



GOVERNO DO ESTADO DE SÃO PAULO
SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE
COORDENAÇÃO DOS INSTITUTOS DE PESQUISA
INSTITUTO ADOLFO LUTZ

REVISTA do INSTITUTO ADOLFO LUTZ

ISSN 0073-9855

RIALA 6

VOLUME 55

NÚMERO 2

Julho/Dezembro

1995

DIRETOR RESPONSÁVEL

LUIZ CARLOS MENEGUETTI

Diretor Geral do Instituto Adolfo Lutz - 1995 / 1996

COMISSÃO DE REDAÇÃO

JOSÉ EDUARDO TOLEZANO, Presidente

PAULO TIGLEA

JÚLIA MARIA MARTINS DE SOUZA FELIPPE

DILMA SCALLA GELLI

HEIDI PINTO MARTINS

ALICE MOMOYO ATA SAKUMA

MYRNA SABINO

CELUTA HELENA MACHADO PAGANELLI, Secretaria da Comissão

PRODUÇÃO:

EDITORA LETRAS & LETRAS

EDITOR

Carlos José Linardi

Av. Ceci, 1945 – S. Paulo – SP

CEP 04065-003

Fone/Fax (011) 577-5746

Endereço/Address

Biblioteca do Instituto Adolfo Lutz
Av. Dr. Arnaldo, 355 – Caixa Postal 7027
01246-902 – São Paulo, SP - Brasil

Publicação semestral / *Bi-annual publication*
Solicita-se permuta / *Exchange desired*

REVISTA DO INSTITUTO ADOLFO LUTZ (Secretaria de Estado da Saúde)
São Paulo, SP – Brasil, 1941

1941 - 1995, 1-55
1995,55 (1)

ISSN 0073-9855
RIALAG

CDD₁₈ 614.07205

(* ASSOCIAÇÃO PAULISTA DE BIBLIOTECÁRIOS. Grupo de Bibliotecários Biomédicos. *Normas para catalogação de publicações seriadas nas bibliotecas especializadas*, São Paulo, Ed. Polígono, 1972.

Os Artigos publicados na REVISTA DO INSTITUTO ADOLFO LUTZ são indexados por Abstracts on Hygiene and Communicable Diseases, AGRINDEX., Analytical Abstracts, Bibliografia Brasileira de Medicina Veterinária e Zootécnica, Biological Abstracts, Chemical Abstracts, Food Science and Technology Abstracts, Index Medicus Latino-americano, LILACS, SP: Saúde Pública, Microbiology Abstracts, Sumários Correntes Brasileiros, Toxicology Abstracts, Tropical Diseases Bulletin, Virology Abstracts e outros.

AOS COLABORADORES

A REVISTA DO INSTITUTO ADOLFO LUTZ tem por finalidade a divulgação de trabalhos especialmente relacionados com as atividades laboratoriais em Saúde Pública.

Os artigos destinados à Revista somente serão recebidos se redigidos de acordo com as seguintes normas:

NORMAS PARA PUBLICAÇÃO

Os originais deverão ser redigidos na ortografia oficial, apresentados em duas vias (original e primeira cópia), datilografados com duplo entrelinhamento em folhas de papel tamanho officio, com margens de 3 cm de cada um dos lados, numeradas com algarismos arábicos no ângulo superior direito. Evitar dividir as palavras no fim da linha, mesmo que a margem fique irregular, e nunca usar com este propósito barras ou sinais tipográficos para encher o espaço. No caso de ser utilizada máquina elétrica, usar a esfera de caracteres tipo redondo para o texto, reservando a esfera tipo itálico para palavras latinas ou de língua estrangeira.

No preparo do original, será observada, sempre que possível, a seguinte estrutura:

Página de rosto

Título do artigo
Nome do(s) autor(es)
Filiação científica

Texto

Introdução
Material e Métodos
Resultados
Discussão
Conclusões
Agradecimentos (se for o caso)

Material de referência

Resumos (em português e em inglês)
Descritores
Referências bibliográficas

TÍTULO - Deverá ser curto e específico, indicando precisamente o conteúdo do artigo; no caso de ser necessário título longo, recorrer a subtítulo.

ABREVIATURAS - Não serão empregadas nos títulos ou nos resumos. No texto, serão evitadas ou usadas apenas as oficiais, já consagradas.

UNIDADES DE MEDIDA E SEUS SÍMBOLOS - Deverão ser usadas somente as unidades legais de medir do Sistema Nacional de Metrologia (BRASIL. Leis, decretos etc. - Resolução nº 11, de 12 outubro de 1988, do Conselho Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial. Diário Oficial, Brasília, 21 out. 1988. Seção I, pt. 1, p. 20524-32. Aprova a Regulamentação Metroológica que com esta baixa revoga a Resolução nº 01/82, de 27 de abril de 1982).

TABELAS - Serão numeradas consecutivamente, com números arábicos e encabeçadas pelos respectivos títulos, que deverão indicar claramente o conteúdo. Os dados apresentados em tabela não deverão ser repetidos em gráficos, a não ser em casos especiais. Na montagem das tabelas, seguir as normas brasileiras para apresentação tabular (FUNDAÇÃO INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA - Normas de apresentação tabular, Rio de Janeiro, IBGE, 1979, 22 p.).

Na ausência de um dado numérico, empregar os seguintes sinais convencionais:

-	quando, pela natureza do fenômeno, não puder existir o dado;
Z	quando o dado for rigorosamente zero;
...	quando não se dispuser do dado;
0,0	quando a aplicação dos critérios de arredondamento não permitir alcançar, respectivamente, os valores 1; 0,1; 0,01 etc.;
X	quando o dado for omitido para evitar a individualização da informação.

ILUSTRAÇÕES (fotografias, gráficos, desenhos, mapas etc.) - Serão designadas no texto como "figuras": terão numeração única e seguida, em algarismos arábicos.

Todas as ilustrações deverão ser identificadas com: número, nome do autor, título do artigo e número da página do texto onde serão inseridas; deverão ser tão claras que permitam sua reprodução com redução de 6,5 cm no sentido da largura, sem perda de nitidez ou legibilidade; as respectivas legendas deverão estar escritas fora da área de reprodução.

Os gráficos, mapas e desenhos deverão ser feitos a nanquim preta, em papel vegetal, com letras e números escritos com normógrafos.

As fotografias deverão ser nítidas e de bom contraste. No caso de diapositivos, estes deverão ser apresentados e não fotografias dos mesmos.

RESUMOS - Serão apresentados um, em português, antecedendo o texto, outro, em inglês (encabeçado pelo título do artigo), no final, antes das referências bibliográficas. Não deverão exceder 200 palavras. O estilo será claro e conciso, pondo em relevo, de forma precisa, os fatos observados e os elementos novos essenciais à conclusão. Serão redigidos pelo próprio autor ou com a colaboração deste, observando-se recomendações da UNESCO (Bol. UNESCO Bibl.23:72-7, 1969). A fim de facilitar a indexação, o resumo deverá conter:

DESCRIPTORIOS - Palavras ou expressões que identifiquem o conteúdo do artigo. Os três principais descritores serão escritos em primeiro lugar, por ordem de importância. Recomendam-se para a escolha dos descritores usar o vocabulário próprio do campo especializado.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS - Deverão ser mencionadas somente as de trabalhos consultados diretamente ligados ao assunto.

No texto - Serão citadas por meio de número Índice correspondente ao da lista de referências, e escritas em versal; assim, para um autor... TAUNAY³¹ verificou...; para dois autores... LEME & CARRIJO¹⁹, pesquisando...; para mais de dois autores: no trabalho de TSUNODA)A e alií ⁶, ou ainda... segundo vários autores^{1,3,7,8}.

Na lista de referências - Terão numeração consecutiva e serão ordenadas alfabeticamente pelo último sobrenome do autor (regra geral). Todos os autores do artigo deverão ser citados.

Para antigos periódicos

Último sobrenome do(s) autor(es) seguido das iniciais dos outros componentes do nome, título do artigo, título do periódico abreviado (WORLD list of scientific periodicals, published in the years 1900-1960; edited by Peter Brown and George Burder Stratton, 4 ed., London, Butterworths 1963-1965, 3 v.) em grifo, nº do volume, nº do fascículo (quando a numeração não for continuada), páginas inicial e final do artigo, data da publicação do volume de fascículo.

Ex.:

MORENO, G.; LOPES, C.A.M.; BELLOUMINI, H.E; PESSOA, G.V.A.; BIASI, P.& ANDRADE, J.C.R.

Enterobactérias isoladas de anfíbios e répteis. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, 15:122-126, 1973.

Para livros

Último sobrenome do(s) autor(es) seguido das iniciais dos outros componentes do nome, título da obra (em grifo), nº da edição (se não for a primeira), local de publicação, editor (quando não coincidir com o autor), ano de publicação, nº de páginas, ou volumes (ou nº da página consultada).

Ex.:

CANTAROW, A. & SHEPARTZ, B. - Bioquímica, 3ª ed. Guanabara, Atheneu, 1968, p. 325.

DA PUBLICAÇÃO

1. Os trabalhos destinados à publicação na *Revista do Instituto Adolfo Lutz* deverão ser encaminhados à Biblioteca do Instituto Adolfo Lutz.
2. A publicação de artigos na *Revista* está condicionada à aprovação da Comissão de Redação, que poderá sugerir ao autor alterações no original. Esse original só será aceito quando tiver o visto da Comissão de Redação.
3. Todo trabalho entregue para publicação deverá ser assinado pelo autor e trazer endereço para correspondência. No caso de mais de um autor, deverá ser expressamente indicado o responsável pela publicação.
4. Os trabalhos serão publicados em ordem cronológica de aprovação, salvo o caso especial de nota prévia, que terá prioridade.
5. A data de recebimento do artigo constará obrigatoriamente no final do mesmo.
6. A primeira prova tipográfica será revisada pelo redator-secretário e conferida pelo autor, que a rubricará.
7. Os originais de trabalhos aceitos para publicação não serão devolvidos aos autores.
8. Os autores terão direito a 30 separatas, quando desejarem maior número, deverão entender-se com o redator-secretário da Revista.
9. É permitida a reprodução, no todo ou em parte, de artigos publicados na *Revista do Instituto Adolfo Lutz*, desde que sejam indicados a origem e o nome do autor de conformidade com a legislação sobre Direitos Autorais.

DA DISTRIBUIÇÃO

A *Revista Adolfo Lutz* é distribuída gratuitamente a entidades governamentais, culturais, ou em permuta com periódicos nacionais ou estrangeiros.

SUMÁRIO/CONTENTS**MICROBIOLOGIA E IMUNOLOGIA MÉDICA / MEDICAL MICROBIOLOGY AND IMMUNOLOGY**

Artigos

ARTIGOS ORIGINAIS / ORIGINAL ARTICLES

- 785 Diagnóstico rápido de vírus por microscopia eletrônica.
Rapid virus diagnoses by electron microscopy. UEDA, M.; TANAKA, H.; KISIELUS, J.J.; JOAZEIRO, P.P. & WEIGL, D.R. 57-65

EMBALAGENS / PACKAGINGS

ARTIGO ORIGINAL / ORIGINAL ARTICLE

- 786 Controle de adequação de embalagens metálicas revestidas para alimentos ácidos.
Quality control of the resealed metallic packagings for acid food. GARRIDO, N.S.; PASCUET, N.S.; MURATA, L.T.F.; ALCANTARA, M.R.S.; NUNES, M.C.D. & SAKUMA, A.M. 67-72

HIGIENE DE ALIMENTOS / FOOD HYGIENE

ARTIGOS ORIGINAIS / ORIGINAL ARTICLES

- 787 Metodologia de análise microscópica para a avaliação das condições higiênicas em misturas para o preparo de sopas e de risotos.
Methodology of microscopic analysis for the evaluation of hygienic conditions of soup mixes and risotto mixes. CORREIA, M. & ATUI, M.B.

CONTAMINANTES QUÍMICOS / CHEMICAL CONTAMINANTS

ARTIGOS ORIGINAIS / ORIGINAL ARTICLES

- 788 Incidência de aflatoxinas em milho (*Zea mays* L.) com diferentes níveis de umidade, após tratamento com fungicida, armazenado em atmosfera com e sem aeração.
Incidence of aflatoxins in corn (*Zea mays* L.) with different levels of moisture after treatment with fungicide, at atmosphere and without ventilation. PRADO, G.; PINTO, N.J.A. & OLIVEIRA, M.S. 79-84
- 789 Contaminação de amendoim e seus produtos comercializados na região de Campinas - SP, por aflatoxinas durante o ano de 1994.
Survey of aflatoxins in peanuts and its products commercialized in city of Campinas - S.P., during the year of 1994. BRIGIDO, B.M.; BADOLATO, M.I.C. & FREITAS, V.P.S. 85-90

DIAGNÓSTICO RÁPIDO DE VÍRUS POR MICROSCOPIA ELETRÔNICA** Rapid virus diagnosis by electron microscopy

Marli UEDA,
Hatune TANAKA*
Jonas J. KISIELIUS
Paulo P. JOAZEIRO
Dalton R. WEIGL

RIALA6/785

UEDA, M.; TANAKA, H.; KISIELIUS, J. J.; JOAZEIRO, P. P.; WEIGL, D. R. - Diagnóstico Rápido de vírus por Microscopia Eletrônica. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 55(2):57-65, 1995.

RESUMO: A Seção de Microscopia Eletrônica (ME) do Instituto Adolfo Lutz (IAL) realiza diagnósticos rápidos de: Herpesvírus, Poxvírus, Papilomavírus, Rotavírus, Adenovírus, Astrovírus, Calicivírus, "Small Round Vírus Particles-SRVP", agente de Norwalk, Parvovírus e bacteriófagos em diversas amostras biológicas. Contribui também no controle de qualidade de antígenos virais como Sarampo, Influenza, Rocio, Dengue, Hepatite A e B, HIV e outros. A coloração negativa é uma das técnicas utilizadas no diagnóstico rápido de vários vírus associados às doenças humanas. A morfologia, a subestrutura e o diâmetro são características importantes para diferenciar esses vírus. Apesar da impossibilidade de se realizar exames em larga escala, do alto custo e da necessidade de técnicos especializados, é uma técnica de fácil execução, com obtenção rápida do resultado. É útil para detectar vírus de difícil cultivo e é o único método que permite observar mais de um agente numa mesma amostra. Embora existam vários laboratórios de ME em Universidades e em Instituições de Pesquisa, cada laboratório está empenhado em sua linha de pesquisa e são poucos os que se dedicam à área de diagnóstico rápido de vírus.

DESCRIPTORES: Microscopia Eletrônica, Coloração Negativa, Vírus, Diagnóstico.

INTRODUÇÃO

O uso da microscopia eletrônica para detecção de partículas virais, pela coloração negativa, é um dos métodos utilizados como diagnóstico auxiliar nas diferentes infecções virais humanas^{1, 12, 13, 16, 19, 32, 46}. A morfologia, a subestrutura e o diâmetro são características importantes para diferenciar esses vírus¹⁶.

A técnica de coloração negativa desenvolvida em 1959 por Brenner & Horne⁵ proporciona um grande aumento no contraste da imagem e rapidez na preparação da amostra. Em consequência disso difundiu-se rapidamente, tendo o uso crescente na área de diagnóstico viral e ampla aplicação nas pesquisas em Virologia.

A coloração negativa foi utilizada, pela primeira vez, no diagnóstico de infecções virais de importância em Saúde Pública, em 1962, por Peters e col.³⁷, na epidemia de *Variola major*, ocorrida na Alemanha. Na Inglaterra, em 1966, durante uma epidemia de

Variola minor, Cruickshank e col.⁷ introduziram essa técnica no diagnóstico de *Small pox*.

Outros autores como Doane e col.¹¹, em 1967, e Joncas e col.²², em 1969, descreveram o uso da coloração negativa no diagnóstico de Paramixovírus e vírus respiratório sincicial, respectivamente, em amostras de secreções nasofaríngeas.

Desde o trabalho inicial de Kapikian e col.²³ em 1972, que pela imunomicroscopia eletrônica, descreveram o agente de Norwalk, o primeiro vírus associado à gastroenterites; inúmeros outros vírus foram sendo descritos progressivamente. Em 1973, Flewett e col.¹⁷, examinando amostras fecais diarreicas por coloração negativa, detectaram pela primeira vez os Rotavírus, de grande importância nas gastroenterites infantis. Também por esta técnica, outros vírus associados a gastroenterites como Astrovírus³⁰ e Calicivírus^{18, 31} foram pela primeira vez detectados em 1975 e 1976, respectivamente. Devido à dificuldade de cultivo *in vitro*, de alguns desses grupos de vírus

* Correspondência para Marli Ueda, Seção de Microscopia Eletrônica, Instituto Adolfo Lutz, Av. Dr. Arnaldo, 355, São Paulo, CEP nº 01246-902, Brasil.

