

# CONTRIBUIÇÃO AO ESTUDO E À APLICAÇÃO DO MÉTODO DE HOWARD NAS CONTAGENS DE COGUMELOS DOS PRODUTOS DE TOMATE

JUAN PADRON G.

Professor de Microbiologia da Escola de Farmácia da Universidade de  
Caracas e Chefe da Seção de Controle Microbiológico de Alimentos e  
Medicamentos do Instituto de Higiene.

J. B. FERRAZ DE MENEZES JUNIOR

Químico do Instituto Adolfo Lutz.

O presente trabalho tem por fim estudar e sugerir algumas observações aplicadas à técnica de Howard, empregada na contagem microscópica de cogumelos dos produtos de tomate e, bem assim, lembrar a necessidade de ser estipulada em nosso Código Bromatológico, uma cifra ajustada a cada tipo desses produtos, de acôrdo com suas densidades.

A nossa regulamentação oficial estabelece 65% de campos positivos com filamentos micelianos para "produtos de tomate", sem se referir ao estado de concentração apresentado pelos mesmos. Como os extratos e as massas de tomate jamais poderão ter o mesmo teor miceliano dos sucos de que procederam, por evaporação, não é justo tolerar-se para estes sucos uma cifra que somente deverá ser encontrada naqueles concentrados, cujas densidades são sensivelmente mais elevadas.

O método original de Howard (1911) e o de Howard e Stephenson (1917) têm servido de base à elaboração da legislação para controle e classificação dos produtos de tomate de vários países, apesar de não ser um método totalmente perfeito, por apresentar ainda algumas falhas.<sup>15</sup> Tem sido, por êste motivo, alvo de insistentes críticas, muito embora continue sendo o método oficial, o único existente no momento para o fim a que se destina.

O nosso interesse na elaboração deste trabalho surgiu ao notarmos a causa de êrro que poderia advir das conclusões analíticas

de produtos de tomate, apresentando diferentes densidades e, a existência de uma cifra única tolerada pelo nosso Regulamento a todos esses produtos. Idêntica observação se pode fazer neste sentido ao Regulamento Bromatológico da Província de Buenos Aires,<sup>10</sup> ao fixar um limite máximo de 60 campos positivos para os diversos produtos derivados do tomate e ao de Santa Fé,<sup>4</sup> fixando não mais de 50 campos positivos para os extratos, unicamente.

Moveu-nos a isto, todavia, não o espírito combativo de crítica, porém o desejo de contribuir com uma parcela do nosso esforço à aplicação e ao aperfeiçoamento de um método amplamente adotado nos controles de alimentos.

Fundaram-se nossos ensaios na observação do aumento gradual e progressivo dos micélios de cogumelos nos diversos estágios de concentração do suco de tomate. Para isto usamos frutos nas diversas fazes de maturação e apresentando gradações no seu estado sanitário — desde os aparentemente são aos sensivelmente avariados. Não utilizamos tomates podres ou completamente alterados em nossas experimentações, por considerarmos que semelhante matéria prima resultaria improcedente para fins industriais.

#### CRÍTICAS AO MÉTODO

As dificuldades existentes em esclarecer alguns detalhes da técnica de Howard, e que são consideradas como falhas, não podem diminuir o valor desse método — o primeiro organizado para o controle microscópico de produtos de tomate.

Não é fácil organizar certos princípios e adaptá-los com felicidade e precisão a normas analíticas, principalmente quando a substância a ser estudada oferece um conjunto de obstáculos provenientes de sua própria contextura, como acontece com os produtos de tomate.

Entre as diversas causas de críticas ao método, poderemos citar as seguintes:

a) exigir de início muita experiência e habilidade do analista, qualidades que não podem ser adquiridas senão após acurada observação e pelo exercício de repetidas contagens;

b) a semelhança estrutural de muitos elementos do tomate com os filamentos de cogumelos, cuja confusão induz o observador ao risco de prejudicar a exatidão da contagem;

c) considerar como positivo tanto o campo que apresente um único micélio de cogumelo com o comprimento mínimo de  $1/6$  de seu diâmetro, como o que exhibe um bloco constituído pelo entrelaçamento de numerosos filamentos micelianos abrangendo todo o campo microscópico;

d) a sedimentação de detritos do tomate sobre hifas de cogumelo, prejudicando ou impedindo a sua perfeita visibilidade;

e) a não existência de uma cifra prefixada para produtos com diferentes densidades;

f) a concentração do produto como causa fundamental de erro nas conclusões dos resultados;

g) ser a tomada da amostra para o preparo da solução destinada à contagem feita por medição ( $\text{cm}^3$ ) do material e não por pesada (em grs.), a fim de se chegar a um resultado mais lógico e exato.

Entre as muitas dificuldades apresentadas pelo método de Howard, a do reconhecimento e identificação dos filamentos micelianos e sua diferenciação dos do tomate, parece ocupar o primeiro plano. O esclarecimento ao microscópio destes dois elementos torna-se trabalhoso, não só pela transparência que apresentam, como pela refringência sofrida pelo efeito dos raios luminosos que lhes põem em relevo certos detalhes inexpressivos.

Rivas<sup>11</sup> aconselha a diluição do material a examinar, não em água como indica Howard, mas em uma solução de azul de algodão, com o fim de facilitar a coloração do protoplasma do cogumelo e de tornar mais visíveis suas paredes. Ainda assim a dificuldade de identificação destes elementos não foi removida, bem como outras causas, que levam o observador a interpretações errôneas.

As células do mesocarpo do tomate mostram seu protoplasma corado em azul, contrastando com a membrana celular que, permanecendo incolor, dá por juxtaposição de suas paredes, o aspecto de micélios em seus bordos. O mesmo se nota na superfície visível da célula, devido à rugosidade surgida pelo aquecimento e sua

consequente retração durante a elaboração do produto. Idêntico fenômeno é observado ao microscópio nos fragmentos de parênquima do tomate, pela superposição de suas células (Microfoto, 1). A isto se deve a dificuldade de observação, motivada pela concentração e falta de homogeneidade da amostra, como sucede particularmente no caso de produtos tais como extratos e massas de tomate.

Como o azul de algodão não cora os protoplasmas micelianos velhos<sup>15</sup>, este fato se torna de suma importância no caso de uma inexperiente observação.

Acontece, muitas vezes, estar sobre a célula, uma hifa mais espessa, hialina e sem tabiques, podendo oferecer ensejo a uma possível confusão com uma dobra da membrana celular (Microfoto, 2).

Podem ser observados, também, sobre a célula, micélios finíssimos, curtamente septados, à semelhança de granulações protoplásmicas, e por este motivo, passarem despercebidos.

No campo microscópico aparecem comumente pêlos procedentes do episperma da semente do tomate e outros filamentos, com caracteres aparentemente idênticos aos dos micélios de cogumelo.

Na figura 3, procuramos ilustrar todos esses detalhes acima mencionados, com aumento de 100 vezes, precisamente como são observados no campo microscópico, a fim de facilitar e objetivar os necessários esclarecimentos que acabamos de fazer.

Haynes<sup>7</sup> procurando elucidar a semelhança existente entre os filamentos de tomate e os micélios de cogumelo, menciona os seis seguintes caracteres diferenciais:

1) *Segmentação* — Alguns filamentos de cogumelo são segmentados. Os filamentos de tomate nunca são segmentados.

2) *Granulação* — Os filamentos de cogumelo são granulosos. Os filamentos de tomate são limpos, vítreos ou fibrosos.

3) *Paralelismo dos lados das paredes da célula* — Os lados das paredes da célula são sempre paralelos na hifa de cogumelo. Nos filamentos de tomate os lados do filamento frequentemente aparecem comprimidos ou dilatados.

4) *Comparação do Plano Focal ou lado das paredes* — Os dois lados das paredes do micélio de cogumelo estão sempre em foco ao mesmo nível, enquanto que os lados das paredes de outros

filamentos podem vir a fóco em dois níveis diferentes. Estes resultados advêm do fato de serem as hifas filamentos cilíndricos ou tubulares, enquanto que os filamentos de tomate são como fitas.

5) *Caracteres dos ramos* — Entre as hifas ocorrem ramos, de ângulos agudos, que podem perfeitamente não ser notados nos outros filamentos.

6) *Aparência das extremidades dos filamentos* — As extremidades das hifas de cogumelo são arredondadas, porém, nunca desfeitas ou pontegudas como nos filamentos de tomate.

### COGUMELOS

Cogumelos ou fungos (Eumicetos), são vegetais pertencentes ao ramo dos Talófitos, formando uma classe diferente das algas por não conterem clorofila. Por êste motivo estão impossibilitados de realizar fotossíntese e de fixar carbono, imprescindível à realização dêsse trabalho de nutrição entre os vegetais. E' esta a razão por que procuram os seres vivos vegetais ou animais e os produtos de decomposição para seu sustento, sendo considerados no primeiro caso como parasitas e no segundo como saprófitos.

São plantas e, entretanto, não apresentam diferenciação entre raiz, caule e folha. Têm estrutura muito simples, reduzida a um talo, donde lhes vem o nome de Talófitos<sup>14</sup>.

As formas inferiores (Ficomictos ou Sifomicetos), são constituídas por filamentos unicelulares, semelhantes a tubos ou sifões, contínuos ou ramificados<sup>3</sup>. A estas ramificações deu-se o nome de hifas e ao conjunto — de micélio. (fig. 4).

Nos cogumelos superiores (Septomicetos) há uma perfeita diversidade de formas e de estrutura em cada grupo e as hifas apresentam-se separadas por paredes ou tabiques denominados septos<sup>3</sup>. Fig. 5.

As hifas podem variar de espessura e de comprimento conforme a espécie e as condições do meio e, os micélios, de simples filamento isolado, a um entrelaçado compacto, formando um falso parênquima ou pletênquima. (Microfoto, 6).

A reprodução dos cogumelos se dá por processo sexual ou assexual.

O processo sexual geralmente se realiza por conjugação e é comum aos Zigomicetos, Ascomicetos e Basidiomicetos.

O processo assexual se faz por cissiparidade, gemiparidade e por esporos, geralmente imóveis.

