FERNANDA DE MELO LIMA BRUGNANO

**Identificação da espécie animal em amostras de carne
através da reação em cadeia pela polimerase: o método de
controle de fraudes em alimentos**

São Paulo

2010

FERNANDA DE MELO LIMA BRUGNANO

**Identificação da espécie animal em amostras de carne através da
reação em cadeia pela polimerase: o método de controle de fraudes
em alimentos**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Departamento:

Medicina Veterinária Preventiva e Saúde
Animal

Área de Concentração:

Epidemiologia Experimental Aplicada às
Zoonoses

Orientadora:

Profa. Dra. Simone de Carvalho Balian

São Paulo

2010

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virginie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da
Universidade de São Paulo)

T.2254
FMVZ

Brugnano, Fernanda de Melo Lima

Identificação da espécie animal em amostras de carne através da reação em cadeia pela polimerase: o método de controle de fraudes em alimentos / Fernanda de Melo Lima Brugnano. -- 2010.

113 f. : il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal, São Paulo, 2010.

Programa de Pós-Graduação: Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses.
Área de concentração: Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses.

Orientador: Profa. Dra. Simone de Carvalho Balian.

1. Inspeção dos produtos de origem animal. 2. Saúde pública. 3. PCR. 4. Vigilância Sanitária de Alimentos. 5. Fraude em alimentos. I. Título.

PARECER

Interessado: Fernanda de Melo Lima Brugnano

Assunto: Protocolo de experimentação adotado em experimento animal.

A Comissão de Ética no uso de animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, reunida no dia 20/01/2010, analisou o projeto protocolado sob o número 1866/2009, intitulado: "Identificação da espécie animal em amostras de carne através da reação em cadeia pela polimerase: o método como controle de fraudes em alimentos", no qual foram utilizadas cinco amostras de carne (bovina, suína e canina), totalizando 15 amostras, fornecidas pela Vigilância Sanitária, sob a responsabilidade da Profa Dra Simone de Carvalho Balian, constatou que o mesmo foi realizado de acordo com os princípios de ética adotados por esta Comissão.

São Paulo, 21 de janeiro de 2010

Profa Dra Denise Tabacchi Fantoni
Presidente

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autor: BRUGNANO, Fernanda de Melo Lima

Título: Identificação da espécie animal em amostras de carne através da reação em cadeia pela polimerase: o método de controle de fraudes em alimentos.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____	Instituição: _____
Assinatura: _____	Julgamento: _____

Prof. Dr. _____	Instituição: _____
Assinatura: _____	Julgamento: _____

Prof. Dr. _____	Instituição: _____
Assinatura: _____	Julgamento: _____

DEDICATÓRIA

Ao meu querido esposo, **Waldemar Brugnano Júnior**, ao meu filho precioso,
Enrico de Melo Brugnano, pela paciência, apoio e amor.

A minha mãe, **Vera Luzia Sargo de Melo Lima**, pelo incentivo e exemplo de
persistência e dedicação aos estudos.

AGRADECIMENTOS

A minha orientadora **Profa. Dra. Simone de Carvalho Balian**, pela confiança, incentivo, amizade. Enfim, pelo ser humano especial e iluminado que é...

Ao **Prof. Dr. Paulo Eduardo Brandão**, a quem considero também como orientador... pelos ensinamentos, apoio contínuo, paciência, sugestões e pelo grande exemplo.

Ao **Prof. Dr. Leonardo José Richtzenhain** por ter me permitido fazer parte do Labmas.

À **Profa. Dra. Evelise de Oliveira Telles**, pela atenção, ajuda nos momentos difíceis, sugestões e amizade.

Ao **Prof. José Antonio Jerez**, por quem tenho grande admiração, pela amizade e apoio para iniciar o mestrado.

Ao **Prof. Dr. Pedro Manuel Leal Germano**, da Faculdade de Saúde Pública, pelos valiosos ensinamentos. Desde 2004, com a Especialização em Vigilância Sanitária de Alimentos, contribuiu para meu interesse e paixão pela área.

À **Dra. Evanise Segala Araújo**, **Dra. Andréa Barbosa Boanova**, **Dra. Celina Barbosa da Silva Dinitzen**, da Coordenação de Vigilância em Saúde, do Município de São Paulo, pela receptividade, amizade e parceria.

Aos técnicos **Sheila Oliveira de Souza Silva**, **Orlando Bispo de Souza**, **Sandra Abelardo Sanches** e **Gisele Oliveira de Souza**, pela colaboração e amizade.

Prof. Dr. Glavur Rogerio Matté e **Profa. Dra. Maria Helena Matté**, da Faculdade de Saúde Pública, pelo conhecimento e aulas sem igual.

Ao **Prof. Dr. Rodrigo Martins Soares**, pelas importantes sugestões.

Ao **Prof. Dr. Sílvio de Arruda Vasconcellos**, pela receptividade, exemplo e dedicação ao Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal.

Aos meus queridos **Maria Fernanda Vianna Marvulo e Jean Carlos Ramos Silva**, por esses mais de dez anos de amizade, pelo incentivo e ajuda para iniciar o mestrado.

À pesquisadora **Alessandra Marnie Martins Gomes de Castro** pela amizade e apoio.

A todos os **Professores, Funcionários e Pós-graduandos do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal**, pela convivência harmoniosa.

Ao **Departamento de Clínica Médica (VCM) e de Patologia (VPT)**, pelas amostras.

À **Cristina, Virgínia e Danival**, da Secretaria do VPS, pela amizade e colaboração.

À **Comissão de Bioética e Roseli da Costa Gomes**, Secretária da Comissão, pela ajuda e compreensão.

À **Claudia Lima, Tânia Delonero, Daura, Carlos e Joana**, da Secretaria da Pós-Graduação, por todo auxílio.

À **Elza Faquim**, da Biblioteca, da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, pela atenção e colaboração para finalizar a dissertação.

Ao **CAPES** pela bolsa de estudo e a **FAPESP** pelo auxílio à pesquisa (processo nº2008/58051-1).

A Deus, pelo fortalecimento contínuo e por iluminar **SEMPRE** o caminho.

***“... o saber não está na ciência alheia, que se absorve, mas,
principalmente, nas idéias próprias que se geram dos
conhecimentos absorvidos, mediante a transmutação,
por que passam, no espírito que os assimila.
Um sabedor não é um armário de sabedoria armazenada,
mas transformador reflexivo de aquisições digeridas...”***

Rui Barbosa.

RESUMO

BRUGNANO, F. M. L. **Identificação da espécie animal em amostras de carne através da reação em cadeia pela polimerase:** o método de controle de fraudes em alimentos. [Identification of animal species for meat samples through the polymerase chain reaction: the food fraud control method.]. 2010. 113 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

O presente estudo teve por objetivos padronizar a reação em cadeia pela polimerase (PCR) para a identificação da espécie bovina, suína e canina em amostras de carne utilizando diferentes concentrações (0% 0,001%, 0,01%, 0,1%, 1%, 10%, 25%, 50%, 75%, 100%); analisar as amostras provenientes de vistorias realizadas pela Coordenação de Vigilância à Saúde (COVISA) do Município de São Paulo e, aferir os custos do método para oferecer como atividade de extensão, as análises laboratoriais. Na padronização o limite mínimo de detecção foi de 0,1% para material bovino, 0,01% para suíno e 10% para cão. É necessário aprimorar a técnica na identificação de cães e testar outros primers, além de padronizar outras espécies. Cinquenta e três amostras foram encaminhadas pela COVISA, sendo analisadas e obtendo os seguintes resultados: 60% bovina, 19% suína, 13% espécie não foi identificada (falta do primer específico) e em 8% ocorreu algum tipo de contaminação da amostra, provavelmente no estabelecimento vistoriado (contaminação cruzada). O custo final da reação para três espécies foi de R\$ 100,47 sendo R\$ 55,27 (55,01%) correspondente aos reagentes e R\$ 45,20 (44,99%) referente a mão de obra. O tempo médio para obtenção dos resultados foi de 9h03'23'', estimado sem qualquer contaminação ou repetição de etapa.

Palavras-chave: Inspeção dos produtos de origem animal. Saúde pública. PCR. Vigilância Sanitária de Alimentos. Fraude em alimentos.

ABSTRACT

BRUGNANO, F. M. L. **Identification of animal species for meat samples through the polymerase chain reaction**: the food fraud control method. [Identificação da espécie animal em amostras de carne através da reação em cadeia pela polimerase: o método de controle de fraudes em alimentos]. 2010. 113 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

The present study aimed at standardizing the reaction polymerase chain (PCR) for the identification of bovine, porcine and canine meat samples using different concentrations (0% 0.001%, 0.01%, 0.1%, 1%, 10%, 25%, 50%, 75%, 100%); at analyzing samples originated from inspections made by the Health Surveillance Coordination (COVISA) of São Paulo, and at evaluating method costs in order to offer laboratorial analyses as an extension activity. In the standardization, the minimum detection limit was of 0.1% for bovine, 0.01% for porcine and 10% for canine material. It is necessary to improve the identification technique in dogs and to test other primers, in addition to standardizing other species. Fifty-three samples were sent by COVISA, and after analysis the following results were obtained: 60% were from bovines, 19% from porcines and 13% from non-identified species (lack of specific primer) in addition to some sort of contamination, probably from the inspected establishment, occurred in 8% of the samples (cross contamination). The final cost of the reaction for the three species was R\$ 100.47, out of which R\$ 55.27 (55.01%) corresponded to reagents and R\$ 45.20 (44.99%) to work labor. The average time for obtaining results was 9h03'23", estimated without the occurrence of any contamination or repetition of the step.

Keywords: Inspection of products of animal origin. Health. PCR. Surveillance of Food. Fraud in food.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 –	Membro posterior bovino.....	44
Figura 2 –	Músculos superficiais do membro pélvico de bovino: vista lateral.....	45
Figura 3 –	Músculos superficiais do membro pélvico de suíno: vista lateral	45
Figura 4 –	Músculos superficiais do membro pélvico de cão: vista lateral...	46
Figura 5 –	Amostras da COVISA lacradas.....	47
Figura 6 –	Termo de coleta da amostra (TCA) da COVISA.....	48
Figura 7 –	Modelo conceitual de variáveis.....	52
Figura 8 –	Gel de agarose: especificidade de suíno.....	60
Figura 9 –	Perfil das bandas no gel de agarose (bovino e suíno).....	61
Figura 10 –	Perfil das bandas no gel de agarose (canino).....	62
Figura 11 –	Perfil das bandas no gel de agarose (bandas inespecíficas).....	79
Figura 12 –	Tripas.....	102
Figura 13 –	Carnes defumadas.....	102
Figura 14 –	Carnes “tipo carpaccio”.....	102
Figura 15 –	Lingüiça de fabricação caseira.....	103

Figura 16 –	Carne com gordura, casco, crua, refrigerada.....	103
Figura 17 –	Presença de várias apresentações.....	103
Figura 18 –	Carne previamente moída.....	103
Figura 19 –	Carnes com osso, cruas, refrigeradas e sem tempero.....	103
Figura 20 –	Carnes com osso, gordura, cartilagem, cruas e refrigeradas.....	103
Figura 21 –	Carnes desconhecidas macroscopicamente.....	104
Figura 22 –	Falha na higienização.....	107
Figura 23 –	Utensílios com sinais de ferrugem e sujidades.....	108
Figura 24 –	Presença de produtos impróprios na área de manipulação.....	108
Figura 25 –	Presença de alimentos no chão (câmara fria e área de manipulação).....	108
Figura 26 –	Alimentos abertos dentro do refrigerador e sem qualquer identificação.....	109
Figura 27 –	Área de manipulação inadequada (ambiente aberto e com presença de bicicleta pendurada).....	109
Figura 28 –	Prateleira inadequada e presença de produto de limpeza (área de manipulação).....	110
Figura 29 –	Restos alimentares do dia anterior e presença de praga.....	110
Figura 30 –	Riscos ao trabalhador.....	111