** Parte deste trabalho foi apresentado no XIV Colóquio da Sociedade Brasileira de Microscopia Eletrônica, realizado em Caxambu, Minas Gerais, no período de 31/08 a 03/09/93.

associados a gastroenterites, a microscopia eletrônica continua sendo um dos meios disponíveis de detecção, mesmo nos grandes centros de pesquisa^{14, 15, 21, 27, 29, 32, 33}.

A Seção de Microscopia Eletrônica do Instituto Adolfo Lutz vem realizando diagnóstico rápido de vírus, desde 1967. Na ocasião, a Seção colaborou intensamente na "Campanha de Erradicação da Varíola" detectando Poxvírus em crostas ou conteúdos vesiculares provenientes de pacientes com Varíola³⁸. A partir de então, diferentes tipos de vírus têm sido analisados em nosso laboratório, em diversas amostras biológicas, ampliando o nosso leque de detecção^{25, 26, 41, 42, 43, 44, 45, 46}.

O objetivo deste trabalho é divulgar os resultados obtidos pela Seção de Microscopia Eletrônica do I.A.L., no diagnóstico de vírus de importância em Saúde Pública e difundir a aplicação da coloração negativa para fins de detecção viral, no nosso meio.

MATERIAL E MÉTODOS

A Seção de Microscopia Eletrônica do I.A.L. recebe da rede hospitalar pública, diversos tipos de amostras biológicas de pacientes com suspeita de infecções virais, para diagnóstico rápido de vírus. Os tipos de amostras são: - líquidos vesiculares, crostas, raspados de lesão, urina e saliva para detecção de vírus do grupo Herpes; lesões cutâneas para detecção de Papovavírus, Moluscum contagiosum e eventualmente Pox-vírus. Em fezes diarréicas são detectados os vírus associados à gastroenterites (Rotavírus, Adenovírus, Astrovírus, Calicivírus, "Small Round Virus Particles - SRVP", agente de Norwalk, Parvovírus e Coronavírus). São realizadas pesquisas de "Parvovirus-like" em urina e soro de pacientes com suspeita de eritema infeccioso⁴³.

Atua no controle de qualidade morfológico de antígenos virais, analisando purificados de amostras com vírus Sarampo, Influenza, Hepatites (A,B), Rocio, Dengue, HIV e outros. Também, realiza detecção de bacteriófagos para o controle de qualidade microbiológica da água e de alimentos²⁰.

Na Microscopia Eletrônica Direta (MED), grades de cobre de 300 "mesh", recobertas com formvar e carvão são utilizadas para a adesão das amostras. Quando a amostra biológica é líquida, como por exemplo líquido vesicular, utiliza-se o próprio material para a adesão. Sendo sólida, como por exemplo as fezes, é preparada uma suspensão a 10% em PBS 0,01M pH 7,0 ou ainda quando a amostra é biópsia de uma lesão, como por exemplo verruga, é feito um macerado da amostra. Para a adesão, a grade é colocada sobre uma gota de 30 µl da amostra. Após a adesão por 30 minutos, o excesso é retirado com papel de filtro e antes de secar, a grade é corada com PTK (fosfotungstato de potássio) a 2%, pH 6.4 a 6.8 por 5 minutos. Após a secagem é examinada num microscópio eletrônico Philips EM-400T, operando a 80 kV.

A Imunomicroscopia Eletrônica (IME) tem sido empregada quando se dispõe de anti-soros específicos. São utilizados 2 métodos de IME: a Imunomicroscopia Eletrônica Clássica, segundo Almeida² e a "Solid Phase Immune Electron Microscopy - SPIEM"^{9,39}; dependendo da quantidade de antígeno e de anticorpo disponíveis. Enquanto no "SPIEM", a reação é realizada sobre a grade de ME, na IME-Clássica, a reação antígeno-anticorpo é realizada em tubo de ensaio e posteriormente transferida para a grade de ME. Tanto na IME-Clássica quanto no "SPIEM", a concentração de anticorpo deve ser titulada para que ocorra uma boa reação imunológica.

RESULTADOS

Foram analisadas pela técnica de coloração negativa 7558 amostras de diversos materiais biológicos, no período de 1967-93, dos quais 2284 (30,22%) apresentaram partículas de vírus.

Os resultados positivos de algumas dessas amostras são apresentados nas figuras.

DISCUSSÃO E CONCLUSÃO

A morfologia e o tamanho da partícula viral observada na coloração negativa, são características que auxiliam na identificação dos vírus, permitindo classificá-los em famílias ou grupos, fornecendo, portanto, um diagnóstico presuntivo^{1,16}.

Existem diversos sais elétron-densos que podem ser utilizados como corantes eletrônicos: acetato de uranila, silicotungstato de sódio e molibdato de amônio. Barth¹, em 1984, realizou um estudo utilizando vários sais eletron-densos; entretanto, o mais utilizado em nosso laboratório, com bons resultados, tem sido o fosfotungstato de potássio (PTK) 2%, pH6.4 a 6.8.

Nossa experiência mostra que são vários os fatores que interferem na obtenção de resultados satisfatórios para detecção de vírus em amostras biológicas. Entre eles ressalta-se a quantidade de vírus presentes na amostra, que também é referido por outros autores^{1, 13, 16, 21, 27}. As amostras devem ser colhidas na época apropriada, ou seja, no início dos sintomas, quando a presença do vírus é maior. O diâmetro da partícula viral é outro fator importante. Quanto menor a partícula viral, maior será a quantidade de vírus necessária para que seja detectado¹. Outro fator essencial é a preservação da partícula viral, pois o diagnóstico por M.E. depende da morfologia. Assim, a colheita, transporte e estocagem das amostras são itens importantes que influenciam na preservação dos vírus. As amostras não devem ser congeladas, devem ser mantidas em banho de gelo (4°C), pois o congelamento e descongelamento podem levar à destruição das características morfológicas de alguns vírus^{21, 27}.

O vírus do grupo Herpes (fig. 1-A) é um dos mais facilmente diagnosticados, pois além do seu diâmetro (cerne de aproximadamente 75 nm com envoltório pleomórfico de 180 a 200nm), apresenta morfologia bastante característica¹³, sendo detectado geralmente em grande quantidade nas amostras biológicas colhidas adequadamente¹. Apesar da morfologia não diferenciar os tipos dos vírus do grupo Herpes, a detecção de vírus por MED tem papel importante principalmente em infecções herpéticas propriamente dita em berçários e em centros cirúrgicos, e também como infecções oportunistas em pacientes aids. Morfologias atípicas foram detectadas nos vírus desses pacientes, até então não observadas⁴⁶. Este diagnóstico tem sido utilizado também para a monitoração na terapêutica de administração de drogas antivirais, não só em pacientes aids, mas também em outros pacientes imunodeprimidos.

Os Papilomavírus também podem ser demonstrados na coloração negativa, pois possuem morfologia bem definida^{36,40}. São vírus icosaédricos com diâmetro em torno de 55 nm, sem envoltório¹³, apresentando nítidos capsômeros (fig. 1-B). A detecção destes vírus por MED tem contribuído para a conclusão do diagnóstico, em casos de pacientes com lesões verruciformes não características.

As amostras de verrugas devem ser homogeneizadas para que as partículas virais sejam liberadas, antes de serem submetidas à coloração negativa.

Outro vírus que não apresenta dificuldade de detecção é o Poxvírus (fig. 1-C). Possui a maior dimensão entre os vírus animais conhecidos (115 x

350nm)^{13,16} e morfologia típica em forma de tijolo³⁴. O diagnóstico de vírus do grupo Pox por MED, em líquido vesicular e crosta de lesões de pacientes com suspeita de Varíola, teve papel relevante na década de 60, durante a “Campanha de Erradicação da Varíola”³⁸. Nessa ocasião, por apresentarem morfologias distintas, o diagnóstico diferencial de vírus do grupo Pox do vírus do grupo Herpes, foi importante nos casos clínicos atípicos. Atualmente, os eventuais casos de pacientes com lesões cutâneas suspeitos de *Moluscum contagiosum*, clinicamente difíceis de serem diagnosticados, podem ser detectados por microscopia eletrônica.

Dos vírus associados às gastroenterites, os Rotavírus e os Adenovírus (figs. 2-A e 2-B), possuem características morfológicas bem definidas, facilitando suas detecções. Quanto aos Adenovírus, apesar de não ser possível se diferenciar pela morfologia os Adenovírus entéricos dos Adenovírus respiratórios a sua detecção em amostras fecais diarréicas é importante. Em relação aos Rotavírus, existe o teste imunoenzimático comercial disponível, que detecta apenas Rotavírus do grupo A. Nos casos de Rotavírus atípicos, a MED desempenha junto com a EGPA (eletroforese em gel de poliácridamida), importante diagnóstico diferencial, uma vez que os testes imunoenzimáticos resultam negativos.

A MED se destaca nos diagnósticos de Astrovírus e Calicivírus, vírus associados a gastroenterites, pouco conhecidos, mas já detectados em nosso meio^{25, 26, 28, 35, 41,44}. Por serem estes agentes de crescimento difícil *in vitro*, ainda a detecção por coloração negativa é

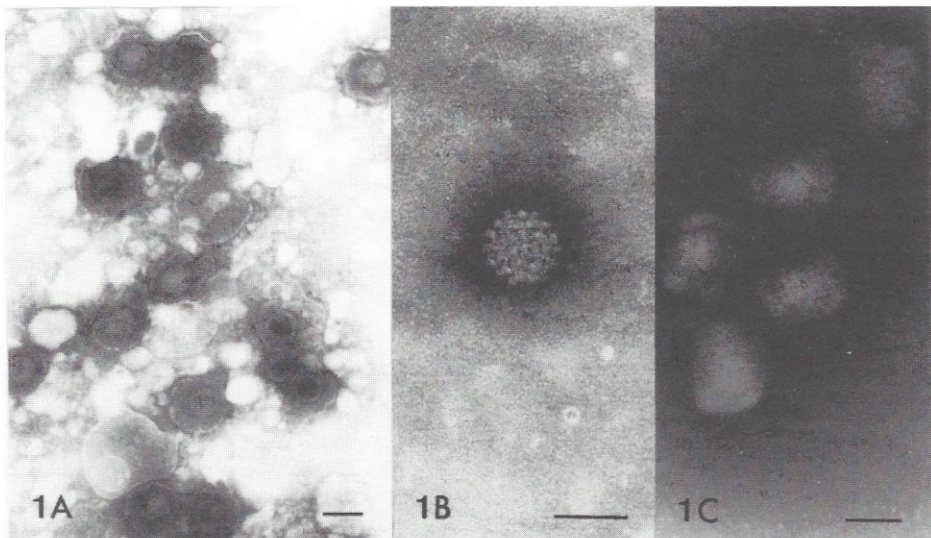


Fig.1 - Fotomicrografias eletrônicas de vírus causadores de lesão de pele. Microscopia Eletrônica Direta.
1-A: Vírus do grupo Herpes em líquido vesicular de paciente portador de HIV. Barra 100 nm.
1-B: Papilomavírus detectado em verruga de paciente portador de HIV. Barra 50 nm.
1-C: Vírus do grupo Pox em lesão de úbere de vaca (varíola bovina). Barra 200 nm.

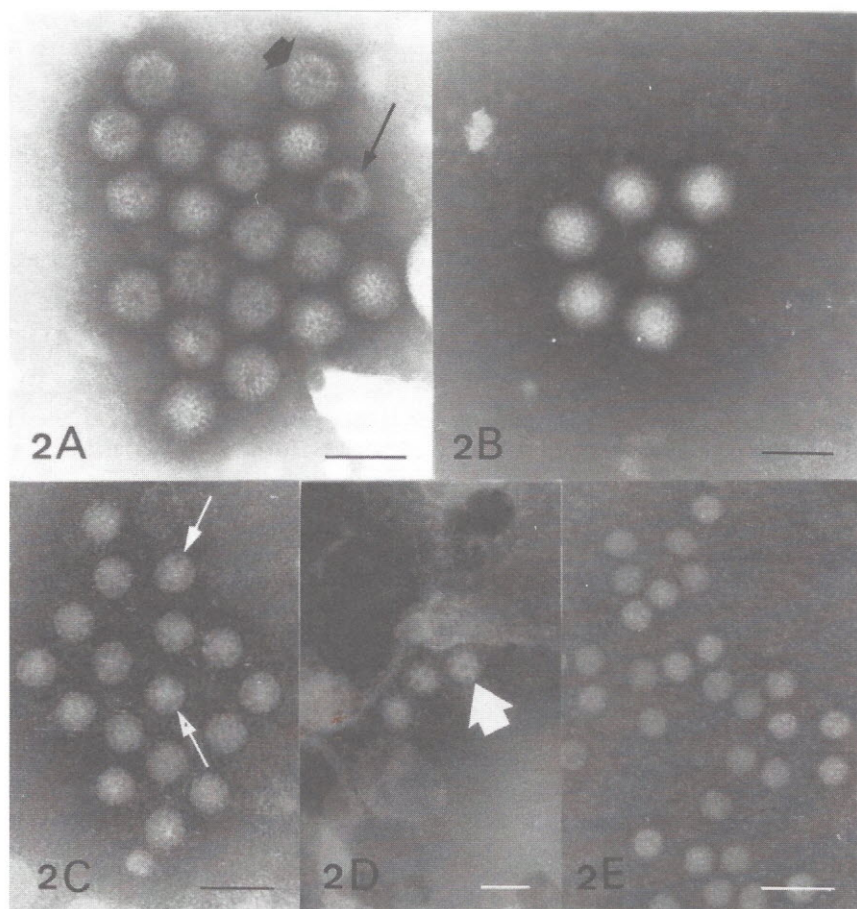


Fig. 2 - Fotomicrografias eletrônicas de vírus associados às gastroenterites.

- 2-A: Rotavírus. Aglomerado de partículas virais típicas. Partícula vazia com cápside externa (). Partículas completas (). Microscopia Eletrônica Direta. Barra 100 nm.
- 2-B: Adenovírus. Partículas virais com morfologia icosaédrica apresentando nítidos capsômeros. Microscopia Eletrônica Direta. Barra 100 nm.
- 2-C: Aglomerado de Astrovírus. A seta () aponta partícula com morfologia típica de formato de estrela com 5 ou seis pontas. Microscopia Eletrônica Direta. Barra 50 nm.
- 2-D: Calcivírus, apresentando morfologia típica de "estrela de Davi" (). Imunomicroscopia Eletrônica Clássica. Barra 50 nm.
- 2-E: Partículas de "Small Round Virus Particles - SRVP" de aproximadamente 22 nm. Microscopia Eletrônica Direta. Barra 50 nm.

um dos poucos meios de diagnóstico. Os Astrovírus apesar de serem liberados em grande quantidade no intestino, apresentam-se por vezes com aspecto de aglutinado viral (fig. 2-C) e morfologia característica em apenas 10 a 20%^{3,30}, portanto, nem sempre é detectado na forma característica de estrela de 5 ou 6 pontas, dificultando o diagnóstico. Quanto aos Calcivírus (fig. 2-D), apesar da morfologia viral peculiar de "estrela de David"³¹, sua detecção torna-se difícil pelo seu tamanho e pequena quantidade presente na amostra.

São considerados "Small Round Virus Particles - SRVP"^{6, 23,25} as partículas virais de dimensão entre 20

e 35 nm (fig. 2-E) encontradas em amostras fecais diarreicas e que não são possíveis de serem identificados morfologicamente. Na tentativa de se identificar os "SRVP", submete-se as amostras positivas à IME, utilizando-se anti-soros específicos (Anti-Astrovírus, Anticalcivírus e Antinorwalk), com isto aumentando-se a sensibilidade diagnóstica²⁵.

O vírus da Hepatite A (fig. 3), que eventualmente pode ser detectado pela microscopia eletrônica em amostras fecais, é identificado através da IME utilizando anticorpo específico¹⁰. A dificuldade neste caso particular reside na obtenção de amostras positivas, pois quando há descarga viral nas fezes o paciente ainda está assintomático.