Os esporos têm formas variadas e recebem nomes diversos conforme sua origem: ascospóreos, zoospóreos, esporangiospóreos, zigospóreos, oospóreos, basidiospóreos, confídios, etc.<sup>9</sup>

Associados às bactérias, os cogumelos decompõem as matérias orgânicas, desdobrando-as em água, gás carbônico, hidrogênio, amônia etc.

Há espécies comestíveis, outras extremamente venenosas, algumas empregadas na indústria de fermentações e inúmeras espécies patogênicas tanto para o homem e animais, como para as plantas.

Sendo o tomate muito rico em substâncias nutritivas, está francamente sujeito ao ataque por cogumelos que parasitam o fruto ainda no tomateiro e por espécies saprófitas que prejudicam seriamente os sucos, as massas e os extratos de tomate, em todas as fazes de elaboração do produto industrial.

Os cogumelos são, portanto, um dos causadores principais da deterioração dos produtos de tomate. Daí a necessária observação de uma técnica perfeita e de uma rigorosa assepsia na manipulação desses produtos, como também de uma seleção meticulosa da matéria prima, a fim de ser evitada, pela indústria, a expedição de produtos com elevada concentração miceliana, os quais resultariam impróprios para o consumo e, por consequência, condenados sanitariamente.

As variedades <sup>1, 13, 15</sup> mais comumente responsáveis pelos danos causados aos produtos de tomate são:

ALTERNARIA (*Dematiaceæ*) Fig. 7

COLLETOTRICHUM (*Melanconiaceæ*) Fig. 8

FUSARIUM (*Tuberculariaceæ*) Fig. 9

MUCOR (*Mucoraceæ*) Fig. 10.

RHIZOPUS (*Mucoraceæ*) Fig. 11

OIDIUM (*Moniliaceæ*) Fig. 12.

PENICILLIUM (*Aspergillaceæ*) Fig. 13

ASPERGILLUS (*Aspergillaceæ*) Fig. 14

BOTRYTIS (*Moniliaceæ*) Fig. 15

Os três primeiros desta série atacam o fruto antes da colheita, os restantes o fazem logo após a mesma e durante a elaboração do produto.

Na indústria, quando há demora no período de concentração, o suco está sujeito a contaminações, por ser, por sua composição, um meio favorável ao crescimento de microrganismos.

### TOMATE

*Solanum Lycopersicum L.*

Sinonímia: *Lycopersicum esculentum* Mill.

(*Solanaceæ*).

VARIETADES — Numerosas são as variedades de tomates cultivadas em nosso Estado, destinando-se umas, exclusivamente ao consumo fresco, em saladas e temperos, e outras, a fins industriais, na confecção de sucos, mólhos, "ketchups", massas e extratos de tomate. Na indústria de massas, mólhos e conservas de tomate, são usadas as seguintes variedades vermelhas: "Pera" "Rei Humberto", "Purungo", "Redondo", "Alsa Graig", "Triumph", "Radio" e "Canárias"<sup>8</sup>.

CARACTERES BOTÂNICOS — O fruto é uma baga cuja côr varia do amarelo ao vermelho vivo e apresenta fórmãs e tamanhos diversos, chegando a atingir o volume de um caquí. Ferri e Joly<sup>5</sup>, em recente trabalho, referem à possibilidade de serem produzidos, por meio de hormônios sintéticos, tomates partenocárpicos, maiores que os normais da mesma espécie. Possui o epicarpo liso e lustroso, tendo na parte inferior pequena cicatriz genérica e, na superior, em depressão, a cicatriz peduncular que é proeminente.

Tem o mesocarpo polposo e suculento, o endocarpo tênue, pouco volumoso e, numerosas sementes, mergulhadas e envoltas por uma substância gelatinosa que enche duas lojas laterais, simétricas, implantadas na parte mais interna do mesocarpo, onde êste se liga, verticalmente, ao endocarpo. A semente é revestida por densa camada de falsos pêlos, possui resistente espermoderma, dentro do qual, cercado pelo endosperma, se destaca o embrião que é formado, na parte mais central, pelos cotilédones, cilíndricos, alongados e enrolados e, na extremidade oposta e periférica,

pela radícula (fig. 16). Aberta a semente, o embrião se destaca facilmente do endosperma e, por êste motivo, é comumente encontrado nas massas e condimentos de tomate de baixo preço, preparados com o fruto integral, triturado, dando a impressão perfeita de pequenos vermes, pelo seu aspecto e sua côr branco-leitosa, contrastando com a côr vermelho-escura do produto.

**ESTRUTURA MICROSCÓPICA** — O pericarpo<sup>18</sup> é constituído por 4 camadas:

1) *Epicarpo* — formado por células mais ou menos poligonais, ricas em pigmentos de côr vermelho-alaranjada. A membrana celular é bastante espessa, de côr amarelo brilhante e apresenta o aspecto de rosário ou de fileira de contas irregulares, presas nos ângulos por pequenos triângulos massivos. Ao microscópio com aumento de 400 vezes, estas células são vistas em número de 9 a 12 sôbre o diâmetro do campo, particularidade esta que permite distingí-las das do pimentão, que não ultrapassam o número de 7 células e com as quais apresenta perfeita semelhança morfológica. (Fig. 17).

2) *Hipoderma* — a estrutura é idêntica à do epicarpo, porém suas células são bem maiores.

3) *Mesocarpo* — consta de grandes células arredondadas, alongadas, piriformes ou elipsóides, revestidas por membranas gelificadas, cujos citoplasmas apresentam granulações de matéria corante amarela e vermelha (cromoplastos), identificadas como — caroteno e licopeno<sup>18</sup>. Nos frutos maduros, algumas destas células revelam grãos de amido, notados em maior quantidade nos tomates verdoengos. Os grãos de amido são arredondados, elípticos ou piriformes, com estrias numerosas, hilo pontuado e excentrico<sup>12</sup>. Sofrendo aquecimento estas células aumentam de volume e o amido perde suas características típicas. Atravessando êste tecido polposo, vêm-se feixes de vasos estreitos, espiralóides, geralmente recobertos por células menores, entremeadas por uma substância de aspecto mucilaginoso que dificultam a perfeita visão da estrutura dos mesmos. Alguns dutos se desprendem do feixe e são vistos, isolados, no campo microscópico. (Fig. 3).

4) *Endocarpo* — formado por um parênquima de células arredondadas, de paredes finas, semelhantes às do mesocarpo, porém menos ricas em granulações de matéria corante.



**SEMENTE** — O tegumento ou episperma é formado por células isodiamétricas características, de paredes esclerificadas, marcadamente sinuosas (Fig. 18), de onde emanam falsos pêlos, longos, de lumem bastante estreito, de base larga, achatada e ligeiramente triangular. Perisperma pouco evidente, porém facilmente notado por prévio tratamento com soluto de hipoclorito de sódio.

O endosperma e o embrião são constituídos por pequenas células poligonais, cheias de diminutos grãos de aleurona e de gotas oleosas. (Fig. 17). As do endosperma são, porém, maiores.

#### PARTE EXPERIMENTAL

Procedemos nossos ensaios partindo de sucos obtidos de 2 quilos de tomates, apresentando graus diferentes de contaminação pela maior ou menor proporção de frutos avariados. Todas as observações foram realizadas nos laboratórios do Instituto "Adolfo Lutz", em São Paulo.

Em todas as amostras, o suco depois de submetido a várias provas analíticas, foi reduzido, por evaporação, aproximadamente à metade de seu volume, em estufa a 55-60°C. Para maior facilidade na compreensão de nossos esclarecimentos, resolvemos chamar ao produto neste 2.º estágio de — Extrato "a".

Logo após terem sido feitas determinações idênticas às primeiras, o extrato "a" foi conservado em estufa até alcançar 1/8 do volume inicial, quando apresentou a contextura dos extratos de tomate comerciais e ao qual denominamos — Extrato "b".

Foram também procedidas neste extrato "b" as mesmas práticas anteriores, que constaram de contagens microscópicas, determinações da umidade, do extrato seco e da densidade.

As contagens foram feitas, uma pela técnica de Howard, fazendo-se a diluição na proporção de 1:3, isto é, medindo-se em cálice graduado uma parte da amostra e duas do diluente que, no nosso caso foi a solução de azul de algodão conforme propõe Rivas, e outra, diluindo-se em água destilada, a volume conhecido (1:3), a amostra previamente pesada e adicionada de algumas gotas de solução alcoólica de tionina ou de azul de algodão a 1%.

As determinações de umidade e de extrato seco foram feitas pelos métodos correntes de análise química, e as de densidade por picnometria.

Deixamos de descrever as técnicas destas determinações por julgarmos bastante conhecidas de todo analista e de uso comum em Bromatologia.

#### PREPARAÇÃO DA AMOSTRA

Lavar em água corrente 2 quilos de tomates, enxugá-los muito bem e triturá-los em máquina de moer carne; passar a polpa assim desfeita em tamiz n.º 20 (64 malhas por cm<sup>2</sup>), para privá-la das cascas e sementes, recolhendo o suco, em seguida, em um cristalizador grande, previamente aferido.

Geralmente 2 quilos de frutos maduros dão, aproximadamente, 1.700 cc. de suco.

Fazer as determinações neste período (*Suco*) e nos dois seguintes (*Extratos "a" e "b"*), depois da amostra permanecer na estufa a 55-60°C, para a devida evaporação até concentração semelhante a das massas e dos extratos de tomate do comércio.

#### CONTAGENS

*Técnica A* — MÉTODO DE HOWARD — Modificação de Rivas.

*Material necessário:*

1) Microscópio (de preferência Baush Lomb) equipado, com objetiva de 16 mm. e ocular de 10x, capazes de obterem aumento compreendido entre 90 a 125 vezes, focalizando um campo circular (area) de 1,5 milímetros quadrados, ou um diâmetro de 1,382 mm. Este diâmetro é facilmente obtido por intermédio do disco calibrador existente em um dos cavaletes da camera de Howard, o que torna dispensavel o uso da lâmina micrométrica para o ajustamento do campo microscópico.<sup>2, 16</sup>

2) Câmara de Howard (fig. 19).

3) Disco micrométrico de Howard (fig. 20).

4) Cálice graduado de 15 cc.

5) Bastão de vidro pequeno e fino (10 cents. x 1 mm.).

