundo o "Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists"^{1,2,3} e "American Association of Cereal Chemists Approved Methods"¹⁰, que descrevemos a seguir:

Pesar 225 g de amostra em um béquer de 1,5 a 2 litros. Adicionar à amostra 1 litro de ácido clorídrico (30 + 970) e 0,3 ml de solução anti-espuma (1g de Dow Corning Antifoam A diluído em 20 ml de acetato de etila). Autoclavar a 121°C. Transferir para um tamis nº 230 e lavar com água quente (50-70°C) para remover todo o líquido inicial e a maior porção do material mais fino. Transferir novamente o material que ficou no tamis para o béquer, utilizando água quente até cerca de 1 litro. Adicionar 30 ml de ácido clorídrico, 50 ml de óleo mineral (nujol). Adaptar um agitador mecânico ao béquer.

Agitar durante 6 minutos. Transferir imediatamente o material para um percolador contendo 250 ml de água quente. Lavar as paredes do béquer com água quente, para retirada do resíduo e adicionar esta água ao percolador. Completar até

o volume de 1.700 ml com água quente. Depois de 2 a 3 minutos, retirar a camada inferior até que o volume da mistura no percolador fique reduzido a 250 ml. Desprezar o líquido drenado e tornar a completar o volume de 1.700ml com água quente, lavando as paredes do percolador. Depois de 2 a 3 minutos, retirar a camada inferior e tornar a completar o volume com água quente, repetindo a operação por mais duas vezes (depois disso a camada inferior deve ficar quase que completamente livre de matéria em suspensão; se isso não ocorrer, repetir as lavagens por uma ou mais vezes). Descarregar, finalmente, a camada de água-óleo até a marca de 250 ml; colocar o béquer utilizado no início da técnica sob o percolador e descarregar totalmente. Lavar imediatamente as paredes do percolador com porções aproximadas de 50 ml de água quente, álcool etílico e água fervente.

Transferir o material do béquer para um papel

de filtro riscado com linhas paralelas distantes 5mm entre si, adaptado a um funil de Büchner, e filtrar a vácuo. Lavar o béquer com porções de 50 ml de álcool etílico, usando um bastão de vidro com extremidade protegida com borracha, para limpar as paredes do béquer, quando necessário.

Examinar os papéis ao microscópio estereoscópico com aumento de 30 X.

RESULTADOS

Os resultados obtidos nas análises de sujidades em massas alimentícias estão expressos nas tabelas 1, 2 e 3.

Os resultados obtidos nas análises das amostras padrão, contaminadas no laboratório e submetidas aos dois métodos em estudo, mostraram haver recuperação completa dos contaminantes adicionados.

TABELA 1

Sujidades em macarrão com ovos, macarrão de sêmola e macarrão comum, analisados pelo método de hidrólise ácida

Amostras		Macarrão com ovos		Macarrão de sêmola		Macarrão comum	
		Nº	%	Nº	%	Nº	%
Sujidades	Fragmentos de insetos	0 a 30 31 a 60 + de 60	64 22 14	28 13 9	56 26 18	15 8 27	30 16 54
	Total	50	100	50	100	50	100
	Pelos de roedores	0 1 a 2	92 8	38 12	76 24	47 3	94 6
Total	50	100	50	100	50	100	
Insetos mortos	0 + de 1	49 1	98 2	49 1	98 2	46 4	92 8
	Total	50	100	50	100	50	100
	Larvas de insetos mortas	0 + de 1	49 1	98 2	50 0	100 0	50 0
Total		50	100	50	100	50	100
Ácaros mortos		0 + de 1	49 1	98 2	47 3	94 6	50 0
	Total	50	100	50	100	50	100

TABELA 2

Sujidades em macarrão com ovos, macarrão de sêmola e macarrão comum, analisados pelo método da hidrólise enzimática

