

ANÁLISE MICROSCÓPICA EM AMOSTRAS DE DOCES COMERCIALIZADOS NO ESTADO DO RIO DE JANEIRO

Microscopical analysis in candy samples sold in the state of Rio de Janeiro

Carlos A. Marques*; Xênia P. R. Nascimento; Ludmilla B. de França; Ana Caroline de L. Freitas;
Leonardo Silvestre G. Rocha; Ivanilton A. Nery.

Laboratório de Microscopia. Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio de Janeiro, *campus* Nilópolis (IFRJ). Rua Lúcio Tavares, 1045, Nova Cidade, Nilópolis, RJ. CEP: 26.530-060

*Autor para correspondência: carlos.alexandre@ifrj.edu.br

RESUMO

No presente trabalho foram analisadas amostras de doces de abóbora (*Cucurbita pepo* L. - Cucurbitaceae) e de amendoim (*Arachis hypogaea* L. - Fabaceae), comercializados nos municípios de Nilópolis, Nova Iguaçu e do Rio de Janeiro, RJ. Foram feitas a caracterização de matérias-primas, bem como a análise de sujidades. A análise microscópica revelou a presença de adulteração da matéria-prima no doce de abóbora. Nos doces de amendoim foram encontrados fragmentos de insetos vetores, um fragmento metálico, fungos produtores de aflatoxinas (*Aspergillus* sp.), além da adição de amido.

Palavras-chave: Microscopia de alimentos; *Cucurbita pepo*; *Ipomoea batatas*; *Arachis hypogaea*.

ABSTRACT

In this paper, was analysed samples of pumpkin (*Cucurbita pepo* L. - Cucurbitaceae) and peanuts candies (*Arachis hypogaea* L. - Fabaceae), sold in Nilópolis, Nova Iguaçu and Rio de Janeiro cities. The characterization of feedstocks, and the filths analysis was made. The microscopical analysis showed the presence of adulteration of the feedstock in the pumpkin candy. In peanuts candies, insects fragments found, one metallic fragment, and molds that produces aflatoxins was found, besides of the addition of starch.

Keywords: Food microscopy; *Cucurbita pepo*; *Ipomoea batatas*; *Arachis hypogaea*.

INTRODUÇÃO

A microscopia de alimentos resulta da combinação de diversos métodos analíticos que permitem avaliar produtos alimentícios de origem vegetal e animal, bem como seus derivados, a fim de caracterizar a presença de matérias-primas, suas possíveis adulterações, além da presença de sujidades diversas que podem contaminar os alimentos (OLIVEIRA & AKISUE, 2005). Existem leis e resoluções específicas sobre o assunto, como a RDC no 14 de 28 de Março de 2014 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), contudo, ainda é pequeno o número de grupos de pesquisas e, conseqüentemente, de projetos desenvolvidos nessa área, no Brasil. Trabalhos envolvendo análises de doces são ainda mais escassos, resumindo-se aos publicados por FRANZOLIN *et al.* (1994) e RODRIGUES *et al.* (1998) que tratavam da identificação de matérias estranhas e de ácaros em doces de amendoim, além de CORREIA e RONCADA (2002), visando a detecção de sujidades e filamentos micelianos nos doces em pasta obtidos na cidade de São Paulo. Desta forma, o presente trabalho objetivou adaptar e comparar métodos analíticos distintos, avaliando o desempenho dos mesmos para detecção e isolamento de contaminantes e/ou sujidades, além de realizar a caracterização histológica de matérias-primas, por meio de caracteres diagnósticos, visando estabelecer parâmetros que contribuam para avaliação da qualidade dos diferentes tipos de doces de abóbora e de amendoim, adquiridos nos municípios de Nilópolis, Nova Iguaçu e do Rio de Janeiro, RJ.