6) Corante — Solução de azul de algodão, cuja fórmula é a seguinte:

- \* Azul de algodão ..... 0,1 gr.
- Lactofenol (fenol, ácido láctico, glicerina e água em partes iguais) ..... 100 cc.

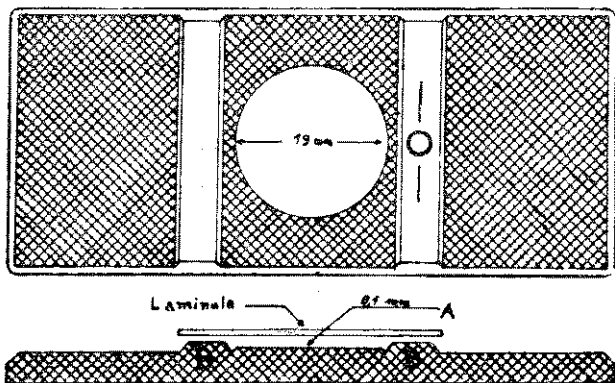
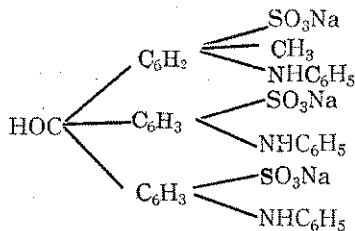


FIG. 19 — Câmara de Howard

É constituída por uma lâmina espessa de vidro opaco, tendo na parte central um disco polido de 19 mm de diâmetro. De cada lado dêste disco estão implantados 2 cavaletes, sôbre os quais deverá pousar a lamínula que guarda entre o disco, precisamente, um espaço de 0,1 mm, onde deverá ser colocado o material a examinar. Sôbre um dos cavaletes está gravado um círculo entre duas linhas, que é o disco calibrador, por meio do qual será facil ajustar o microscópio a fim de focalizar um campo microscópico precisamente de 1,382 mm de diâmetro. Área do campo: 1,5 mm<sup>2</sup>. Capacidade: 0,15 mm<sup>3</sup> (= 0,00015 cc.)

A lamínula tem 33 x 33 cents. e 2 mm de espessura.

(\*)O azul de algodão é um derivado trissulfonado da rosanilina, cuja fórmula segundo Tassart<sup>17</sup> é a seguinte:



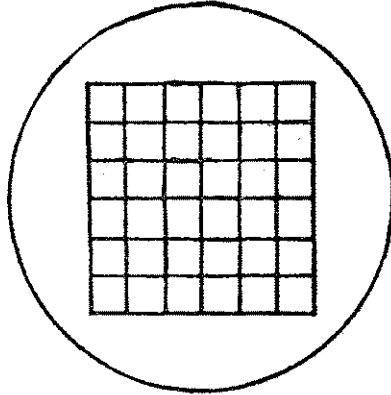


FIG. 20 — Disco micrométrico de Howard

É um disco de vidro transparente tendo gravado na parte central um quadrado que está subdividido em 36 quadrados. Cada um destes pequenos quadros representa exatamente  $1/6$  do campo microscópico, porquanto seis destes quadrados perfazem precisamente o diâmetro desse campo. Este disco é colocado no interior da ocular e é observado sobre o campo examinado, cobrindo inteiramente a sua superfície.

#### *Método operatório*

1) Diluir a amostra na proporção de 1:3. Para isto, toma-se um cálice graduado de 15 cc e, por meio de um bastão de vidro, mede-se 5 cc. da amostra, completando-se em seguida o volume de 15 cc. com solução de azul de algodão. Agita-se muito bem a fim de evitar a presença de grumos na diluição e até que esta se apresente perfeitamente homogênea.

2) Colocar, com o bastão, uma gota da diluição sobre a câmara de Howard e cobrir com a lamínula. Verificar que não haja extravasamento lateral do material a examinar, sobre a câmara, e si os anéis de Newton são notados, a fim de que se tenha uma preparação em condições de assegurar uma contagem precisa. Quando há perfeita juxtaposição de superfícies polidas, estes anéis, com as côres do arco-iris, se formam, devido a decomposição da luz.

3) Levar a preparação ao microscópio, contar 25 campos seguidos, anotando os positivos e negativos. Considera-se posi-

tivo um campo quando nele forem notados um ou vários filamentos micelianos ou, ainda, quando o comprimento do cogumelo presente ou a soma de três hifas, seja superior a  $1/6$  do campo.<sup>16</sup> Esta determinação é grandemente facilitada pela adaptação do disco micrométrico de Howard à ocular.

4) Carregar novamente a câmara e repetir a contagem.

5) Somar os campos positivos das duas contagens e multiplicar por 2 a fim de ser obtida a porcentagem de campos positivos.<sup>15</sup>

*Técnica B* — MÉTODO DE HOWARD — (Técnica por nós ensaiada).

*Material necessário:*

- 1) Microscópio equipado, etc., como o da Técnica A.
- 2) Câmara de Howard. (Fig. 19).
- 3) Disco micrométrico de Howard. (Fig. 20).
- 4) Balança.
- 5) Cálice graduado de 15 cc.
- 6) Bastão de vidro pequeno e fino (10 cents. x 3 mm.).
- 7) Corante — Solução alcoólica de tionina (cloridrato de diaminadifeniltiazina) a 1% ou  
Solução alcoólica de azul de algodão a 1%.

#### *Método operatório*

- 1) Pesar 5 grs. da amostra em um cálice tarado.
- 2) Adicionar 20 gotas de solução de tionina.
- 3) Agitar com um bastão por 2-3 minutos, até perfeita homogeneização.
- 4) Juntar água destilada até completar 15 cc.
- 5) Misturar bem.
- 6) Deixar em repouso por uns 10 minutos.
- 7) Carregar a câmara, usando o bastão, pois o uso deste é de maior conveniência para a uniformidade da técnica, por poder empregar-se em forma calibrada.
- 8) Praticar a contagem.

Com o intuito de se obter uma média mais exata, fizemos 4 preparações, nas quais se contaram 200 campos, ou sejam, 50 em cada uma. O total de campos positivos foi dividido por 2

para se computar a respectiva porcentagem. De posse dos dados correspondentes às determinações de densidade e de resíduo sêco, foram feitos os necessários cálculos para a obtenção dos resultados de campos positivos, primeiramente por gr. e por cc. da amostra analisada e, em seguida, para se referir a 1 gr. de matéria sêca.

Para a obtenção dos aludidos resultados, aplicar as seguintes formulas:

$$\text{Em 1 gr. da amostra: } \frac{\text{CP}}{\text{CN}} \times \frac{1}{0,00015} \times \frac{\text{Dil}}{\text{P}} = \text{G} \text{ donde}$$

CP = Campo positivo.

CN = Campo negativo.

0,00015 cc = Líquido examinado por campo.

1 = Para referir a 1 cc.

Dil = Diluição da amostra (em cc.).

P = Peso da amostra (em grs.).

G = Número de campos positivos por gr. da amostra.

Exemplo (Amostra n.º 3 — Suco)

$$\frac{17}{82} \times \frac{1}{0,00015} \times \frac{15}{5} = 4077 \text{ campos positivos por 1 gr. da amostra.}$$

Em 1 cc. da amostra: 1 : G :: D : X em que

1 = Referência a 1 gr. da amostra.

G = Número de campos positivos por 1 gr. da amostra.

D = Densidade da amostra.

X = Número de campos positivos por 1 cc. da amostra.

Exemplo (Amostra n.º 3 — Suco)

$$1 : 4077 :: 1,0086 : X = 4112 \text{ campos positivos por 1 cc. da amostra.}$$

Em 1 gr. de matéria seca: R : G :: 1 : X onde

R = Resíduo sêco de 1 gr. da amostra.

G = Número de campos positivos por 1 gr. da amostra.

1 = Referência a 1 gr. de matéria sêca.

X = Número de campos positivos por 1 gr. de matéria sêca.

Exemplo (Amostra n.º 3 — Suco)

$$0,043 : 4077 :: 1 : X = 94,813 \text{ campos positivos por 1 gr. de matéria sêca.}$$

## DESCRIÇÃO DAS AMOSTRAS

*Amostra n.º 1* — Foi obtida com 100% de tomates sãos. Frutos apresentando defeitos, amassados, moles ou partidos, foram rejeitados, a fim de se conseguir um suco, aparentemente puro ou com um teor mínimo de contaminação.

Foi evaporado até a obtenção dos extratos "a e b".

QUADRO N.º 1

AMOSTRA N.º	PRODUTO OBTIDO	DENSIDADE a+15°C	UMIDADE a+105°C % grs.	RESÍDUO SECO a+105°C % grs.	CAMPOS POSITIVOS por 1 cc.	CAMPOS POSITIVOS por 1 gr. Mat. úmida	CAMPOS POSITIVOS por 1 gr. Mat. seca	CAMPOS POSITIVOS Técnica — A —	CAMPOS POSITIVOS Técnica — B —
1	Suco	1.0079	95,250	4,750	402	399	8.489	2 %	2 %
	Ext.o a	1.0268	86,755	13,245	1.065	1.038	7.863	3 %	5 %
	Ext.o b	1.0444	60,580	19,420	1.795	1.719	8.860	5 %	8 %

*Amostra n.º 2* — Na confecção desse suco foram utilizados 75% de frutos sãos e 25 % de avariados. Foram obtidos os extratos "a e b".

QUADRO N.º 2

AMOSTRA N.º	PRODUTO OBTIDO	DENSIDADE a+15°C	UMIDADE a+105°C % grs.	RESÍDUO SECO a+105°C % grs.	CAMPOS POSITIVOS por 1cc.	CAMPOS POSITIVOS por 1gr. Mat. úmida	CAMPOS POSITIVOS por 1 gr. Mat. seca	CAMPOS POSITIVOS Técnica — A —	CAMPOS POSITIVOS Técnica — B —
2	Suco	1.0071	94,365	5,635	2.474	2.457	43.875	12%	11%
	Ext.o a	1.0216	89,763	10,237	3.880	3.798	37.235	15%	16%
	Ext.o b	1.0605	74,730	25,270	21.207	19.998	79.353	52%	50%

*Amostra n.º 3* — Esta amostra foi preparada com partes iguais desses frutos, ou seja, 50% de tomates sãos e 50% de avariados. Foram obtidos os extratos "a e b".