Apesar de não ser o método de escolha, a M.E. serve de apoio diagnóstico nos casos em que existam falta de insumos básicos, como é o caso de detecção de "Parvovírus-like" em soro ou urina concentrada de pacientes com suspeita de eritema infeccioso⁴³.

No IAL a microscopia eletrônica direta (MED) não tem sido utilizada para fins de diagnóstico dos

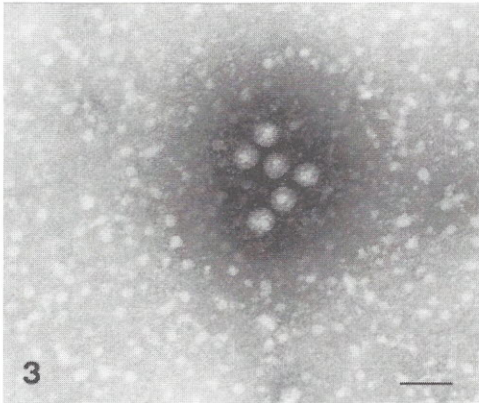


Fig. 3 - Fotomicrografia eletrônica de vírus da Hepatite-A. Imunomicroscopia Eletrônica Clássica. Barra 50 nm.

Ortomixovírus e Paramixovírus, embora alguns autores citem o emprego desta técnica^{11,22}. A existência de testes de escolha mais práticos e menos onerosos como imunofluorescência e ELISA, somada à excessiva presença de muco no material de origem, torna a MED menos indicada¹; apesar destes vírus serem freqüentemente analisados por coloração negativa para controle morfológico da produção e purificação de antígenos virais (figs. 4-A e 4-B).

A experiência nos mostra que os vírus com envoltório devem ser manipulados com extremo cuidado, para evitar rompimentos dos respectivos envoltórios e liberação do ácido nucléico (fig. 5-A e 5-B1). Por vezes, as espículas também podem ser perdidas, pela sua labilidade, alterando a sua morfologia (Figs. 5-A e 5-B2) e dificultando a identificação¹. Em alguns vírus com nucleocapsídeos helicoidais, como o vírus do sarampo (fig. 4-B), é interessante que algumas partículas estejam rompidas para permitir a saída dos nucleocapsídeos e facilitar a identificação²⁴. Entretanto, na análise do purificado de antígenos de superfície do vírus da hepatite-B (AgHBs) essa dificuldade em questão não ocorre, pois gativo enquanto a MED detectará a presença de

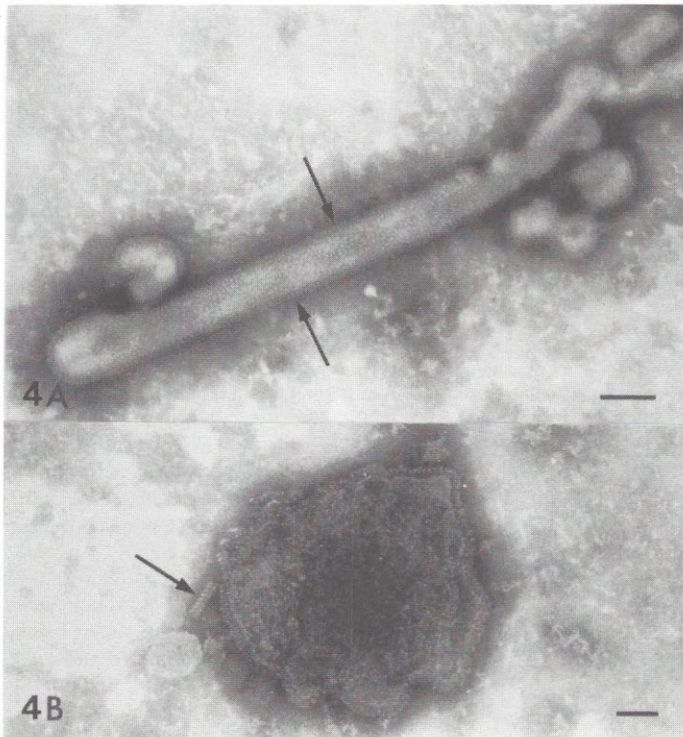


Fig. 4 - Fotomicrografias eletrônicas de:

4-A: Vírus Influenza (Ortomixovírus), apresentado nas formas pleomórficas, com suas espículas características no seu envoltório (). Microscopia Eletrônica Direta. Barra 100 nm.

4-B: Vírus do Sarampo (Paramixovírus). Partícula com envoltório parcialmente rompido com liberação dos nucleocapsídeos (). Microscopia Eletrônica Direta. Barra 50 nm.

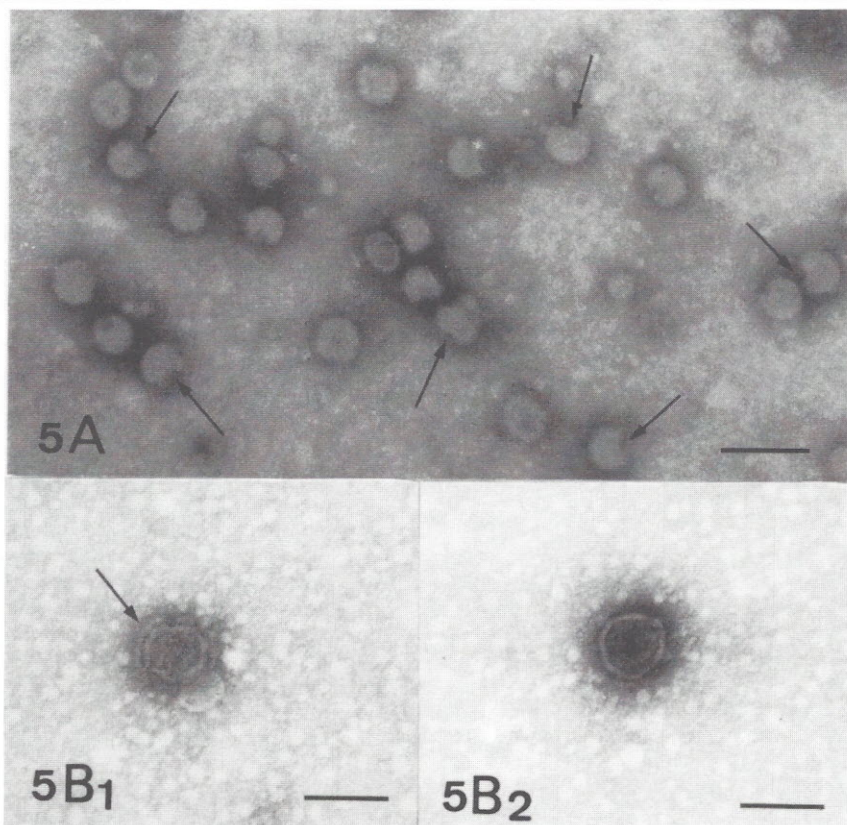


Fig. 5 - Fotomicrografias eletrônicas de:

5-A: Vírus Rocio (SPH-34675) causador de encefalite humana. Purificado viral a partir de encéfalo de camundongo experimentalmente inoculado. Algumas partículas apresentam-se rompidas e sem espículas do envoltório (). Microscopia Eletrônica Direta. Barra 100 nm.

5-B: Vírus HIV (co-cultivo em linfócitos). Microscopia Eletrônica Direta:

5B1 - Partícula viral apresentando espículas típicas em seu envoltório (). Barra 100 nm.

5B2 - Partícula com envoltório viral sem suas espículas. Barra 100 nm.

as partículas são esféricas (em torno de 22nm) ou tubulares (fig. 6) bem característicos⁸.

Em 1983, ocorreu na cidade de São Paulo um surto de meningite asséptica, que atingiu pessoas de várias faixas etárias, sendo isolado do líquido desses pacientes um provável novo vírus. Foram detectadas partículas semelhantes a vírus com diâmetro em torno de 40 nm no sobrenadante de cultura celular infectado, ressaltando-se aqui a importância dos resultados obtidos pela ME⁴².

Os nossos resultados com 30,22% de positividade, apresenta uma baixa sensibilidade. A M.E. é geralmente citada como a 3ª na lista de sensibilidade, abaixo dos testes de radioensaio e ensaios imunoenzimáticos¹. Porém, essa baixa sensibilidade é relativa, pois na realidade a ME e os testes imunoenzimáticos deveriam ser considerados como complementares. Por exemplo, uma amostra fecal diarréica contendo Adenovírus, sendo analisada por ensaio imunoenzimático dirigido para Rotavírus do Grupo A e por MED, o resultado do ensaio enzimático será ne-

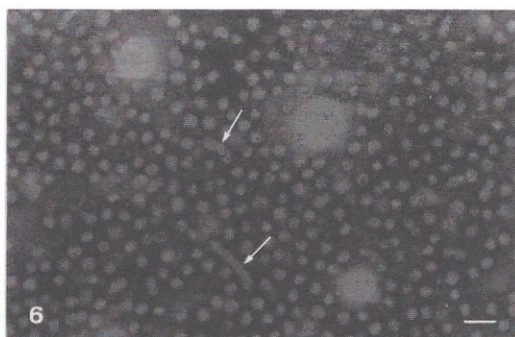


Fig. 6 - Fotomicrografia eletrônica de um purificado de antígeno HBs (vírus da Hepatite-B), apresentando formas esféricas e algumas alongadas (). Microscopia Eletrônica Direta. Barra 50 nm.

gativo enquanto a MED detectará a presença de partículas com morfologia de Adenovírus. A MED é ainda a única que permite detectar mais de um agente numa mesma amostra (fig.7).

Apesar da MED depender da interpretação individual do técnico especializado, tornando-a subjetiva, dificultando a avaliação de sua sensibilidade e aliada à impossibilidade de se realizar exames em larga escala, é uma técnica de fácil execução, com a vantagem de se obter resultados rápidos usando pouca amostra biológica. Não devemos esquecer também o alto custo operacional.

Embora os grandes centros de pesquisas e hospitais em países desenvolvidos mantenham laboratórios de microscopia eletrônica realizando diagnós-

tico rápido de vírus voltados às doenças de etiologias virais, no nosso país esta atividade ainda é restrita.

Tendo-se em mente a existência de vários laboratórios de ME voltados a atendimento da saúde humana, porém mais voltados para a pesquisa, este trabalho foi escrito com o intuito de divulgar a nossa experiência e incentivar a formação de técnicos especializados nesta área.

AGRADECIMENTOS

Nossos agradecimentos às estagiárias da Seção de Microscopia Eletrônica, Elizabeth A. Ferreira e Rosemeire R. Santana, pela realização de parte das colorações negativas deste trabalho.

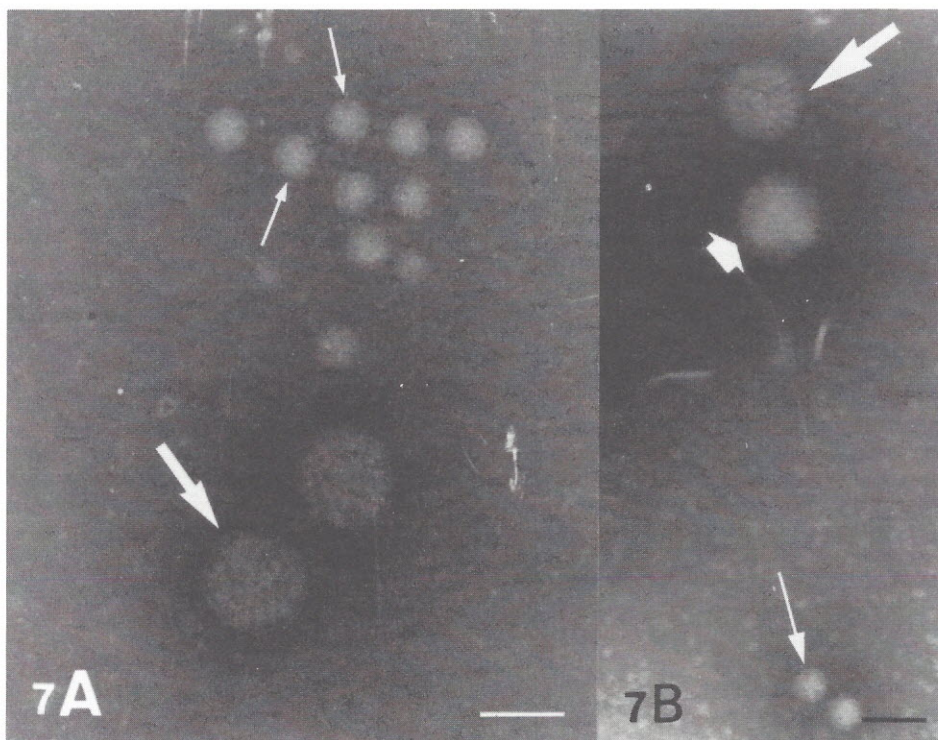


Fig. 7 - Fotomicrografias eletrônicas apresentando detecções de mais de um vírus numa mesma amostra de fezes diarréicas. Microscopia Eletrônica Direta.

7-A: Rotavírus () e Astrovírus (). Barra 50 nm.

7-B: Rotavírus (), Adenovírus () e Astrovírus (). Barra 50 nm.

UEDA, M.; TANAKA, H.; KISIELIUS, J, J.; JOAZEIRO, P, P.; WEIGL, D.R. - Rapid vírus diagnoses by electron microscopy. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 55(2):57-65, 1995.

ABSTRACT: The Electron Microscopy Section of Adolfo Lutz Institute performs rapid virus diagnosis in clinical specimens such as: vesicle fluid, scrapies lesions, saliva and urine (Herpesvirus group), skin lesions (Papilloma virus, Poxvirus group), diarrhoeal samples (Rotavirus, Adenovirus, Astrovirus, Calicivirus, Small Round Virus Particles-SRVP, Norwalk agent, Parvovirus and Coronavirus) and water's analysis (bacteriophages). It contributes too, in the morphologic quality control of virus antigens analysing samples of Measle, Influenzae, Rocio, Dengue, Hepatite A and B, HIV, and others. Negative staining is one of the techniques for viruses diagnosis in human diseases. Morphology, sub-structure and shape are important features for differentiation of the viruses. In spite of high cost, need of specialized technicians and impossibility to carry out analysis of great scale, the negative staining is an easy and rapid method, and it uses little quantity of biological specimens. It is useful to detect viruses that are difficult to cultivate *in vitro* such as several viruses associated with gastroenteritis in humans, and its advantage is only one that allows to observe two or more agents in the same specimen. Although, there are some Electron Microscopy Laboratories at Universities and Research Institutions, each laboratory have its own researchs and a few laboratories accomplish the rapid virus diagnosis.

DESCRIPTORS: Electron microscopy, Negative staining, Virus, Diagnosis

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ALMEIDA, J.D. Uses and abuses of diagnostic electron microscopy. *Curr. Trop. Microbiol. Immunol.*, **104**: 147-58, 1983.
2. ALMEIDA, J.D. & WATERSON, A.P. The morphology of vírus - antibody interaction. *Adv. Virus Res.*, **15**:307 - 38, 1969.
3. ASHLEY, C.R. et alii. Astrovirus-associated gastroenteritis in children. *J. Clin. Pathol.*, **31**: 939-43, 1978.
4. BARTH, O.M. Estudos sobre a contrastação negativa de suspensões virais. *Rev. Brasil. Biol.*, **44**: 71-80, 1984.
5. BRENNER, S. & HORNE, R.W. A negative staining method for high resolution electron microscopy of víruses. *Biochim. Biophys. Acta.*, **34**: 103-10, 1959.
6. CAUL, E.O. & APPLETON, H. The electron microscopical and physical characteristics of small round human fecal víruses: an interim scheme for classification. *J. Med Virol.*, **9**: 257-65, 1982.
7. CRUICKSHANK, J.G. et alii. Electron microscopy in the rapid diagnosis of small pox. *Lancet* **ii**, 527, 1966.
8. DANE, D.S. et alii. Vírus-Like particles in serum of patients with Australia-antigen-associated hepatitis. *Lancet*, **ii**:695-8, 1970.
9. DERRICK, K.S. Quantitative assay for plant víruses using serologically specific microscopy. *Virology*, **56**: 652-3, 1973
10. DIENSTAG, J.L. et alii. Quantitation of antibody to hepatitis A antigen by immune electron microscopy. *Infect. Immun.*, **13**: 1209-13, 1976.
11. DOANE, F.W. et alii. Rapid laboratory diagnosis of paramyxovirus infection by electron microscopy. *Lancet* **ii**, 751, 1967.
12. DOANE, F.W. et alii. Application of electron microscopy to the diagnosis of virus infections. *Can. Med. Ass. J.*, **100**: 1043-9, 1969.
13. DOANE, F.W. & ANDERSON, N. *Electron microscopy in diagnostic virology*. Cambridge University Press, 1987.
14. DOLIN, R. et alii. Novel agents of viral enteritis in humans. *J. Infect. Dis.*, **155**: 365-76, 1987.
15. DONELLI, G. et al. A three-year diagnostic and epidemiological study on viral infantile diarrhoea in Rome. *Epidem. Inf.*, **100**: 311-20, 1988.
16. FIELD, A.M. Diagnostic virology using electron microscopy. *Adv. Virus. Res.*, **27**: 1-69, 1982.
17. FLEWETT, T.H. et alii. Virus particles in gastroenteritis. *Lancet*, **2**: 1497, 1973.
18. FLEWETT, T.H. et alii. Calicivirus in man (letter). *Lancet*, **ii**: 311, 1976.
19. GARDNER, P.S. Rapid Virus Diagnosis. (Review Article) *J. gen. Virol.*, **36**: 1-29, 1977.
20. GELLI, D.S. & SOUZA, A. Bacteriófagos fecais em águas, verduras cruas não lavadas e outros produtos alimentícios: observações quanto ao seu achado durante surto de hepatite infecciosa e em condição normal. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, **52**: 63-9, 1992.
21. GLASS, R.I. et alii. Summary of the consensus Workshop on the Electron - microscopic detection of viral agents of gastroenteritis. Center for Infectious Diseases, CDC, Atlanta - GA, USA, 1990.

