

## Condições higiênico-sanitárias da pimenta do reino em pó (*Piper nigrum* L.) com o emprego de duas diferentes técnicas para detecção de sujidades leves

Assessment of hygienic conditions of ground pepper (*Piper nigrum* L.) by means of two methodologies for detecting the light filth

RIALA6/1195

Márcia Bittar ATUI<sup>1</sup>\*, Márcia Jorge CASTEJON<sup>2</sup>, Rosemeire YAMASHIRO<sup>2</sup>, Tatiana DE LUCCA<sup>1</sup>, Paul W. FLINN<sup>3</sup>

\*Endereço para correspondência: Seção de Microscopia Alimentar, Instituto Adolfo Lutz, Av. Dr. Arnaldo, 355, São Paulo, SP, Brasil, CEP 01246-902, email: marcatui@ial.sp.gov.br

<sup>1</sup>Seção de Microscopia Alimentar, Divisão de Bromatologia e Química, Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, SP, Brasil.

<sup>2</sup>Seção de Sorologia, Divisão de Biologia Médica, Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, SP, Brasil.

<sup>3</sup>Laboratório Grain Marketing and Production Research Center, Kansas, USA.

Recebido: 18.03.2009 – Aceito para publicação: 30.04.2009

### RESUMO

A pimenta do reino deve ser colhida, processada, embalada em condições ideais para evitar a presença de matérias estranhas. Com o objetivo de avaliar as condições higiênicas da pimenta do reino em pó, comercializada em São Paulo, foram analisadas 22 amostras por meio de duas diferentes técnicas no período de maio a setembro de 2006. Para a análise de sujidades leves foi utilizada a técnica de flutuação segundo AOAC e ensaio imunoenzimático – ELISA. Observou-se que 100% das amostras continham fragmentos de insetos e em várias amostras foram demonstrados mais de um tipo de matéria estranha; e 23% das amostras mostraram ser impróprias ao consumo em virtude da presença de pelos de roedor. Para realizar o ELISA, foram adicionados os padrões constituídos de 1, 2, 4, 8 e 10 insetos para estimar o número de insetos nas amostras em análise, por meio de valores de densidade óptica (DO). Verificou-se que 36,4% das amostras apresentaram valores de DO próximos aos correspondentes ao do padrão 8 insetos, 40,9% ao do padrão 4 insetos, 18,2% ao do padrão 10 e 4,5% ao do padrão 2 insetos. A técnica descrita na AOAC mostra ser mais apropriada, em função de sua eficiência de detecção de insetos, bem como de outras matérias estranhas, enquanto que o ELISA detecta especificamente a miosina presente no músculo dos insetos, cuja degradação ocorre com o passar do tempo.

**Palavras-chave.** pimenta do reino, ELISA, flutuação, sujidades leves.

### ABSTRACT

The pepper ought to be collected, processed, packed under optimum conditions to avoid the presence of foreign matters. The hygienic conditions of ground pepper marketed in São Paulo city were assessed by means of two methodologies on 22 samples during the period from May to September 2006. For determining the occurrence of light filth the flotation technique was employed following the methodology recommended by AOAC, and the enzyme – linked immunosorbent assay (ELISA). It was observed that 100% of the samples contained insect's fragments and in various samples more than one type of foreign matters were found. Twenty-three percent of samples were unqualified for consumption owing to the occurrence of rodent hair. For performing ELISA, the standard samples containing 1, 2, 4, 8 and 10 insects were included in order to estimate the number of insects in the analyzed samples by means of optical densities (OD) values. Of 22 samples, 36.4% of samples presented OD values close to that corresponding to standard 8 insects, 40.9% samples to standard 4 insects, 18.2% to 10, and 4.5% to standard 2 insects. According to the results observed in the present study, the technique described in the AOAC is more suitable for detecting not only the insects but also the additional filth in analyzed samples, while ELISA is specific to detect myosin from the insect muscle, which undergoes degradation after some time.

**Key words.** pepper, ELISA, flotation technique, light filth.

## INTRODUÇÃO

O Brasil é um grande produtor de pimenta do reino e sua utilização como guarnição representa um risco à saúde, uma vez que a mesma pode ser utilizada diretamente sobre o alimento, sem nenhuma etapa que neutralize os contaminantes presentes<sup>1</sup>.