LISTA DE GRÁFICOS E FLUXOGRAMA

Gráfico 1 –	Amostras encaminhadas pela COVISA, segundo a espécie, no período de junho a novembro de 2009 - São Paulo - 2009.	63
Gráfico 2 –	Resultado das amostras encaminhadas pela COVISA, no período de junho a novembro de 2009 - São Paulo - 2009.....	66
Fluxograma 1 –	Atividades envolvidas na realização das análises laboratoriais para identificação da espécie por PCR. São Paulo, 2009.....	53

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 –	Classificação segundo as culturas (comestível / não comestível) de certas espécies animais.....	27
Quadro 2 –	Resultado do PCR das amostras encaminhadas pela COVISA provenientes de restaurantes vistoriados em São Paulo, por ordem numérica de lacre, no período de junho a novembro de 2009 - São Paulo - 2009.....	65
Quadro 3 –	Custo unitário de reagentes utilizados para identificação da espécie na PCR, valores aferidos de maio a novembro de 2009 - São Paulo - 2009.....	67
Quadro 4 –	Custos das soluções preparadas no LABMAS para PCR, no período de maio a novembro de 2009 - São Paulo - 2009.....	69
Quadro 5 –	Reagentes utilizados na PCR para identificação da espécie, com amostra única, no Laboratório de Higiene Alimentar e LABMAS - São Paulo - 2009.....	71
Quadro 6 –	Reagentes utilizados para PCR, com uma amostra e dois controles (positivo e negativo), no Laboratório de Higiene Alimentar e LABMAS - São Paulo - 2009.....	73
Quadro 7 –	Reagentes utilizados para PCR, com uma amostra e dois controles (positivo e negativo) e triplicata a partir do mix - São Paulo - 2009.....	74
Quadro 8 –	Reagentes utilizados para PCR, com dez amostras e três controles (um positivo e dois negativos) - São Paulo - 2009.....	81

Quadro 9 –	Plano de classificação de funções do grupo técnico da Universidade de São Paulo, aprovado pelo CCRH em 08.06.2009 - São Paulo - 2009.....	105
Quadro 10 –	Vencimento de funcionários da Universidade de São Paulo, atualizada em 22 de junho de 2009 - São Paulo - 2009.....	106

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 –	Principais características macroscópicas das amostras coletadas nas vistorias realizadas pela COVISA, durante o período de junho a novembro de 2009 - São Paulo - 2009.....	64
Tabela 2 –	Determinação do tempo para a realização de PCR de uma amostra e dois controles (positivo e negativo) nos Laboratórios de Higiene Alimentar e LABMAS, com triplicata a partir do mix, no período de julho a novembro de 2009 - São Paulo - 2009.....	75
Tabela 3 –	Especificações de reagentes utilizados na PCR para identificação da espécie - São Paulo - 2009.....	98

LISTA DE SÍMBOLOS

%	porcento
°C	graus Celsius
'	minuto de hora
μL	microlitros
μg	microgramas
''	segundos de minuto
®	marca registrada
R\$	Reais
U\$	Dólar
+	adição
h	hora
V	Volts
$\bar{x}$	média
C+	controle positivo
C-	controle negativo

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BSE	encefalopatia espongiforme bovina
CCRH	Comissão Central de Recursos Humanos
cd	cada
cm	centímetro
COVISA	Coordenação de Vigilância em Saúde
CVE	Centro de Vigilância Epidemiológica
cx	caixa
DECAP	Departamento de Polícia Judiciária da Capital
DEPC	dietilpirocarbonato
DIPAC	Divisão de Padronização e Classificação de Produtos de Origem Animal
dNTP	deoxinucleosídeo-trifosfato
DNA	ácido desoxirribonucléico
DPCC	Departamento de Polícia de Proteção à Cidadania
et al.	colaboradores
EDTA	ácido etilenodiaminotetracético
EPI	equipamento de proteção individual
FMVZ	Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
fr	frasco
g	gramas
GT	Isotiocianato de guanidina
kg	Quilo
LABMAS	Laboratório de Biologia Molecular Aplicada e Sorologia
L	litro

M	molar
mg	miligrama
MgCl ₂	cloreto de magnésio
mix	mistura
mL	mililitro
mM	milimolar
Na ₂ EDTA	EDTA sal dissódico
NaOH	hidróxido de sódio
n/mol	nanomol
PA	Estado do Pará
p.a	pronto para o uso
pb	pares de bases
PCR	reação em cadeia pela polimerase
PCR-RFLP	restriction fragment length polymorphism
pcte	pacote
pH	concentração de hidrogênio iônico
primers	oligonucleotídeos
RIISPOA	Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal
RNA	ácido ribonucléico
SIF	Serviço de Inspeção Federal
SMS	Secretaria Municipal de Saúde
SP	São Paulo
TBE	tris borato EDTA
TCA	termo de coleta da amostra

TE TRIS EDTA	tampão TRIS EDTA
TRIS	hidroximetil aminometano
Tris HCl	hidroximetil aminometano com ácido clorídrico
U	unidades
USP	Universidade de São Paulo
UV	ultravioleta
X g	vezes aceleração da gravidade terrestre ($9,8 \text{ m/s}^2$)

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	24
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	26
2.1 PERIGOS RELEVANTES PARA A SAÚDE PÚBLICA.....	30
2.2 TÉCNICAS PARA A DETERMINAÇÃO DE AUTENTICIDADE DE PRODUTOS CÁRNEOS.....	33
2.3 CONTABILIDADE DOS CUSTOS LABORATORIAIS E MENSURAÇÃO DO TEMPO.....	36
3. JUSTIFICATIVA	38
4. OBJETIVOS	41
4.1 OBJETIVOS GERAIS.....	41
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	41
5. MATERIAIS E MÉTODO.....	43
5.1 AMOSTRAGEM.....	43
5.1.1 Padronização da técnica.....	43
5.1.2 Análise das amostras obtidas da COVISA.....	47
5.2 EXTRAÇÃO DO DNA.....	49
5.3 AMPLIFICAÇÃO.....	50
5.4 DETECÇÃO DO PRODUTO AMPLIFICADO.....	51
5.5 LEVANTAMENTO DOS CUSTOS E TEMPO.....	52

6. RESULTADOS	60
6.1 PADRONIZAÇÃO DA TÉCNICA.....	60
6.1. 1 Limiar mínimo de detecção.....	61
6.2 AMOSTRAS DA COVISA.....	62
6.3 LEVANTAMENTO DOS CUSTOS E TEMPO.....	67
 7. DISCUSSÃO.....	 77
 8. CONCLUSÃO.....	 84
 REFERÊNCIAS.....	 86
 APÊNDICES	 96
 ANEXOS.....	 100

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

O potencial de emprego da reação em cadeia pela polimerase (PCR), com a finalidade de detectar a espécie de origem na matéria-prima em produtos cárneos, começou a ser percebido alguns anos após esta metodologia ser empregada na área médica e na pesquisa biológica básica.

Alguns métodos analíticos foram desenvolvidos com o objetivo de identificar adulterações em produtos de origem animal, porém o desempenho destas técnicas é limitado, ao se analisar proteínas que sofrem alterações por processos tecnológicos.

A substituição de uma matéria prima animal por outra espécie implica em fraude, gerando falsidade ideológica, desigualdade competitiva, prejuízos econômicos ao setor e riscos para a saúde pública.

A identificação e o combate a fraudes em alimentos dependem de recursos eficientes, fundamentados por conhecimento científico e disponibilidade tecnológica.

Dentre as atividades dos serviços oficiais de fiscalização da produção e comercialização dos produtos de origem animal está, além da salvaguarda da saúde pública e saúde animal, a identificação e controle de fraudes e adulterações de produtos.

A necessidade atual das autoridades sanitárias e dos órgãos oficiais de inspeção motivou o presente trabalho, pois, desde o ano de 2006, há suspeitas de comercialização de carnes provenientes de espécies não regulamentadas para o abate, mais especificamente de carne de cão.

Este trabalho teve por objetivo padronizar a PCR para a identificação das espécies bovina, suína e canina, em amostras de carne sob diferentes concentrações, com a finalidade de possibilitar um recurso diagnóstico viável aos serviços oficiais de inspeção e vigilância sanitária de alimentos e aferir os custos do método, para oferecer como atividade de extensão às análises laboratoriais.

REVISÃO DA LITERATURA

2 REVISÃO DA LITERATURA

O desenvolvimento da biotecnologia trouxe avanços científicos em diferentes segmentos do conhecimento, oferecendo recursos de alta sensibilidade e especificidade. Em relação à agroindústria da carne e seus derivados, a técnica da amplificação do ácido desoxirribonucleico (DNA) pela reação em cadeia de polimerase (PCR) é um recurso viável para análises de rotina da avaliação da autenticidade de produtos, cuja importância ultrapassa os limites de aspectos relacionados à fraude, abarcando em valores de natureza social, ética e de saúde pública.

Segundo Maciel (2001), a escolha do que será considerado "alimento" e de como, quando e por que será consumido, está relacionada com uma classificação estabelecida culturalmente. Em muitos países, carne de cachorro, não é considerada "comestível", porém, em alguns, é uma iguaria. Na Índia, por crença religiosa, a ingestão de carne de vaca é um tabu, mesmo que os rebanhos sejam abundantes; já em países islâmicos, a carne suína é considerada "impura". Assim, o que é "alimento" em uma cultura, não é em outra, fato derivado não de seu valor nutritivo ou risco à saúde.

Além da definição do que é alimento, há também a escolha da apresentação deste (cru, cozido, assado, vivo, apodrecido) e da técnica utilizada para preservação (salgado, defumado, congelado). Estes aspectos constituem sistemas alimentares que estão ligados a representações coletivas e crenças. O tipo de alimento pode marcar um território, nação ou região (podemos assim falar em "cozinhas" de um ponto de vista "territorial", tal como a "cozinha chinesa", a "cozinha baiana", ou a "cozinha mediterrânea") (MACIEL, 2001).

De acordo com Stobel et al. (2005), inicialmente com a imigração e atualmente com o livre mercado, a culinária brasileira passou a ser composta por várias culturas, devido à introdução de particularidades gastronômicas, bem como seu respectivo preparo e consumo; fato também propiciado pela globalização.

Quadro 1 - Classificação segundo as culturas (comestível / não comestível) de certas espécies animais

ANIMAL	COMESTÍVEL	NÃO COMESTÍVEL
Insetos	América Latina, Ásia, África	Parte da Europa e América do Norte
Cão	Coréia, China e Oceania	Europa, América do Norte, América do Sul
Cavalo	França, Bélgica, Japão	Grã-Bretanha, América do Norte
Coelho	França, Itália	Grã-Bretanha, América do Norte
Rã	França, Ásia	Europa, América do Norte

Fonte: Fischler (2001).

Pelo quadro 1, podemos verificar as diferenças culturais na aceitação de ingestão de carne. No Brasil, a carne de cachorro não é aceita, apesar de ser comestível na Coreia, China e Oceania. Em nosso país, o cão é tratado quase como membro da família e não há legislação específica para seu abate (com a finalidade de consumo), muito menos Inspeção Federal.

De acordo com o Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal (RIISPOA), do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Decreto-Lei 30691/52, Art.106: nos estabelecimentos subordinados à Inspeção Federal é permitida a matança de bovinos, eqüinos, suínos, ovinos, caprinos e coelhos, bem como das diferentes aves domésticas e de caça (procedentes de criadouro), usadas na alimentação humana (BRASIL, 1952).

Portanto, a carne de cachorro implica no consumo de produto clandestino, conduta que tem reflexos em diversas áreas: saúde (na medida em que coloca em risco a população, podendo provocar doenças), meio ambiente (pode acarretar poluição ambiental, como dispensa de materiais em manancial) e consumidor (por violar direitos básicos da relação de consumo).