22. JONCAS, J. et alii. Diagnosis of viral respiratory infection by electron microscopy. *Lancet* **i**: 956, 1969.
23. KAPIKIAN, A.Z. et alii. Visualization by immune electron microscopy of a 27 nm particle associated with acute infectious nonbacterial gastroenteritis. *J. Virol.*, **10**: 1075-81, 1972.
24. KELLEN, A.E. & McLEOD, D.A. Differentiation of myxoviruses by electron microscopy and immunoelectron microscopy. In: Kurstak, E. & Morisset, R., eds. *Viral immunodiagnosis*. New York, Academic Press, 1974. p. 257-75.
25. KISIELIUS, J.J. et alii. Detecção por microscopia eletrônica (ME), de SRVP ("Small Round Virus Particles") em fezes de pacientes com quadros de gastroenterites. In: Encontro Nacional de Virologia, 5º São Lourenço, MG, 1990. Resumos, São Lourenço, 1990, p. 69/H49.
26. KISIELIUS, J.J. et alii. Detecção de calicivírus por microscopia eletrônica. In: *Virologia* 93. Encontro de Virologia, Abrangência Cone Sul, Porto Alegre, 1993. *Resumos*, Porto Alegre, 1993. p. 320/PO-3-19.
27. LeBARON, Ch. et alii. Viral agents of gastroenteritis - Public health importance and outbreak management. *MMWR - Recommendations and Reports - CDC*, **39**(RR-5), 1990.
28. LEITE, J.P.G. et alii. Astrovirus in faeces of children with acute gastroenteritis in Rio de Janeiro, Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 489-90, 1991.
29. LEW, J.F. et alii. Six-year retrospective surveillance of gastroenteritis viruses identified at ten electron microscopy centers in the United States and Canada. *Pediatr. Infect. Dis.J.*, **9**: 709-14, 1990.
30. MADELEY, C.R. & COSGROVE, B.P. 28 nm particles in faeces in infantile gastroenteritis. (letter) *Lancet*, **ii**: 451, 1975.
31. MADELEY, C.R. & COSGROVE, B.P. Calicivírus in man. (letter) *Lancet*, **i**: 199-200, 1976.
32. MILLER, S.E. Diagnostic virology by electron microscopy. *ASM News*, **54**: 475-81, 1988.
33. MONROE, S.S. et alii. Electron microscopy reporting of gastrointestinal viruses in the United Kingdom, 1985-1987. *J. Med. Virol.*, **33**: 193-8, 1991.
34. MOSS, B. Poxviridae and their replication. In: Fields, B.N. et alii. *Fundamental Virology*, 2nd e. New York, Ed. Raven Press, Ltd, 1991. p. 953-85.
35. NOZAWA, C.M. et alii. Detection of astrovírus-like in diarrhoeic stool and its coexistence with rotavirus. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*. **27**: 238-41, 1985.
36. NOYES, W.F. Structure of the human wart vírus. *Virology*, **23**: 65-72, 1964.
37. PETERS, D. et alii. Viriolo die Zwierlassig der electroen mikroskopischen schnell diagnostik. *Deutsche Medizinische Wochenschrift*, **78**: 2240, 1962.
38. SALLES-GOMES, L.F. et alii. Varíola: diagnóstico etiológico de 1967-70, no Instituto Adolfo Lutz. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, **31**: 5-12, 1971.
39. SHUKLA, D.D. & GOUGH, K.H. The use of protein-A from staphylococcus aureus in immune electron microscopy for detecting plant virus particles. *J. Gen. Virol.*, **45**: 533-6, 1979.
40. STANBRIDGE, C.M. et alii. Demonstration of papilloma virus particles in cervical and vaginal scrape material: a report of 10 cases. *J. Clin. Pathol.*, **34**: 524-31, 1981.
41. STEWIEN, K.E. et alii. Viral, bacterial and parasitic pathogens associated with severe diarrhoea in the city of São Paulo, Brazil. *J. Diarrhoeal Dis. Res.*, **11**: 148-52, 1993.
42. TAKIMOTO, S. et alii. Preliminar characterization of new vírus isolated from the spinal fluid of patients with meningitis in São Paulo, Brazil. *Rev. Inst. Med. trop. São Paulo*, **32**: 162 - 7, 1990.
43. TAKIMOTO, S. et alii. Presumptive rapid diagnosis of parvovirus infection in patients with Erythema Infectiosum-like illness. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, **52**: 27-30, 1992.
44. TANAKA, H. et alii. Intrafamiliar outbreak of astrovirus gastroenteritis in São Paulo, Brazil. In: *General Meeting of the American Society Microbiology*, 91st, Dallas, Texas, USA, 1991. Abstracts, Dallas, 1991, p. 406.
45. TIMENETSKY, M.C.S.T. et alii. Rotavírus, adenovirus, astrovirus, calicivírus e "small round vírus particles" em fezes de crianças, com e sem diarreia aguda, no período de 1987 a 1988, na Grande São Paulo. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, **35**: 275-80, 1993.
46. UEDA, M. et alii. Diagnóstico rápido de vírus do Grupo Herpes por microscopia eletrônica: observações atípicas nas amostras de pacientes aidéticos. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, **51**: 57-62, 1991.

Recebido para publicação em 02/12/94

CONTROLE DA ADEQUAÇÃO DE EMBALAGENS METÁLICAS REVESTIDAS PARA ALIMENTOS ÁCIDOS*

Neusa Santesso GARRIDO***
Neus Sadocco PASCUET**
Lúcia Tiego Fukushima MURATA**
Maria Rosa da Silva de ALCANTARA**
Maria Cecília Depieri NUNES**
Alice Momoyo SAKUMA**

RIALA 6/786

GARRIDO, N.S.; PASCUET, N.S.; MURATA, L.T.F.; ALCANTARA, M.R.S.; NUNES, M.C.D. & SAKUMA, A.M. - Controle da adequação de embalagens metálicas revestidas para alimentos ácidos. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 55(2):67-72, 1995.

RESUMO: Os cinco principais tipos de embalagens metálicas fabricados no Brasil para acondicionamento de alimentos ácidos foram analisados para verificar seu comportamento frente a legislação brasileira e testar como solventes alternativos: clorofórmio, metilacetona e N,N-dimetilformamida, para determinar a fração orgânica do resíduo obtido após prova de cessão. Das amostras analisadas, 40% apresentaram valores de resíduo total (fração orgânica e inorgânica) acima do permitido. O clorofórmio mostrou-se o melhor solvente para a extração. Foram determinados, também, os teores de chumbo, ferro e estanho migrados das embalagens metálicas.

DESCRITORES: embalagens metálicas, alimentos ácidos, determinações: chumbo, ferro e estanho, espectrofotometria de absorção atômica, espectrometria de emissão atômica com plasma de argônio acoplado indutivamente.

INTRODUÇÃO

As embalagens metálicas, graças à sua resistência mecânica e impermeabilidade, são utilizadas na conservação e armazenamento de alimentos, permitindo o processamento e a esterilização dos mesmos na própria embalagem, sendo ainda ideais para alimentos fotossensíveis¹⁵. Sua grande aceitação no mercado deve-se, também, ao fato do aço ser o material mais reciclado no mundo. No Brasil, atualmente, 18% das latas são recicladas⁸.

Existem no mercado diferentes tipos de materiais metálicos, produzidos com aço de baixo teor de carbono, revestidos em sua grande maioria com estanho quimicamente puro (folha-de-flandres) ou com cromo (folhas cromadas)²¹. Estes possuem características mecânicas e químicas que influem definitivamente no desempenho da embalagem. Também interferem

no comportamento final da embalagem, os diferentes tipos de vernizes que são aplicados sobre os materiais metálicos e cuja escolha é feita em função das características do produto alimentício que entrará em contato com a embalagem.

Os revestimentos orgânicos utilizados na parte interna das embalagens metálicas auxiliam na proteção contra a corrosão, prevenindo a dissolução dos metais pela interposição de uma barreira física entre o substrato metálico e o alimento²⁰. Além disso, uma grande importância tem sido dada ao uso desses produtos por razões puramente estéticas. O valor de uma aparência limpa na lata vazia combinada com a boa preservação do alimento, tanto no odor quanto na sua cor não podem ser desprezadas¹⁹.

O bom desempenho do verniz aplicado vai depender da espessura da camada do revestimento, de sua

* Realizado na Seção de Plásticos, Vernizes e Outros Materiais de Embalagem e na Seção de Equipamentos Especializados do Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, SP.

**Do Instituto Adolfo Lutz - Laboratório Central.

***Do Instituto Adolfo Lutz - Laboratório I de Ribeirão Preto.

aderência sobre a folha, e do seu grau de cozimento e porosidade²⁰.

Existem, entretanto, situações em que danos mecânicos removem o filme de verniz e expõem a camada metálica prejudicando assim a finalidade deste. Por mais bem aplicado que seja um verniz, uma certa porosidade não pode ser evitada, devido à aspereza da folha metálica e a não perfeita homogeneidade do verniz. Os microfuros formados na aplicação dão fragilidade à película¹⁰.

Em termos de proteção à corrosão da lata, o fator mais importante a ser considerado é a agressividade do alimento¹⁹.

Produtos alimentícios são sistemas complexos com diferentes propriedades físico-químicas e valores de pH, constituídos de uma gama de compostos que podem acelerar ou inibir o mecanismo da corrosão.

Do ponto de vista de Saúde Pública, dois fatores devem ser considerados na aprovação de uma embalagem metálica envernizada para alimentos: a migração de substâncias provenientes do revestimento orgânico e a de metais da lata.

Assim, após o tratamento térmico e durante o período de estocagem dos alimentos enlatados, as interações verniz-alimento praticamente não devem ocorrer¹.

O teor de estanho que se transfere da lata para o alimento tem um limite de migração estabelecido pelo CODEX ALIMENTARIUS⁷ e através da determinação da quantidade migrada pode-se determinar a vida-de-prateleira do alimento.

O ferro, que é um componente natural dos alimentos, pode ter sua concentração aumentada como consequência do enlatamento. Na maioria dos casos, os níveis presentes não ocasionam problemas, embora teores da ordem de 30 mg/kg de alimento ou menores confirmam odor e sabor ao produto, provocando uma perda de qualidade².

A dissolução do chumbo proveniente da embalagem onde se utilizou a solda convencional de chumbo/estanho para os alimentos é importante do ponto-de-vista de Saúde Pública, devido à sua toxicidade¹⁶. A eliminação de chumbo pelo organismo é lenta, fazendo com que seu consumo por períodos prolongados, mesmo a baixas concentrações, origine o acúmulo em quantidade suficiente para manifestação de seus efeitos tóxicos^{11, 18}. Entretanto, a maioria das latas comercializadas atualmente no Brasil são eletrossoldadas e não utilizam mais a solda convencional⁹.

Na legislação brasileira as embalagens metálicas revestidas são objeto de duas Resoluções: a Resolução 8/75⁴, referente às folhas metálicas e a Resolução

45/77⁵, que dispõe sobre seus revestimentos orgânicos, ambas da Comissão Nacional de Normas e Padrões para Alimentos - C.N.N.P.A.

Na Resolução 45/77, quando se analisa uma embalagem metálica, deve-se fazer o teste da migração global. Frequentemente, para alimentos aquosos ácidos, onde se utiliza o solvente simulante ácido acético a 3% v/v, o resíduo se apresenta acima do limite estabelecido. Em 1990, análises realizadas pelo Instituto Adolfo Lutz condenaram inúmeras amostras de embalagens metálicas revestidas com verniz, colhidas pela fiscalização.

Considerando que a legislação brasileira se refere ao revestimento orgânico, e não ao conjunto folha metálica/revestimento, os setores envolvidos (fabricantes de vernizes, de embalagens metálicas e de alimentos), alegaram que a análise da migração levava em conta o resíduo orgânico, referente ao revestimento e o inorgânico, referente à parte metálica. Foi então formada uma comissão para discutir e estudar este assunto, objetivando avaliar metodologias analíticas alternativas e propor normas mais adequadas para o controle deste tipo de embalagem.

A legislação italiana referente a embalagens metálicas¹³ foi revista e atualizada¹⁴, baseada no trabalho desenvolvido por Barbieri², que sugeria, após a prova de cessão com solvente simulante para alimentos ácidos, uma extração com clorofórmio e somente este segundo resíduo seria considerado, além de dosagens específicas para alguns metais.

Em 1992, a Subcomissão de Embalagens do MERCOSUL passou a estudar propostas de normas específicas para o controle de embalagens metálicas. Nessa ocasião foram enviados os primeiros dados sobre estes estudos.

Assim sendo, os objetivos deste trabalho são: verificar o comportamento das embalagens metálicas frente à legislação brasileira, testar solventes alternativos para determinar a fração orgânica do resíduo obtido após prova de cessão e fornecer subsídios à Comissão do Mercosul para a elaboração de um regulamento técnico específico.

MATERIAL E MÉTODOS

Cinco dos principais fabricantes de embalagens metálicas forneceram amostras de seus produtos mais comumente usados no acondicionamento de alimentos ácidos. As características dessas embalagens estão descritas na Tabela I.

Para cada tipo de embalagem metálica enviada foram efetuadas cinco provas de cessão, em duplicata, utilizando-se como solvente simulante para alimentos ácidos uma solução de ácido acético a 3% v/v, de

TABELA I
Especificação das amostras enviadas

Caracterização da Folha		Tipo de solda	Tipo de lata	Revestimento Orgânico (Verniz)	Camada seca do Verniz* g/m ²	
Corpo	Tampa/fundo					
A	Estanhada	Cromada	Elétrica	Sem friso	Epoxi Óleo Resinoso	10,74
B	Estanhada	Cromada	Elétrica	Frisada	Epoxi / Fenólico Óleo Resinoso Do Corpo: Epóxi/Fenólico	14,80
C	Estanhada	Cromada	Elétrica	Frisada	Da Tampa/Fundo: Óleo Resinoso com deslizante	12,23
D	Estanhada	Estanhada	Convencional	Sem friso	Epoxi/Fenólico Óleo Resinoso	10,74
E	Estanhada	Cromada	Elétrica	Frisada	Epoxi/Fenólico Óleo Resinoso	14,56

* Determinação efetuada de acordo com a metodologia do Livro de Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz.

TABELA II
Resíduos obtidos após prova de cessão com ácido acético a 3% v/v e após extração com clorofórmio e metiletilcetona.

Amostra	Resíduo Total		Fração Orgânica	
	Resíduo após prova de cessão (mg/l)	Resíduo após extração com clorofórmio ** (mg/l)	Resíduo após extração com MEC ** (mg/l)	
A	18,7	2,7	2,7	
B	224,6	4,5	3,6	
C	27,2	2,7	0,9	
D	257,9	1,8	1,8	
E	26,3	3,6	5,3	

* Média de 10 (dez) determinações

** Média de 5 (cinco) determinações

TABELA III
Níveis de chumbo, ferro e estanho contidos na fração inorgânica obtida pela extração do resíduo total com clorofórmio e MEC.