QUADRO N.º 3

AMOS- TRA N.º	PRODUTO OBTIDO	DENSIDADE a+15°C	UMIDADE a+105°C % grs.	RESÍDUO SECO a+105°C % grs.	CAMPOS POSITIVOS por 1 cc.	CAMPOS POSITIVOS por 1 gr. Mat. úmida	CAMPOS POSITIVOS por 1 gr. Mat. seca	CAMPOS POSITIVOS Técnica — A —	CAMPOS POSITIVOS Técnica — B —
3	Suco	1.0086	95,697	4,308	4,112	4,077	94,813	18 %	17 %
	Ext.o a	1.0226	89,160	10,840	9,611	9,399	87,027	36 %	32 %
	Ext.o b	1.0524	78 880	26,120	29,043	27,597	105,735	58 %	58 %

*Amostra n.º 4* — Constatou a preparação dessa amostra de 25% de frutos sãos e de 75% de avariados. Foram obtidos os extratos "a e b".

QUADRO N.º 4

AMOS- TRA N.º	PRODUTO OBTIDO	DENSIDADE a+15°C	UMIDADE a+105°C % grs.	RESÍDUO SECO a+105°C % grs.	CAMPOS POSITIVOS por 1 cc.	CAMPOS POSITIVOS por 1 gr. Mat. úmida	CAMPOS POSITIVOS por 1 gr. Mat. seca	CAMPOS POSITIVOS Técnica — A —	CAMPOS POSITIVOS Técnica — B —
4	Suco	1.0086	95,415	4 585	8.979	8.902	199.583	31 %	31 %
	Ext.o a	1.0161	92,250	7,750	13,317	13,106	170,207	40 %	40 %
	Ext.o b	1.0642	73,522	26,478	49,648	46,653	176,715	61 %	70 %

*Amostra n.º 5* — Foi preparada com 100% de frutos avariados. Foram obtidos os extratos "a e b".

QUADRO N.º 5

AMOS- TRA N.º	PRODUTO OBTIDO	DENSIDADE a+15°C	UMIDADE a+105°C % grs.	RESÍDUO SECO a+105°C % grs.	CAMPOS POSITIVOS por 1 cc.	CAMPOS POSITIVOS por 1 gr. Mat. úmida	CAMPOS POSITIVOS por 1 gr. Mat. seca	CAMPOS POSITIVOS Técnica — A —	CAMPOS POSITIVOS Técnica — B —
5	Suco	1.0067	94,820	5,180	19.325	19,197	376.411	49 %	49 %
	Ext.o a	1.0214	89,800	10,200	34.763	34,035	333.676	64 %	63 %
	Ext.o b	1.0354	85,560	14,440	55.956	54,054	375.375	70 %	73 %



*Amostra n.º 6* — Foi obtida com tomates completamente alterados, infestados, partidos, amassados, apresentando môfo visível e manchas escuras na superfície dos frutos. Deixou-se de proceder à evaporação do suco para a obtenção dos extratos "a e b", por desnecessária, visto ter a contagem de cogumelos atingido a 100% de campos positivos logo na primeira fase (suco).

QUADRO N.º 6

AMOSTRA N.º	PRODUTO OBTIDO	DENSIDADE a+15°C	UMIDADE a+105°C % grs.	RESÍDUO SECO a+105°C % grs.	CAMPOS POSITIVOS por c. c.	CAMPOS POSITIVOS por 1 gr. Mat. úmida	CAMPOS POSITIVOS por 1 gr. Mat. seca	CAMPOS POSITIVOS Técnica — A —	CAMPOS POSITIVOS Técnica — B —
6	Suco	1.0067	95,250	4,750	272.080	270.270	7.507.500	100 %	100 % 78 %*

\* Para se obterem os resultados que aparecem neste quadro, modificou-se a técnica B, pesando-se 1 gr. da amostra que ficou diluída em q.s. para 15 cc. de água destilada.

*Amostras de PRODUTOS COMERCIAIS* — Constataram de três *sucos* de tomate. Dêstes 3 produtos um era de procedência estrangeira e os outros dois de fabricação nacional.

QUADRO N.º 7

PRODUTO	ESPÉCIE	DENSIDADE a+15°C	UMIDADE a+105°C % grs.	RESÍDUO SECO a+105°C % grs.	CAMPOS POSITIVOS por 1 cc.	CAMPOS POSITIVOS por 1 gr. Mat. úmida	CAMPOS POSITIVOS por 1 gr. Mat. seca	CAMPOS POSITIVOS Técnica — A —	CAMPOS POSITIVOS Técnica — B —
Estrangeiro	Suco	1.0145	93,820	6,180	2.249	2.217	36.344	12 %	10 %
Nacional	Suco	1.0124	94,520	5,480	2.244	2.217	41.055	8 %	10 %
Nacional	Suco	1.0154	91,420	8,580	9.988	9.837	115.729	33 %	33 %

## QUADRO GERAL

AMOSTRA N.º	PREPARADA COM:	PRODUTO OBTIDO:	DENSIDADE a +15°C	UMIDADE a 105°C % grs.	RESÍDUO SECO a +105°C % grs.	CAMPOS POSITIVOS per 1 cc.	CAMPOS POSITIVOS per 1 gr. Mat. úmida	CAMPOS POSITIVOS per 1 gr. Mat. seca	CAMPOS POSITIVOS TÉCNICA A	CAMPOS POSITIVOS TÉCNICA B
1	Tomates Sãos 100%	Suco	1.0679	95,250	4.750	402	399	8.489	2 %	2 %
		Ext.º a	1.0268	86,755	13.245	1.065	1 638	7.863	3 %	5 %
		Ext.º b	1.0444	80 580	19.420	1.795	1.719	8.860	5 %	8 %
2	Tomates Sãos 75% Avariad. 25%	Suco	1.0071	94,365	5,635	2.474	2.457	43.875	12 %	11 %
		Ext.º a	1 0216	19.763	10,237	3.880	3.798	37.235	15 %	16 %
		Ext.º b	1.0605	74,730	25,270	21 207	19.998	79.353	52 %	50 %
3	Tomates Sãos 50% Avariad. 50%	Suco	1.0086	95 697	4,903	4.112	4.077	94.813	18 %	17 %
		Ext.º a	1.0226	89,160	10 840	9.611	9.599	87.027	36 %	32 %
		Ext.º b	1.0524	73,880	16,120	29.043	27.597	105.735	58 %	58 %
4	Tomates Sãos 25% Avariad. 75%	Suco	1.0086	95,415	4,585	8.979	8.962	199.533	31 %	31 %
		Ext.º a	1.0161	92,250	7,750	13.317	13.106	170.207	40 %	40 %
		Ext.º b	1.0642	73,522	26,478	49.648	46.653	176.715	61 %	70 %
5	Tomates Avariados 100 %	Suco	1.0067	94,820	5,180	19.325	19.197	376.411	49 %	49 %
		Ext.º a	1.0214	89,800	10,200	34.763	34.935	333.676	64 %	63 %
		Ext.º b	1.0354	85,560	14,440	55.956	54.054	375.375	70 %	73 %
6	Tomates Alterados 100 %	Suco	1.0067	95,250	4,750	272.080	270.270	7.507.500	100 %	100 %
Estrangeiro	Suco	1.0145	93,820	6,180	2.249	2.217	36.344	12 %	10 %	
Nacional	Suco	1.0124	94,520	5,480	2.244	2 217	41.055	8 %	10 %	
Nacional	Suco	1.0154	91,420	8 580	9.988	9.837	115.729	33 %	33 %	

\* Percentagem obtida com a diluição a 1: 15

## INTERPRETAÇÃO DO QUADRO GERAL

Convem recordar para os fins interpretativos dêste quadro, que os tomates considerados como avariados são os que apresentavam aspecto aparentemente suspeito, quer dizer, moles, amassados, porém inteiros e sem defeitos.

Os resultados da amostra n.º 1, provam de um modo manifesto que, produtos preparados à base de matéria prima selecio-

nada e emprêgo de processo higiênico, permitem a obtenção de uma porcentagem mínima de campos positivos, o que nos revela a sua ótima qualidade.

Ao contrário, na amostra n.º 2, observamos um aumento de campos positivos proporcional ao grau de seleção da matéria prima, que neste caso representa 25% de material avariado ou um grau de contaminação comparável. Consideramos que as cifras obtidas com essa amostra são as mais significativas e orientadoras para os fins de controle sanitário, porque representam o grau de contaminação máxima que pode indicar matéria prima devidamente selecionada e convenientemente elaborada. E' por isto que nas "Conclusões", sugerimos para os extratos de tomate não mais de 50% de campos positivos; para as massas, produtos cuja densidade oscila entre a dos sucos e dos extratos, 30% de campos positivos e, para os sucos, tomando em consideração o estabelecido a respeito, em outros paizes <sup>4</sup> <sup>10</sup>, recomendamos a cifra tolerável de 20% de campos positivos.

Os resultados que nos indica a amostra n.º 3, revelam proporcionalidade do grau de contaminação com a seleção da matéria prima, e ainda que estas cifras guardem certa relação com as anteriores, não exprimem uma diferença acentuada, como seria de esperar-se nessas contagens. Convem recordar neste sentido o apontado anteriormente com relação a tomates avariados, e à tolerância da cifra de 50% de campos positivos para os extratos.

As cifras obtidas com as amostras n.ºs 4 e 5 nos indicam a qualidade de produtos obtidos à base de uma matéria prima rejeitável, e por sua vez, poder evidenciar o exposto com respeito ao critério que sustentamos na "Discussão", referente ao definido como campo positivo.

A amostra n.º 6 foi preparada com o fim de observação, já que o material empregado se encontrava alterado, e portanto, impróprio sanitariamente para fins industriais. Neste caso, pôde-se observar a elevada porcentagem da contagem, que nos obrigou modificar a quantidade de amostra pesada segundo a técnica B (5 grs. em 15 cc.), por outra de diluição maior (1 gr. em 15 cc), para obter as cifras respectivas.