Tais atos podem ser considerados crime, sendo previstos na legislação brasileira:

- ❖ Código Penal Brasileiro, Decreto-Lei N° 2.848/40, Capítulo III - dos Crimes Contra Saúde Pública, Infração de medida sanitária preventiva:

Art. 268 - infringir determinação do poder público, destinada a impedir introdução ou propagação de doença contagiosa;

Art. 278 - fabricar, vender, expor à venda, ter em depósito para vender ou, de qualquer forma, entregar a consumo coisa ou substância nociva à saúde, ainda que não destinada à alimentação ou a fim medicinal (BRASIL, 1940).

- ❖ Lei N° 8.137/90, Capítulo II – dos Crimes Contra Economia e as Relações de Consumo:

Art. VII, parágrafo II - vender ou expor à venda mercadoria cuja embalagem, tipo, especificação, peso ou composição esteja em desacordo com as prescrições legais, ou que não corresponda à respectiva classificação oficial (BRASIL, 1990a).

- ❖ Código de Defesa do Consumidor, Lei ° 8.078/90, Capítulo IV – da Qualidade de Produtos e Serviços, da Prevenção e Reparação dos Danos, Seção I, da proteção à Saúde e Segurança:

Art. 8 - os produtos e serviços colocados no mercado de consumo não acarretarão riscos à saúde ou segurança dos consumidores, exceto os considerados normais e previsíveis em decorrência de sua natureza e fruição, obrigando-se os fornecedores, em qualquer hipótese, a dar as informações necessárias e adequadas a seu respeito;

Art. 18 § 6º - São impróprios ao uso e consumo: II - os produtos deteriorados, alterados, adulterados, avariados, falsificados, corrompidos, fraudados, nocivos à vida ou à saúde, perigosos ou, ainda, aqueles em desacordo com as normas regulamentares de fabricação, distribuição ou apresentação;

Art. 39 - é vedado ao fornecedor de produtos ou serviços, dentre outras práticas abusivas: VIII - colocar, no mercado de consumo, qualquer produto ou serviço em desacordo com as normas expedidas pelos órgãos oficiais competentes (BRASIL, 1990b).

- ❖ Lei Contra Crimes Ambientais, Lei N° 9.605/98 - Capítulo V – dos Crimes Contra o Meio Ambiente. Seção I – dos Crimes Contra a Fauna:

Art. 32. Praticar ato de abuso, maus-tratos, ferir ou mutilar animais silvestres, domésticos ou domesticados, nativos ou exóticos.

Ainda nessa legislação, há a definição quando o abate não é considerado crime no Art. 37 - não é crime o abate de animal, quando realizado: I em estado de necessidade, para saciar a fome do agente ou de sua família; II - para proteger

lavouras, pomares e rebanhos da ação predatória ou destruidora de animais, desde que legal e expressamente autorizado pela autoridade competente; IV - por ser nocivo o animal, desde que assim caracterizado pelo órgão competente (BRASIL, 1998).

Além da ausência de fiscalização ou obediência a normas estabelecidas pelos órgãos oficiais competentes, em locais de abate clandestino há o predomínio de péssimas condições de higiene, cujas operações são realizadas num total desacordo com procedimentos tecnológicos; manejo de animais em condições de crueldade, deficiência de equipamentos, falta de controle de temperatura do produto (durante todo o processo), bem como detecção sorológica de patógenos e até falha no uso equipamentos de proteção individual, colocando em risco tanto a saúde do consumidor, quanto a do manipulador (FREITAS et al., 2006).

Em 2005, Abrahão relata que mesmo a carne obtida de animais sadios é um veículo potencial de contaminantes de natureza biológica, física e química, nas diversas fases de processamento, que vão desde a produção, transformação, armazenamento, transporte e condições de comercialização. A carne pode ser contaminada desde a sangria, abate do animal e até no varejo; portanto, os processos demandam uma série de cuidados e, de acordo com o Art. 11 do RIISPOA, todos os estabelecimentos de carnes e derivados que abatem e industrializam as diferentes espécies de açougue e de caça, necessitam ter uma inspeção federal permanente (BRASIL, 1952).

Segundo Azevedo (2001), no Brasil, assim como em diversos países, o mercado informal (clandestino) caminha paralelamente ao mercado formal, comercializando produtos e competindo em busca do consumidor. O mercado clandestino oferece carne com preço aproximadamente 30% inferior devido à sonegação fiscal, comparado com os abates legais.

A situação é mais grave, se levarmos em consideração uma pesquisa realizada por Buso (2000), a qual relata que o consumidor tem uma grande confiança (75%) em relação à segurança do alimento. Esta confiabilidade, por sua vez, não decorre muitas vezes das certificações sanitárias, mas em especial, da relação entre consumidor e o ponto de venda ou de consumo.

Silva (2000) relata a ocorrência da adição de carne de baixo valor comercial ou de espécies diferentes daquela declarada no rótulo de produtos cárneos em

diversas partes do mundo, citando Estados Unidos, Inglaterra, Austrália e Espanha. Veloso, desde 2002, afirma que a autenticidade dos alimentos tornou-se um problema mundial e cada vez mais exigida no mercado globalizado.

A indústria e os serviços oficiais de fiscalização da produção e comercialização de produtos de origem animal necessitam ter à sua disposição, meios que possam dar respostas precisas. A reação em cadeia pela polimerase (PCR) tem demonstrado viabilidade para a identificação da espécie, além de ter baixas taxas de falso-positivo e falso-negativo (MEYER et al., 2001).

2.1 PERIGOS RELEVANTES PARA A SAÚDE PÚBLICA

Importantes doenças ou zoonoses podem ser adquiridas a partir do consumo de carnes. Dentre elas, podem ser citadas:

- Encefalopatia espongiforme bovina (BSE): identificada na Inglaterra em 1986, vulgarmente conhecida como “Doença da Vaca Louca”. Afeta o gado doméstico e apresenta como sintomatologia: alterações comportamentais, tremores, contração muscular e paresia de membros. Doença causada por uma forma especial de proteína (chamada príon). O animal pode adquirir BSE pelo consumo de ração com farinha de carne. É transmissível ao homem através da ingestão de carne proveniente de animal contaminado (ANDERSON et al., 1996).
- Triquenelose: parasita intestinal do homem ou de outros animais (caninos, felinos, roedores e suínos). Infecção ocorre pela ingestão de carne crua ou mal cozida, com cistos. Doença cosmopolita, sendo mais freqüente em países da Ásia, África e América Latina; apresenta como sintomatologia irritabilidade, insônia e dores abdominais. Não há relatos no Brasil, mas há casos humanos devido à ingestão de carne de cão na China (WANG et al., 2001).
- Brucelose: segundo o Centro de Vigilância Epidemiológica (CVE), em humanos é caracterizada por febre, debilidade, cefaléia e perda de peso

(CVE, [2002]a). Doença zoonótica transmitida por alimento, tem como fatores de risco, além da ingestão de alimentos contaminados, o contato com animais e o exercício de atividades que envolvem o contato com eles. Em estudo realizado em Belém – PA, suínos procedentes de abate clandestino apresentaram títulos de anticorpos para brucelose (FREITAS et al., 2001). De acordo com Carvalho et al. (1995), casos de brucelose devido ao consumo de carne são raros e difíceis, pois limitam-se a um pequeno número de bactérias por grama de músculo.

- Toxoplasmose: protozoonose que apresenta manifestações graves, desde esplenomegalia, icterícia, convulsões, surdez, uveíte e retinocoroidite. O homem pode contrair a infecção pela ingestão de cistos presentes em carnes insuficientemente cozidas (mal passadas), principalmente carne suína (GERMANO; GERMANO, 2003). De acordo com o Centro de Vigilância Epidemiológica (CVE, [2002]b), a transmissão também pode ocorrer pela ingestão de oocistos provenientes de mãos contaminadas por fezes, alimentos ou água. Embora o consumo de carne seja comum em algumas culturas, o cão aparentemente só é veiculador de oocistos através do pêlo (ALVES, 2007).
- Complexo Teníase-Cisticercose: grande problema de saúde pública, pois provoca teníase no homem, pela ingestão de alimento ou água contaminada com ovos de *Taenia* e a cisticercose pela ingestão de carne crua ou insuficientemente cozida, que contenha cisticercos viáveis. Em estudo de Ungar (1992) sobre cisticercose bovina no Estado de São Paulo, a partir do Serviço de Inspeção Federal (SIF), foi encontrada uma prevalência de 5,5% da doença.
- Raiva: vírus da família *Rhabdoviridae*, gênero *Lyssavirus*, transmitido através da mordedura, arranhadura ou lambadura de pele ferida; há relatos de transmissão por aerossóis, transplante de córnea e órgãos. O cão e o morcego hematófago continuam sendo os principais reservatórios (CARRIERI et al., 2006). O hábito de ingestão de carne de cachorro é comum no Sul da China, onde ocorre uma epidemia de raiva; muitas famílias vendem cães não

vacinados e sem dieta especial para os restaurantes com a finalidade de aumentar a renda (média de 12 a 15 dólares por cão). Segundo Tao et al. (2009), cães comprados são abatidos rapidamente, não ocorrendo tempo para transmissão do vírus e, até o momento, não há relatos de raiva humana pelo consumo dessa carne na China.

- Tuberculose: ocorrência tem sido atribuída à ingestão de leite não pasteurizado ou ingestão de carne crua. De acordo com Abrahão et al. (2005), no Brasil o risco de contrair tuberculose é menor, devido à baixa incidência do agente em tecidos musculares; além disso não temos o hábito de ingestão de carne crua, porém o problema não pode ser ignorado.
- Salmonelose: bactéria transmitida por alimentos contaminados (ovos, carnes e seus derivados), responsável por síndromes febris e enterocolite. Segundo Maciel et al. (2004), os cães representam um importante reservatório de sorotipos exóticos de *Salmonella* sp.
- Outros agentes bacterianos de importância como: *Bacillus cereus*, *Clostridium botulinum*, *Clostridium perfringens*, *Campylobacter* spp, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* e *Yersinia enterocolitica* (GERMANO; GERMANO, 2003).

O risco de transmissão de agentes patogênicos não se dá somente pelo consumo de carne de animais com procedência duvidosa; indivíduos que participam das operações de abate (corte e recorte dos animais), também se expõem através do contato direto com tecidos, sangue e vísceras. Em levantamento sorológico de trabalhadores de frigoríficos no Estado do Paraná, realizado por Gonçalves et al. (2006), foi encontrada taxa de positividade para leptospirose de 4%, para brucelose de 0,66% e para toxoplasmose de 70%.

Deve-se considerar ainda, que existem vários outros perigos, além dos citados acima. Frente a esta situação, é necessário investir, ampliar conhecimento e aprimorar técnicas capazes de dar suporte aos órgãos oficiais de inspeção e vigilância sanitária para que, de fato, cumpram seu papel na sociedade.

2.2 TÉCNICAS PARA DETERMINAÇÃO DE AUTENTICIDADE DE PRODUTOS CÁRNEOS

São conhecidas algumas técnicas, para determinação da autenticidade de produtos cárneos, pela identificação das espécies animais nas matérias-primas. Por exemplo: cromatografia gasosa (TOOROP et al., 1997), técnicas imunológicas (GIOVANNACCI et al., 2004) e a eletroforese capilar (VALLEJO et al., 2005). Apesar de serem técnicas úteis em várias situações, podem não ser totalmente convenientes em análises de rotina, em virtude do relativo custo, pelo tempo necessário, complexidade de execução e limitação destas técnicas ao se analisar proteínas, muitas das quais sofrem alterações em processos tecnológicos (CHEN; HSIEH, 2000).

A identificação da espécie em produtos cárneos intensamente processados pelo calor é dificultada pela desnaturação progressiva da proteína e, também, a salga e a dessecação podem interferir na maioria dos métodos biológicos ou bioquímicos (PARDI et al., 2004).