Amostras		Macarrão com ovos		Macarrão de sêmola		Macarrão comum	
		Nº	%	Nº	%	Nº	%
Sujidades de insetos	0 a 30	39	78	32	64	27	54
	31 a 60	6	12	12	24	11	22
	+ de 60	5	10	6	12	12	24
Total		50	100	50	100	50	100
Pelos de roedor	0	45	90	47	94	47	94
	1 a 2	5	10	3	6	3	6
	Total	50	100	50	100	50	100
Insetos mortos	0	49	98	49	98	49	98
	+ de 1	1	2	1	2	1	2
	Total	50	100	50	100	50	100
Larvas de insetos mortas	0	48	96	50	100	48	96
	+ de 1	2	4	0	0	2	4
	Total	50	100	50	100	50	100
Ácaros mortos	0	49	98	48	96	50	100
	+ de 1	1	2	2	4	0	0
	Total	50	100	50	100	50	100

TABELA 3

Classificação das amostras de macarrão com ovos, macarrão comum e macarrão de sêmola analisadas pelos métodos da hidrólise enzimática e da hidrólise ácida, com referência à legislação em vigor

Amostras	Métodos empregados											
	Hidrólise enzimática						Hidrólise ácida					
	Macarrão c/ ovos		Macarrão comum		Macarrão sêmola		Macarrão com ovos		Macarrão comum		Macarrão sêmola	
	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%
Condenadas	18	36	25	50	20	40	24	48	40	80	29	58
Aprovadas	32	64	25	50	30	60	26	52	10	20	21	42
Total	50	—	50	—	50	—	50	—	50	—	50	—

DISCUSSÃO

À vista dos resultados obtidos, verifica-se que, utilizando-se o método de hidrólise enzimática, o número de fragmentos de insetos e de pelos de roedor encontrado é inferior ao obtido empregando o método da hidrólise ácida.

Aplicando-se o método da digestão com pancreatina, observa-se que, após a filtração do líquido extrator, resta muito amido no papel de filtro, o que dificulta a identificação das sujidades pesquisadas. No método da hidrólise ácida, a recuperação é maior, obtêm-se um papel mais limpo, sendo mais fácil a identificação, tanto dos fragmentos de insetos, como de pelos de roedor e de larvas de insetos. Talvez seja esta a causa de se obter menor contagem de sujidades quando se empregou o método de hidrólise enzimática do que quando foi utilizado o método de hidrólise ácida, visto que, em amostras-padrão contaminadas no laboratório e analisadas pelos dois métodos, a recuperação, tanto de fragmentos de insetos como de pelos de roedor e de larvas, foi igual em ambos.

O desenvolvimento do método da pancreatina é mais dispendioso devido ao preço da enzima, mais demorado, além do que exige a dedicação do analista durante toda a execução da análise. Utilizando-se o método da hidrólise ácida, o tempo empregado na execução da análise é menor, sendo que a fase de hidrólise é realizada em autoclave, poupando a ação do analista pelo menos na primeira etapa do processo.

Em ambos os métodos não foi notada alteração nos fragmentos de insetos e nos pelos de roedor, isto é, tanto a pancreatina, como o ácido clorídrico utilizados na hidrólise do macarrão não atacaram os fragmentos ou pelos, de modo a dificultar sua identificação ao exame microscópico estereoscópico.

Do método da hidrólise ácida pode ser excluída a fase da lavagem com detergentes, preconizada pela AOAC², porque o percolador fica bem limpo usando-se somente álcool etílico para retirar o óleo mineral.

Observou-se que o maior número de fragmentos de insetos foi encontrado em macarrão comum, tanto no analisado pelo método da hidrólise ácida como no submetido ao método da hidrólise enzimática; o maior número de amostras condenadas, contendo mais de 31 fragmentos de insetos em 225g de amostras pertenciam ao macarrão comum, em 80% das amostras em que foi utilizado o método da hidrólise ácida, e em 50% das amostras em que se usou o método da hidrólise enzimática.

Pelos de roedor foram encontrados em maior número de amostras de macarrão de sêmola (24%) quando se utilizou o método da hidrólise ácida e em maior número de amostras de macarrão com ovos (10%), quando foi utilizado o método da hidrólise enzimática.

Os números máximos de fragmentos de insetos encontrados foram 372 em macarrão comum e 345 em macarrão de sêmola, maiores que os encontrados por *Gecan & Atkinsons*⁷, e 282 em macarrão com ovos, menores que os encontrados pelos autores citados, embora a nossa amostragem fosse menor.