MATERIAL E MÉTODOS

Para realização do presente trabalho, foram adquiridas amostras de doce de abóbora, de amendoim (na forma de pequenas barras, de formato variável), além de paçocas, obtidas no comércio formal dos municípios de Nilópolis, Nova Iguaçu e do Rio de Janeiro. Para fins de comparação, utilizaram-se amostras do mesocarpo de abóbora (*Cucurbita pepo* L. - Cucurbitaceae) e de sementes de amendoim (*Arachis hypogaea* L.- Fabaceae), obtidas no mercado local. Todas as amostras foram analisadas em triplicata. Foram executados diferentes métodos, adaptados aos diferentes objetivos e aos diferentes materiais, conforme descritos à seguir: Inicialmente, todas as amostras foram pesadas em balança analítica. Suas embalagens foram observadas ao microscópio estereoscópico para verificar a eventual presença de furos ou rasgos.

Para análise do doce de abóbora, pesaram-se 50g de doce (peso equivalente a duas unidades, em média), seccionados em fragmentos de aproximadamente 1 cm². Em seguida adicionaram-se, à cada material, 100 mL de água destilada em um béquer e aqueceu-se o sistema à 50°C, sob agitação constante, até a completa dissolução. Uma alíquota de 3mL foi retirada com pipeta pasteur e seu conteúdo foi colocado entre lâmina e lamínula para observação ao microscópio fotônico. Foram feitos testes com Floroglucina, para detecção de lignina e com Lugol, para detecção de amido, (KRAUS e ARDUIN, 1997). Os materiais botânicos usados como padrões de comparação foram tratados de maneira distinta. Foram montadas lâminas, com secções transversais à fresco do mesocarpo, usando-se glicerina 50% como meio de montagem, além de outras lâminas com material previamente cozido em água fervente, até o amolecimento de toda a estrutura, a fim de visualizar eventuais deformações na anatomia provocadas pelo cozimento. Da mesma forma, foram feitos os testes para detecção de amido e lignina.

Para detecção de matérias estranhas, o material dissolvido em água aquecida foi filtrado à vácuo. O conteúdo retido no papel de filtro foi analisado ao microscópio estereoscópico nos aumentos de 20 e 40X, triando-se os fragmentos, visualmente estranhos às amostras, com auxílio de pinça de ponta fina. O material removido foi colocado entre lâmina e lamínula, usando-se glicerina 50% como meio de montagem, sendo analisado ao microscópio fotônico com câmera fotográfica digital acoplada. As descrições presentes em MENEZES-JÚNIOR (1949) auxiliaram na comparação e identificação dos caracteres diagnósticos das matérias-primas vegetais que compunham os doces.

Em seguida analisaram-se quatro marcas distintas de paçocas (PC 1, 2, 3 e 4) e outras duas de doces de amendoim (DA 1 e 2), adquiridos em estabelecimentos comerciais nos municípios de Nova Iguaçu e do Rio de Janeiro, RJ, onde testaram-se dois métodos para isolamento de sujidades: no primeiro, descrito em RODRIGUES *et al.* (1999), usaram-se uma solução aquosa de lauril sulfato de sódio 2% e o segundo, baseado na modificação de um método da AOAC (BOESE e CICHOWICZ, 1995) para isolamento de sujidades por flutuação em solução de heptano. As análises foram feitas em triplicata e os resultados obtidos foram comparados, avaliando-se o mais eficiente no isolamento das sujidades. Os doces também foram submetidos à análise de integridade das embalagens, ao microscópio estereoscópico, nos aumentos de 20 e 40X.

No primeiro método de análise, pesaram-se 50g de amostras (paçocas e doces de amendoim) de cada marca. Em seguida, o material foi submetido à secagem em estufa por 2-3 horas, com temperatura de aproximadamente 60°C sendo, posteriormente, misturadas em um béquer à uma solução detergente de lauril sulfato de sódio 2% em água destilada. A solução contendo as amostras foi homogeneizada em agitador magnético por 2-3 horas. Ao final deste processo, foi colocada em um funil de separação de 1000 mL. As duas fases formadas (aquosa e espuma) foram filtradas, separadamente, à vácuo. Posteriormente, o material contido na espuma e retido na filtração foi triado, com auxílio de uma pinça, ao microscópio estereoscópico.