Outro fator inconveniente destas técnicas é o nível mínimo de detecção. Segundo Meyer et al. (1994), testes imunológicos não foram capazes de detectar níveis baixos de carne de porco na amostra (inferior a 20% na carne cozida e menores de 10% na carne fresca).

Segundo Losio et al. (2004), métodos eletroforéticos e imunológicos não podem distinguir espécies estreitamente relacionadas entre si e não são adequados para produtos alimentares com matrizes complexas.

Métodos baseados na análise do DNA são bastante atrativos. Meyer e Candrian, em 1996, afirmaram que a PCR é viável para análise em alimentos por ser simples e específica; reconhecem-na como ferramenta segura na identificação de espécies em produtos alimentares, oferecendo informações mais precisas em relação à pesquisa de proteínas, devido à maior resistência do DNA aos processos térmicos e por estar presente em qualquer tecido e célula.

Alguns pesquisadores já trabalharam com o DNA em estudos paleontológicos (ossos de fósseis ou de restos estruturais); na medicina humana forense (estudando o DNA da saliva, cabelo, sangue presentes em cenas de crime); na identificação de microrganismos invasores e, mais recentemente, na autenticação de alimentos

(TELETCHÉA et al., 2005).

Na área de alimentos, houve maior número de trabalhos científicos sobre PCR para detecção da espécie animal a partir da BSE. Porém a grande maioria deles visou a detecção de matéria animal usada para a fabricação de ração (DALMASSO et al., 2004; TOYODA et al., 2004; SHINODA et al., 2008; CAWTHRAW et al., 2009; YOSHIDA et al., 2009; ZENG et al., 2009;). A fraude em alimentos ou derivados apresenta ainda número reduzido de trabalhos científicos.

Um dos trabalhos descrevendo a PCR para amplificação de DNA mitocondrial específico de bovino em produtos derivados de carne bovina foi publicado por Tartaglia et al. (1998). O método descrito permitiu a detecção de material bovino em carne, numa taxa de inclusão de 0,125%.

Citando alguns autores, na Holanda, Janssen et al. (1998) detectaram em 20 amostras de hambúrguer: carne suína, eqüina e de frango, em substituição ou em adição à carne bovina. Em outras amostras de carne para exportação com destino a países islâmicos, foi encontrada carne suína em produtos bovinos.

Calvo et al. (2001) conseguiu detectar 0,005% de carne de porco em conservas, produtos curados e patês. Em 2002, Calvo, Osta e Zaragoza, detectaram 0,01% de carne bovina, aquecidas ou não, em produtos derivados de carne, como embutidos, conservas e hambúrgers; nesse mesmo ano (2002) Calvo et al., detectaram fraude através da adição de carne de porco em patê de pato comercial, quantificando o grau de contaminação em 1%.

De acordo com Calvo, Osta e Zaragoza (2002), a PCR é um recurso adequado para a identificação espécie específica de DNA em carne, osso e em misturas destes, havendo boa especificidade no teste.

Rodriguez et al. (2003) utilizaram seqüências conservadas de DNA do gene 12S do RNA ribossomal e diferenciaram com precisão, pela técnica da PCR: ganso, pato, galinha, peru e suíno, em amostras de *foie-gràs*. Encontraram o limite mínimo de detecção de 1% para cada espécie e o processamento térmico não interferiu negativamente.

No ano seguinte, Rodriguez et al. (2004), também utilizando sequência de DNA no gene 12S do RNA ribossomal, identificou um limite de detecção de 1% de carne de porco, carne bovina, ovina e caprina em misturas à base de carne.

O método da PCR também foi utilizado por Gao et al. em 2004, para detecção de materiais caninos em alimentos para animais utilizando DNA mitocondrial, obtendo resultado para confirmação da presença de material de cão em uma concentração reduzida (0,05%).

López-Andreo et al. (2005) utilizou PCR em tempo real em alimentos processados comerciais detectando 1% de carne de porco, frango e peru e de 5% para carne bovina e de cordeiro.

Tanabe et al. em 2007, desenvolveu PCR em tempo real para detectar carne de porco, frango, bovina, carneiro e de cavalo, em alimentos processados.

Em trabalho realizado na Espanha, as carnes de camurça (espécie de capríneo da Europa), cabra das montanhas rochosas e carneiro da montanha foram submetidas à identificação por PCR após pasteurização experimental de 72°C por 30' e esterilização a 121°C por 20', sendo o limite de detecção para cada espécie alvo de 0,1% (FAJARDO et al., 2007).

Ainda em 2007, Girish et al., utilizaram à técnica Restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) para identificar e diferenciar carnes de aves, como: frango, pato, codornas, galinha d'angola e peru.

Em estudo de Caldwell et al. (2007), foi analisada a contaminação fecal em efluentes, utilizando PCR em gene mitocondrial, tendo como base a sequência de nucleotídeos específicos para a espécie bovina e suína. Neste estudo, foi encontrada uma eficiência respectivamente de 95% e 100% do método. Em relação à especificidade, obteve-se 100% de identidade para a espécie de origem. Não foi relatado nenhum falso positivo ou reação cruzada com outra espécie similar.

A substituição de uma espécie animal por outra implica em desvios por falsidade ideológica, infração da legislação, prejuízos econômicos para o Estado e desigualdade competitiva entre produtores e comerciantes. Além do que, na fraude, utilizam-se de “alternativas” de baixo valor nutricional e qualidade questionável, colocando em risco a saúde pública. Acredita-se que a identificação e controle de tais práticas, irão depender do desenvolvimento de recursos eficientes.

2.3 CONTABILIDADE DOS CUSTOS LABORATORIAIS E MENSURAÇÃO DO TEMPO

Para oferecer o método da PCR como recurso diagnóstico aos Serviços Oficiais de fiscalização, faz-se necessária uma análise de custo.

A contabilidade de custos no laboratório de análises auxilia na gestão e no planejamento dos recursos, garantindo equilíbrio financeiro para sua manutenção.

De acordo com Lima (2007), os propósitos de um sistema de custo são:

- identificar e controlar os custos de suas operações,
- dar base para fixação de preços,
- auxiliar na tomada de decisão sobre alternativas de investimento de capital e de métodos,
- favorecer a melhoria contínua de tecnologia e de métodos.

Para obtenção dos custos, a literatura especializada em contabilidade refere alguns métodos de custeio; o utilizado para esse trabalho, é chamado custeio direto ou variável, que é fundamentado na separação dos custos fixos e variáveis. No cálculo dos custos finais são computados somente os custos variáveis, os fixos são considerados como despesas (FREITAS, 2005).

Os custos também podem ser classificados quanto à apuração (SANNAZZARRO, 1998):

- custos diretos (mão-de-obra, material, depreciação de equipamentos),
- custos indiretos (rateio, energia elétrica, água, telefone, material de escritório / limpeza, aluguel, transporte, alimentação, administração e segurança patrimonial).

Deve-se salientar que o processo de avaliação de custos numa determinada instituição não deve ser um processo meramente estatístico, mas constantemente avaliado, pois os valores podem ser afetados por política cambial (importados), substituição de fornecedores e por diversos motivos, característicos de uma economia globalizada (GERTH, 2001).

JUSTIFICATIVA

3 JUSTIFICATIVA

A cidade de São Paulo é considerada um centro gastronômico, com opções desde a cozinha regional até a mais requintada e exótica tendência internacional, apresentando uma diversidade de pratos e iguarias. Portanto, é fundamental identificar as espécies animais comercializadas ou utilizadas na preparação de alimentos tanto para combater fraudes, como para eliminar, diminuir ou prevenir riscos à saúde da população.

“Em março de 2006, a Vigilância Sanitária de Alimentos do Município de São Paulo, recebeu um ofício do Departamento de Polícia Judiciária da Capital (DECAP), da Secretaria da Segurança Pública, solicitando vistoria sanitária em um estabelecimento, onde os responsáveis estariam cometendo atos de abuso e ou maus tratos, conforme Art. 32 da Lei Federal nº 9.605/98 (BRASIL, 1998), por “sacrificar” cães para comercialização da carne.

Segundo o Art. 135 do RIISPOA, só é permitido o sacrifício de animais por métodos humanitários, utilizando-se de prévia insensibilização baseada em princípios científicos, seguida de imediata sangria e somente de espécies descritas no Art. 106, já citado anteriormente (BRASIL, 1952).

No ato de vistoria da equipe técnica da Coordenadoria de Vigilância em Saúde (COVISA), Subgerência de Vigilância de Alimentos, foram constatadas inúmeras irregularidades tais como: falta de licença da Prefeitura (para funcionamento e exercício da atividade), ausência de atestados de saúde dos manipuladores, presença de animais vivos (peixes, crustáceos e anfíbios), falta de uso do uniforme, falha na higiene de equipamentos e utensílios, além da manipulação incorreta de alimentos.

Amostras de carne crua e cozida com aspecto e coloração estranha foram coletadas, respectivamente três de cada, totalizando seis amostras para a identificação da espécie de origem, uma vez que a denúncia relatava o uso de carne de cão. O Instituto Adolfo Lutz, da Secretaria de Estado da Saúde, realizou análise das amostras pelo método de imunoeletroforese com restrições, pois a técnica disponível necessitava de anti-soro espécie-específico e que todas as amostras estivessem cruas (sem desnaturação de proteínas).

Em relação aos resultados, duas amostras de carne crua foram reagentes para proteína suína, uma amostra não reagiu para proteína suína, não tendo sido realizada outra análise por falta de anti-soro de outras espécies (inclusive a canina) e as demais amostras não foram analisadas por apresentarem-se cozidas. Os resultados não reagentes continuaram como “indeterminados”.

Desde o ano de 2006, durante as fiscalizações de estabelecimentos de Cozinha Oriental, principalmente Chinesa e Coreana, foram observadas carnes com coloração que diferem do aspecto de carne bovina ou suína.

Em 12 de novembro de 2009, a 2ª Delegacia de Saúde Pública do Departamento de Polícia de Proteção à Cidadania (DPCC) prendeu um casal suspeito de manter abatedouro de cães e vender a carne para restaurantes coreanos da cidade de São Paulo (Anexo F).

A suspeita continua recorrente, porém a Vigilância Sanitária de Alimentos não dispõe, no âmbito do Estado de São Paulo, recursos aplicáveis e viáveis economicamente para o esclarecimento dessas situações e tomada de decisões” (informação verbal)¹.

É urgente a necessidade de se desenvolver metodologia precisa, segura, eficiente e aplicável para produtos crus, cozidos, congelados, processados, adicionados de outros ingredientes ou defumados.

Considerando todas as disposições acima, o presente trabalho, objetiva padronizar a PCR para as espécies bovina, suína e canina, levantar os custos do método e aplicá-lo em amostras de alimentos provenientes de vistorias realizadas pelo Serviço de Vigilância Sanitária de Alimentos do Município de São Paulo.

¹ Informação fornecida pela Médica Veterinária Andrea Barbosa Boanova – COVISA - Vigilância Sanitária de Alimentos - Secretaria Municipal de Saúde – Prefeitura de São Paulo em fev. 2008.

OBJETIVOS

4 OBJETIVOS

OBJETIVO GERAL

O projeto teve como objetivo padronizar a reação em cadeia pela polimerase para a identificação da espécie bovina, suína e canina em amostras de carne em diferentes concentrações, visando oferecer um recurso diagnóstico para os Serviços de Vigilância Sanitária de Alimentos no combate às fraudes, mais especificamente carne e derivados, além de aferir os custos do método para oferecer como atividade de extensão às análises laboratoriais.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Padronização a PCR para a identificação de carne bovina, suína e canina em diferentes concentrações: 0%; 0,001%; 0,01%, 0,1%; 1%; 10%; 25%; 50%, 75% e 100%.
- ✓ Aplicação da PCR em alimentos suspeitos provenientes de vistorias realizadas pela COVISA, Subgerência de Vigilância de Alimentos, no Município de São Paulo, em estabelecimentos comerciais, durante o período de 01 de junho de 2009 a 15 de novembro de 2009.
- ✓ Levantamento dos custos diretos (reagentes e mão de obra) e tempo para realização pelo técnico laboratorial de nível médio.