O número máximo de pelos de roedor encontrado foi 2 em macarrão de sêmola e em macarrão com ovos, menores que os encontrados por *Gecan & Atkinsons*⁷.

Levando em consideração o número de fragmentos de insetos, podemos verificar que o macarrão de sêmola e o macarrão comum são de qualidade inferior às do macarrão com ovos; e que o macarrão de sêmola apresentou maior contaminação com pelos de roedor, sendo 24% das amostras analisadas impróprias para o consumo pela presença dessa sujidade.

Se extrapolarmos o número de fragmentos de insetos que a legislação tolera de 100 gramas para 225 gramas de macarrão, que é a tomada de ensaio do método, o número de fragmentos de insetos seria 67,5 das 150 amostras analisadas pelo método de hidrólise ácida, somente 22% do total apresentaram número de fragmentos de insetos superior a 60.

Quanto à presença de ácaros, 2% das amostras de macarrão com ovos e 6% das amostras de macarrão de sêmola apresentaram ácaros mortos, quando submetidas ao método da hidrólise ácida, sendo portanto consideradas impróprias para o consumo, ao passo que o macarrão comum apresentou ausência dessa contaminação.

CONCLUSÕES

Analisando 150 amostras de massas alimentícias, a saber, 50 de macarrão comum, 50 de macarrão de sêmola e 50 de macarrão com ovos, empregando o método da digestão com pancreatina e o da hidrólise ácida, podemos concluir:

1. O método da hidrólise ácida é menos demorado, menos dispendioso e permite contagem maior de fragmentos de insetos e pelos de roedor
2. Tanto no método da hidrólise ácida como no da digestão com pancreatina, não há modificação significativa no aspecto, ao microscópio estereoscópico, dos fragmentos de insetos e pelos de roedor.

3. A fase de lavagem com detergente, descrita no método da hidrólise ácida original da AOAC, pode ser excluída, porque a limpeza com álcool etílico é suficiente para retirar o óleo mineral aderido ao percolador.
4. Sessenta e quatro por cento das amostras de macarrão com ovos, 60% das amostras de macarrão de sêmola e 50% das amostras de macarrão comum estavam de acordo com a legislação em vigor, quando se utilizou o método da digestão com pancreatina, e 52% das amostras de macarrão com ovos, 42% das amostras de macarrão de sêmola e 20% das amostras de macarrão comum obedeciam a legislação, quando se utilizou o método da hidrólise ácida; portanto, pelo método da hidrólise ácida houve maior índice de condenação.
5. Utilizando o método da hidrólise ácida, concluímos que 80% das amostras de macarrão comum estava em desacordo com a legislação, quando se tomou como parâmetro o número de fragmentos de insetos. Este foi o tipo de macarrão que apresentou pior qualidade.
6. Podemos propor que o número de fragmentos de insetos tolerado pela legislação passe a ser 30 em 225 g de macarrão, visto que 64% das amostras de macarrão com ovos, 30% das amostras de macarrão comum e 56% das amostras de macarrão de sêmola, correspondendo a 21,3%, 10,0% e 18,7% respectivamente do total de 150 amostras apresentaram de 0 a 30 fragmentos de insetos, quando analisadas pelo método da hidrólise ácida; portanto, 40% do total das 150 amostras estavam no limite proposto.
7. Sugerimos que seja mantida a legislação atual que exige ausencia de pelos de roedor, ácaros vivos e/ou mortos, insetos vivos e/ou mortos e larvas de insetos vivas e/ou mortas.

RIALA6/652

ZAMBONI, C.Q. & ATUI, M.B. – Comparison of methods for filth in alimentary pastes – *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 49(1):11-17, 1989.