Foram, em seguida, colocados entre lâmina e lamínula, usando-se glicerina 50% como meio de montagem sendo, na etapa subsequente, observados e registrados ao microscópio fotônico com câmera digital acoplada.

No segundo método, analisaram-se, separadamente, 100g de cada marca de doce. Cada amostra foi solubilizada em um béquer contendo 25 mL de heptano. Completou-se o volume de 1000mL com água destilada, em placa aquecedora, com agitador magnético, na temperatura entre 45-50° C. Neste caso, as amostras foram agitadas por um minuto à cada 5 minutos, até que se completassem 20 minutos. Posteriormente, transferiu-se a mistura obtida para um funil de separação sendo, em seguida, filtrada à vácuo. O material retido na filtração foi observado, ao microscópio estereoscópico, para triagem de possíveis sujidades sendo, em seguida, analisado ao microscópio fotônico binocular, após montagem entre lâmina e lamínula, usando-se glicerina 50% como meio de montagem. O ímã usado na agitação magnética foi analisado ao microscópio estereoscópico, no aumento de 40X, visando a identificação dos fragmentos metálicos aderidos. Nesses doces, foram feitos testes para verificar a presença de amido, com Lugol, e de lipídios, usando-se Sudan III, preparados segundo KRAUS e ARDUIN (1997), independente dos métodos de isolamento testados.

Para avaliação microbiológica, foi feita análise de bolores e leveduras, onde uma amostra de cada material analisado foi inoculada em uma placa de Petri contendo meio de cultura seletivo para fungos (Sabouraud), segundo método da ICMSF (2002). Essas análises também foram realizadas em triplicata.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nas amostras de doces de abóbora não foram encontradas sujidades. Observaram-se células parenquimáticas típicas do mesocarpo, de formato poliédrico ou arredondado, onde se observam a coloração alaranjada típica dos pigmentos carotenoides presentes nos cromoplastos dessas células (Figura 1) e alguns grãos de amido discretos. É possível, ainda, identificar elementos de protoxilema anelados ou espiralados, típicos dessa espécie (Figura 2). Em *Cucurbita pepo*, os grãos de amido são isolados, arredondados, truncados ou quase poliédricos. São variados na forma (Figura 3). Não há hilo ou lamelas aparentes. Quando o mesocarpo é cozido, esses grãos diminuem gradativamente de tamanho até dissolverem-se por hidrólise. Contudo, foram encontradas células parenquimáticas contendo grãos de amido bem distintos. Tal fato fica melhor evidenciado comparando-se a forma dos grãos de amido nas duas espécies. Além disso, em meio às células parenquimáticas, encontraram-se elementos de metaxilema pontoados, evidenciados, inclusive, pelo teste com floroglucina (Figura 5), bem diferentes dos encontrados no doce de abóbora. Tanto os grãos de amido diferenciados, quanto os elementos de vaso pontoados, conferem com a descrição de MENEZES-JÚNIOR (1949) para o tubérculo da batata-doce (*Ipomoea batatas* (L.) Lam – Convolvulaceae).

Em *Ipomoea batatas*, o grão de amido tem hilo bem evidente, em geral, excêntrico, frequentemente estrelado ou pontoado. As lamelas, apesar de discretas, são visíveis. São irregulares, truncados em uma ou mais faces, quando tendem ao formato arredondado, ou poliédricos (Figuras 4 e 6). O efeito sob luz polarizada, segundo OLIVEIRA & AKISUE (2005), é bem visível. Na análise em triplicata, a adulteração da matéria-prima foi encontrada duas vezes. No período entre 1984 e 1988, ZAMBONI *et al.* (1989) identificaram fraudes e materiais estranhos em doces em pasta no estado de São Paulo e identificaram a mistura de batata-doce em 7 das 74 amostras de doces de abóbora em pasta analisados. Duas décadas depois, as mesmas adulterações foram encontradas no estado do Rio de Janeiro. Cabe ressaltar que, desde 1977, através da Lei no 6.437 de 20 de Agosto (BRASIL, 1977), o governo brasileiro considera infração sanitária “fraudar, falsificar ou adulterar alimentos, inclusive bebidas, medicamentos, drogas, insumos farmacêuticos, correlatos, cosméticos, produtos de higiene, dietéticos, saneantes ou quaisquer outros que interessem à saúde