A pimenta do reino de boa qualidade deve ser colhida, processada, embalada, transportada e conservada em condições que não desenvolvam e/ou agreguem substâncias físicas, químicas ou biológicas que coloquem em risco a saúde do consumidor<sup>2</sup>.

As variações climáticas e a secagem artesanal em regiões tropicais e subtropicais fazem com que as especiarias fiquem mais sujeitas à contaminação por micro-organismos e insetos. Esses últimos, por sua vez, favorecem o crescimento de fungos por meio da atividade metabólica que aumenta o teor de umidade e temperatura do meio<sup>3</sup>.

A pesquisa de matérias estranhas em alimentos é de fundamental importância para a manutenção da qualidade física, sanitária e nutricional do produto. A *Association of Official Analytical Chemists* (AOAC) define como matéria estranha qualquer material diferente, não pertencente ao alimento que possa estar presente, devida às práticas inadequadas durante a fase de produção, armazenamento ou distribuição. Dentre as matérias estranhas estão as sujidades leves, como exemplos os insetos e seus fragmentos, ácaros, pelos de animais e bárbulas de aves<sup>4</sup>. A detecção desses contaminantes representa um desafio constante para a indústria e é indicativa das condições sanitárias dos produtos armazenados, estocados e/ou processados.

O Código de Defesa do Consumidor, em vigor desde 1991, provocou mudanças significativas nas relações entre consumidores de alimentos e indústrias processadoras do Brasil. As atuais legislações para o cumprimento dos parâmetros microscópicos são: a Resolução RDC nº 175/MS e a Portaria nº 326/MS, que estabelece disposições gerais para a avaliação de matérias estranhas macroscópicas e microscópicas prejudiciais à saúde humana em alimentos embalados e os requisitos gerais de higiene e de boas práticas de fabricação para alimentos produzidos ou fabricados para consumo, respectivamente<sup>5,6,7</sup>.

A metodologia de flutuação para a extração de sujidades leves em pimenta do reino é preconizada pela AOAC e vem sendo utilizada há muitos anos nos laboratórios oficiais.

Atualmente, o ensaio imunoenzimático - ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) foi desenvolvido para detectar insetos em amostras de alimentos, por meio da detecção de miosina, proteína presente no músculo de insetos. A técnica pode apresentar vantagens em relação ao método de flutuação por ser rápida, custo relativamente baixo e permitir a análise de um grande número de amostras em um único ensaio. A miosina presente em grandes quantidades, tanto em larvas como em insetos adultos, é facilmente extraída e difere muito pouco entre as espécies de insetos<sup>8,9</sup>.

Este estudo tem como objetivo avaliar as condições higiênico-sanitárias da pimenta do reino em pó, comercializada em diferentes pontos da cidade de São Paulo, por meio das metodologias da AOAC (flutuação) e imunoenzimática - ELISA.

## MATERIAL E MÉTODOS

Foram analisadas 22 amostras de pimenta do reino em pó adquiridas no comércio da cidade de São Paulo, com marcas, lotes e prazos de validade distintos, no período de maio a setembro de 2006.

O estudo foi realizado nos laboratórios de Microscopia Alimentar e HIV/Aids do Instituto Adolfo Lutz – Laboratório Central e no Laboratório *Grain Marketing and Production Research Center*, do Ministério da Agricultura, Kansas, USA.

Para a análise de sujidades leves em pimenta do reino moída foi utilizado o método de flutuação nº 972.40A, descrito na *Association of Official Analytical Chemists* (AOAC) International, 18ª ed., 2005 e o ensaio imunoenzimático – ELISA - kit comercial Biotec (Austin TX) para a detecção de miosina, por meio de anticorpos policlonais, observando-se todos os procedimentos sugeridos pelo fabricante<sup>4</sup>.

As amostras foram processadas em duplicatas e os resultados expressos como média aritmética.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos para as amostras de pimenta do reino em pó pelo método de flutuação estão apresentados nas Tabelas 1 e 2.