MATERIAIS E MÉTODO

5 MATERIAIS E MÉTODO

Os materiais e método estão descritos a seguir.

5.1 AMOSTRAGEM

5.1. Padronização da técnica

Para a padronização, foram testadas cinco amostras de músculo bovino e suíno e três amostras para cão, utilizando a matriz carne sob diferentes apresentações: crua refrigerada, crua temperada refrigerada, crua congelada, cozida sem tempero, cozida temperada, cozida congelada e carne em decomposição.

A amostra cárnea foi considerada em decomposição quando apresentou pelo menos três das seguintes características: limosidade na superfície, grande formação de exsudato, descoloração / alteração dos pigmentos cárneos, produção de gás / odores / cores anormais e decomposição da gordura (LAWRIE, 2005).

Nos cortes temperados, em cerca de 20g da amostra cárnea, foram adicionados 0,045g de sal, 0,010g de orégano e 0,005g de pimenta do reino, no Laboratório de Higiene Alimentar da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ) da Universidade de São Paulo (USP).

No mesmo laboratório, também foi realizada a cocção padronizada das amostras, utilizando 10mL de óleo de soja, por 10' a 100°C.

Todas as amostras coletadas foram armazenadas de acordo com a Portaria da Secretaria Municipal da Saúde (SMS) de São Paulo (SP) nº 1210 de 02 de agosto de 2006, mantidas sob refrigeração até 4 °C e a de congelamento a -18 °C, de acordo com a análise proposta (SÃO PAULO, 2006).

Os cortes utilizados para a padronização foram selecionados por proximidade de região anatômica, optando-se por músculos do membro posterior, como ilustrado na figura 1.

Figura 1 – Membro posterior (bovino)

Fonte: (BRASIL, 1988).

De acordo com a Divisão de Padronização e Classificação de Produtos de Origem Animal (DIPAC), essa região compreende os seguintes músculos: isquiocavernoso (no macho), sartório, reto interno (grácil), pectíneo, adutor, semimembranoso, semitendinoso, glúteo bíceps, bíceps femoral, vasto lateral, reto femoral, vasto medial, vasto intermediário, quadrado femoral, gêmeos, obturador externo, obturador interno, extensor digital longo, extensor digital lateral, extensor digital curto, fibular longo (peroneal longo), fibular terceiro (peroneal terceiro), tibial cranial, extensor digital longo do primeiro dedo, gastrocnêmio, sóleo, flexor digital superficial, flexor digital profundo e poplíteo (BRASIL, 1988).

Segundo a Portaria nº05/88, do Ministério da Agricultura, o corte de carne do membro posterior é obtido pela liberação das massas musculares da peça ao redor do fêmur, tíbia e articulação do tarso (a musculatura que envolve tíbia e fíbula, também faz parte do coxão). Essa região pode ser subdividida em: coxão-mole, coxão-duro, lagarto, patinho, músculo-mole e músculo-duro (BRASIL, 1988).

Em relação à espécie bovina (figura 2), foi analisado o músculo de primeira ou músculo-mole, constituído das massas musculares separadas do coxão-duro e coxão-mole, aderidas à face posterior do joelho (articulação fêmuro-tibial).

Figura 2 – Músculos superficiais do membro pélvico de bovino: vista lateral

- 27. Porção caudal do músculo bíceps femoral
- 28. Músculo tensor da fáscia-lata
- 29. Músculo vasto lateral
- 30. Músculo glúteo médio
- 31. Músculo semi-tendinoso
- 32. Fáscia crural
- 33. Músculo extensor longo dos dedos
- 34. Músculo peroneal longo
- 35. Tendão do músculo flexor superficial dos dedos
- 36. Músculo flexor profundo dos dedos

Fonte: Popesko (1997) modificado

Quanto à espécie suína (figura 3), foi utilizado o pernil que, em relação ao bovino, compreende os cortes: coxão mole, coxão duro, lagarto, músculo e patinho.

Figura 3 – Músculos superficiais do membro pélvico de suíno: vista lateral

- 21. Músculo glúteo médio
- 22. Músculo tensor da fáscia-lata
- 23. Músculo glúteo superficial
- 23'. Músculo bíceps femoral
- 24. Músculo semimembranoso
- 25. Músculo semitendinoso
- 27. Músculo peroneal longo

Fonte: Popesko (1997) modificado

Em cães (figura 4) foi simulado um corte de carne de membro posterior, correspondente ao músculo bíceps femoral.

Figura 4 – Músculos superficiais do membro pélvico de cão: vista lateral

Fonte: Done et al. (2002) modificado.

Os cortes de carne de bovinos e suínos foram obtidos em diversos Hipermercados nas cidades de Santo André, São Bernardo do Campo e São Paulo, durante o período de novembro de 2007 a abril de 2009. O músculo de cão foi proveniente de animais submetidos a necrópsia pelo Departamento de Patologia Animal, da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, durante o mesmo período.

Para definição da especificidade do teste, outras amostras foram coletadas, sendo o músculo equino obtido através de necrópsia realizada no Departamento de Clínica Médica de Equinos, a “carne” de soja (ou seja, proteína de soja) e a carne de coelho foram adquiridas em Hipermercado na cidade de São Paulo, durante o período de janeiro a maio de 2008.

Para verificar o limite de detecção, cada amostra foi diluída em água dietilpirocarbonato (DEPC) na proporção de 0%; 0,001%; 0,01%; 0,1%; 1%; 10%; 25%; 50%, 75% e 100% e, conjuntamente, foram colocados dois controles negativos

(com somente água DEPC, para verificar possíveis contaminações durante a extração de DNA) e um controle positivo (sangue da espécie em questão).

4.2 Análise das amostras obtidas da COVISA

Após padronização da PCR, foram realizadas análises de amostras obtidas a partir de vistorias e inspeções fiscais pela COVISA – Subgerência de Vigilância de Alimentos, da Prefeitura do Município de São Paulo, durante o período de 01 de junho a 15 de novembro de 2009, totalizando 53 amostras.

A Subgerência de Vigilância de Alimentos, da Gerência de Vigilância Sanitária de Produtos e Serviços de Interesse à Saúde, da COVISA tem como área de atuação a Fiscalização Sanitária do Comércio Varejista, Atacadista, Indústrias e Transportadoras de Alimentos, localizados no Município de São Paulo.

As amostras foram coletadas pelos técnicos da COVISA, em sacos plásticos estéreis, lacrados e numerados (figura 5). Foram acondicionados em caixa isotérmica até o seu recebimento na FMVZ/USP. Juntamente foi lavrado termo de coleta de amostra (TCA), de cada uma delas, conforme figura 6 e, preenchido formulário pelas autoridades sanitárias (Apêndice A).

Figura 5 – Amostras da COVISA lacradas

PREFEITURA DO MUNICÍPIO DE SÃO PAULO
Secretaria Municipal da Saúde
Coordenação de Vigilância em Saúde - COVISA

Endereço para Contato:
R. Costa Lima, 181
908 - 16 COB

TERMO de COLETA de AMOSTRA - Série D / Nº 12512

Dados do Detentor:

Nome: _____ RG: _____
 Pessoa Física: ☐ ☐ CNPJ: _____
 Pessoa Jurídica: ☐ ☐ Nº: _____
 Endereço: _____ CEP: _____
 Complemento: _____
 Telefone: _____ Fax: _____ E-mail: _____ CCM: _____

Fabricante / Importador: _____ CNPJ: _____
 Endereço Local: Rua: _____ Nº: _____
 Complemento: _____ CEP: _____
 Telefone: _____ Fax: _____ E-mail: _____

Produto: _____ Marca: _____
 Fabricação: _____ Validade: _____ Lote: _____ Quantidade: _____
 Registro: _____ Temperatura: _____ Peso: _____ Embalagem: _____
 Amostra: ☐ Original ☐ Única

Finalidade: ☐ Análise Toxicol. ☐ Análise Física ☐ Controle ☐ Outra

Especificação: _____
Objetivo: ☐ Projeto ☐ Denúncia ☐ Surto ☐ Suspeita, decorrente de inspeção ☐ Outro

Especificação: _____
Exame Solicitado: ☐ Microscópico ☐ Físico-Químico ☐ Microbiológico ☐ Composição do Produto ☐ Outro(s)

Especificação: _____
Observações: _____

Amostras e Lacre: Amostra Nº 1 e Lacre Nº _____ Amostra Nº 2 e Lacre Nº _____ Amostra Nº 3 e Lacre Nº _____
 Esta amostra fica sob poder do detentor, conforme o disposto nos artigos 185 e 184 da Lei 12.735, de 08/01/04.

Assinatura: _____ **Nº de Endosso:** _____ **Data:** _____ **Assinatura:** _____
 Autoridade Sanitária (Carimbo e Assinatura) _____

Assinatura do Detentor ou Representante: _____ **Data:** _____ **Assinatura:** _____

☐ Declaro que o fornecedor registrou e possui este Termo de Coleta de Amostra.

1ª Testemunha: _____ **2ª Testemunha:** _____

Figura 6 – Termo de coleta da amostra (TCA) da COVISA

Na FMVZ/USP as amostras foram identificadas pelo número do lacre e fotografadas, sendo armazenadas congeladas em freezer vertical a temperatura média de -12°C, por até 15 dias antes de serem analisadas. Para cada amostra foram feitas três análises, devido a utilização de três primers diferentes. Os resultados foram apresentados à COVISA em laudo específico (Apêndice B).

5.2 EXTRAÇÃO DO DNA

As amostras provenientes da padronização ou encaminhadas pela Vigilância Sanitária seguiram o mesmo tipo de procedimento, descrito abaixo.

As amostras de carnes foram obtidas com o auxílio de uma tesoura, colocadas em tubos estéreis e pesadas. Foram selecionadas 20g de amostra cárnea, adicionando-se 80mL de TE TRIS EDTA pH 8.0 (Anexo A). Esse material foi processado no mixer (Back&Decker SB40) por 1', filtrado com papel-filtro e colocado 1000µL em tubos graduados de 1,5mL, livres de DNA e ácido ribonucléico (RNA), totalizando três microtubos (dois para congelamento, caso seja necessária a repetição da extração).

A extração do DNA foi realizada a partir do produto dessa filtração, com técnica baseada em Chomczynsky (1993) com modificações, utilizando tiocianato de guanidina 5M / Fenol pH 7,5 (Anexo A), conforme descrito abaixo.

Num eppendorf de 1,5mL foi homogeneizado: 600µL de Tiocianato de Guanidina (GT) com 200µL da amostra cárnea, através do vórtex modelo Maxi Mixplus™ – Thermolyne por 15".

Para controle negativo, foi adicionado 200µL água DEPC com 600µL de GT e também homogeneizado em vórtex durante 15". Na padronização foram utilizados dois controles negativos (somente água DEPC), bem como na análise das amostras encaminhadas pela COVISA.

Após homogeneização, os microtubos foram mantidos em temperatura ambiente por 10'. O clorofórmio (100µL) foi adicionado e homogeneizado em vórtex por 15" e mantido por 10' à temperatura ambiente.

Na centrífuga modelo 5804R – Eppendorf, os microtubos ficaram por 5' a 4°C em 12.000 X g, cerca de 400µL do sobrenadante foi transferido para outro tubo previamente identificado com 600µL de propanol. Após homogeneização em vórtex por 15", foram mantidos a - 20°C pelo tempo mínimo de duas horas.

Sem prévio descongelamento, os tubos foram centrifugados em 12.000 X g por 20' a 4°C, o sobrenadante foi descartado. Adicionou-se 500µL de etanol a 70% homogeneizado em vórtex por 15" e novamente centrifugados em 12.000 X g por 10' a 4°C.