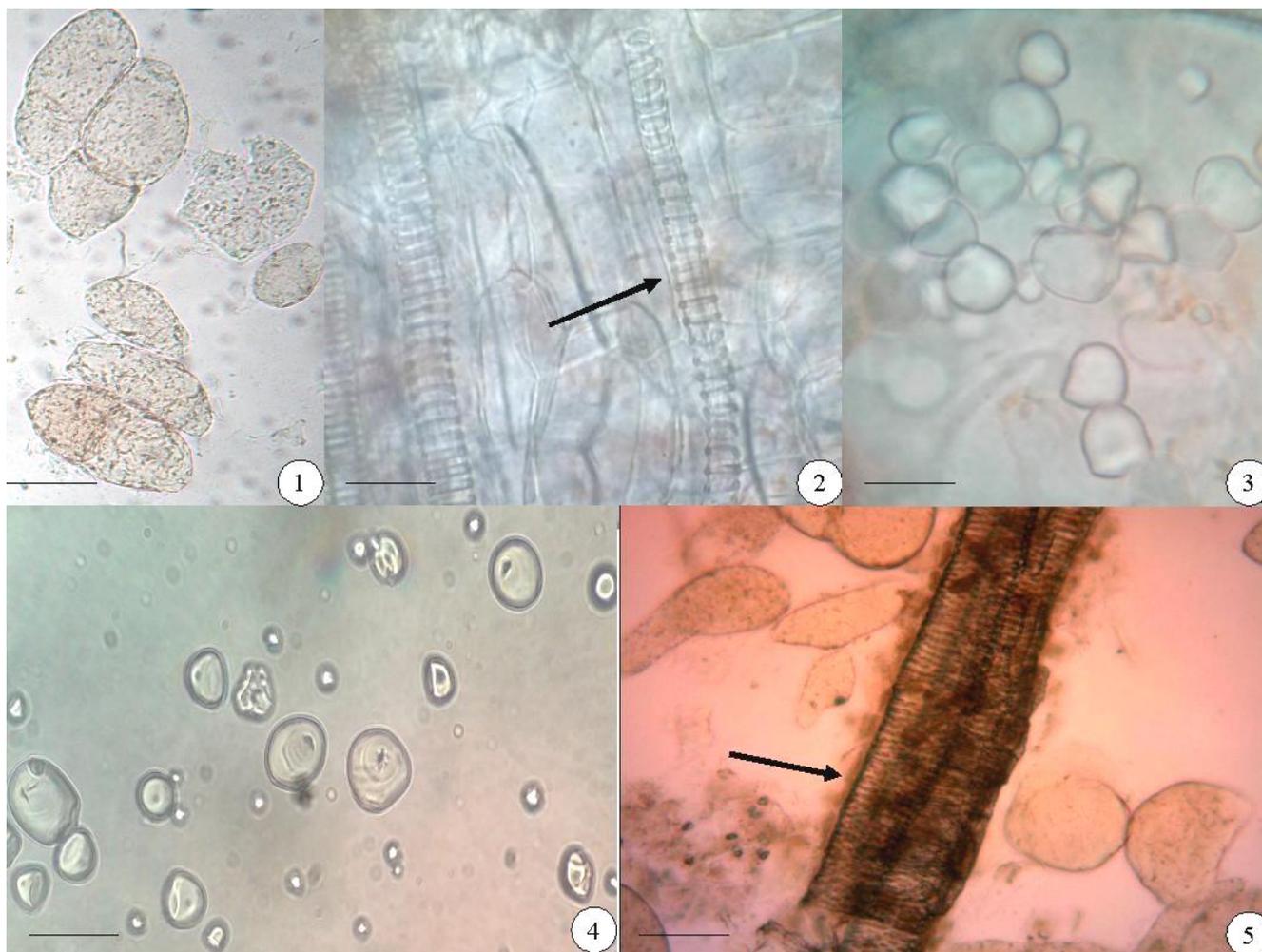
pública”, sob pena de advertência, apreensão, inutilização e/ou interdição do produto, suspensão de venda ou fabricação do produto, cancelamento do registro do produto, interdição parcial ou total do estabelecimento, cancelamento da autorização para funcionamento da empresa, cancelamento do alvará de licenciamento do estabelecimento, proibição de propaganda e/ou multa (Redação dada pela medida provisória no 2.190-34 de 2001).