Amostra	Fração inorgânica obtida após extração do resíduo com:					
	Clorofórmio*			Metiletilcetona*		
	Chumbo (mg/kg)	Ferro (mg/kg)	Estanho (mg/kg)	Chumbo (mg/kg)	Ferro (mg/kg)	Estanho (mg/kg)
A	<0,05	5,80	<0,04	<0,05	6,42	<0,04
B	<0,05	72,12	<0,04	<0,05	72,69	<0,04
C	<0,05	10,83	<0,04	<0,05	10,39	<0,04
D	2,14	97,12	0,17	7,53	91,67	0,37
E	<0,05	9,94	<0,04	<0,05	10,38	<0,04

* Média de 5 (cinco) determinações.

acordo com a Resolução 45/77. O mesmo procedimento foi realizado substituindo-se o solvente simulante por salmoura cítrica (0,3g de ácido cítrico e 2,0g de cloreto de sódio em 100 ml de água).

Para a determinação do resíduo foi usada a metodologia descrita no Livro de Normas do Instituto Adolfo Lutz¹², estabelecendo-se como tempo de contato 10 dias a temperatura de 40°C.

As frações orgânica e inorgânica do resíduo foram determinadas através da técnica descrita abaixo.

Após a determinação do resíduo com solução de ácido acético efetuou-se a extração da fração orgânica utilizando-se o clorofórmio como solvente, seguindo a técnica:

Em capela, dissolver o resíduo contido na cápsula com 25 ml de clorofórmio, a quente. Filtrar em papel Whatman nº 40. Repetir esta operação por duas vezes com novas porções de clorofórmio. Lavar o papel de filtro com mais 25 ml de clorofórmio. Recoher os filtrados em cápsula tarada. Evaporar e pesar até peso constante (fração orgânica).

Queimar o papel de filtro contendo a fração inorgânica em cápsula a 400° C até obtenção de cinzas brancas. Dissolver em aproximadamente 1 ml de ácido clorídrico concentrado e aquecer em chapa elétrica para eliminar o excesso. Caso as amostras não se solubilizem, colocar 1 ml de ácido nítrico concentrado e aquecer. Transferir para balão volumétrico de 25 ml e completar o volume com água destilada. Determinar neste extrato os teores de chumbo, ferro e estanho.

Paralelamente, fazer o branco correspondente, seguindo o mesmo procedimento.

Neste trabalho, o teor de chumbo foi determinado em espectrofotômetro de absorção atômica Perkin-Elmer, mod. 460, com corretor de deutério e lâmpada EDL de chumbo nas condições instrumentais indicadas pelo fabricante para o elemento em estudo.

Os teores de estanho e ferro foram determinados utilizando-se um espectrômetro de emissão atômica com plasma de argônio acoplado indutivamente marca Perkin-Elmer, mod. P40 com comprimentos de onda de 224,605 nm para o estanho e de 238,204 nm para o ferro.

O mesmo procedimento foi seguido substituindo-se o clorofórmio por metiletilcetona (MEC) e N,N-dimetilformamida.

RESULTADOS

Os resultados do estudo comparativo das diferentes técnicas utilizadas se encontram nas tabelas II e III.

DISCUSSÃO E CONCLUSÃO

Não foram tabelados os resultados obtidos pela técnica de extração com o solvente N,N-dimetilformamida por não apresentarem boa repetibilidade.

Como a simulação dos alimentos ácidos através da solução de ácido acético tem sido questionada, neste estudo foi considerada a salmoura cítrica como solvente alternativo para a simulação, por ser o veículo normalmente utilizado em conservas. Entretanto, a quantificação dos resíduos encontrados quando se utilizou a salmoura cítrica apresentou valores discrepantes, não sendo considerados neste trabalho.

As amostras B e D apresentaram resíduo total acima do permitido pela legislação brasileira. Entretanto, após a extração da fase orgânica com clorofórmio e com MEC as mesmas apresentaram resultados dentro do limite estabelecido.

Os dados encontrados na extração com clorofórmio apresentaram uma menor variação quando comparados com aqueles obtidos utilizando-se MEC como solvente.

Considerando que tanto a metodologia analítica para o controle de embalagens metálicas descritas na legislação americana⁶ quanto a legislação italiana^{13,14} adotam o clorofórmio como solvente de extração da fração orgânica do resíduo total e considerando, ainda, que neste trabalho o solvente que apresentou menor variação dos resultados foi o clorofórmio, o mesmo foi sugerido como solvente de extração na proposta de norma encaminhada à Subcomissão de Embalagens do MERCOSUL.

Essa Comissão, após um estudo, aprovou a proposta na forma da Res. GMC 27/93³ que passará a vigorar como legislação brasileira a partir de 1995.

Foram encontrados teores elevados de ferro migrados da maioria das embalagens estudadas, fato que pode ser atribuído a: maior agressividade do solvente simulante ácido acético empregado quando comparado com os alimentos comumente embalados; o não fechamento hermético à temperatura elevada, que não simula corretamente o processamento do alimento, mantendo o oxigênio no espaço livre, fator de corrosão e conseqüente migração do ferro.

Os valores de estanho encontrados estão abaixo do limite permitido para alimentos¹⁷.

Apenas a amostra D apresentou nível significativo de chumbo após prova de cessão, o que se justifica, pois trata-se da única amostra que utilizava solda convencional. (tabela I)

A discrepância entre os valores dos níveis de chumbo obtidos após extração com clorofórmio e MEC (tabela III) pode estar relacionada com uma não homogeneidade na aplicação da solda na costura da lata ou com uma interação metal/solvente. Possíveis falhas na aplicação do verniz ou danos mecânicos na região da solda também podem ser responsáveis pela variação dos resultados.

Os teores de ferro e estanho migrados apresentaram, entretanto, resultados concordantes nos dois solventes de extração, pois são metais que se encontram uniformemente distribuídos na embalagem.

O clorofórmio apresentou-se como o solvente mais adequado para determinação do resíduo orgânico proveniente de embalagens revestidas; entretanto, sugere-se estudos posteriores com outros solventes.

Os dados deste trabalho serviram como subsídios para o estabelecimento de um regulamento técnico específico para embalagens metálicas revestidas, no âmbito do MERCOSUL.

RIALA6 /786

GARRIDO, N.S.; PASCUET, N.S.; MURATA, L.T.F.; ALCANTARA, M.R.S.; NUNES, M.C.D. & SAKUMA, A.M. - Quality Control of revested metallic packagings for acid food. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 55(2):67-72, 1995.

ABSTRACT: The five main kinds of metallic packagings made in Brazil and used for acid food were analysed according to brazilian legislation. Chloroform, methyl ethyl ketone and N,N dimethylformamide, were tested as alternative solvents to determine the organic residue after cession tests. 40% of the analysed sample showed total residue values above the limits permitted by brazilian regulation. The results showed that chloroform was the best solvent for the extraction. Levels of lead, iron and tin migrated from these metallics packagings were also determined.

DESCRIPTORS: metallic packagings, acid food, determinations: lead, iron and tin, flame atomic absorption spectrophotometry, inductively coupled plasma atomic emission spectroscopy.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ANJOS, V.D.A.; FARIA, E.V.; SOLER, R.M.; DANTAS, S.T. - *Interação de embalagens metálicas com produtos alimentícios*. Campinas: ITAL/SBCTA, 91p., 1989.
2. BARBIERI, G. - Problemi e prospettive delle pellicole di vernice applicate sulla superficie interna di contenitori in banda stagnata destinati a venire in contatto con alimenti. *Tecniche dell'imballaggi*, anno VII, 1976.
3. BOLETIM DE INTEGRAÇÃO LATINO-AMERICANA. Rio de Janeiro, Ministério das Relações Exteriores. Nº 12, jan/mar. 1994.
4. BRASIL. Leis, decretos, etc. - Resolução 8/75 da Comissão Nacional de Normas e Padrões para Alimentos do Ministério da Saúde. *Diário Oficial*, Brasília, 26 jun. 1975. Seção I, pt. I, p. 7547. Dispõe quanto às substâncias e materiais que poderão ser empregados no fabrico de recipientes ou utensílios destinados a entrar em contato com alimentos...
5. BRASIL. Leis, decretos, etc. - Resolução 45/77 da Comissão Nacional de Normas e Padrões para Alimentos do Ministério da Saúde. *Diário Oficial*, Brasília, 1 fev. 1978. Seção I, pt. I, p. 1781 - 95. Aprova as listas de polímeros, resinas e respectivos aditivos e regulamenta seu emprego na elaboração ou revestimento de embalagens.
6. CODE OF FEDERAL REGULATIONS - *Food and Drugs*. Washington, CFR, title 21, part 175.300, p. 157-163. c1993.
7. CODEX ALIMENTARIUS COMMISSION. List of maximum levels recommended for contaminants by the FAO/WHO Codex Alimentarius Commission. 3th series. Rome, FAO/WHO, 1978.
8. COMPROMISSO EMPRESARIAL PARA RECICLAGEM - CEMPRES. *Jornal Informativo*. v. 1, Nº 19, nov., 1994.
9. DANTAS, S.T. & FARIA, E.V. - *Latas eletrossoldadas: aspectos tecnológicos e avaliação da qualidade*. Campinas: ITAL, 81 p. 1991.
10. FARIA, E.V. et alli. - *Controle de qualidade de embalagens metálicas*. Campinas: ITAL, p. 152. 1990.
11. FRIBERG, L. et alli - *Handbook on the toxicology of metals*. Amsterdam, Elsevier, 1979.

12. INSTITUTO ADOLFO LUTZ (São Paulo) - *Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz*, 3 ed. São Paulo, IMESP, 1985, v.1: Métodos químicos e físicos para análise de alimentos. p. 443-464.
13. ITALIA. Leis, decretos, etc. - Decreto Ministeriale 21 marzo 1973. *Gazzeta Ufficiale della Repubblica Italiana*, Roma, 20 aprile 1973. Pt. 1 (Supl. 104) p. 132 - 68. Disciplina igienica degli imballaggi, recipient, utensili, destinati a venire in contato con le sostanze alimentari o con sostanze d'uso personale.
14. ITALIA. Leis, decretos, etc. - Decreto Ministeriale 18 febbraio 1984. *Gazzeta Ufficiale della Repubblica Italiana*, Roma, 16 marzo 1984. Pt. 1 (Supl. 76) p. 2294 - 97. Disciplina del contenitori in banda stagnata saldati con lega stagno-piombo ed altri mezzi.
15. PANOSSIAN, Z. & DI GIORGI, F. - Embalagens e materiais de embalagem metálicos: falhas em serviços. In: *WORLD CONFERENCE ON PACKAGING*, 8 th, São Paulo, 1993 - Campinas, IAPRI, CETEA, p. 413-434. 1993.
16. PIOTROWSKI, I.K. & COLEMAN, J.K. - Environmental hazards of heavy metals: summary evaluation of lead, cadmium and mercury. London, MARC/GEMS, p. 1-18 (MARC Report nº20). 1980.
17. SÃO PAULO. Leis, Decretos, etc. Decreto Nº. 12.486, de 20 de outubro de 1978. *Diário Oficial*, São Paulo, 21 de out. 1978, p. 211 (NTA 31) e p. 217 (NTA 32). Aprova normas de técnicas especiais relativas a alimentos e bebidas.
18. SAX, N.I. - *Dangerous properties of industrial materials*. 5 th ed. New York, Van Nostrand/Reinhold, p. 388-90, 455-9, 765-71. 1979.
19. SOLER, R.M. - Estudo da vida útil de prateleira de produtos alimentícios enlatados. In: *CONGRESSO BRASILEIRO DE EMBALAGEM*, 1, São Paulo, Anais. p. 36-39. 1977.
20. SOLER, R.M. & FARIA, E.V. - Tendências sobre revestimentos orgânicos destinados à proteção de embalagens metálicas. *Boletim SBCTA*, Campinas, v.17, n. 4, p. 357-63, 1983.
21. SOLER, R.M. et alli - *Manual de controle de qualidade de embalagens metálicas para alimentos*. Campinas, ITAL/SBCTA, 131p. 1985.

Recebido para publicação em 21/12/94

METODOLOGIA DE ANÁLISE MICROSCÓPICA PARA A AVALIAÇÃO DAS CONDIÇÕES HIGIÊNICAS EM MISTURAS PARA O PREPARO DE SOPAS E DE RISOTOS.*

Marlene CORREIA**
Márcia Bittar ATUI**

RIALA6/787

CORREIA, M. & ATUI, M. B - Metodologia de análise microscópica para a avaliação das condições higiênicas em misturas para o preparo de sopas e de risotos. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 55(2):73-77, 1995.

RESUMO: Neste trabalho, a metodologia da A.O.A.C. para pesquisa de sujidades leves em pães brancos e produtos com alto teor de gordura, com modificações, é proposta como método para análise microscópica de misturas para o preparo de sopas e de risotos. Este método mostrou-se eficiente para a extração das matérias estranhas presentes nas amostras-teste. Foram analisadas, pelo método proposto, 50 amostras de misturas para o preparo de sopas e 50 para o preparo de risotos, adquiridas em supermercados e com finalidade institucional (amostras destinadas à merenda escolar). Das amostras analisadas, 92% de misturas para sopas e 88% dos risotos estavam em condições higiênicas insatisfatórias. As amostras de natureza institucional apresentaram maior número de matérias estranhas.

DESCRITORES: análise microscópica; misturas para o preparo de sopas; misturas para o preparo de risotos; matérias estranhas; sujidades leves.

INTRODUÇÃO

Com as mudanças que vão ocorrendo no hábito alimentar da população, em função da vida atribulada das grandes cidades como São Paulo, cada vez mais são comercializados em supermercados, produtos alimentícios prontos ou semi-prontos que permitem uma diminuição no tempo necessário para a preparação das refeições.

A produção de alimentos de preparo instantâneo começou a crescer nos últimos cinco anos, com o desenvolvimento de novas fórmulas para sopas, sopões e misturas de arroz, entre outros⁵.

As misturas em pó para o preparo de alimentos, além do menor tempo para o seu preparo, têm uma vida de prateleira relativamente longa, podendo ser estocadas sem necessidade de refrigeração. Outra importante utilização desses produtos é na alimentação de escolares através do Programa da Merenda Escolar, pelo qual são distribuídos alimentos adqui-

ridos pelo Governo às escolas públicas estaduais e municipais.

As misturas para o preparo de sopas e de risotos à disposição da população em supermercados e as oferecidas na alimentação escolar devem suprir parte das necessidades nutricionais do indivíduo e estar em boas condições higiênicas para evitar danos à saúde.

Tanto as misturas para o preparo de sopas como risotos são constituídas basicamente de alimentos vegetais como farinhas, arroz, legumes e macarrão.

Os principais contaminantes encontrados nas farinhas e massas alimentícias, são fragmentos de insetos originários do trigo contaminado por pragas do campo ou dos armazéns e pela manipulação ou estocagem da farinha em condições higiênicas insatisfatórias.¹⁰

Em trabalho anterior, analisando amostras de arroz, foram encontrados fragmentos de insetos, ácaros, larvas, insetos, pêlos de roedor e excrementos³.

* Realizado na Seção de Microscopia Alimentar da Divisão de Bromatologia e Química do IAL.

** Do Instituto Adolfo Lutz.

A maioria dos insetos que atacam esses tipos de produtos pertencem às ordens *Coleoptera* e *Lepidoptera* e principalmente aos gêneros *Sitophilus*, *Oryzaephilus*, *Tribolium*, *Rizopertha* e *Ephesia*^{6,7,8}.

Ao lado dos numerosos insetos que se adaptaram ao habitat de produtos armazenados, há muitas formas de vida como ácaros, os quais são transportados por roedores, aves e insetos e que são atraídos para esses depósitos em busca de alimentos⁴.

Em trabalho anterior, foi desenvolvido um método de análise microscópica para misturas e pós para o preparo de sopas, que detectava as matérias estranhas presentes em cada tipo de ingrediente do produto fornecendo, desta forma, subsídios às indústrias quanto ao ingrediente que se apresentava em condições higiênicas insatisfatórias¹¹.