De acordo com as Tabelas 1 e 2, observou-se, respectivamente, que 100% (22/22) das amostras de pimenta do reino continham fragmentos de insetos e em

**Tabela 1.** Número e porcentagem de amostras com presença de sujidades leves em 22 amostras de pimenta do reino moída. São Paulo, 2008

Pimenta do reino	Presença		Ausência	
	Nº	%	Nº	%
Inseto	4	18,2	18	81,8
Fragmento de inseto	22	100	0	0
Larva	3	13,6	19	86,4
Fragmento de larva	4	18,2	18	81,8
Ácaro	9	41	13	59
Pelo de roedor	5	23	17	77
Fragmento de pena de ave	1	4,5	21	95,5
Pelo de animal não identificado	1	4,5	21	95,5

n = número de amostras.

**Tabela 2.** Amostras de pimenta do reino moída por tipo de matéria estranha encontrada, São Paulo, 2008

Nº da amostra	Fragmento de inseto	Larva	Fragmento de pena de ave	Inseto	Fragmento de larva	Ácaro	Pelo de roedor	Pelo de animal não identificado
1	3,5	1	0	0	0	0	0	0
2	34	0	0	0	0	0	0	0
3	22,5	0	0	0	0	0	0	0
4	7	0	0	1	0	0	0	0
5	11	1	0	1	5	1	0	0
6	6,5	0	0	0	0	0	0	0
7	17	0	0	0	0	0	0	0
8	49,5	0	0	0	0	1	0	0
9	293	1	0	0	1	1	0	1
10	67,5	0	0	0	0	1	0	0
11	40,5	0	0	3	1	2	1	0
13	352	0	0	0	0	0	2	0
14	65	0	0	0	0	0	0	0
15	10,5	0	0	1	0	1	0	0
16	19	0	0	0	0	0	1	0
17	56,5	0	0	0	0	0	2	0
18	12,5	0	0	0	0	1	0	0
19	6	0	0	0	0	1	0	0
20	466	0	1	0	1	9	1	0
21	23	0	0	0	0	0	0	0
22	14	0	0	0	0	0	0	0
23	55	0	0	0	0	0	0	0

várias amostras mais de um tipo de matéria estranha, que podem ter sido originados no campo ou durante o do armazenamento.

Embora estes tipos de insetos não causem nenhum dano à saúde do consumidor, as indústrias devem produzir seus produtos de maneira adequada, adotando as boas práticas de fabricação, armazenamento e distribuição<sup>6,7</sup>.

Os fragmentos de insetos são constituídos por quitina e quando ingeridos pelo homem não são metabolizados, pois o sistema digestivo humano não apresenta a enzima quitinase, deste modo, além de não trazer benefício nutricional podem causar danos à mucosa intestinal<sup>10</sup>.

O produto pode ser infestado e avariado por insetos que se desenvolvem na área de produção e colheita. No campo, os insetos mais comuns são os das Ordens Lepidoptera, Coleoptera, Hymenoptera, Homoptera e Hemiptera, e no armazenamento, os que podem atacar o produto são, principalmente, os da Coleoptera e Lepidoptera.

Muitos dos insetos encontrados nas amostras deste estudo pertenciam à ordem Homoptera, que são fitófagos e muitas espécies aparecem como pragas de plantas cultivadas<sup>11,12</sup>.

Neste estudo encontramos 41% (9/22) de amostras com presença de ácaros, que podem veicular bactérias, leveduras e fungos. As partículas fecais dos ácaros possuem substâncias tóxicas capazes de causar sensibilização nos homens ou animais, resultando em enterites agudas e podendo provocar lesões macróticas na mucosa intestinal. Os ácaros encontrados pertenciam às ordens Mesostigmata e Cryptostigmata, sendo muitos da família Oribatidea, que são ácaros de solo<sup>13,14</sup>.

Gecan et al. realizaram um estudo com vários tipos de condimentos adquiridos no varejo para determinação da qualidade sanitária dos mesmos. No que concerne à pimenta do reino, os autores verificaram que das 1523 amostras analisadas, 98,4% continham fragmentos de insetos, 46% estavam contaminadas com ácaros e 20% com pelos de roedores, o que vem de encontro com os dados obtidos<sup>15</sup>.