Na análise microscópica dos doces de amendoim foi observado que, em duas das marcas de paçoca, obteve-se resultado positivo para presença de amido, evidenciado pelo teste com Lugol (Figura 7) e cuja morfologia do grão sugere a adição de farinha de trigo, não descrito como ingrediente na embalagem. As características do amido de trigo foram obtidas em MENEZES-JÚNIOR (1949). Foram encontrados insetos inteiros, ou seus fragmentos, em três das quatro marcas de paçocas (PC 1, 2 e 3), (Figuras 8-16). Nessas amostras, o número de sujidades encontradas variou entre 50 e 100. Já em PC 4 e nas duas marcas de doces de amendoim analisadas (DC 1 e 2), o quantitativo de sujidades variou entre 20 e 50, considerando-se como sujidades os fragmentos metálicos (Figura 12), grãos de areia, além dos fragmentos de insetos ou insetos inteiros encontrados. Em meio aos fragmentos genéricos de exoesqueletos (Figura 10), destacaram-se a presença de ninfas inteiras e pernas de Blattaria (baratas) (Figuras 11 e 13), uma ooteca (Figura 9), genitálias (Figura 8), além de fragmentos de Hymenoptera (formigas) (Figuras 14-16). A RDC número 14, de 28 de março de 2014 da ANVISA (BRASIL, 2014) estabelece, como limite de tolerância, 1,5% de areia nos alimentos em geral. Logo, não se pode afirmar que a presença desses grãos de areia faça com que o material analisado esteja fora dos limites estabelecidos. Contudo, a mesma resolução também determina que são toleradas, dentro dos limites estabelecidos, sujidades inevitáveis dos alimentos descritos nos anexos da própria resolução, bem como os alimentos produzidos a partir de ingredientes com limites estabelecidos na mesma. Esta RDC estabelece limites de tolerância para sujidades encontradas nos produtos à base de tomate, de frutas desidratadas, como a uva passa, doces em pasta e geleia de frutas, farinhas e derivados, como massas, produtos de panificação e outros produtos derivados de cereais, café, chás, especiarias (temperos), cacau e derivados, queijo e cogumelos. Dessa forma, não se pode tolerar a presença das sujidades encontradas nos materiais analisados, já que os doces de amendoim e paçocas não compõem a listagem de alimentos citada.

A análise microscópica revelou a presença de fungos identificados como *Aspergillus* sp. (Figura 17). Na análise microbiológica foram obtidos resultados relativos à formação de bolores e leveduras, quantificados em unidades formadoras de colônias por grama (UFC/g). Dessa forma, descreve-se à seguir os resultados obtidos em cada tipo de doce: paçoca (PC 1) = $2,0 \times 10^2$ UFC/g.; paçoca (PC 2) = $2,0 \times 10^2$ UFC/g.; paçoca (PC 3) = ausência de UFC/g.; paçoca (PC 4) = $2,0 \times 10^2$ UFC/g. Doce de amendoim (DC 1) = $2,0 \times 10^2$ UFC/g.; doce de amendoim (DC 2) = $2,0 \times 10^3$ UFC/g. A presença desses fungos (Figura 17) está correlacionada à provável produção de aflatoxinas pelos mesmos, o que pode representar risco à saúde do consumidor. A ANVISA, em um regulamento técnico de boas práticas de fabricação para estabelecimentos industrializadores de amendoins e derivados, definiu as aflatoxinas como metabólitos tóxicos produzidos por fungos do gênero *Aspergillus*, os quais se desenvolvem durante o cultivo e a estocagem de produtos agrícolas (BRASIL, 2003).