As análises das três últimas amostras também se fizeram a título de observação. As cifras apontadas por estas análises evidenciaram, uma vez mais, a necessidade de se fixar um máximo

de campos positivos para os sucos, de acôrdo com a sua qualidade. tal como indicamos anteriormente.

Ao expressar resultados sôbre matéria úmida (1 gr. e 1 cc), animou-nos o desejo de poder destacar as porcentagens obtidas em forma diferenciada que permitisse uma melhor apreciação, já que esta maneira de expressar as contagens, não obstante ser mais lógica, resulta menos prática. Contrariamente, as cifras que nos indicam a matéria sêca (1 gr.), têm grande importância porque nos refletem o grau de uniformidade que se observa nas contagens por êste método, já que estas cifras, por amostra (suco, extrato "a" e extrato "b") deveriam guardar relação constante.

Os resultados apresentados pelas contagens obtidas pelas técnicas A e B, apresentaram cifras aproximadas, conforme demonstra o respectivo gráfico (fig. 21), onde as linhas descritas, algumas vezes, chegam a ser quasi paralelas. Entretanto, os números referentes aos resultados da técnica B, encerram um conceito mais lógico de interpretação e mostram, com maior clareza, a perfeita relação existente entre o estado sanitário das amostras e as diversas determinações nelas procedidas.

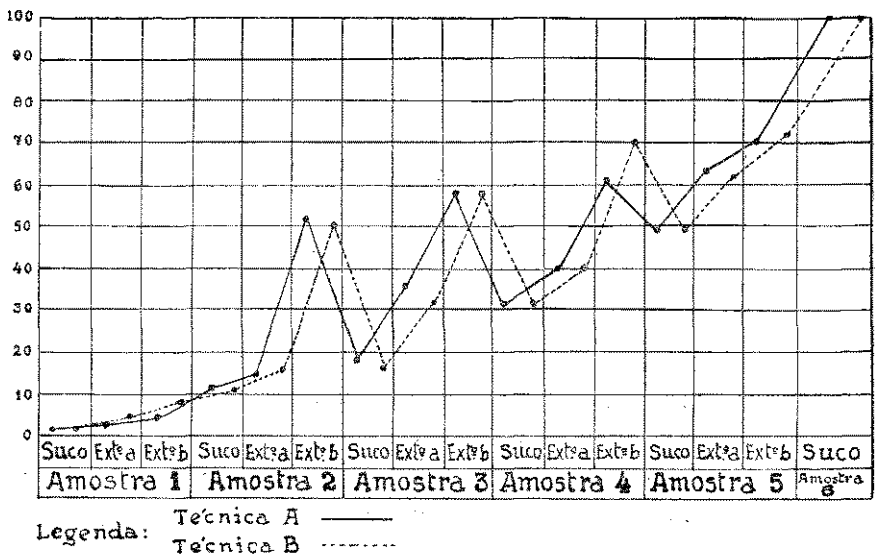


FIG. 21

Gráfico da aplicação das técnicas A e B, indicando, pelas linhas quasi paralelas, a proximidade dos resultados obtidos e o aumento gradativo de campos positivos, de acordo com o grau de contaminação das amostras.

## DISCUSSÃO

Com o objetivo de podermos chegar a resultados concludentes, procedemos nossas experimentações em produtos de tomate de composição conhecida. Para isto, as amostras utilizadas nesses ensaios, foram por nós preparadas, em número de seis e apresentavam todos os graus de contaminação julgados imprescindíveis à obtenção de resultados seguros e orientadores. Em cada amostra, depois de conhecido o número de filamentos micelianos do suco, procurámos verificar o progressivo aumento de cogumelos nos extratos "a e b".

Esta prática só se tornaria possível nas condições adotadas, porquanto com produtos comerciais jamais poderíamos chegar a conclusões satisfatórias, tendo-se em mira que o extrato de tomate está sujeito a uma série de fatores que favorecem a sua deterioração nas diversas fazes por que passa o produto industrial.

Notámos que a porcentagem de cogumelo existente no suco, aumenta geralmente de 2 a 4 vezes para o respectivo extrato "b", e que neste último, a porcentagem aumentada é inversamente proporcional à riqueza miceliana daquele. Desta forma, um suco de tomate contendo 2% de campos positivos dará um extrato "b" com 8%, ao passo que, um suco contendo 49% de campos positivos dificilmente apresentará um extrato final com contagem superior a 73% de campos positivos. (Ver quadros 1 e 5).

Consideramos que tal fato tenha origem em um dos princípios básicos do método, ao definir o que se entende por campo positivo. Um exemplo simples aclararia esta situação ao supormos que a contagem de um suco nos desse 50% de campos positivos, tendo em geral 1 a 2 filamentos de cogumelo por campo. Ao se concentrar êste suco a 50% gr. e praticar nova contagem, seriam encontrados 70% de campos positivos, observando-se na maioria dos campos positivos 4 a 5 filamentos micelianos, o que explica a falta de proporcionalidade nos resultados obtidos. (Microfoto, 22).

Desta forma, a amostra de um suco de tomate com 100% de campos positivos, apresentaria idêntica porcentagem para os seus extratos "a e b", com a única diferença, do aumento, em cada campo positivo, do número de filamentos micelianos.

Entretanto o aumento de campos positivos em sucos de escassa contaminação, guarda certa proporção nos concentrados dos mesmos (extratos "a e b") devido não somente ao número de campos negativos tornados em positivos, como também a que, nestes extratos, podem manter-se os campos positivos com a presença de 1 a 2 filamentos por campo. (Microfoto, 23).

As seis amostras analisadas apresentavam os seguintes característicos:

N.º 1	—	preparada com 100%	de tomates	sãos e	escolhidos.
N.º 2	—	"	"	25%	" " avariados.
N.º 3	—	"	"	50%	" " "
N.º 4	—	"	"	75%	" " "
N.º 5	—	"	"	100%	" " "
N.º 6	—	"	"	100%	" " alterados

Por tomates avariados consideramos os frutos, moles, amassados, praticamente contaminados, porém inteiros, sem defeitos notórios, e por alterados, os completamente infestados, partidos, amassados, apresentando princípio de fermentação, visível infiltração de mofo e manchas escuras na parte externa.

Com as amostras preparadas com tomates avariados (n.ºs 2 a 5), a contagem não ultrapassou a cifra de 73% de campos positivos no extrato "b", enquanto que na de n.º 6, em que figuravam somente frutos alterados, o número de micélios de cogumelo atingiu a 100% logo na primeira fase (suco). Deixamos, por este motivo, de submeter o produto à concentração até o estado de extrato, ficando entretanto evidenciado a impraticabilidade do aproveitamento de frutos desta natureza para fins industriais. (Microfoto, 24).

A fim de ser possível a computação do número de cogumelos existentes nesta amostra, fizemos a respectiva diluição pesando 1 gr. do suco para 15 cc de água destilada, ao em vez de 1:3 como foi usada para as técnicas A e B das demais amostras, alcançando-se ainda a cifra elevada de 73% de campos positivos.

Procedemos a todas as provas analíticas, três sucos de tomate do comércio, tendo sido os dois primeiros enquadrados entre os produtos de boa qualidade pelas baixas contagens apresentadas e o último, pelo número de campos positivos suficientemente elevado (33%), como produto condenável. (Ver Quadro n.º 7).

A aplicação da solução corante, em gotas, sobre o material a examinar, seguida da adição de água destilada, deu melhores re-

sultados por apresentar maior nitidez e corar suave e uniformemente todos os elementos do campo microscópico, mantendo este último claro e sem refringência, o que facilita grandemente a identificação pelo perfeito contraste apresentado. (Fig. 3).

Esta foi a técnica por nós ensaiada e que recomendamos pelos ótimos resultados que nos permitiu alcançar.

A diluição feita por este processo é de consistência fluida, não acontecendo o mesmo com a obtida por meio da solução de azul de algodão (técnica A), que tem por veículo o lactofenol — líquido bastante denso e refringente.

Temos a impressão de que isto concorreria não só a uma deficiente homogeneidade do meio, como a possível flutuação de microrganismos nele existentes, notando-se que o campo aparece intensamente corado e denso, o que dificulta a observação da presença de filamentos micelianos.

O emprêgo da solução alcoólica de azul de algodão a 1% deu idênticos resultados aos apresentados pela solução alcoólica a 1% de tionina (técnica B).

Não foi constatada diferença sensível entre a contagem de 25 ou 50 campos para ser calculada a porcentagem de campos positivos com micélios de cogumelo dos diversos produtos do tomate.

#### CONCLUSÕES

Do conjunto de observações feitas durante o experimento a que nos propuzemos, chegámos às seguintes conclusões:

1.º) Não se pode adotar um mesmo critério de tolerância ao estabelecer um limite máximo de campos positivos para produtos de tomate de diferentes densidades como são o suco, as massas e os extratos.

2.º) O aumento de campos positivos guarda certa proporcionalidade com a concentração dos produtos obtidos de uma mesma matéria prima.

3.º) A tomada de amostra para a preparação da diluição destinada à contagem, deve ser feita por pesada, por ser este processo mais exato e prático e ainda, por facilitar a expressão dos resultados obtidos por gramo de amostra, quando isto se torne necessário.

4.º) O uso de um corante para cogumelos favorece a observação microscópica e contribue eficazmente para a exatidão da contagem.

5.º) A técnica B, por nós ensaiada, deu resultados melhores e mais seguros, o que nos anima a aconselhar sua aplicação.

6.º) A porcentagem de campos positivos obtida contando 25 ou 50 campos por carga de câmara, acusa resultados aproximados para os efeitos dêste método.

7.º) Baseados nestes fatos consideramos necessária e justa a fixação das seguintes cifras limites para os diversos produtos de tomate:

- a) *Sucos* ..... até 20% de campos positivos.
- b) *Massas comuns* (substância sêca entre 10% e 16%) — até 30% de campos positivos.
- c) I — *Extrato simples* (substância sêca entre 16% e 28%) } até 50%  
 II — *Extrato duplo* (substância sêca entre 28% e 33%) } de campos  
 III — *Extrato triplíce* (substância sêca acima de 33%) } positivos

Queremos aquí deixar consignados os nossos sinceros agradecimentos ao Dr. Bruno Rangel Pestana, Chefe da Subdivisão de Bromatologia e Química do Instituto "Adolfo Lutz", pela solicitude e valiosa colaboração, proporcionando-nos os meios necessários à realização dêste trabalho; ao Dr. Hélio Martins, Chefe da Secção de Controles Biológicos e D. Olivia de Godoy, Chefe da Sub-Secção de Microscopia Alimentar, pela gentileza de tornarem possíveis nossos experimentos; e aos colegas Sr. Jordano Maniero e Ds. Cordelia Nobrega Duarte, Vicentina da Cunha Fleury Corrêa e Lygia Arantes Dantas, pela eficiente colaboração.