As amostras com presença de pelos de roedores são impróprias ao consumo por conter matéria estranha considerada prejudicial à saúde, uma vez que os roedores são transmissores em potencial de uma série de doenças, entre elas a leptospirose, salmoneloses, peste (bubônica, pneumônica, septicêmica) e viroses, entre outras<sup>15,16</sup>.

No trabalho realizado por Graciano et al em amostras de pimenta do reino moída, foram encontradas 98,5% de amostras contendo fragmentos de insetos, 24,6% com presença de ácaros e 23,2% com pelos de roedores. Comparando os dados encontrados neste estudo com o realizado em 1999/2000, nota-se que o controle de qualidade realizado pelas indústrias produtoras e empacadoras de pimenta do reino no Estado de São Paulo, não se mostrou efetivo<sup>1</sup>.

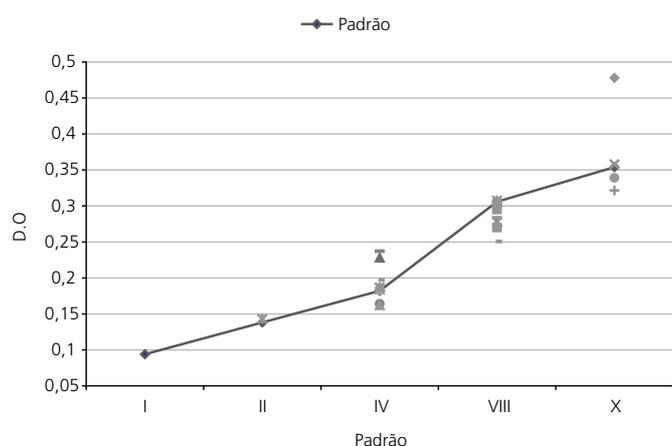
Com relação à legislação em vigor, 100% (22/22) das amostras estão em desacordo, por conter insetos e fragmentos, ácaros, pelos de animal não identificado, larvas, fragmentos de larvas, indicando a não adoção e/ou manutenção das Boas Práticas de Fabricação<sup>7</sup>. Conforme a RDC nº 175/2003 para matérias estranhas macroscópicas e microscópicas prejudiciais à saúde, somente as amostras contendo pelos de roedor (23%) são consideradas impróprias para o consumo<sup>6,11</sup>.

Para a metodologia imunoenzimática – ELISA os resultados são apresentados conforme mostra a Figura 1.

Na Figura 1 foram adicionados os padrões, nos quais o número correspondente indica a quantidade de insetos presentes - 1, 2, 4, 8 e 10 - para estimar o número de insetos presentes nas 22 amostras, por meio das densidades ópticas (D.O) obtidas. De acordo com os padrões acima citados, 36,4% (8/22) das amostras apresentaram suas D.O próximas ao padrão 8, 40,9% (9/22) ao padrão 4, 18,2% (4/22) ao padrão 10 e 4,5% (1/22) ao padrão 2. Pelos padrões pode-se estimar o número de insetos adicionados.

O limite mínimo de detecção do ensaio imunoenzimático - ELISA é de 0,5 inseto e o limite máximo é de 10 insetos por 50 gramas/amostra. A amostra com contaminação acima desse valor terá seu resultado máximo de detecção para 10 insetos, enquanto que pelo método da AOAC não importa a quantidade de infestação que a mesma será detectada, mesmo que em número elevado.

Segundo a literatura, o anticorpo policlonal utilizado no ensaio imunoenzimático - ELISA reage com a miosina presente em várias espécies que podem infestar os grãos, deste modo, a infestação dos grãos e subprodutos pode ser determinada quantitativamente. O ensaio baseado em uma reação colorimétrica fornece resposta consistente para avaliação de uma grande quantidade de insetos<sup>17</sup>.