Como o método proposto anteriormente é bastante trabalhoso, dificultando sua implantação como rotina no laboratório, pretendeu-se com essa pesquisa sugerir uma metodologia mais barata e que demandasse menos tempo para se chegar a resultados satisfatórios quanto à extração das matérias estranhas presentes, além de verificar as condições higiênicas das misturas para o preparo de sopas e de risotos comercializados em supermercados da Cidade de São Paulo e destinadas à merenda escolar (institucionais).

MATERIAIS E MÉTODOS

Amostras teste

Os testes para escolha da metodologia de análise mais adequada foram realizados com amostras de misturas para o preparo de sopas e de risotos enviados ao Instituto Adolfo Lutz para análise.

Para testar a eficiência do método quanto à recuperação de matérias estranhas, foram contaminadas artificialmente no laboratório, 10 amostras de misturas para o preparo de sopas e 10 amostras para o preparo de risotos, cada uma com 10 élitros e 10 pêlos de roedor.

Amostragem

Foram analisadas, pelo método proposto, 50 amostras de misturas para o preparo de sopas (25 adquiridas em supermercados da Cidade de São Paulo e 25 institucionais que foram enviadas ao Instituto Adolfo Lutz para análise) e 50 amostras de misturas para o preparo de risotos (com a mesma distribuição das sopas), no período de março a dezembro de 1994.

MÉTODOS

Sujidades leves

A adaptação de uma metodologia de análise microscópica para misturas para o preparo de sopas e risotos, baseou-se, inicialmente, em métodos oficiais da A.O.A.C. para pesquisa de sujidades leves em farinhas, macarrão ou arroz que são os principais ingredientes dos produtos em estudo. Como as sopas e os risotos semi-elaborados contêm grande quantidade de gordura, optou-se pelo método da A.O.A.C. que tem como princípio a digestão ácida, para a pesquisa de sujidades leves em pães brancos e produtos com alto teor de gordura.

Procedimento (com modificações)¹:

- Pesar 225g de amostra em bequer de 2000 ml e adicionar 1000ml de sol. de HCl a 3% e 20ml de Igepal.
- Autoclavar por 30min a 121°C.
- Transferir o material para peneira nº 230, lavando com água quente.
- Retornar o material tamisado para o bequer, adicionar 30ml de HCl concentrado e completar o volume para 1000ml com água filtrada.
- Ferver com agitação por 6min., adicionar 50ml de vaselina líquida e agitar sem aquecimento por 3min.
- Transferir o material para frasco armadilha e completar o volume com água filtrada.
- Deixar 30min, agitando em 10 e 20min e extrair para bequer.
- Adicionar 30 ml de vaselina líquida, agitar e completar o volume do frasco com água filtrada, deixar em repouso 20min e extrair no mesmo bequer.
- Filtrar a vácuo em papel de filtro.
- Examinar ao microscópio estereoscópico.

Análise Estatística

Aplicou-se o teste de duas proporções com aproximação normal², para determinar se haviam diferenças significativas entre os tipos e a origem dos produtos e os níveis de matérias estranhas apresentados. Considerou-se alfa = 0,05 e "z" de alfa = 1,96 como nível de rejeição.

RESULTADOS

As porcentagens de recuperação e o desvio padrão das matérias estranhas nas amostras teste estão representadas na Tabela 1.

Na Tabela 2 observa-se as freqüências de amostras em condições higiênicas satisfatórias e insatisfatórias, das misturas para o preparo de sopas e de risotos de supermercados e institucionais.

As freqüências de amostras contendo os sete tipos de matérias estranhas encontradas em misturas para o preparo de sopas e para o preparo de risotos de supermercados e institucionais são apresentadas na Tabela 3.

Na Tabela 4 são apresentados os totais de matérias estranhas encontradas para cada tipo de produto analisado, e as médias em relação às amostras em condições higiênicas insatisfatórias.

DISCUSSÃO

Pela Tabela 1 observa-se que houve uma alta porcentagem de recuperação nas amostras teste para pêlos de roedor e élitros de insetos (85% e 92% respectivamente), e com desvio padrão próximo a um, indicando que o método proposto é adequado para análise microscópica dos produtos em estudo.

Verifica-se pela Tabela 2, que 90% das amostras analisadas estavam em condições higiênicas insatisfatórias, isto é, continham pelo menos um tipo de matéria estranha e não houve diferença estatisticamente significativa ($p > 0,05$) entre as amostras de supermercados e as institucionais para um mesmo tipo de produto.

Na análise da Tabela 3, observam-se variações nas freqüências de amostras contendo os sete tipos de matérias estranhas encontradas.

TABELA 1
Distribuição da freqüência relativa e desvio padrão de matéria estranha, segundo a recuperação e tipo de mistura. São Paulo, 1994.

Tipo	Recuperação			
	Élitros		Pêlos de roedor	
	FR	DP	FR	DP
Misturas para sopa	92	1,03	87	0,95
Misturas para risoto	93	0,82	85	0,97

FR = freqüência relativa (%)

DP = desvio padrão

TABELA 2
Distribuição do número e porcentagem de amostras analisadas, segundo condições higiênicas, tipo e procedência. São Paulo, 1994.

Tipo e procedência	Condições higiênicas					
	Satisfatórias		Insatisfatórias		Total	
	FA	FR	FA	FR	FA	FR
Sopa supermercado	2	8,0	23	92,0	25	100,0
Sopa institucional	2	8,0	23	92,0	25	100,0
Risoto supermercado	5	20,0	20	80,0	25	100,0
Risoto institucional	1	4,0	24	96,0	25	100,0
TOTAL	10	10,0	90	90,0	100	100,0

FA = freqüência absoluta

FR = freqüência relativa (%)

As amostras de sopas apresentaram principalmente fragmentos de insetos (de 1 a 86) em 92% das amostras analisadas, enquanto que os risotos continham além de fragmentos, larvas de insetos (média, entre risotos de supermercado e institucional, de 80,0% e 44,0%, respectivamente).

Apesar de não haver diferenças estatisticamente significantes entre as amostras de sopas e de risotos em condições higiênicas insatisfatórias (Tabela 2), pode-se observar, pela Tabela 4, uma grande variação no número de matérias estranhas totais encontradas entre as amostras de misturas para sopa e para risoto e também entre as amostras de misturas para sopas de supermercado e institucionais.

CONCLUSÕES

- O método da A.O.A.C. de pesquisa de sujidades leves em pães brancos e produtos com alto teor de gordura, adaptado para análise de misturas para o preparo de sopas e de risotos, mostrou-se eficiente para a extração das matérias estranhas presentes.

- Na análise das misturas para o preparo de sopas e de risotos encontrou-se uma alta porcentagem de amostras em condições higiênicas insatisfatórias, principalmente pela presença de fragmentos de insetos.

TABELA 3
Distribuição do número e porcentagem de amostras de misturas, segundo procedência e tipos de matérias estranhas. São Paulo, 1994.

Matéria estranha	tipo	intervalo	Sopas				Risotos			
			Supermercado		Institucional		Supermercado		Institucional	
			FA	FR	FA	FR	FA	FR	FA	FR
Fragmentos de insetos	1—86	23	92,0	23	92,0	19	76,0	21	84,0	
Larvas de insetos	1—7	0	0,0	3	12,0	10	40,0	12	48,0	
Ácaros mortos	1—3	0	0,0	1	4,0	0	0,0	3	12,0	
Insetos mortos	1—2	1	4,0	0	0,0	0	0,0	2	8,0	
Pêlos de roedor	1	1	4,0	0	0,0	0	0,0	2	8,0	
Pêlo não identificado	1	1	4,0	0	0,0	1	4,0	1	4,0	
Areia		0	0,0	0	0,0	1	4,0	0	0,0	

FA = frequência absoluta

FR = frequência relativa(%)

TABELA 4
Total de matérias estranhas presentes nas amostras, segundo tipo e procedência. São Paulo, 1994.

Amostras	Número de amostras	Total matérias estranhas	Matérias estranhas/amostra
Sopa supermercado	23	342	14,9
Sopa institucional	23	630	27,4
Risoto supermercado	20	187	9,3
Risoto institucional	24	238	9,9

CORREIA, M. & ATUI, M.B. - Methodology of microscopic analysis for the evaluation of hygienic conditions of soup mixes and risotto mixes. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 55(2):73-77, 1995.

ABSTRACT: Fifty soup samples and fifty risotto samples, some bought in supermarkets and others acquired from the School Lunch Meal Program of São Paulo State, were analysed for the purpose of verification of the sanitation. For this study we suggest the use of the. A.O.A.C. method for high fat products in analyzing soups and risottos, as it is efficient for recuperation of insect fragments and rodent hairs in test samples. It was found that 92% of the soup samples and 88% of risotto samples were in unsatisfactory sanitary conditions due to filth. It was concluded that the method utilized gave good results, and the School Lunch Meal Program samples were found to be more contaminated than the others.

DESCRIPTORS: soups, risottos, filth in, microscopical analysis.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. - *Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists*. 14 ed. Washington D.C., A.O.A.C., p. 386 (tecn. 970.70). 1984.
2. BERQUÓ, E.S. et alii. - *Bioestatística*. 1ª ed. rev. São Paulo, EPU, 1981.
3. Condições higiênicas em grãos - *Bol. IAL-BIAL*, 1(1): 06, 1991.
4. FLECHTMANN, C.H.W. - Ácaros em produtos armazenados e na poeira domiciliar. Piracicaba, Fundação de Estudos Agrários Luiz de Queiroz, 1986. (Mimeografado).
5. GODOY, S.O - O "boom" dos alimentos instantâneos. *Alimentos & Tecnologia*, 9 (49): 24-7, 1993.
6. GORHAM, J.R., ed. - *Insect and mite pests in food - an illustrated key*. v.2. Washington, D.C., 1991.
7. KLEIN, R.M. - Pictorial Guide for rapid identification of common adult storage insects. *J. of Food Protection*. 49 (2) : 154-60, 1986.
8. KURTZ, O.L. & HARRIS, KL. - *Micro-analytical entomology for food sanitation control*. Washington, D.C., s.d.
9. SÃO PAULO. Leis, decretos, etc. - Decreto nº 22.379 de 1º de junho de 1984. *Diário Oficial*, São Paulo, 20 jun 1984, p.1. Dispõe sobre a municipalização da merenda escolar, regulamentando a Lei nº 4021 de 22 de maio de 1984.
10. ZAMBONI, C.Q. & ATUI, M.B. - Comparação entre métodos para pesquisa de sujidades e verificação das condições higiênicas das massas alimentícias por microscopia. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*. 49 (1): 11-17, 1989.
11. ZAMBONI, C.Q.; ALVES, H.I.; ATUI, M.B. - Métodos para detecção de sujidades leves em sopas desidratadas. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 50 (1/2): 31-5, 1990.

Recebida para publicação em 03/01/95

INCIDÊNCIA DE AFLATOXINAS EM MILHO (*ZEA MAYS L.*) COM DIFERENTES NÍVEIS DE UMIDADE, APÓS TRATAMENTO COM FUNGICIDA, ARMAZENADO EM ATMOSFERA COM E SEM AERAÇÃO

Guilherme PRADO¹
Nicézio Janssen ALMEIDA PINTO²
Marize Silva de OLIVEIRA¹

RIALA6/788

PRADO, Guilherme e col. - Incidência de aflatoxinas em milho (*Zea mays L.*) com diferentes níveis de umidade, após tratamento com fungicida, armazenado em atmosfera com e sem aeração. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 55(2):79-84, 1995.

RESUMO: Foi verificada a produção de aflatoxinas em amostras de milho, cultivar BR 201, plantada em 1994, no Centro Nacional de Milho e Sorgo (EMBRAPA), em Sete Lagoas, Minas Gerais. As amostras, coletadas em duplicata, apresentando diferentes níveis de umidade, foram tratadas com solução aquosa e oleosa de Iprodiona (20ppm), seguido de um armazenamento em tambores metálicos, com e sem aeração, proporcionando uma temperatura de 18-20°C e 35-40°C, respectivamente. Os resultados encontrados mostraram uma redução dos níveis de aflatoxinas nas amostras tratadas com Iprodiona e armazenadas em atmosfera aerada. Quando o acondicionamento foi realizado em atmosfera sem aeração (temperatura 35-40 °C), o decréscimo dos teores de aflatoxinas não foi significativo, principalmente nos níveis de umidade mais elevados, indicando que temperatura e umidade são fatores importantes na biossíntese de aflatoxinas.

DESCRIPTORIOS: Milho, aflatoxinas, iprodiona, controle.

INTRODUÇÃO

As aflatoxinas são metabólitos secundários produzidos por fungos do gênero *Aspergillus* que contaminam as culturas no campo, os grãos durante o armazenamento e também os produtos alimentícios destinados ao consumo humano. Devido aos efeitos carcinogênicos, mutagênicos e teratogênicos, as aflatoxinas representam um risco à saúde pública, havendo pois a necessidade de desenvolver medidas de controle durante o processo de produção de alimentos: cultivo, colheita, armazenamento e transporte¹⁵.

Vários são os fatores que influenciam o desenvolvimento de fungos e a produção de aflatoxinas em alimentos, sendo a temperatura e a umidade (atividade de água e teor de umidade) dois parâmetros descritos como fundamentais neste processo da bios-

síntese. DIENER & DAVIS², SCHINDLER et alii¹¹ verificaram que a temperatura mínima de produção de aflatoxina é 12°C e a máxima de 42°C, sendo a ótima entre 24 e 30°C. Com relação à umidade relativa observou-se que o limite mínimo é de 85%, ou seja, o substrato deve apresentar atividade de água de no mínimo 0,85 para que o fungo possa produzir a toxina. Em milho, foi verificado que a atividade de água que mais favorece a produção de aflatoxina por *Aspergillus parasiticus* é de 0,90⁴. PRADO et alii⁷ verificaram a influência da atividade de água no crescimento de fungos e mesófilos e na produção de aflatoxinas durante o armazenamento de amendoim, variedade Tatu Vermelho. Após o armazenamento do amendoim, a temperatura ambiente, em câmaras equilibradas em atividade de água 0,75, 0,83, 0,86, 0,93 e 0,97, os autores verificaram que a produção máxima de aflatoxina ocorreu em atividade de água de 0,93 e

1. Divisão de Bromatologia e Toxicologia Fundação Ezequiel Dias Belo Horizonte/M.G.

2. EMBRAPA/Centro Nacional de Milho e Sorgo Cx. Postal 151, Sete Lagoas/M.G.

que a 0,86 não houve síntese por um período de 120 dias.

O milho é um importante cereal para a nutrição humana, sendo o Estado de Minas Gerais um dos maiores produtores do Brasil. Com uma área plantada de 14 milhões de hectares e uma produção de 30 milhões de toneladas, o Brasil é o maior produtor de milho da América do Sul, sendo o responsável por aproximadamente 75% do total produzido no subcontinente em 1993⁵. Trabalhos desenvolvidos nos últimos anos^{9,10,12 e 14}, relatam ser o milho um bom substrato para o desenvolvimento de fungos e produção de aflatoxinas. Esse fato, juntamente com as condições ambientais favoráveis (temperatura e umidade) encontradas em países tropicais, como o Brasil, mostram a necessidade de um monitoramento constante e desenvolvimento de novas técnicas de cultivo, pós-colheita, armazenamento e transporte, capazes de impedir a ocorrência de fungos e a biossíntese de aflatoxinas.

O fungicida Iprodiona é utilizado na proteção de grãos e frutas, antes e pós-colheita, tendo uma ação efetiva contra espécies de *Alternaria*, *Botrytis*, *Didymella*, *Rhizoctonia* e *Sclerotinia*^{3,6}. O único trabalho descrito na literatura que relaciona o efeito de Iprodiona e a produção de aflatoxina foi desenvolvido por ARINO & BULLERMAN¹. Foi observado que esporos de *Aspergillus parasiticus* NRRL 2999, quando inoculado em caldo de extrato de levedura e sacarose, contendo Iprodiona (0 a 20 µg/ml) e incubado a 25° C por 4 a 21 dias, apresentaram menor crescimento vegetativo, sendo que não houve produção de aflatoxinas em níveis de Iprodiona de 20 µg/g.

O objetivo desse trabalho foi verificar a eficácia da Iprodiona em inibir a produção de aflatoxinas por fungos, em grãos de milho com alta umidade, em condições de clima tropical.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram cultivados, em 1994, sob irrigação, dois hectares de milho da cultivar BR 201, no Centro Nacional de Pesquisa de Milho e Sorgo, Sete Lagoas em Minas Gerais. A colheita foi realizada no período de 28/03/94 a 06/05/94, à medida que os grãos atingiam as umidades desejadas.