Um estudo realizado pelo INMETRO (2000) atestou que 60% das marcas de amendoim e 80% das amostras de paçoca, analisadas em dez estados brasileiros, não estavam em conformidade com a legislação vigente à época, sendo que, três das dez amostras de paçoca continham um nível elevado de aflatoxinas. Essas toxinas, são produzidas por *Aspergillus*, tal como encontrado nas amostras analisadas no presente trabalho. No mesmo estudo, verificaram-se que quatro das dez marcas apresentavam alguma mistura com

algum tipo de farinha ou cereal não permitido pela legislação, fato que também se repetiu no presente trabalho, dezesseis anos depois, no estado do Rio de Janeiro. Contudo, o estudo do INMETRO não verificou a presença de sujidades, como fragmentos de insetos ou metálicos. No presente trabalho foram encontrados fragmentos metálicos, de insetos e grãos de areia. Cabe ressaltar que, em 28 de Julho de 2000, a diretoria de alimentos e toxicologia da ANVISA determinou, à época, o recolhimento de lotes de doces de amendoim e paçocas que apresentassem contaminação por aflatoxinas (BRASIL, 2000).



Figuras 1-3. Aspectos relevantes na análise dos doces de abóbora (*Cucurbita pepo*). **Figura 1.** Células parenquimáticas, provenientes do mesocarpo, em detalhe. Barra = 50 μm . **Figura 2.** Detalhe dos elementos de vaso anelados (seta). Barra = 50 μm . **Figura 3.** Grãos de amido arredondados, truncados ou quase poliédricos em detalhe. Barra = 6 μm . **Figura 4.** Grãos de amido isolados de *Ipomoea batatas*. Barra = 50 μm . **Figura 5.** Elementos de vaso pontoados, típicos de *I. batatas*, encontrados no material analisado. Barra= 50 μm .