**Figura 1.** Resultados obtidos (D.O.) das amostras e dos padrões no ensaio imunoenzimático – ELISA.

O kit utilizado neste trabalho foi desenvolvido com anticorpos policlonais e os padrões são específicos para *S.granarius*. Para as amostras infestadas com outros tipos de insetos, os valores de miosina podem estar abaixo daqueles encontrados para o padrão. Nestas amostras de pimenta do reino, não foram identificados todos os insetos presentes e os que foram identificados pertenciam a Ordem Homóptera, sendo assim a quantidade de miosina pode ter sido subestimada, uma vez que o teste foi desenvolvido para insetos pertencentes à Ordem Coleoptera<sup>18</sup>.

No trabalho desenvolvido por Kitto, o ensaio imunoenzimático – ELISA mostrou uma excelente correlação entre a cor produzida e o número de *Sitophilus granarius* adicionados em amostras de trigo limpo. A cor desenvolvida e sua intensidade são proporcionais à quantidade de miosina presente na alíquota avaliada, correlacionando bem com a massa muscular do inseto presente na amostra de trigo ou farinha, o que pode ser extrapolado para o número de insetos presentes na amostra<sup>8</sup>.

No estudo realizado por Atui et al., 2002, foi demonstrado que a miosina presente na farinha de trigo (depois da moagem do grão) degradou após duas semanas. O mesmo pode ter acontecido com a concentração de miosina presente na pimenta do reino adquirida em diferentes pontos do comércio de São Paulo, pois não se sabe quando ocorreu o processamento<sup>18</sup>.

As amostras, quando infestadas com número conhecido de insetos, têm alta correlação com os valores de densidade óptica obtidos no ELISA, conforme verificado em vários estudos. Neste caso, não existe a correlação dos

resultados encontrados pelo método de flutuação com a técnica de ELISA, por não conhecer a contaminação prévia das amostras de pimenta do reino<sup>18-20</sup>.

## CONCLUSÃO

O ensaio imunoenzimático – ELISA utilizado é específico para detectar a miosina presente no músculo dos insetos, portanto somente detecta insetos e fragmentos de insetos, porém sabe-se que a miosina degrada-se com o passar do tempo.

Pelo método de flutuação pode-se determinar qual espécie está infestando a amostra, por meio da identificação dos fragmentos de insetos recuperados, diferente do ensaio imunoenzimático - ELISA que não é capaz de determinar a espécie do inseto presente.

A concentração de miosina pode servir para estimar o número de insetos e fragmentos.

O ensaio imunoenzimático - ELISA é rápido, sensível e barato e de fácil execução, pode ser utilizado no controle de qualidade na indústria, porém não é adequado para as amostras que se encontram no comércio.

O ELISA correlaciona a miosina do inseto presente na amostra fornecendo meios quantitativos para estimar a contaminação por insetos dentro do limite de detecção do kit, já o método de flutuação faz a contagem de fragmentos de insetos sem se preocupar com o tamanho.

Neste trabalho, a metodologia da AOAC foi mais apropriada para pimenta do reino, uma vez que por ela são recuperadas além de insetos e seus fragmentos outras matérias estranhas, tais como ácaros, larvas, pelos de roedores e outros animais.

## AGRADECIMENTOS

Ao funcionário Kenlee Friesen, do *Grain Marketing and Production Research Center*, Manhattan, Kansas, USA, pela ajuda na realização da parte prática deste trabalho.

## REFERÊNCIAS

1. Graciano RAS, Atui MB, Dimov MN. Avaliação das condições higiênic-sanitárias de cominho e pimenta do reino em pó comercializados em cidades do Estado de São Paulo, Brasil, mediante a presença de matérias estranhas. *Rev Inst Adolfo Lutz*. 2006; 65(3): 204-8.
2. Brasil. Resolução RDC nº 276, de 22 de setembro de 2005. ANVISA. Aprova o Regulamento Técnico para Especiarias, Temperos e