#### RESUMO

Os autores procuram estudar e sugerir algumas observações à técnica de Howard para contagem microscópica de cogumelos nos produtos de tomate, e, bem assim, lembrar a necessidade da fixação, em nosso Código Bromatológico, de uma cifra limite de campos positivos com micélios de cogumelo para tais produtos, de conformidade com suas densidades.

Referem às críticas ao método de Howard e procuram esclarecer todos os detalhes em que há, ainda, dificuldades na interpretação, ilustrando-os com desenhos e microfotos.



Fazem um estudo botânico e microscópico do tomate e dos cogumelos que o atacam nas diversas fazes de elaboração do produto industrial.

A parte experimental foi feita nos laboratórios do Instituto Adolfo Lutz, partindo de 6 amostras de sucos de tomate, diversamente contaminadas e submetidas à evaporação em estufa a 55-60.º C, primeiramente à metade e, em seguida, a 1/8 do seu volume inicial, até consistência dos extratos e massas comerciais. Em todos os estágios a amostra passou pelas seguintes provas analíticas: determinação da umidade, do extrato sêco, da densidade e contagens microscópicas de cogumelos, pelas técnicas A e B.

*Técnica A* — Método de Howard — modificação de Rivas.

*Técnica B* — Método de Howard (modificado) — na qual, à amostra previamente pesada (e não medida), juntam-se 20 gotas de solução alcoólica de tionina a 1%, para em seguida fazer-se a diluição com água destilada.

Esta técnica, ensaiada pelos autores, deu ótimos resultados não só pela uniforme coloração de todos os elementos do campo microscópico, como por manter-se êste bastante claro e sem refringência.

Apresentam varios quadros em que resumem os trabalhos e fazem sua interpretação.

Do conjunto de suas observações os autores chegaram às seguintes conclusões:

Não se pode adotar somente uma cifra de tolerancia de campos positivos para todos os produtos de tomate.

O aumento de campos positivos guarda proporcionalidade com a concentração do produto.

A amostra deve ser pesada (gr.) e não medida (cc.) ao se fazer a diluição.

O uso de um corante favorece a observação microscópica.

A contagem de 25 ou 50 campos por carga de camara dá resultados aproximados.

Consideram necessária e justa a fixação das seguintes cifras limites para os diversos produtos de tomate:

Sucos .....	até 20% de campos positivos.
Massas comuns .....	até 30% de campos positivos.
Extratos (simples, duplo e tríplice) .....	até 50% de campos positivos.

## ABSTRACT

The authors try to study and suggest some observations to Howard's technique for the microscopic count of fungi in tomato products and at the same time consider the necessity of determining, in our Bromatological Code, a limit for the number of positive fields with mycelii of fungi for these products, according to their density.

The observations refer to Howard's method and try to point out all the details in which there are yet difficulties in the interpretation, illustrating these with designs and photomicrographs.

There is made a botanical and microscopical study of the tomato and of the fungi which attack it during the different phases of the elaboration of the industrial product.

The experimental part was made in the laboratories of the Instituto Adolfo Lutz, starting with 6 samples of tomato juice, differently contaminated and submitted to evaporation in the incubator at 55-60°C, first to half and afterwards to 1/8 of its initial volume, so as to obtain the consistency of commercial extracts and pastes.

In all the phases the sample has passed the following analytical procedures: determination of moisture, of dry extract, of density and microscopic count of the fungi, by the techniques A and B.

*Technique A* — Howard's method — modified by Rivas.

*Technique B* — Howard's method (modified) in which to the sample previously weighed (and not measured) there were added 20 drops of an alcoholic solution of tionine at 1%, and afterwards there was made a dilution with distilled water.

This technique, tried out by the authors, gave excellent results not only because of the uniform coloring of all the elements of the microscopic field, but also because of the fact that it remained fairly clear and without refraction.

There are given various tables with abstracts of the experiments and their interpretation.

As a result of their observations the authors came to the following conclusions:

There should not be adopted only one figure of tolerance of positive fields for all tomato products.

The increase of positive fields maintains a certain proportionality with the concentration of the product.

The sample should be weighed (gr.) and not measured (ml.) when the dilution is made.

The use of a coloring matter favors the microscopical observation.

The count of 25 or 50 fields for each mount gives approximate results.

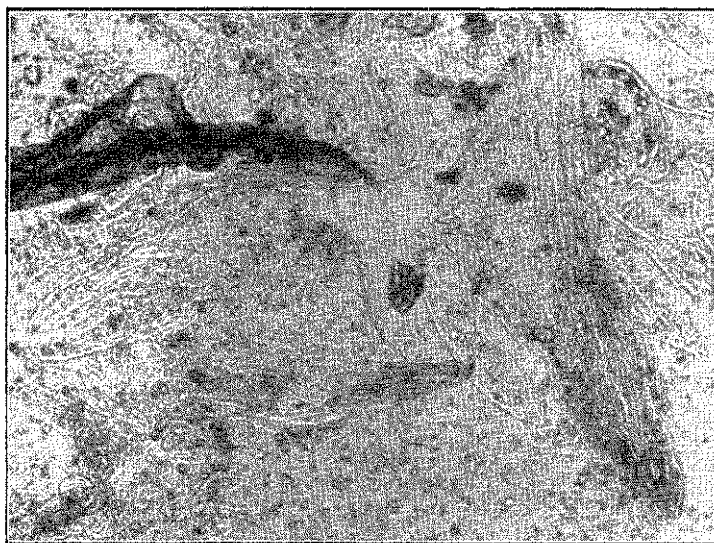
The authors consider as necessary and justified the fixation of the following limits for the various tomato products:

Juices .....	up to 20% of positive fields
Common pastes....	up to 30% of positive fields
Extracts	
(Simple, double and triple) .....	up to 50% of positive fields.

#### BIBLIOGRAFIA

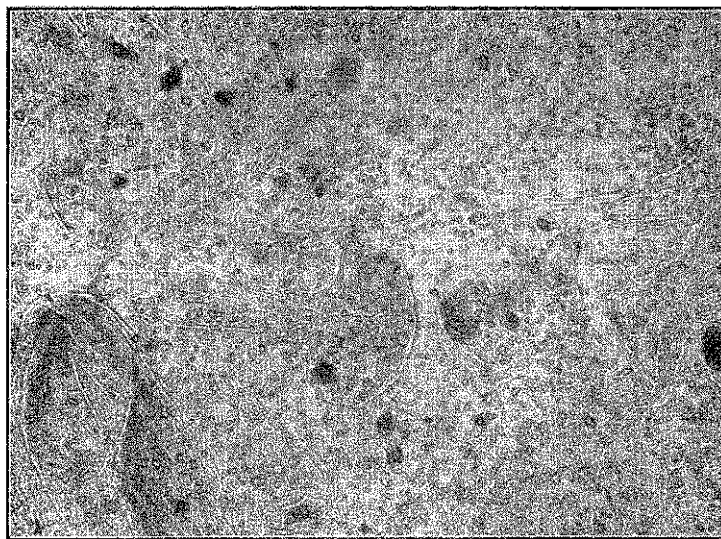
- 1 — AINSWORTH, G. C. & BISBY, G. R. — 1943 — A dictionary of the fungi. Kew, Surrey, The Imperial Mycological Institute.
- 2 — Association of Official Agricultural Chemists — 1945 — Methods of analysis. Washington D. C., 6th. ed.: p. 766-791.
- 3 — BARROS, L. A. de ALENCAR — 1944 — Compêndio de botânica geral e sistemática. S. Paulo, Editora Clássico-Científica, p. 94-103.
- 4 — Código bromatológico y regulamentacion de los productos de consumo en general — 1944 — Santa Fé, Editorial Legislacion y Jurisprudencia, p. 130.
- 5 — FERREI, MARIO G. e JOly, AYLTON B. — 1948 — Partenocarpia induzida com o ácido B-naftóxi-acético. S. Paulo, Bol. Fac. Fil. Ciênc. Letras, 18 (6) p. 22.
- 6 — Food and Drug Administration — 1944 — Microanalysis of food and drug products. Washington, Food and Drug Circular n. 1.
- 7 — HAYNES — 1941 — Canning age, n. 8, p. 438-458.
- 8 — LORENA, BERNARDO — 1937 — Cultura do tomateiro. S. Paulo, Dir. Pub. Agr. Secr. Agr. Ind. Comércio, p. 25-28.
- 9 — POTSCHE, WALDOMIRO — Botânica Rio de Janeiro, Liv. Francisco Alves, p. 250-261.
- 10 — Reglamento bromatológico de la Provincia de Buenos Aires — 1944 — Plata, Tercera edicion, p. 150.
- 11 — RIVAS, J. G. — 1937 — Bol. de Frutas y Hortalizas del Minist. de la Nacion, 2 : 1.

- 12 — SCHNEIDER, A. — 1920 — The microanalysis and microbiology of foods. Philadelphia, P. Blakiston's Son & Co., p. 176.
- 13 — SILVEIRA, V.D. — 1946 — Lições de micologia. Rio de Janeiro, Liv. Kosmos Editora.
- 14 — SMITH, G. — 1942 — An introduction to industrial mycology. London, Edward Arnold & Co., 2nd. ed., p. 2-3.
- 15 — SOUTO, A.B. e Godoy O. — 1942 — Investigações sôbre produtos de tomate. S. Paulo, Rev. Inst. Ad. Lutz, 1 (15) p. 100-179.
- 16 — TANNER, F.W. — 1944 — Microbiology of foods. Champaign, Ill., Gerrard Press, 2nd. ed. p. 674-692.
- 17 — TASSART, C.L. — 1890 — Les matières colorantes et la teinture. Paris, J.B. Baillièrre et Fils, p. 102.
- 18 — WINTON, A.L. & Winton, K.B. — 1935 — The structure and composition of foods. New York, John Wiley & Sons. Inc. v. 2, p. 404-416.