O tratamento foi efetuado imediatamente após a colheita, utilizando-se solução de Iprodiona (20ppm), em

veículo aquoso e oleoso. Paralelamente, uma amostragem foi obtida sem a aplicação do princípio ativo.

Posteriormente, as amostras foram acondicionadas em 72 tambores metálicos de 200 litros de capacidade. Trinta e seis (36) foram adaptados com fundo falso perfurado e dutos de aeração, promovida por dois ventiladores. Todos os tambores foram dotados de pontos de retirada de amostras e pontos para determinação da temperatura da massa de grãos.

O período de armazenamento foi estabelecido em função do exame visual de fungos nos grãos de milho. As amostras de milho com maiores teores de umidade (25,8% e 22,9%), ficaram 14 e 16 dias armazenadas, respectivamente, em atmosfera aerada e não aerada. As amostras com menores níveis de umidade (18,8%, 17,7%, 16,1% e 11,7%) ficaram 28 dias armazenadas, também em atmosfera aerada e não aerada.

Após o período de armazenamento, amostras em duplicata, foram retiradas (5kg), moídas (granulometria de 20 mesh), e acondicionadas à baixa temperatura até o momento da análise.

As aflatoxinas foram extraídas e quantificadas pela técnica descrita por SOARES & RODRIGUEZ-AMAYA¹³, sendo a confirmação efetuada pelo método de PRZYBYLSKI.⁵

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados são apresentados nas Tabelas 1 e 2. Observa-se que nas amostras controle (sem fungicida), que foram armazenadas sob aeração (temperatura 18-20 °C), os níveis de aflatoxinas foram superiores aos encontrados nas amostras tratadas com fungicida e armazenadas em aeração, indicando um efeito protetor do tratamento efetuado. No caso de acondicionamento das amostras sem aeração (temperatura 35-40 °C), verificou-se que algumas amostras que sofreram tratamento com fungicida em veículo aquoso, apresentaram níveis de aflatoxinas superiores ao do grupo controle, indicando que a temperatura e/ou a água são fatores paralelos que influenciam a produção de aflatoxinas. A heterogenicidade das amostras, bem como a distribuição das aflatoxinas nos alimentos, pode explicar os resultados encontrados. Os experimentos com Iprodiona em veículo oleoso reduziram os níveis de aflatoxinas em milho de uma maneira mais significativa do que quando foi utilizado a água como diluente.

TABELA 1
Níveis de aflatoxinas em milho em grão, com diferentes níveis de umidade, e armazenado em atmosfera aerada (Temperatura: 18-20°C)

Amostra	Iprodiona (20 ppm)	Umidade a 105°C (%)	Aflatoxina Total (µg/kg) ¹
		25,8	
P ₁	Água		274
P ₂	Água		181
P ₃	Óleo		492
P ₄	Óleo		90
P ₅	Controle		863
P ₆	Controle		501
		22,9	
P ₇	Água		500
P ₈	Água		485
P ₉	Óleo		420
P ₁₀	Óleo		568
P ₁₁	Controle		1156
P ₁₂	Controle		1201
		18,8	
P ₁₃	Água		35
P ₁₄	Água		56
P ₁₅	Óleo		30
P ₁₆	Óleo		25
P ₁₇	Controle		64
P ₁₈	Controle		54
		17,7	
P ₁₉	Água		ND
P ₂₀	Água		ND
P ₂₁	Óleo		ND
P ₂₂	Óleo		ND
P ₂₃	Controle		ND
P ₂₄	Controle		ND
		16,1	
P ₂₅	Água		ND
P ₂₆	Água		ND
P ₂₇	Óleo		ND
P ₂₈	Óleo		ND
P ₂₉	Controle		ND
P ₃₀	Controle		ND
		11,7	
P ₃₁	Água		ND
P ₃₂	Água		ND
P ₃₃	Óleo		ND
P ₃₄	Óleo		ND
P ₃₅	Controle		ND
P ₃₆	Controle		ND
I Média de duplicata	P ₁ a P ₆ : 14 dias de armazenamento		
ND: Não detectado	P ₇ a P ₁₂ : 16 dias de armazenamento		
	P ₁₃ a P ₃₆ : 28 dias de armazenamento		

TABELA 2
Níveis de aflatoxina em milho em grão, com diferentes níveis de umidade, e armazenado em atmosfera não aerada (Temperatura: 35-40°C)

Amostra	Iprodiona (20 ppm)	Umidade a 105°C (%)	Aflatoxina Total (µg/kg) ¹
		25,8	
P37	Água		2909
P38	Água		2976
P39	Óleo		1421
P40	Óleo		1587
P41	Controle		2876
P42	Controle		2726
		22,9	
P43	Água		2623
P44	Água		2292
P45	Óleo		928
P46	Óleo		1008
P47	Controle		2766
P48	Controle		2945
		18,8	
P49	Água		1002
P50	Água		1197
P51	Óleo		366
P52	Óleo		784
P53	Controle		1258
P54	Controle		1072
		17,7	
P55	Água		818
P56	Água		415
P57	Óleo		179
P58	Óleo		237
P59	Controle		866
P60	Controle		867
		16,1	
P61	Água		75
P62	Água		127
P63	Óleo		29
P64	Óleo		19
P65	Controle		47
P66	Controle		40
		11,7	
P67	Água		ND
P68	Água		ND
P69	Óleo		ND
P70	Óleo		ND
P71	Controle		ND
P72	Controle		ND

¹ Média de duplicata P37 a P42: 14 dias de armazenamento

ND: Não detectado P43 a P48: 16 dias de armazenamento

P49 a P72: 28 dias de armazenamento

Foi observado que mesmo com teores de umidade relativamente elevados (16,1% e 17,7%), somente o acondicionamento com aeração é suficiente para inibir a produção de aflatoxinas. Entretanto, para evitar a formação de aflatoxinas em amostras acondicionadas em ambiente sem aeração, há necessidade de um menor nível de umidade das amostras (11,7%). Observou-se também, em análises complementares, que nesse nível de umidade, em atmosfera aerada, não houve formação de aflatoxinas após 60 e 120 dias de armazenamento.

As amostras que sofreram o processo de aeração (temperatura 18-20 °C), apresentaram em todas as umidades testadas e nas mesmas condições, níveis de aflatoxinas inferiores às amostras não aeradas (35-40°C), indicando ser a temperatura um fator importante para a biossíntese de aflatoxinas pelo *Aspergillus flavus* e/ou *Aspergillus parasiticus*. Observou-se também, nos dois tratamentos, que os níveis de aflatoxinas foram superiores nas amostras com teores de umidade mais elevados, sugerindo que a água influencia o processo de formação de aflatoxinas.

Foi verificado que nas amostras de milho aeradas e com teor de umidade 22,9%, os níveis de aflatoxinas foram superiores aos encontrados nas amostras aeradas e com umidade de 25,8%. Uma possível explicação pode ser o tempo de armazena-

mento dessas amostras (14 dias), inferior em relação às amostras com umidade de 22,9%, que ficaram armazenadas durante 16 dias. Resultados semelhantes não foram encontrados no experimento sem aeração. Talvez o efeito temperatura tenha uma influência maior na produção de aflatoxinas que o tempo de armazenamento.

CONCLUSÃO

De uma maneira geral, a aplicação da Iprodiona, tanto na forma aquosa quanto oleosa, provocou um decréscimo nos níveis de aflatoxinas nas amostras de milho, armazenadas em ambiente aerado e não aerado. Entretanto, não houve inibição da biossíntese de aflatoxinas. Nos próximos ensaios, alterações nas condições experimentais deverão ser efetuadas (concentração do princípio ativo na formulação, temperatura de armazenamento) com o objetivo de tentar reduzir a contaminação de milho com aflatoxina.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à Rhodia Agro Ltda., pelo apoio financeiro.

RIALA6/788

PRADO, Guilherme et alii Incidence of aflatoxins in corn (*Zea mays L.*) with different levels of moisture, after treatment with fungicide, at atmosphere with and without ventilation, *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 55(2):79-84, 1995.

ABSTRACT: It was verified the production of aflatoxins in corn samples, cultivar BR 201, grown in 1994, at Centro Nacional de Milho e Sorgo, in Sete Lagoas, Minas Gerais. Duplicate samples, showing different levels of moisture, were treated with Iprodione aqueous and oily solution (20 ppm), and were stored in metal containers, with and without ventilation, at temperatures ranging from 18 to 20 °C and from 35 to 40 °C, respectively. The found results showed a reduction of the aflatoxins levels in samples treated with Iprodione and stored at a ventilated atmosphere. When the samples were stored without ventilation (temperature between 35 and 40 °C), the decrease of the aflatoxins levels was not significant, mainly when the moisture values were high, showing that temperature and moisture were important factors in aflatoxins biosynthesis.

DESCRIPTORS: corn, aflatoxins, iprodione, control.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ARINO, A.A. & BULLERMAN L. B. Growth and aflatoxin production by *Aspergillus parasiticus* NRRL 2999 as affected by the fungicide Iprodione. *J. Food Prot.*, 56: 718-721, 1993.
2. DIENER, U.L. & DAVIS, N.D. Limiting temperature and relative humidity for growth and production of aflatoxin and free fatty acids by *Aspergillus flavus* in sterile peanuts. *J. Amer. Oil Chem. Soc.*, 44:259-263, 1967.
3. FRANK, R.; BRAUN, H.E.; RIPLEY, B.D. Residues of insecticides, and fungicides in fruit produced in Ontario, Canada, 1986-1988. *Food Add. Contam.* 7: 637-648, 1990.
4. MONTANI, M.L. & VAAMOND, G. Water activity influence on aflatoxin accumulation in corn. *Intern. J. Food Microb.*, 6:349-353, 1988.
5. NICÁCIO, MAURÍCIO AGUIMAR DE SOUZA. Determinação de aflatoxinas e identificação da microbiota fúngica em milho (*Zea mays L.*) pós-colheita. Belo Horizonte: Universidade Federal de Minas Gerais, 1995. 72p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia). Curso de Pós-Graduação em Microbiologia, Instituto de Ciências Biológicas, 1995.
6. OSORIO, J. M.; ADASKAVEG, J.E.; OGAWA, J.M. Comparative efficacy and systemic activity of Iprodione and the experimental anilide E-0858 for control of brown rot on peach fruit. *Plant-Disease*, 77:1140-1143, 1993.
7. PRADO, G.; MARTINS VIEIRA, M.B.C.; NICÁCIO, M.A.S.; GLÓRIA, M.B.A. Efeito da umidade relativa na contaminação microbiana e produção de aflatoxinas em amendoim em grão. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*. 11:264-273, 1991.
8. PRZYBYLSKI, W. Formation of aflatoxin derivatives on thin layer chromatographic plates. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 58: 163-164, 1975.
9. SABINO, M.; PRADO, G.; COLEN, G. Ocorrência de aflatoxinas, ocratoxina A e zearalenona em milho de Minas Gerais. Parte I. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 46:65-71, 1986.
10. SABINO, M.; PRADO, G.; INOMATA, F.I.; PEDROSO, M.O. & GARCIA, R.V. Natural occurrence of aflatoxins and zearalenone in maize in Brasil. Part II. *Food Add. Contam.*, 6:327-331, 1989.
11. SCHINDLER, A.F.; PALMER, J.G.; EISENBERG, W.V. Aflatoxin production by *Aspergillus flavus* as related to various temperatures. *Appl. Microb.*, 15: 1006-1009, 1967.
12. SHOTWELL, O.L. & HESSELTINE, C.W. Five-years study of mycotoxins in Virginia wheat and dent corn. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 6:1466-1469, 1983.
13. SOARES, L.M.V & RODRIGUES-AMAYA, D.B. Survey of aflatoxins, ochratoxin A, zearalenone and sterigmatocystin in brazilian foods by using multi-toxin thin-layer chromatographic methods. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 73: 22:26, 1989.
14. STOLOFF, L.; HENRY, S.; FRANCIS, O.J. - Survey for aflatoxins and zearalenone in 1973 crop corn stored on farms and in country elevators. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 59: 119: 121, 1976.
15. WHO - Environmental Health Criteria 11: *Mycotoxins*. Geneve, World Health Organization, 1979, 127p.

Recebido para publicação em 28/03/95

CONTAMINAÇÃO DE AMENDOIM E SEUS PRODUTOS COMERCIALIZADOS NA REGIÃO DE CAMPINAS - SP., POR AFLATOXINAS DURANTE O ANO DE 1994.

Berenice Mandel BRIGIDO**
Maria Irene C. BADOLATO**
Valéria P. Silva FREITAS**

RIALA6/789

BRIGIDO, B.M.; BADOLATO, M.I.C. & FREITAS, V.P.S. - Contaminação de amendoim e seus produtos comercializados na região de Campinas-SP, por aflatoxinas durante o ano de 1994. *Rev. Inst. Adolfo Lutz* 55(2):85-90, 1995.

RESUMO: Foram analisadas 66 amostras de diferentes procedências, sendo 36 de amendoim e 30 de produtos de amendoim da região de Campinas, Estado de São Paulo, no ano de 1994, para determinação de aflatoxinas B₁, B₂, G₁, G₂ por cromatografia em camada delgada. Em 51% das amostras não foram detectadas estas aflatoxinas; 2% destas apresentaram teores de aflatoxinas B₁+G₁ menor ou igual a 30 µg/Kg e 47% continham teores acima do limite tolerado pela legislação brasileira (30 µg/Kg); numa faixa de contaminação de 28 a 997 µg/Kg para aflatoxina B1 e 14 a 149 µg/Kg para aflatoxina G₁.

DESCRITORES: aflatoxinas, amendoim, produtos de amendoim, determinação de aflatoxinas.

INTRODUÇÃO

Aflatoxinas são produtos secundários de metabolismo de cepas de *Aspergillus flavus* e de *Aspergillus parasiticus* que freqüentemente afetam sementes oleaginosas durante a colheita, armazenamento e industrialização, contaminando os alimentos^{22,29}. Fatores como integridade física do cereal, temperatura ambiental superior a 20°C e umidade relativa do ar entre 80 e 90%, influenciam a produção de aflatoxinas, sendo que estes últimos são característicos de clima tropical, como o Brasil^{11,14,16,22,27}.

As aflatoxinas são derivados da difurano cumarina. Quatro tipos de aflatoxinas são mais comumente isolados: B₁, B₂, G₁, G₂^{18,22,29}. Aflatoxina B₁ (AFB₁) é carcinogênica, teratogênica e mutagênica^{4,6,8,22} e por causa destas propriedades é considerada de grande importância em saúde pública e animal.

A legislação brasileira fixou uma tolerância de 30 µg/Kg para as aflatoxinas calculadas pela soma dos conteúdos das aflatoxinas B₁ e G₁³ e em estudos rea-

lizados tem sido constatado um grande número de amostras com presença de altos níveis de contaminação por aflatoxinas em alimentos destinados ao consumo humano^{2,4,5,9,10,12,13,17,18,19,20,24,25}.

Atentos a todas essas considerações, temos como objetivo avaliar a contaminação por aflatoxinas em amostras de amendoim e seus produtos comercializados na região de Campinas até 1997. Avaliação esta que está no programa de parceria com o Centro de Vigilância Sanitária da Secretaria de Estado da Saúde^{4,5,13}.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram analisadas amostras de diferentes procedências, sendo 36 de amendoim e 30 de produtos de amendoim, dando um total de 66 amostras, para determinar aflatoxinas B₁, B₂, G₁, G₂.

As amostras foram colhidas pelas equipes de Vigilância Sanitária de ERSAS e prefeituras da região de Campinas, durante o ano de 1994.

* Realizado na Seção de Bromatologia e Química do Instituto Adolfo Lutz - Laboratório I de Campinas.

** Do Instituto Adolfo Lutz - Laboratório I de Campinas.

Amostras pesando aproximadamente 1Kg foram trituradas, homogeneizadas e retirada uma sub-amostra de 50g para análise.

Foi utilizado o Método de Soares & Rodriguez-Amaya²⁶ que consiste de extração, partição líquido-líquido, detecção e quantificação. A separação foi feita por Cromatografia em Camada Delgada e a quantificação por comparação visual com o padrão sob luz ultravioleta.