- Molhos. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 23 de setembro 2005. Seção I, p378.
- Correia M, Daros VSMG, Silva RP. Matérias estranhas em canela em pó e páprica em pó, comercializadas no Estado de São Paulo. *Ciênc Tecnol Aliment*. 2000; 20(3): 1-10.
  - Association of Official Analytical Chemists (AOAC) International. *Official Methods of Analysis of AOAC International*, 17<sup>o</sup> ed., William Horwitz (Editor), Gaithersburg, MD, AOAC Official Method 972.40A., 2000.
  - Brasil. Lei nº 8.078, de 11 de setembro de 1990. Presidência da República, Casa Civil. Dispõe sobre a proteção do consumidor e dá outras providências. Diário Oficial da União. Brasília, DF, nº 176, 12 de setembro de 1990. Suplemento, p.1-12.
  - Brasil. Resolução RDC nº 175, de 08 de julho de 2003. ANVISA. Aprova o Regulamento Técnico de Avaliação de Materiais Macroscópicas e Microscópicas Prejudiciais à Saúde Humana em Alimentos Embalados. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 2003. Disponível em: [http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/2003/rdc/175\\_03rdc.htm](http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/2003/rdc/175_03rdc.htm).
  - Brasil. Portaria SVS/MS nº 326, de 30 de julho de 1997. Regulamenta as Condições Higiênico-Sanitárias e de Boas Práticas de Fabricação para Estabelecimentos Produtores/Industrializadores de Alimentos. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 1 de agosto de 1997. Seção I.
  - Kitto GB. A new rapid biochemical technique for quantitating insect infestation in grain. *Association of operative Millers Bulletin*, 1991; 5835-8.
  - Bair J, Kitto GB. New Methods for rapid determination of insects in grain. *Proceeding of GEAPS*, 1992: pp: 85-94.
  - Gorhan JR. Filth in foods. Implications for health. In: Gorhan JR. ed. *Principles of food analysis for filth, decomposition, and foreign matter*. Washington, DC, Food and Drug Administration. P.27-32 (FDA Technical Bulletin, 1), 1981.
  - Food and Drug Administration (FDA). The food defect action levels: current levels for human use that present no health hazard. Washington, US Department of Health and Human Service/Public Health Service Food and Drug Administration Bureau of Foods, 1982, 20p.
  - Wirtz RA. Food Pests as Disease Agents. In: Gorham JR ed. *Ecology and Management of Food – Industry Pests*. (FDA Technical Bulletin Number 4) Association of Official Analytical Chemists, Arlington, Virginia, p:469-75, 1991.
  - Baggio D, Franzolin MR. Análise e controle dos ácaros em alimentos e produtos armazenados. In: Encontro Nacional de Analistas de Alimentos, 1991. 18p.
  - Fletchman CHW. Ácaros em produtos armazenados e na poeira domiciliar. Piracicaba, Fundação de Estudos Agrários Luiz de Queiroz. 1986 (mimeografado).
  - Gecan SJ, Bandler R, Glaze LE, Atkinson JC. Microanalytical quality of ground and unground marjoram, sage and thyme, ground allspice, black pepper and paprika. *Journal of Food Protection* 1986; 49(3): 216-21.
  - Carvalho Neto C. Manual prático de biologia e controle de roedores. 2<sup>a</sup> ed. rev. ampl. São Paulo, CIBA-GEIGY; 1987.
  - Chen WM, Kitto GB. Species-specific immunoassays for *Sitophilus granarius* in wheat. *Food & Agricultural Immunology*. 1993, 5: 165-75.
  - Atui MB. Avaliação de metodologias para detecção de insetos, seus fragmentos e de resíduos de terra diatomácea em grãos e farinha de trigo. [Tese de Doutorado – Pós Graduação em Ciências Biológicas – Área de concentração em Entomologia – Universidade Federal do Paraná]. 2002. Curitiba, PR, 77 p.
  - Kitto GB, Thomas PN, Lemburg J, Brader B, Burkholder WE. Development of immunoassays for quantitative detection of insects in stored products. *Proceedings of the 6<sup>th</sup> International working Conference on Stored-product Protection*. v. I, 1992, 415-20.
  - Kitto GB, Thomas PN, Lemburg J, Brader B, Burkholder WE. Immunoassays for detecting insect contamination of foods products. In: *Immunoassays for Residue Analysis: Food Safety*. RC Bier and LH Stanker (eds). American Chemical Society, Washington, DC. 1996.