O sobrenadante foi descartado e os microtubos foram secos no termobloco / banho-seco (Thermolyne Type 16500, Dri Bath) a 56°C por 10'. Após secagem, os tubos com os pellets foram ressuspensos com 20µL de água DEPC, colocados em breve centrifugação no vórtex, incubados a 56°C por 15', homogeneizados no vórtex e deixados sob refrigeração a 4°C, enquanto o mix era preparado.

5.3 AMPLIFICAÇÃO

Devido à alta sensibilidade do teste e o fato de não ocorrer reação cruzada com outras espécies, as seqüências utilizadas como base neste projeto para identificação de espécie bovina e suína foi a mesma de Caldwell et al. (2007) e para identificação da espécie canina a de Gao et al. (2004), já citados anteriormente. Ambos utilizam DNA mitocondrial.

- para bovinos: 5'-CAGCAGCCCTACAAGCAATGT-3' (forward primer) e 5'-GAGGCCAAATTGGGCGGATTAT-3' (reverse primer). (CALDWELL et al., 2007).
- para suínos: 5'-ACAGCTGCACTACAAGCAATGC-3' (forward primer) e 5'-GGATGTAGTCCGAATTGAGCTGATTAT-3' (reverse primer). (CALDWELL et al., 2007).
- para caninos: 5'-TCCAGGTAAACCCTTCTT-3' (forward primer) e 5'-TACGAGCAAGGGTTGATGG-3' (reverse primer). (GAO et al., 2004).

A amplificação da dupla fita continha no final um volume de 25µL com: 2,5µL de tampão 10 x PCR buffer (Invitrogen®), 4µL de dNTP 1,25 mM (Fermentas®), 0,75µL de Cloreto de magnésio 50mM (Invitrogen®), 1,25µL de cada primer 10uM (IDT®), 12,50µL de água DEPC, 0,25µL de Platinum Taq DNA polimerase 500U (Invitrogen®) e 2,5µL da amostra (após extração do DNA). Valores conforme recomendação do fabricante da Taq DNA (com modificações).

Os DNAs bovino e suíno foram amplificados no termociclador modelo Peltier Thermal Cycler - BioRad, seguindo o perfil: desnaturação inicial à 95°C por 3', 39 ciclos de desnaturação do DNA à 94°C por 30", hibridização dos primers à 60°C por

30", polimerização do DNA à 72°C por 45", extensão final à 72°C por 10' e 10 °C até a retirada das amostras do equipamento (CALDWELL et al., 2007 modificado).

Quanto ao DNA canino, o perfil no mesmo termociclador foi: desnaturação inicial à 95°C por 3', 39 ciclos de desnaturação do DNA à 94°C por 30", hibridização dos primers à 56°C por 30", polimerização do DNA à 72°C por 45", extensão final à 72°C por 10' e 10 °C até a retirada das amostras do equipamento (GAO et al., 2004 modificado).

5.4 DETECÇÃO DO PRODUTO AMPLIFICADO

Os fragmentos amplificados foram analisados através da eletroforese realizada em cuba horizontal, com gel de agarose a 1,5% imerso em tampão TBE 0,5X (Anexo A) e submetidos a corrente elétrica.

Na eletroforese foram colocados 2µL de corante (6 x Loading Dye Solution) juntamente com 10µL da amostra amplificada num parafilm para diluição. Após homogeneização, 10µL dessa mistura foi colocada na cuba preparada com agarose (1,5%) solidificada imersa em TBE 0,5X. Para cada pente, foi colocado um poço com 3µL de marcador de peso molecular (GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder).

Na cuba foi aplicada uma corrente elétrica por 30' à 100 volts (V), permitindo migração das moléculas de acordo com seu tamanho (padrão utilizado 1 a 10V/cm de gel). Após decorrido o tempo, a placa foi para uma solução com corante fluorescente de brometo de etídio na concentração de 0,5µg/ml (Anexo A).

A formação de bandas foi visualizada por transluminação ultravioleta (UV) e fotografada pelo sistema foto-documentação (Alphamager®, Alpha Innotech) para análise.

Tanto o resultado da padronização, como os das amostras provenientes das vistorias foram analisados através da detecção de banda específica: 191 pares de bases (pb) para bovinos, 196 pb para suínos (CALDWELL et al., 2007) e 213 pb para cães (GAO et al., 2004).

5.5 LEVANTAMENTO DOS CUSTOS E TEMPO

O método de investigação escolhido foi uma pesquisa exploratória de abordagem quantitativa, para busca de maiores informações sobre determinado assunto, que pouco se conhece, por ser uma investigação empírica, na qual o investigador não tem controle direto sobre as variáveis independentes (MARTINS, 2003). As variáveis estão representadas na figura 7.

Figura 7 - Modelo conceitual de variáveis

Fonte: Lima (2007) modificado.

Os custos fixos como: energia elétrica, água, telefone, administração, material de escritório, equipamentos, material de limpeza, aluguel e equipamento de proteção individual (EPI) são considerados custos indiretos. Portanto, não foram contabilizados, visto que as amostras foram processadas dentro da FMVZ/USP (amplitude: Laboratório de Higiene e Inspeção de Alimentos e Laboratório de Biologia Molecular Aplicada e Sorologia).

Devido ao envolvimento de dois Laboratórios, foi delineado um fluxograma de trabalho (fluxograma 1), que fornece a sequência de atividades, ou seja, as etapas necessárias para realização das análises laboratoriais.

Fluxograma 1 - Atividades envolvidas na realização das análises laboratoriais para identificação da espécie por PCR. São Paulo, 2009

As informações relevantes na triagem foram: aspecto / características macroscópicas, data de recebimento e de processamento, sendo descritas em formulário (Apêndice A).

Para o levantamento de custos, foram construídas planilhas para obtenção dos dados e cálculo dos valores médios.

Os valores dos insumos foram expressos em reais (R\$), com média mensal do dólar variando de U\$ 1,7376 a 2,0601 (compra) no período 01 de maio a 30 de novembro de 2009, de acordo com os Atos Declaratórios Executivos da Receita Federal (BRASIL, [2009]).

Para todos os cálculos foram computados até cinco frações numéricas. Somente no cálculo do custo final foi padronizada a regra de arredondamento de valores, estabelecida pelo Sistema Internacional de Unidades, que estabelece duas casas decimais após a vírgula, arredondando frações de centavos, obedecendo ao seguinte padrão (TOGINHO FILHO; ANDRELLO, [2009]):

- Algarismo menor que 5: Se o algarismo decimal seguinte for menor que 5, o anterior não se modifica.
- Algarismo maior que 5: Se o algarismo decimal seguinte for maior que 5, o anterior incrementa-se em uma unidade.
- Algarismo igual a 5: Se o algarismo decimal seguinte for igual a 5, o anterior incrementa-se em uma unidade caso ele seja ímpar. Caso seja par, o algarismo é conservado.

Os dados referentes à média aritmética ($\bar{x}$) do custo bruto (CB_m) dos materiais foram obtidos através de orçamento de, no mínimo, três fornecedores dos materiais e as cotações foram realizadas num período de 6 meses (maio a novembro de 2009). Foram consideradas somente as cotações com as especificações determinadas, através da descrição do produto e quantidade almejada (Apêndice C).

$$CB_m = Or / N$$

CB_m : custo bruto.

Or: somatória dos orçamentos.

N: número de orçamentos.

Como existem dois kits utilizados (Taq DNA polimerase + $MgCl_2$ + Tampão Buffer e 100BP DNA Ladder + 6X Loading) foi calculado a somatória do volume de

todos os ingredientes para ter o preço do Kit e consequentemente por μL , visto não se possível aferir valor de cada produto individualmente.

A partir dos valores do custo bruto (CB_m), foi calculado o custo por g, mL, μL ou n/mol de cada reagente (CpU_m), visto que, grande parte dos produtos necessários para a PCR é utilizada na forma de solução (preparadas no Laboratório) e não na sua forma bruta ou prontos para o uso (p.a.). Portanto, foi calculado o custo por produto (CpP), para depois realizar a somatória de todos os ingredientes necessários para a preparação de cada solução (CFS).

$$\text{CpP} = \text{CpU}_m \times \text{Vu}$$

CpP : custo por produto.

CpU_m : custo por unidade medida.

Vu : volume utilizado.

CFS: somatória dos CpP

CFS: custo final da solução.

CpP : custo por produto.

Com o valor final de cada solução (CFS) foi possível aferir o custo unitário médio (CUM_a) de cada ingrediente utilizado para a PCR.

$$\text{CUM}_a = \text{QUA} \times \text{CFS} / \text{QTs}$$

CUM_a : custo unitário médio.

QUA: quantidade utilizada por amostra.

CFS: custo final da solução.

QTs: quantidade total da solução.

Para os produtos p.a. (DEPC, propanol e clorofórmio utilizado na extração do DNA) foi realizado somente um cálculo para o custo unitário médio (CUM_b).

$$\text{CUM}_b = \text{QUA} \times \text{CpU}_m$$

CUM_b : custo unitário médio.

QUA: quantidade utilizada por amostra.

CpU_m : custo por unidade medida.

No cálculo do custo da mão de obra especializada computou-se o valor da hora trabalhada do Técnico de Laboratório I (faixa início IA, código 680, aprovado pela Comissão Central de Recursos Humanos (CCRH) em 24/03/2009, através de levantamento no Departamento de Recursos Humanos da Coordenadoria de Administração Geral - Codage, Universidade de São Paulo, em 21 de setembro de 2009 (Anexo C e D) baseado nos vencimentos com carga horária de 240h mensais.

A remuneração da mão de obra (RMO) foi calculada com base no salário, encargos sociais e benefícios:

- INSS, Fundo de garantia, PIS e outros: 28,5% do salário bruto.
- Insalubridade: 20% do salário mínimo.
- Auxílio transporte: R\$ 9,40 dia útil x qtd de dias/mês (abatimento de 6% no salário bruto).
- Vale-alimentação: R\$ 400,00 / mês.
- Décimo-terceiro: 8% do salário bruto / mês.
- Férias: 8% do salário bruto + 1/3.

Com o RMO foi possível calcular o custo da mão de obra por hora e por segundo.

$$\text{RTH} = \text{RMO} / 240\text{h}$$

RTH: remuneração de trabalho por hora.

RMO: remuneração da mão de obra.

240h: carga horária mensal estimada pelo Recursos Humanos da FMVZ/USP.

Como é necessário estimar o tempo gasto pela mão de obra, foi calculado o tempo através da média durante três aferições em dias diferentes, em cada etapa do procedimento.

Etapas consideradas: recebimento da amostra (T1), triagem (T2), preparo da amostra (T3), extração do DNA (T4), amplificação (T5), eletroforese (T6), elaboração do laudo de resultado (T7).

Em cada etapa foi mensurado um tempo, totalizando sete tempos (T1, T2, T3, T4, T5, T6, e T7), gerando o tempo gasto total (TG_t).

$$\mathbf{TG_t: T1 + T2 + T3 + T4 + T5 + T6 + T7}$$

$$\mathbf{MTG_t: TG_t / Af}$$

MTG_t: média do tempo gasto total.

TG_t: tempo gasto total.

Af: número de aferições.

A mensuração do tempo despendido foi feita com um cronômetro de minuto decimal. O tempo gasto médio não inclui processos em que a amostra encontra-se à -20°C, no termociclador, na corrida da eletroforese ou em qualquer etapa na qual é necessário o aguardo de mais de 10 minutos, pois nesse caso, o técnico está apto a desempenhar outras atividades.

Nos tempos T4, T5 e T6 o cálculo foi em relação à análise de uma amostra juntamente com um controle negativo e um controle positivo.

A partir da média do tempo gasto total (TG_t), foi calculado o custo da mão de obra em relação à hora.

$$\mathbf{CCMO= MTG_t \times RTH}$$

CCMO: Cálculo do custo da mão de obra.