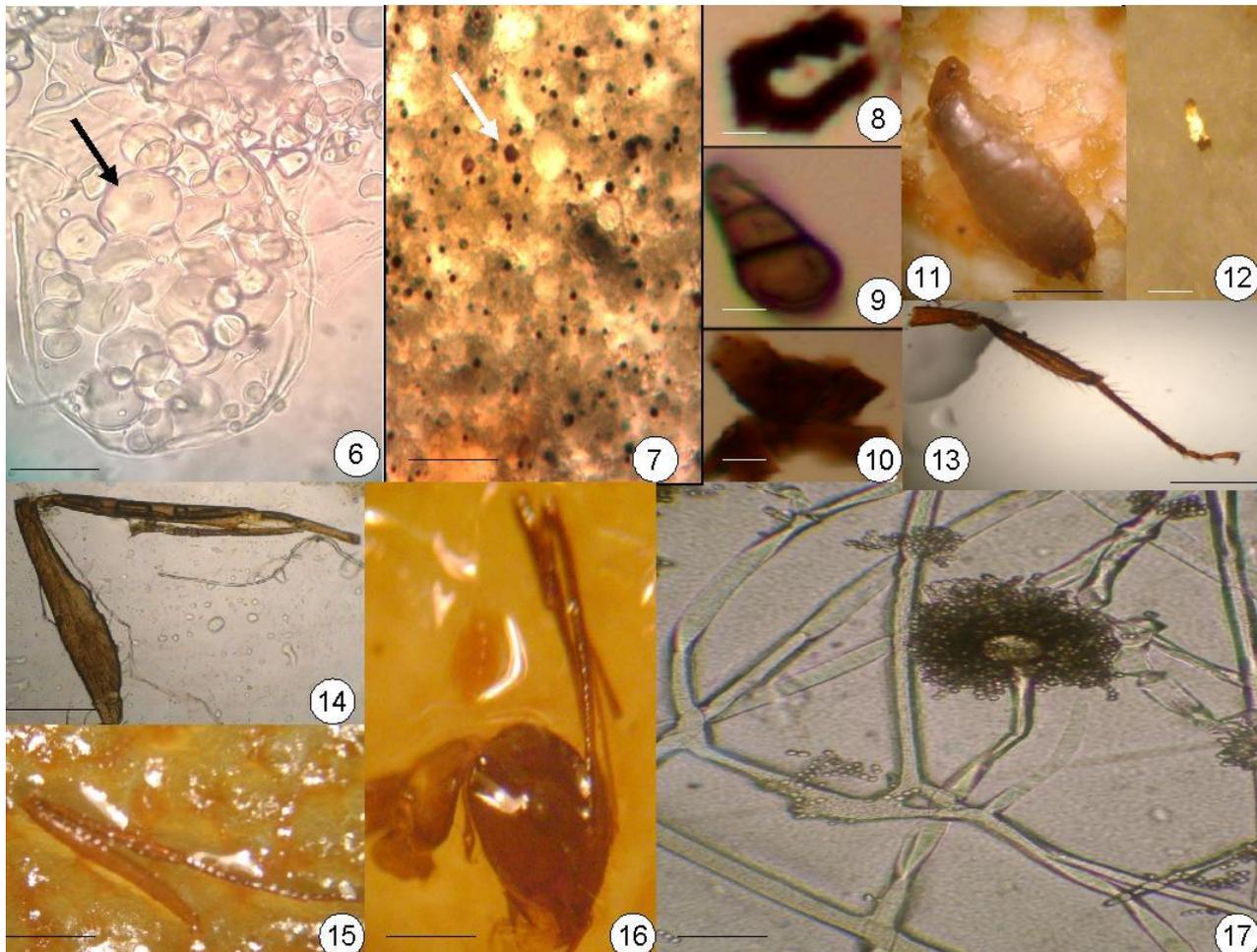


Figura 6. Célula parenquimática contendo grãos de amido, compatíveis com os de *I. batatas*, encontrados no material analisado (seta). Barra = 50 μ m. **Figura 7.** Resultado positivo ao teste com lugol, mostrando o amido (seta) presente em doces de amendoim. Barra = 75 μ m. **Figuras 8 – 16.** Sujidades encontradas nos doces de amendoim e paçocas. **Figuras 8 e 9.** Genitália e ooteca de inseto, respectivamente. Barras = 50 μ m. **Figura 10.** Fragmentos de exoesqueleto. Barra = 75 μ m. **Figura 11.** Ninfa de Blattaria em detalhe. Barra = 2 mm. **Figura 12.** Fragmento metálico isolado. Barra = 1 mm. **Figura 13.** Perna de Blattaria em detalhe. Barra = 150 μ m. **Figuras 14 e 15.** Pernas de Hymenoptera (formigas). Barra = 150 μ m. **Figura 16.** Cabeça (com uma antena) de Hymenoptera (formiga). Barra = 150 μ m. **Figura 17.** *Aspergillus* sp. em detalhe. Barra = 6 μ m.

CONCLUSÕES

Baseando-se nos resultados acima expostos, pode-se concluir que a análise microscópica revelou resultado positivo para amido, revelando a adição de farinha de trigo aos doces de amendoim e a adição de batata doce, caracterizando assim adulteração da matéria-prima nos doces de abóbora. Além disso, os dois métodos usados para isolamento de sujidades mostraram-se igualmente eficientes e complementares e permitiram isolar sujidades diversas, como fragmentos de insetos, insetos inteiros e fragmentos metálicos nos doces de amendoim. A análise microbiológica revelou a presença de bolores e fungos (*Aspergillus* sp.) em cinco das seis amostras de doces de amendoim analisadas, relacionados à presença de aflatoxinas, o que caracteriza uma ameaça à saúde do consumidor.