As concentrações e a pureza do padrão das aflatoxinas B₁ e G₁ foram determinadas conforme a técnica descrita pela Association of Official Analytical Chemists (A.O.A.C.)²³.

A confirmação da identidade das aflatoxinas foi feita utilizando derivação química específica e observação da alteração nas propriedades cromatográficas.

RESULTADOS

A tabela abaixo demonstra os níveis de aflatoxinas (B₁ e G₁) em amendoim e seus produtos na região de Campinas no ano de 1994.

O gráfico 1 representa a distribuição das aflatoxinas B₁, B₂, G₁ e G₂ em amendoim e seus produtos no mesmo período.

Já o gráfico 2, mostra a variação em concentração dos níveis de aflatoxinas (B₁+G₁) relacionada com o número de amostras de amendoim e de produtos de amendoim.

TABELA 1
Níveis de aflatoxinas (B₁ + G₁) em amendoim e seus produtos na região de Campinas no ano de 1994.

Tipos de amostras	Nº de amostras	Nº de amostras		Nº de amostras		Média da conc. das amostras positivas µg/Kg	90º percentil µg/Kg	Nível de variação					
		N.D. *		<30 µg/Kg **				> 30 µg/Kg **		conc. B1 µg/Kg		conc. G1 µg/Kg	
		nº	%	nº	%	nº	%	min.	máx.	min.	máx.		
Amendoim	36	16	44	-	-	20	56	159	389	28	997	14	149
Produtos de amendoim	30	18	60	1	3	11	37	101	299	30	622	14	149
TOTAL	66	34	51	1	2	31	47	133	389				

* N.D. - não determinado (limite de detecção: 2,5 µg/Kg)

** 30 µg/Kg - limite máximo tolerado na legislação brasileira (B₁ + G₁)

GRÁFICO 1

Distribuição qualitativa das aflatoxinas B₁, B₂, G₁, G₂ em amostras de amendoim e seus produtos

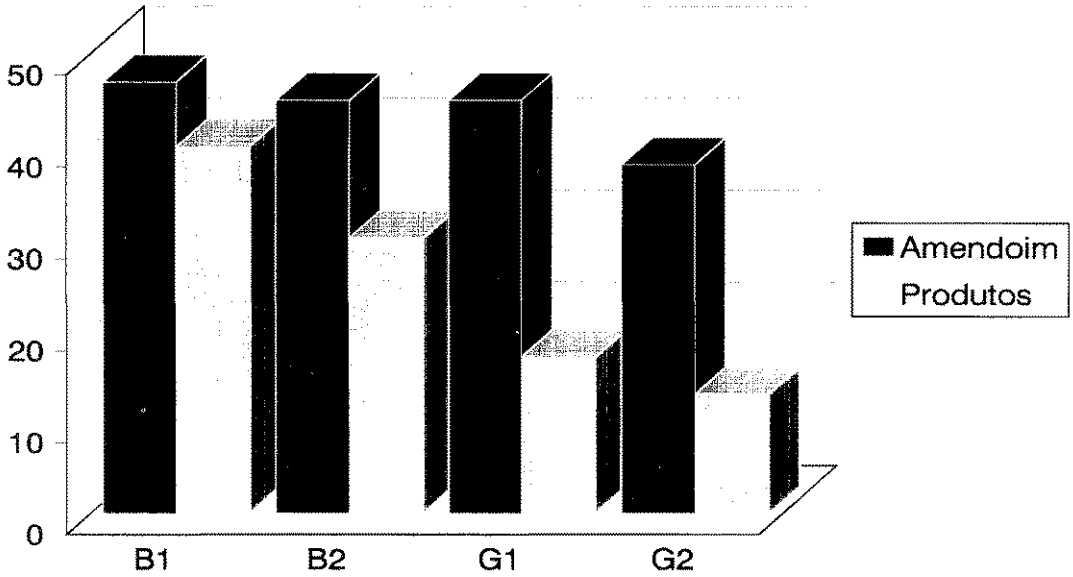
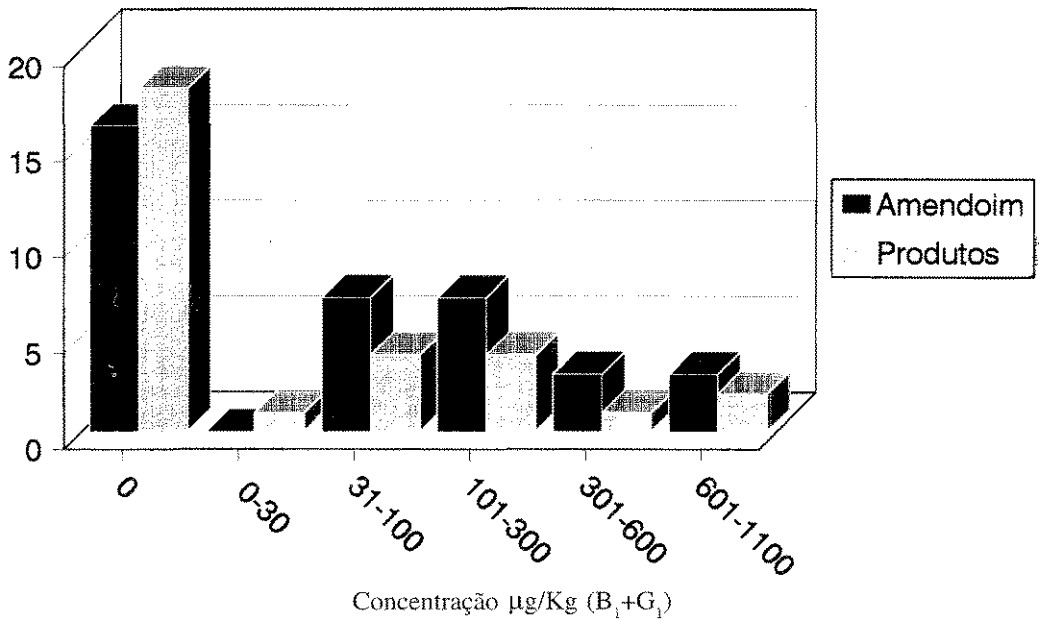


GRÁFICO 2

Varição dos níveis de aflatoxinas B₁ + G₁, µg/Kg em amostras de amendoim e de produtos de amendoim



DISCUSSÃO E CONCLUSÃO

Pelos resultados apresentados na tabela verifica-se que grande porcentagem de amostras de amendoim (56%) e seus produtos (37%) comercializados continuam apresentando contaminação por aflatoxinas, com teores acima do limite tolerado, estipulado pela legislação brasileira³. Freitas e Badolato³, em 1988, analisaram 316 amostras de paçoca de amendoim consumidas na cidade de Campinas e encontraram 51,58% com teores acima de 20µg/Kg. Prado et alii¹³, no período de 1983 a 1988, analisaram 400 amostras de amendoim cru consumidas em Belo Horizonte, encontrando 61,5% de amostras positivas contaminadas numa faixa de 4 a 1032 µg/Kg de aflatoxina B₁. Fonseca et alii⁴ durante os anos de 1988 e 1989, analisaram 625 amostras de amendoim descascado procedentes de diferentes regiões do Estado de São Paulo e observaram que 52% das amostras de 1988 e 32% de 1989 estavam contaminadas.

Analisando os nossos resultados podemos observar que os teores de AFB₁ variaram de 28 a 997 µg/Kg e de AFG₁ de 14 a 149µg/Kg, com 90% de 389 µg/Kg para amendoim e 299 µg/Kg para produtos de amendoim. Tais resultados são expressivos, pois esses valores estão em discordância com a legislação brasileira em vigor.

Pelo gráfico I nota-se claramente quantidade significativa de amostras também contaminadas pelas

aflatoxinas B₂ e G₂, indicando necessidade de estabelecimento de limites de tolerância para estas aflatoxinas, sendo inclusive uma preocupação discutida no Mercosul, resultando a inclusão das aflatoxinas B₂ e G₂ no regulamento que estabelece os limites máximos para aflatoxinas nesse tratado¹⁵.

É importante que exista um contínuo e sistemático monitoramento de aflatoxinas em alimentos, envolvendo evidentemente as precauções necessárias com o processo amostral, já que as aflatoxinas de um lote de amendoim podem estar concentradas em até 0,5% dos grãos e que alguns grãos podem estar contaminados com teores de até um milhão de ppb (µg/Kg)^{24,29}. Só assim, as autoridades governamentais terão subsídio para adequar a legislação e concentrar esforços na prevenção e controle dos produtos susceptíveis a esse tipo de contaminação.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos à Dra. Myrna Sabino pela valiosa colaboração prestada na revisão deste trabalho.

A Daniel Tortorelli, agente de Apoio à Pesquisa Científica e Tecnológica da Seção de Bromatologia e Química do Laboratório I de Campinas, pela colaboração técnica do presente trabalho.

RIALAG/789

BRIGIDO, B.M.; BADOLATO, M.I.C. & FREITAS, V.P.S. - Survey of aflatoxins in peanuts and its products commercialized in city of Campinas, SP., during the year of 1994. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 55(2):85-90, 1995.

ABSTRACT: Peanuts (36 samples) and its products (30 samples) commercialized in the area of Campinas, State of São Paulo, were analysed for aflatoxins B₁, B₂, G₁, G₂, utilizing a thin layer chromatographic method. Aflatoxins were not detected in 51% of the samples. Levels below or equal to the brazilian regulation (30µg/Kg B₁+G₁) were found in 2% of the samples, however, 47% of the samples were found to exceed the regulatory limit and ranges of 28 to 997 µg/Kg for aflatoxin B₁ and 14 a 149 µg/Kg for aflatoxin G₁ were found.

DESCRIPTORS: aflatoxins, peanuts, peanuts goods, aflatoxin determination.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS - *Official methods of analysis of the Association of official Analytical Chemists*, 15 th edition, Arlington, Virginia, A. O. A. C., 1990, p. 1197 (Tecn. 975. 37).
2. BALDISSERA, M.A.; SANTURIO, J.M.; CANTO, S.H.; PRANKE, P.H.; ALMEIDA, C.A.A. & SCHMIDT, C. - Aflatoxinas, ocratoxinas A e zearalenona em alimentos para consumo animal no sul do Brasil - parte II. *Rev. Adolfo Lutz*, 53 (1/2): 5-10, 1993.
3. BRASIL. Leis, decretos, etc. - Resolução nº 34/76 da Comissão Nacional de Normas e Padrões para Alimentos. *Diário Oficial*, Brasília, 19 jan. 1977. Sec. I pt. I, p. 710. Fixa padrões de tolerância para as aflatoxinas em alimentos.
4. FONSECA, H.; VALARINI, I.; DOMINGUES, M.A.C.; WETTSTEIN, A.S. R. & SILVA, A.E.G. - Ocorrência de aflatoxina em amendoim, no Estado de São Paulo, durante os anos de 1988 e 1989. *Anais Esalq* 48:301-6, 1991.
5. FREITAS, V.P.S. & BADOLATO, M.I.C. - Incidência de aflatoxinas em paçocas de amendoim consumidas na cidade de Campinas, Estado de São Paulo. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 52 (1/2): 83-7, 1992.
6. IARC - *Environmental Carcinogens Selected Methods of Analysis. Some Mycotoxins*. Lyon, IARC, V. 5. p. 3-14.
7. IARC - *IARC monographs on the evaluation of the carcinogenic risk of chemicals to man*. Lyon, IARC, 1976, v. 10. p. 51-2.
8. IARC - Working group on the evaluation of the carcinogenic risk of chemicals to man. Geneva, 1971. *Evaluation of the carcinogenic risk of chemicals to man*. Lyon, IARC, 1972. v. 1, p. 145-56.
9. MIRANDA, M.S.; CARVALHO, R.; CORRAL, F.; OLIVEIRA, M.Z. & BATISTA, A. R. P. L. - Pesquisa de aflatoxina em amendoim comercializado em Salvador, Bahia. *Livro de Resumos*, V. Encontro de Micotoxinas, São Paulo, SP, p. 22 1988.
10. OLIVEIRA, V.; MESQUITA, A.J.; SERAFINI, A.B.; RIBEIRO, J.L. & SILVA M.R.R. - Ocorrência de aflatoxinas B1 e G1 em amendoim comercializado em Goiânia-Go. *Rev. Microbiol.*, 22:319-22, 1991.
11. ORGANIZACION MUNDIAL DE LA SALUD. *Critérios de salud ambiental 11: Micotoxinas* - 1983, 131 p.
12. PRADO, G. - Incidência de AFB₁ em alimentos. *Rev. Farm. Bioquím.* 5: 147-57, 1989.
13. PRADO, G.; MATTOS, S.V. de M. & PEREIRA E.C. - Níveis de aflatoxinas em alguns alimentos consumidos em Belo Horizonte no período de 1983 a 1988. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 9(2) : 138-47, 1989.
14. PRADO, G.; VIEIRA M.B.C.M.; NICÁCIO, M.A.S. & GLÓRIA, M.B.A. - Efeito da umidade relativa na contaminação microbiana e produção de aflatoxinas em amendoim em grão. *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, 11(2): 264-73, 1991.
15. *Regulamento Técnico sobre Limites Máximos de Aflatoxinas MERCOSUL/GMC/Res nº 56/94*.
16. RIBEIRO NETO, L.V. - Aflatoxinas e Câncer Hepático, *Ciência e Cultura*, 33(8): 1051-3, 1980.
17. SABINO, M - National monitoring and control program on mycotoxins in Brasil. In *Proceedings of the International Workshop on Aflatoxin Contamination of Groundnut*. International Crop Research Institute for the Semi-Arid Tropics (ICRISAT), 6-9 october, 1987, Hyderabad, Índia.
18. SABINO, M.; INOMATA, E. I. & LAMARDO, L.C.A. - Variação dos níveis de aflatoxina B₁ em pasta de amendoim e paçoca consumidas no Estado de São Paulo. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 42(1/2): 39-44, 1982.
19. SABINO, M.; PRADO, G.; INOMATA, E.I.; PEDROSO, M.O. & GARCIA, R.V. - Natural occurrence of aflatoxins and zearalenona in maize in Brasil. Part II. *Food Additives and Contaminants*, 6:327-31, 1989.
20. SABINO, M.; ZORZETTO, M.A.P.; PEDROSO, M. O. & MILANEZ, T.V. - Incidência de aflatoxinas em amendoim e produtos derivados consumidos na Cidade de São Paulo, no período de 1980 a 1987. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 49:41-4, 1989.
21. SÃO PAULO - Comunicado CVS-19 de 23-2-94. *Diário Oficial*, São Paulo, 24 fev. 1994, sec I, 104 (36, p. 19). Comunica às Vigilâncias Sanitárias dos Escritórios Regionais de Saúde que deverá realizar as colheitas de amostras dos produtos relacionados conforme o programa para 1994.

22. SÃO PAULO. Instituto Adolfo Lutz - Micotoxinas (datilografado), 1993, p. 1-26.
23. SCOTT, P.M. - Natural poisons. In: ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS - *Official methods of analysis of the Association of Analytical Chemists*, Arlington, Virginia, A.O.A.C.; 1990, 970. 44, 971. 22, P. 118587
24. SCUSSEL, V.M.; RODRIGUEZ-AMAYA, D.B. - Teores de aflatoxinas em amendoim e seus produtos comercializados em Campinas, em 1980-1982. *Bol. SBCTA*, 19:109-19,1985.
25. SCUSSEL, V.M.; RODRIGUEZ-AMAYA, D.B. & DA SILVA, W.J. - Incidência de aflatoxinas em milho (*Zea mays L.*) e seus produtos derivados comercializados na região de Campinas, Estado de São Paulo. *Ciênc. Tecnol. Aliment.* 6: 75-85, 1980.
26. SOARES, L.M.V. & RODRIGUEZ-AMAYA, D.B. - Determinação de aflatoxinas em amendoim. *J. Assoc. Anal. Chem.*, 72: 22-6, 1989.
27. SYLOS, C.M. & AMAYA-FARFAN, J. - Aflatoxin destruction during heat precessing of contaminated peanuts. A reavalution. *Bol. SBCTA*, 26(2): 89-96, jul/dez 1992.
28. WHITAKER, T.B. - Sampling granular foodstuffs for aflatoxin - *Pure and Appl. Chem.*, 49: 1709-77,1977.
29. WORLD HEALTH ORGANIZATION - *Mycotoxins*, Geneve, WHO, 127 p. (Environmental Health Criteria, 11).

Recebido para publicação em 03/04/95