MICROFOTO 1

Células de tomate, cujos bordos podem estabelecer confusão com micélicas de cogumelo. Ao centro vê-se uma hifa com o comprimento de  $\frac{1}{6}$  do diâmetro do campo microscópico. (160 x)



MICROFOTO 2

Hifa de cogumelo pousando sobre a extremidade de uma célula de tomate. (160 x)

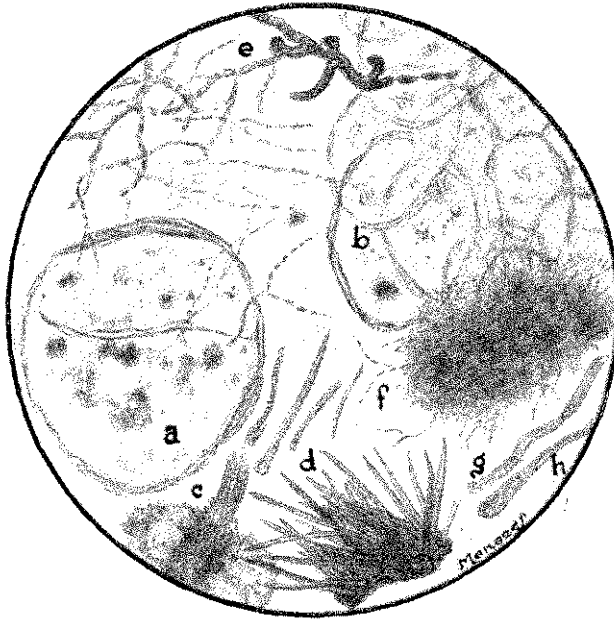


Fig. 3

Elementos histológicos de tomate e filamentos micelianos, corados pela técnica B. (100 x)

a) célula do mesocarpo do tomate apresentando alguns cogumelos na sua superfície; b) parênquima do mesocarpo do tomate; c) feixes de vasos espiralóides; d) falsos pêlos do episperma da semente; e) vários tipos de micélio de cogumelo; f) grumo de produto de tomate infiltrado por micélio finíssimos; g) fibra de algodão; h) pêlo pluricelular da superfície do caule, ramos, calice e folhas do tomateiro, encontrado acidentalmente nos produtos de tomate. (Original)

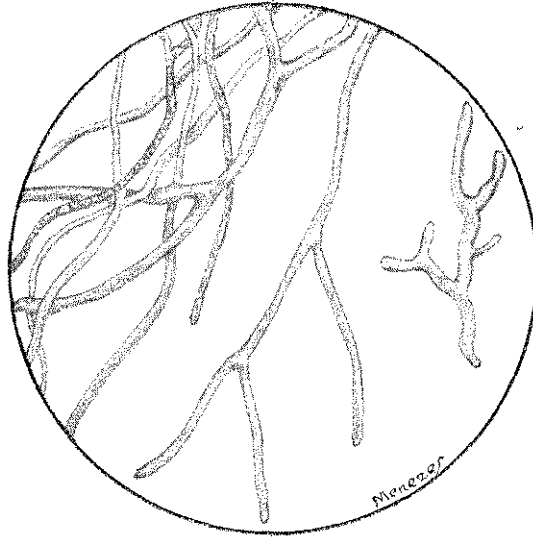


FIG. 4  
Micélicos unicelulares (ficomicetos). (200 x)

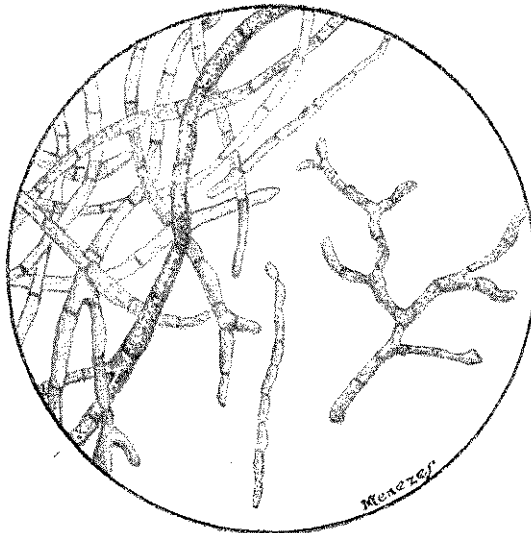
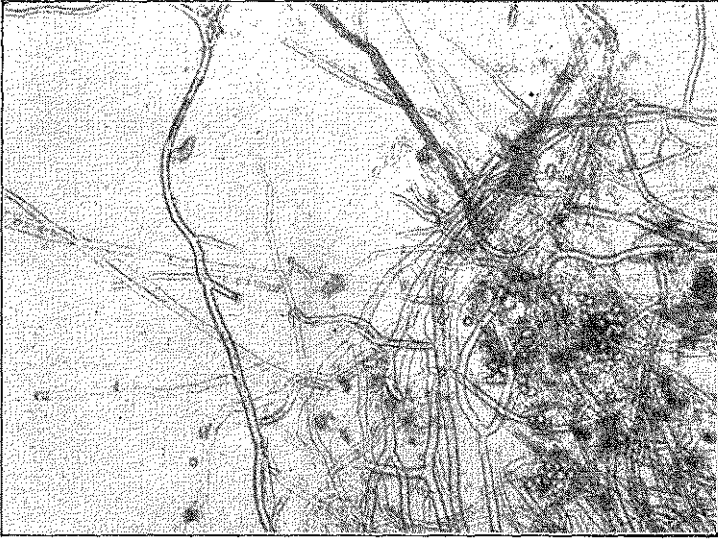


FIG. 5  
Micélicos septados. (200 x)



MICROFOTO, 6

Campo microscópico mostrando um bloco de micélios de cogumelo e levedura, em extrato de tomate. (160 x).