ABSTRACT: Samples of three types of spaghetti, 50 units of wheat macaroni, 50 units of semolina macaroni and 50 units of egg macaroni, were examined for sanitary quality and for the comparison of acid hidrolisis method and pancreatin digestion method for light filth such as insect fragments, whole insects, insect larvae, mites, rodent hairs. The acid hidrolisis method seemed to be more sensitive for recovery of light filth; in 53 samples the counts of insect fragments was twice more than pancreatin method when the method employed was the acid hidrolisis method; and in 14 samples the counts of insect fragments were five times superior. The acid hidrolisis method is considerably less time consuming until the microscope results are available and results in filter papers clean, easy to examine; use more inexpensive and readily available reagents and the analyst is required in shorter time. It was suggested that the AOAC and AACC acid hidrolisis method be modified in the detergent wash step. Results showed that wheat flour macaroni samples were in a poorer quality than the semolina macaroni and egg macaroni in relation to insect fragments, the mostly encountered defect. It was suggested that the Brazilian legislation could tolerate up to 30 insect fragments per 225g of macaroni, since 40% of the 150 samples were in the limit of 30 insect fragments in 225g of sample. It was suggested that the legislation do not tolerate rodent hairs, mites alive or dead, whole insect alive or dead or insect larvae alive or dead.

DESCRIPTORS: pasta (macaroni), animal filth in, microscopical detection; pasta (macaroni), animal filth in, extraction; methods, acid hidrolisis, pancreatin digestion.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. AMERICAN ASSOCIATION OF CEREAL CHEMISTS – *Approved methods of the American Association of Cereal Chemists*. 8thed. St. Paul, Minnesota, A.A.C.C., 1983. v1 [A.A.C.C. method 28-32].
2. ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS – *Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists*. 14thed. Washington, D.C., A.O.A.C., 1984. p. 903. [Tecn. 44.069].
3. ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS – *Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists*. 14thed. Washington, D.C., A.O.A.C., 1984. p. 902. [Tecn. 44.064].
4. BRASIL. Leis, decretos etc. – Resolução nº 12/78 da Comissão Nacional de Normas e Padrões para Alimentos. *Diário Oficial*, Brasília, 24 jul. 1978. Seção I, pt. I, p. 11516. Aprova Normas Técnicas Especiais, do Estado de São Paulo, relativa a alimentos (e bebidas).
5. BRASIL. Leis, decretos, etc. – Portaria nº 1, de 4 de abril de 1986, da Divisão Nacional de Vigilância Sanitária de Alimentos do Ministério da Saúde. *Diário Oficial*, Brasília, 8 de abril de 1986. Seção I, p. 5039. Estabelece provisoriamente o limite máximo de até 30 fragmentos de insetos a nível microscópico, em 100 (cem) gramas do produto... até que sejam concluídos os estudos de revisão da Resolução Nº 12/78 – CNNPA.
6. BRICKEY, P.M., JR.; GECAN, J.S.; THRASHER, J.J. & VASQUEZ, A.N. – Notes on microanalytical techniques in the analysis of foods for extraneous materials. *J. Assoc. off anal. Chem.*, **51** (4): 875-6, 1968.
7. GECAN, J.S. & ATKINSONS, J.C. – Microanalytical quality of macaroni and noodles - *J. Food Protec.*, **48** (5): 400-2, 1985.
8. SÃO PAULO. Leis, decretos etc. – Decreto nº 12.486, de 20 de outubro de 1978. *Diário Oficial*, São Paulo, 21 out. 1978. p. 24. Aprova Normas Técnicas Especiais Relativas a Alimentos e Bebidas (NTA 49).
9. TERBUSH, L.E. – The medical significance of mites of stored food. *FDA by lines*, **3** (2): 57-70, 1972.
10. THRASHER, J.J. – Collaborative study of acid autoclave method for mineral oil extraction of light filth from spaghetti and macaroni. *J. Assoc. off anal. Chem.*, **52** (3): 463-5, 1969.
11. ZAMBONI, C.Q. & RODRIGUES, R.M.M.S. – Comparação entre métodos de extração de sujidades em farinha de rosca. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, **45** (1/2):13-20, 1985.
12. ZAMBONI, C.Q. & BATISTIC, M.A. – Verificação das condições higiênicas de biscoitos por microscopia. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, **45** (1/2):61-4, 1985.

Recebido para publicação em 7 de junho de 1988.