Comparando-se os resultados do presente trabalho com estudos feitos em décadas anteriores, conclui-se que as inconformidades relativas à adulteração de matérias-primas, nos doces de abóbora, permanecem as mesmas. Já em relação aos doces de amendoim, o aumento das inconformidades (sujidades), além da presença de fungos produtores de aflatoxinas demonstraram uma piora na qualidade dos produtos comercializados, o que reforça a necessidade de maior rigor na fiscalização.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BRASIL. Presidência da República. Casa Civil. Subchefia para assuntos jurídicos. Lei no 6.437 de 20 de Agosto de 1977. (Redação dada pela medida provisória no 2.190-34 de 2001). In: http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/leis/L6437.compilado.htm. Acesso em: 19 de Novembro de 2016.
- BRASIL. Diretoria de Alimentos e Toxicologia. Resolução n. 89 de 28 de julho de 2000 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). In: <http://www.inmetro.gov.br/consumidor/produtos/amendoim.asp?iacao=imprimir>. Acesso em: 18 de Novembro de 2016.
- BRASIL. Resolução da Diretoria Colegiada - RDC n. 172 de 04 de Julho de 2003. **Diário Oficial da União, seção 1, n. 128, de 07 de Julho de 2003**, p. 45.
- BRASIL. Resolução da Diretoria Colegiada - RDC n. 14 de 28 de Março de 2014 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). In: http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2014/rdc0014_28_03_2014.pdf. Acesso em: 18 de Novembro de 2016.
- BOESE, J.B.; CICHOWICZ, S.M. Extraneous materials: Isolation. In: **AOAC Methods** (Chapter 16). 16th Ed. 1995. 1-69.
- CORREIA, M.; RONCADA, M.J. Padronização de método e quantificação de matérias estranhas e filamentos micelianos. I. Doces de fruta em pasta. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, **61**(2), 85-90. 2002.
- FRANZOLIN, M.R.; BAGGIO, D.; CORREIA, M.; RODRIGUES, R.M.M.S. Presença de ácaros e doces de amendoim e de leite vendidos por ambulantes na cidade de São Paulo. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, **54**(1), 11-15, 1994.
- ICMSF. **Microorganisms in foods 7. Microbiological testing in food safety management**. International Commission on Microbiological Specifications for Foods (ICMSF). 2002. 362p.
- KRAUS, J.E.; ARDUIN, M. **Manual básico de métodos em morfologia vegetal**. Seropédica, RJ: EDUR.1997. 198p.
- INMETRO. Produtos derivados de amendoim (amendoim e paçoca). In: <http://www.inmetro.gov.br/consumidor/produtos/amendoim.asp?iacao=imprimir>. Acesso em: 18 de Novembro de 2016.
- MENEZES-JUNIOR, J.B.F. Investigações sobre o exame microscópico de algumas substâncias alimentícias. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, **9**, 19-77, 1949.
- OLIVEIRA, F.; AKISUE, G. **Fundamentos de Farmacobotânica**. 2a. Ed. São Paulo, SP: Ed. Atheneu. 2005.178p.
- RODRIGUES, R.M.M.S.; ATUI, M.B.; CORREIA, M. **Métodos de análise microscópica de alimentos – isolamento de elementos histológicos**. Instituto Adolfo Lutz. São Paulo, SP: Ed. Letras e Letras. 1999. 167p.
- VASQUEZ, A.W. Hairs (Chapter 9). **FDA Technical Bulletin**, **1**, 125-151, 1981.
- ZAMBONI, C.Q. *et al.* Fraudes e condições de higiene de doces em pasta. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, **49**(2), 125-129, 1989.