MTG_t: média do tempo gasto total.

RTH: Remuneração de trabalho por hora.

Para a realização do custo total direto médio do teste (CTDM), a aferição foi baseada na somatória dos custos unitários médios mais o cálculo do custo de mão de obra.

$$\text{CTDM} = \text{SCUM} + \text{CCMO}$$

CTDM: Custo Total Direto Médio do teste.

SCUM: somatória dos custos médios (CUM_a e CUM_b).

CCMO: cálculo do custo de mão de obra.

O cálculo do custo final foi baseado na somatória do custo total direto médio do teste.

RESULTADOS

6 RESULTADOS

Os resultados da padronização da técnica, limiar mínimo de detecção, análise das amostras da COVISA e levantamento de custos estão descritos a seguir.

6.1 PADRONIZAÇÃO DA TÉCNICA

Não houve formação de banda na PCR com amostras de carne de eqüino, de coelho e proteína de soja, não havendo resultado falso positivo ou reação cruzada, como ilustrado na figura 8 (no caso, para a espécie suína).

Figura 8 - Gel de agarose: especificidade de suíno.

L: marcador de peso molecular; Sui: amostra de carne de suíno; Can: amostra de músculo de cão; Bov: amostra de carne de bovino; Coe: amostra de carne de coelho; Soj: amostra de proteína de soja; Eq: amostra de músculo eqüino; Neg: controle negativo (100% água DEPC).

A apresentação do produto (refrigerado, congelado, cru, cozido, temperado ou adicionado de outros ingredientes) não interferiu no processo.

6.1.1 Limiar mínimo de detecção

Obteve-se 0,1% como limite mínimo de detecção para bovino (figura 9), 0,01% para suíno (figura 9) e 10% para cão (figura 10).

Figura 9 - Perfil das bandas no gel de agarose (bovino e suíno)

Primeira linha: 1. 100% água DEPC; 2. 0,001% carne suína; 3. 0,01% carne suína; 4. Controle negativo (100% água DEPC); 5. 0,1% carne suína; 6. 1% carne suína; 7. 10% carne suína; 8. 25% carne suína; 9. 50% carne suína; 10. 75% carne suína; 11. 100% carne suína; 12. Controle negativo (100% água DEPC); 13. Controle negativo mix; L. Marcador de peso molecular.

Segunda linha: 1. 100% água DEPC; 2. 0,001% carne bovina; 3. 0,01% carne bovina; 4. 0,1% carne bovina; 5. 1% carne bovina; 6. Controle negativo (100% água DEPC); 7. 10% carne bovina; 8. 25% carne bovina; 9. 50% carne bovina; 10. 75% carne bovina; 11. 100% carne bovina; 12. Controle negativo (100% água DEPC); 13. Controle negativo do mix; L. Marcador de peso molecular.

Figura 10 - Perfil das bandas no gel de agarose (canino)

1. 100% água DEPC; 2. 0,001% músculo canino; 3. 0,01% músculo canino; 4. 0,1% músculo canino; 5. 1% músculo canino; 6. Controle negativo (100% água DEPC); 7. 10% músculo canino; 8. 25% músculo canino; 9. 50% músculo canino; 10. 75% músculo canino; 11. 100% músculo canino; 12. Controle negativo (100% água DEPC); 13. Controle negativo mix; L. Marcador de peso molecular.

6.2 AMOSTRAS DA COVISA

No período da pesquisa, a Vigilância Sanitária do Município de São Paulo encaminhou 53 amostras provenientes de 20 restaurantes coreanos vistoriados, nos bairros da Liberdade, Aclimação e Bom Retiro.

Nas vistorias, quando da coleta de amostras foi perguntado ao representante do estabelecimento (proprietário ou funcionário que acompanhou a fiscalização) qual o tipo de carne estava sendo coletada, sendo relatado (gráfico 1): 28/53 (52,83%) como espécie bovina, 8/53 (15,09%) como espécie suína, 2/53 (3,77%) como ovina, 1/53 (1,89%) como carne de pato, 0 (0%) como espécie canina e, em 14/53 (26,42%) amostras não foi informada à espécie.

Gráfico 1 – Amostras encaminhadas pela COVISA, segundo a espécie*, no período de junho a novembro de 2009 - São Paulo - 2009

* informações obtidas no estabelecimento vistoriado

As amostras vieram em diversas formas de apresentação, as principais características macroscópicas estão descritas na tabela 1.

Tabela 1 – Principais características macroscópicas das amostras coletadas nas vistorias realizadas pela COVISA, durante o período de junho a novembro de 2009 - São Paulo - 2009

Amostras coletadas	Quantidade
Carne crua, refrigerada, sem tempero	6
Carne crua, refrigerada, sem tempero, tipo “carpaccio”	2
Carne crua, refrigerada, temperada	4
Carne crua, congelada, sem tempero	6
Carne crua, congelada, temperada	4
Carne cozida, refrigerada, sem tempero	1
Carne cozida, congelada, temperada	1
Carne com osso, crua, refrigerada, sem tempero	1
Carne com osso, crua, refrigerada, temperada	1
Carne com osso, crua, congelada, sem tempero	5
Carne com osso, com gordura, crua, congelada	1
Carne com osso, com gordura, cozida, congelada, temperada	1
Carne com osso, com gordura, cartilagem, crua, refrigerada	2
Carne com osso, pêlos, cozida, congelada, temperada	2
Carne com gordura, crua, refrigerada, sem tempero	2
Carne com gordura, cozida, temperada	1
Carne com gordura, crua, congelada temperada	2
Carne com gordura, pele, crua, refrigerada	1
Carne com gordura, pele, crua, congelada	1
Carne com gordura, casco, crua, refrigerada	1
Carne fibrosa (consistência firme), congelada, temperada	1
Carne moída, crua, refrigerada, temperada	1
Carne moída, crua, refrigerada, sem tempero	1
Carne defumada, peça única, congelada, temperada	1
Carnes defumadas, três peças, com gordura, cozida, temperada	1
Tripa congelada	1
Tripa em trança refrigerada (conteúdo intestinal)	1
Lingüiça (carne previamente moída, com pouca quantidade de gordura, temperada embutida)	1
TOTAL	53

Os resultados das amostras encaminhadas pela COVISA provenientes de restaurantes vistoriados em São Paulo, por ordem numérica de lacre estão citadas no quadro 2.

Quadro 2 – Resultado do PCR das amostras encaminhadas pela COVISA provenientes de restaurantes vistoriados em São Paulo, por ordem numérica de lacre, no período de junho a novembro de 2009 – São Paulo – 2009.

(continua)

LACRE	TCA nº	AMOSTRA *	RESULTADO	OBSERVAÇÃO
7309	13037	Não informada	Não identificado	Falta de primer específico ¹
7312	13034	Não informada	Suína	
7313	13033	Não informada	Bovina e Suína	Contaminação
10499	Não recebido	Não informada	Bovina	
10501	Não recebido	Não informada	Bovina	
12512	12512	Pato	Não identificado	Falta de primer específico ²
12513	12513	Suína	Suína	
12514	12514	Bovina	Bovina	
12515	12515	Bovina	Bovina	
12516	12516	Bovina	Bovina	
12517	12517	Bovina	Bovina	
12518	12518	Bovina	Bovina	
12519	12519	Bovina	Bovina	
12520	12520	Bovina	Bovina	
12521	12521	Bovina	Bovina	
12522	12522	Suína	Suína	
15744	13032	Não informada	Bovina	
15745	13036	Não informada	Bovina e Suína	Contaminação
15753	13035	Não informada	Bovina e Suína	Contaminação
15754	13038	Não informada	Não identificado	Falta de primer específico ³
15756	13031	Não informada	Bovina	
15757	1473	Não informada	Suína	
16077	12557	Bovina	Bovina	
16078	12554	Bovina	Bovina	
16079	12554	Suína	Suína	
16080	12553	Bovina	Bovina	
17425	12567	Bovina	Bovina	
17982	12509	Bovina	Bovina	
17983	12510	Bovina	Bovina	
18083	12563	Bovina	Bovina	
18701	13029	Não informada	Bovina	
18702	13028	Não informada	Bovina	
18703	13027	Não informada	Não identificado	Falta de primer específico ⁴
18704	12776	Não informada	Bovina e Suína	Lingüiça caseira
18710	13026	Não informada	Suína	
19811	12551	Bovina	Bovina	
19812	12552	Bovina	Bovina	
19813	12561	Bovina	Bovina	
19814	12561	Bovina	Bovina	
19819	12562	Bovina	Bovina	
19820	12552	Suína	Suína	
19822	12555	Bovina	Bovina	
19823	12555	Bovina	Bovina	
19869	12511	Bovina	Bovina	
19891	12572	Suína	Suína	

(conclusão)

LACRE	TCA nº	AMOSTRA *	RESULTADO	OBSERVAÇÃO
19894	12569	Suína	Suína	
19895	12573	Bovina	Bovina	
19896	12574	Ovina	Não identificado	Falta de primer específico ⁵
19897	12571	Suína	Suína	
19898	12568	Bovina	Bovina	
19899	12570	Suína	Suína	
19900	12574	Ovina	Não identificado	Falta de primer específico ⁵
28469	12566	Bovina	Bovina	

* espécie relatada pelo proprietário do estabelecimento durante a coleta.

¹ semelhança macroscópica: carne de avestruz

² semelhança macroscópica: carne de pato

³ semelhança macroscópica: peixe

⁴ semelhança macroscópica: carne de frango

⁵ semelhança macroscópica: carne ovina

Das amostras submetidas à reação em cadeia pela polimerase, 32/53 (60,38%) foram da espécie bovina, 11/53 (20,75%) da espécie suína, 6/53 (11,32%) de espécie não identificada, 4/53 (7,55%) apresentaram banda para a espécie bovina / suína e 0/53 (0%) da espécie canina. Dados representados no gráfico 2.

Gráfico 2 – Resultado das amostras encaminhadas pela COVISA, no período de junho a novembro de 2009 - São Paulo - 2009

Todas as amostras analisadas geraram um laudo (Apêndice B), encaminhado à COVISA.

6.3 LEVANTAMENTO DE CUSTOS E TEMPO

Com base nos orçamentos, foi feito a média do custo bruto (CB_m) e o custo por g, mL, μ L ou por n/mol de cada reagente (CpU_m), conforme quadro 3.

Quadro 3 – Custo unitário de reagentes utilizados para identificação da espécie na PCR, valores aferidos de maio a novembro de 2009 - São Paulo - 2009

(continua)

REAGENTES	ORÇAMENTOS R\$ (Or) ¹	MÉDIA R\$ (CB_m) ²	CUSTO R\$ (CpU_m) ³ por g, mL, μ L ou n/mol
Tiocianato de Guanidina	1640,00 1.706,00 227,00 1053,28	1.156,57	2,31314/g
Tris base	80,00	80,00	0,8/g
Tris HCl	202,32 149,00	175,66	1,7566/g
Na ₂ EDTA	164,00 119,00	141,50	1,415/g
Fenol	108,00	108,00	1,08/mL
NaOH	13,81	13,81	0,05524/g
Glicogênio	315,52	315,52	3,1552/ μ L
Clorofórmio p.a.	81,90 81,90 78,00	80,60	0,0806/mL
Propanol p.a.	178,50 68,60	123,55	1,2355/mL
Etanol p.a.	81,20 81,20	81,20	0,0812/mL
Acido Bórico	114,10 119,00 170,00	134,36666	0,26873/g
Água destilada	9,36	9,36	0,00936/mL
Água destilada ultrapura (livre de DNA e RNA)	190,00	190,00	0,19/mL
Água DEPC	643,33 250,56	446,945	0,44694/mL

(conclusão)

REAGENTES	ORÇAMENTOS R\$ (Or) ¹	MÉDIA R\$ (CB _m) ²	CUSTO R\$ (CpU _m) ³ por g, mL, µL ou n/mol
dNTP SET 100mM: dATP, dCTP, dGTP, dTTP	290,00 369,00 864,90 1081,12	651,255	0,65125/µL
Primer bovino forward	40,95 35,70	38,325	1,21281/nmol
reverse	42,90 37,40	40,15	1,10606/nmol
Primer Suíno forward	42,90 37,40	40,15	1,17742/nmol
reverse	52,65 45,90	49,275	1,39589/nmol
Primer Cão forward	35,10 30,60	32,85	1,38608/nmol
reverse	37,05 32,30	34,675	0,95261/nmol
Taq DNA polimerase + MgCl ₂ + Tampão Buffer	100,00 280,00 246,00	208,66666	0,05796/µL
Agarose para eletroforese	565,64 2700,00 786,64 615,00 540,00	1.041,456	10,41456/g
Brometo de etídio	442,75	442,75	14,75833/mL
100BP DNA Ladder + Corante 6 X Loading	140,00 390,00 445,44	325,14666	0,30966/µL

¹ Or: orçamentos² CB_m: custo bruto³ (CpU_m): custo por unidade medida

Devido ao elevado número de soluções preparadas no Laboratório, inicialmente, foi calculado o custo por produto (CpP) e realizado o custo total da solução (CFS), conforme quadro 4.