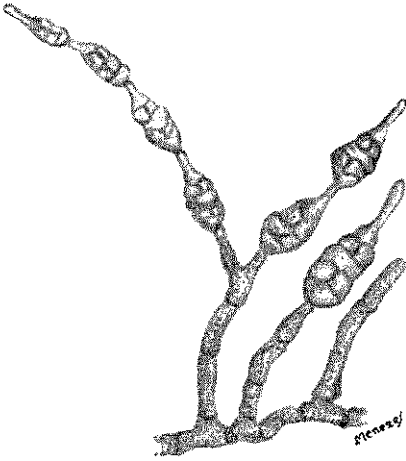


FIG. 7 — Alternaria

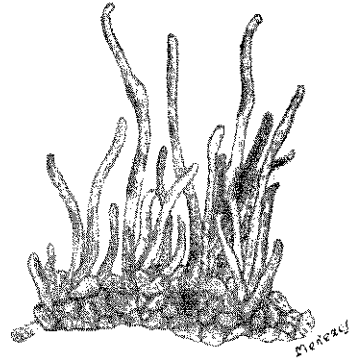


FIG. 8 — Colletotrichum

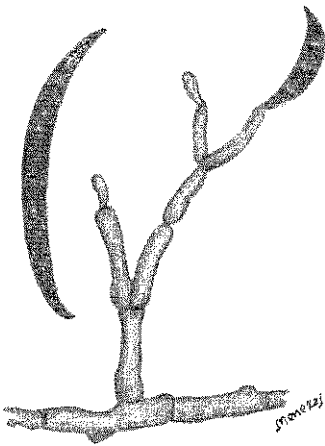


FIG. 9 — Fusarium

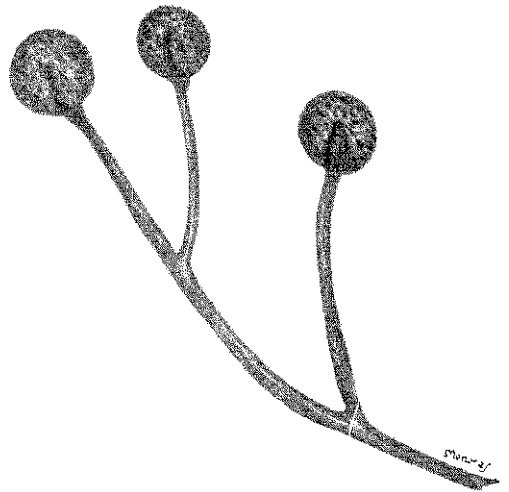


FIG. 10 — Mucor

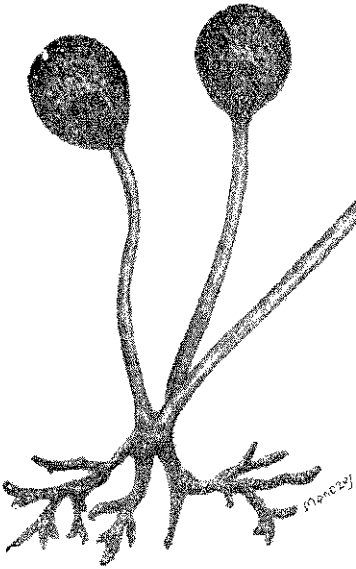


FIG. 11 — Rhizopus

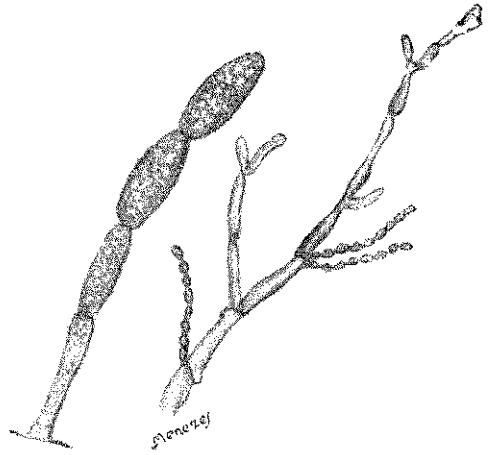


FIG. 12 — Oidium

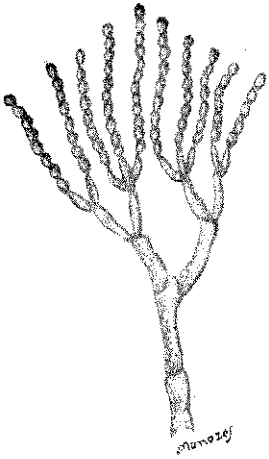


FIG. 13 — Penicillium

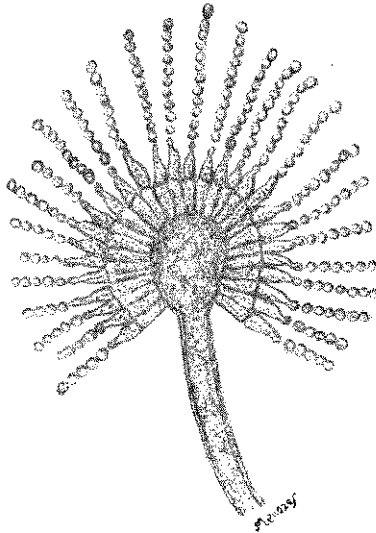


FIG. 14 — Aspergillus

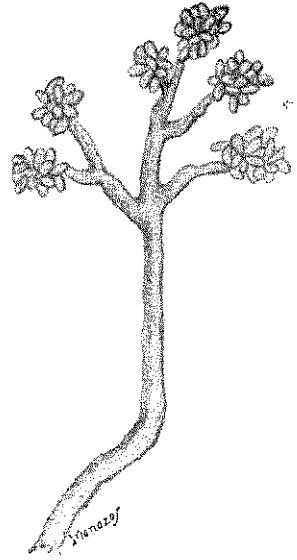


FIG. 15 — Botritis

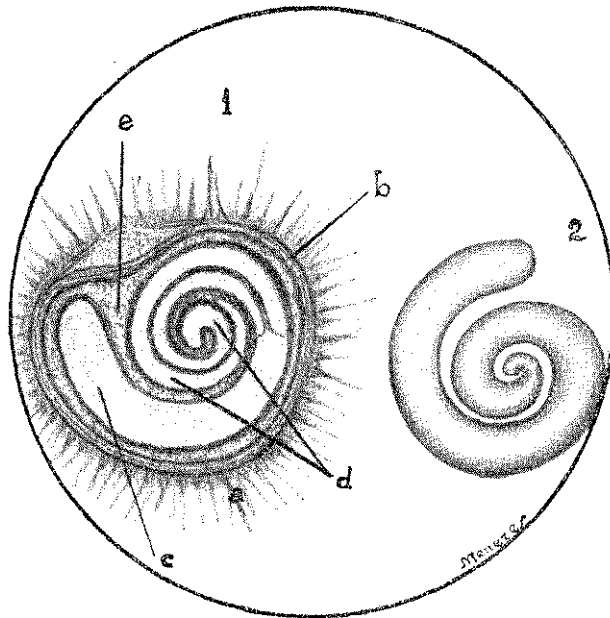


FIG. 16

*Semente de tomate (25 x)*

- 1 — (côrte longitudinal) — a — falsos pêlos; b — epis-perma; c — radícula; d — cotilédones; e — endos-perma.  
 2 — Embrião, destacado dos demais elementos da semente. (Original).

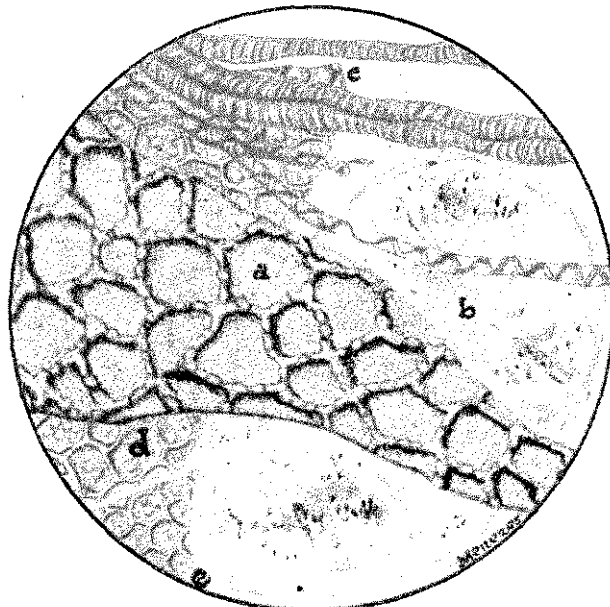


FIG. 17

*Elementos histológicos de tomate (400 x).*

- a) Epicarpo; b) Célula do mesocarpo com matéria coarante e grãos de amido alterados pelo calor; c) dutos espiralôides; d) endosperma; e) embrião. (Original).

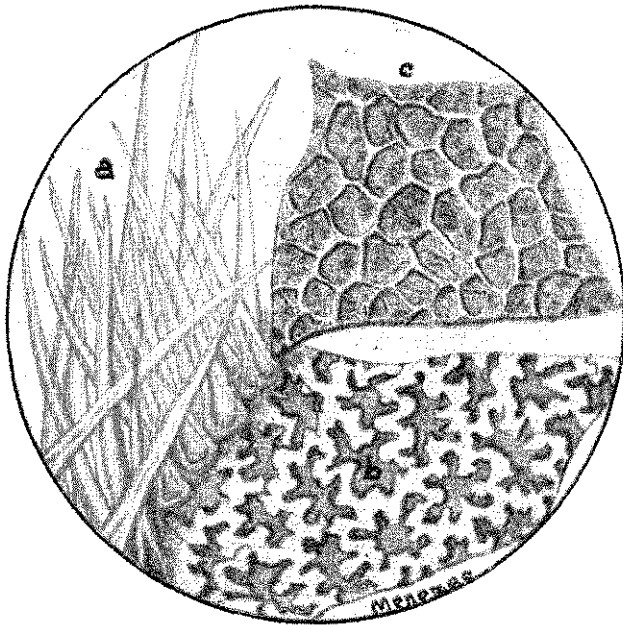
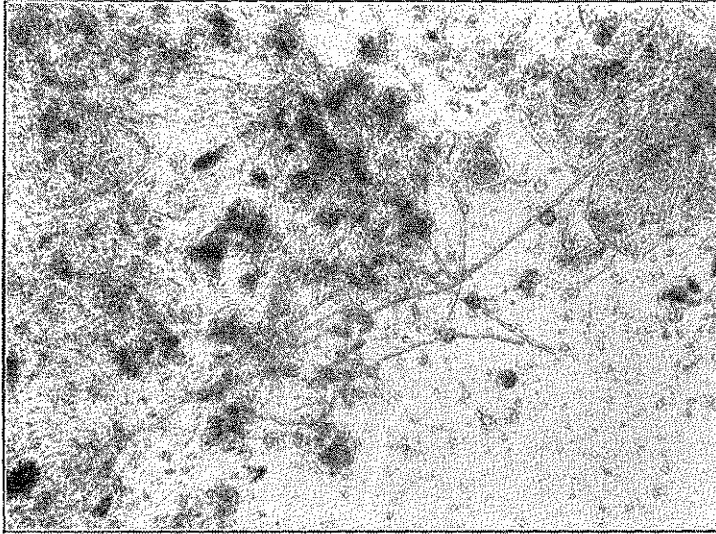


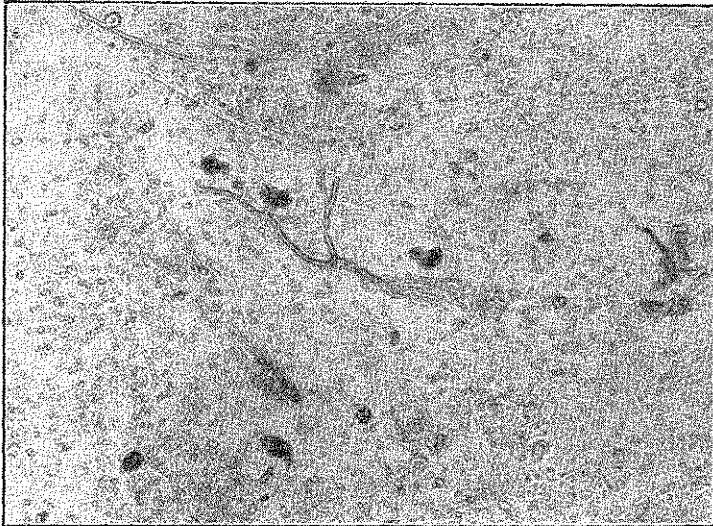
FIG. 18

*Semente de tomate*

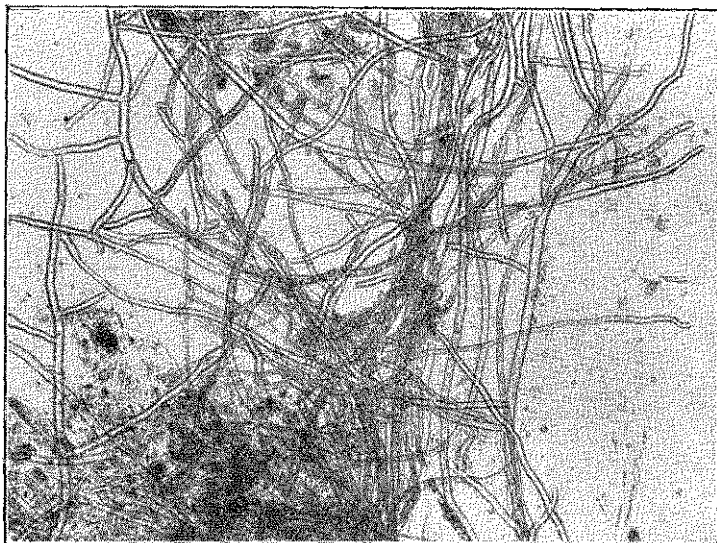
Elementos histológicos do episperma — a) falsos pêlos;  
b) camada externa; c) camada interna ou perisperma.  
(400 x) Original.



MICROFOTO N.º 22.  
Campo com poucos micélios de cogumelo. (160 x)



MICROFOTO N.º 23  
Campo pouco contaminado (2 filamentos micelianos). Neste campo pode-se observar a semelhança existente entre os filamentos de cogumelo e os de tomate. (160 x).



MICROFOTO N.º 24  
Campo riquíssimo em filamentos micelianos (produto muito con-  
taminado). 160 x.