Quadro 4 – Custos das soluções preparadas no LABMAS para PCR, no período de maio a novembro de 2009 - São Paulo - 2009

(continua)

SOLUÇÃO	ÍTEM	VOLUME (Vu) ¹	CUSTO R\$ (CpP) ²	TOTAL R\$ (CFS) ³	QTDE (QTs) ⁴
TRIS HCl 1M	a) TRIS HCl 1M pH 7.5 b) Água destilada	121,1g 800mL	121,72426 152,00	273,72426	800mL
Na ₂ EDTA 0,5M pH 8.0	a) EDTA Sal dissódico b) Água destilada c) NaOH (ajuste pH)	186,1g 800mL x:20g	263,3315 152,00 1,1048	416,4363	800mL
GT 5M fenol pH 7.5	Isotiocianato de guanidina TRIS HCl 1M Na ₂ EDTA 0,25M pH 8.0 (Na ₂ EDTA 0,5M + água destilada d) Água destilada e) Fenol pH 7.5 f) Glicogênio	60g 5mL 5mL 5mL 90mL 100mL 20 µL	138,7884 1,71077 2,6027 0,95 17,10 108,00 0,06310	269,21497	200mL
Etanol 70%	a) Etanol p.a. b) Água destilada	70mL 30mL	5,684 5,70	11,384	100mL
TE TRIS EDTA pH 8.0	a) TRIS HCl 1M b) Na ₂ EDTA 0,5M c) Água destilada	5mL 1mL 94mL	1,71077 0,52054 93,86	95,91131	500mL
dNTP 10mM	a) dATP, dGTP, dCTP, dTTP b) Água destilada	10µL cd 60µL	26,05 0,0114	26,0614	100µL
dNTP 1,25mM (*)	a) dNTP 10mM b) Água destilada	62,5µL 437,50µL	16,28812 0,08312	16,37124	500µL
Brometo de etídeo	a) Brometo de etídeo b) Água destilada	25µL 500mL	0,36895 4,68	5,04895	500mL
100bp Ladder	a) DNA Ladder b) 6x DNA Loading Dye c) Água destilada	10µL 10µL 40µL	3,0966 3,0966 0,0076	6,2008	60µL
Primer 1 (solução mãe)	a) Primer bovino f b) Água destilada a) Primer bovino r b) Água destilada	36,3nmol 363 µL 31,6nmol 316 µL	38,325 0,06897 40,15 0,06004	38,39397 40,21004	363 µL 316 µL
Primer 1 (1:10)	a) Solução mãe1 f b) Água destilada a) Solução mãe1 r b) Água destilada	20µL 180 µL 20µL 180 µL	2,11537 0,0342 2,54113 0,0342	2,14957 2,57533	200µL 200µL
Primer 2 (solução mãe)	a) Primer suíno f b) Água destilada a) Primer suíno r b) Água destilada	34,1nmol 341 µL 35,3nmol 353 µL	40,15 0,06479 49,275 0,06707	40,21479 49,34207	341 µL 353 µL

(conclusão)

SOLUÇÃO	ÍTEM	VOLUME (Vu) ¹	CUSTO R\$ (CpP) ²	TOTAL R\$ (CFS) ³	QTDE (QTs) ⁴
Primer 2 (1:10)	a) Soluç. Mãe 2 f	20µL	2,35863	2,39283	200µL
	b) Água destilada	180µL	0,0342		
	a) Soluç. mãe 2 r	20µL	2,79558	2,82978	200µL
	b) Água destilada	180µL	0,0342		
Primer 3 (solução mãe)	a) Primer cão f	23,7nmol	32,85	32,89503	237µL
	b) Água destilada	237 µL	0,04503		
	a) Primer cão r	36,4nmol	34,675	34,74416	364µL
	b) Água destilada	364µL	0,06916		
Primer 3 (1:10)	a) Soluç. Mãe 3 f	20µL	2,77595	2,81015	200µL
	b) Água destilada	180µL	0,0342		
	a) Soluç. mãe 3 r	20µL	1,90901	1,94321	200µL
	b) Água destilada	180µL	0,0342		
TBE 10X	a) TRIS base	10,8g	1,728	99,1808	500mL
	b) Ácido bórico	5,5g	1,47801		
	c) Na ₂ EDTA	0,83g	0,97479		
	d) Água destilada	500mL	95,00		
TBE 0,5X	a) TBE 10X	25mL	4,9709	95,2209	500mL
	b) Água destilada	475mL	90,25		
Agarose 1,5%	a) Agarose	1,5g	15,62184	36,665	100mL
	b) TBE 0,5X	100mL	19,044		

(¹) concentração inicial x volume inicial= concentração final x volume final

¹ **Vu**: volume utilizado

² **CpP**: custo por produto

³ **CFS**: custo final da solução

⁴ **QTs**: quantidade total da solução preparada

Com a quantidade total de solução preparada (QTs) e o valor final de cada solução (CFS) foi possível aferir o custo unitário médio (CUM_a) da solução utilizada para a PCR. Nos produtos prontos para o uso, só foi calculado o custo unitário médio dos produtos p.a (CUM_b).

O valor total da PCR contabilizados com o primer específico de cada espécie e amostra única (sem controles) estão no quadro 5.

Quadro 5 – Reagentes utilizados na PCR para identificação da espécie, com amostra única, no Laboratório de Higiene Alimentar e LABMAS - São Paulo - 2009

(continua)

ESPÉCIE BOVINA		
REAGENTES	QUANTIDADE UTILIZADA POR AMOSTRA (QUA)¹	CUSTO (CUM_a)² ou (CUM_b)³
TE TRIS EDTA pH 8.0	80mL	15,3456
Solução de GT	600µL	0,80764
Clorofórmio	100µL	0,00806
Propanol	600µL	0,7413
Solução de Etanol a 70%	500µL	0,05692
Água destilada ultrapura	20µL	0,0038
Solução dNTP 1,25mM	4µL	0,13096
Primers bovino forward	1,25µL	0,01344
reverse	1,25µL	0,0161
Taq DNA polimerase	0,25µL	0,01449
Cloreto de magnésio	0,75µL	0,04347
Tampão Buffer 10X PCR	2,5µL	0,1449
DEPC	12,5µL	0,00559
Solução Agarose 1,5%	30mL	10,9995
Solução Brometo de etídio	500mL	5,04895
Solução 100BP DNA Ladder	3µL	0,31005
TOTAL (R\$)		33,69
ESPÉCIE SUÍNA		
REAGENTES	QUANTIDADE UTILIZADA POR AMOSTRA (QUA)¹	CUSTO (CUM_a)² ou (CUM_b)³
TE TRIS EDTA pH 8.0	80mL	15,3456
Solução de GT	600µL	0,80764
Clorofórmio	100µL	0,00806
Propanol	600µL	0,7413
Solução de Etanol a 70%	500µL	0,05692
Água destilada ultrapura	20µL	0,0038
Solução dNTP 1,25mM	4µL	0,13096
Primers suíno forward	1,25µL	0,01495
reverse	1,25µL	0,01767
Taq DNA polimerase	0,25µL	0,01449
Cloreto de magnésio	0,75µL	0,04347
Tampão Buffer 10X PCR	2,5µL	0,1449
DEPC	12,5µL	0,00559
Solução Agarose 1,5%	30mL	10,9995
Solução Brometo de etídio	500mL	5,04895
Solução 100BP DNA Ladder	3µL	0,31005
TOTAL (R\$)		33,69

(conclusão)

CÃO		
REAGENTES	QUANTIDADE UTILIZADA POR AMOSTRA (QUA)¹	CUSTO (CUM_a)² ou (CUM_b)³
TE TRIS EDTA pH 8.0	80mL	15,3456
Solução de GT	600µL	0,80764
Clorofórmio	100µL	0,00806
Propanol	600µL	0,7413
Solução de Etanol a 70%	500µL	0,05692
Água destilada ultrapura	20µL	0,0038
Solução dNTP 1,25mM	4µL	0,13096
Primers cão forward	1,25µL	0,01756
reverse	1,25µL	0,01215
Taq DNA polimerase	0,25µL	0,01449
Cloreto de magnésio	0,75µL	0,04347
Tampão Buffer 10X PCR	2,5µL	0,1449
DEPC	12,5µL	0,00559
Solução Agarose 1,5%	30mL	10,9995
Solução Brometo de etídio	500mL	5,04895
Solução 100BP DNA Ladder	3µL	0,31005
TOTAL (R\$)		33,69

¹QUA: quantidade utilizada por amostra²CUM_a: custo unitário médio da solução³CUM_b: custo unitário médio dos produtos p.a

É importante ressaltar que na realização de uma PCR deve ser colocado juntamente com a amostra, um controle negativo e um positivo da reação. Portanto, o valor deve ser contabilizado sobre a amostra e seus controles, como no quadro 6.

Quadro 6 – Reagentes utilizados para PCR, com uma amostra e dois controles (positivo e negativo), no Laboratório de Higiene Alimentar e LABMAS São Paulo - 2009

REAGENTES	QUANTIDADE UTILIZADA (QUA) ¹			CUSTO (CUM _a) ² ou (CUM _b) ³
	A	C-	C+	
TE TRIS EDTA pH 8.0	80mL	-	80mL	30,6912
Solução de GT	600µL	600µL	600µL	2,42293
Clorofórmio	100µL	100µL	100µL	0,02418
Propanol	600µL	600µL	600µL	2,2239
Solução de Etanol a 70%	500µL	500µL	500µL	0,17076
Água destilada ultrapura	20µL	220 µL	20 µL	0,0494
Solução dNTP SET	4µL	4µL	4µL	0,39288
<i>x̄</i> dos primers forward reverse	1,25µL	1,25µL	1,25µL	0,04595
	1,25µL	1,25µL	1,25µL	0,04592
Taq DNA polimerase	0,25µL	0,25µL	0,25µL	0,04347
Cloreto de magnésio	0,75µL	0,75µL	0,75µL	0,13041
Tampão Buffer	2,5µL	2,5µL	2,5µL	0,4347
DEPC	12,5µL	12,5µL	12,5µL	0,01676
Solução Agarose 1,5%	30mL			10,9995
Solução Brometo de etídio	500mL			5,04895
Solução 100BP DNA Ladder	3µL			0,31005
TOTAL (R\$)				53,05

¹ QUA: quantidade utilizada por amostra

² CUM_a: custo unitário médio da solução

³ CUM_b: custo unitário médio dos produtos p.a

A: amostra, C-: controle negativo, C+: controle positivo

Esse cálculo é referente a extração de DNA para uma espécie, como para cada amostra é necessário fazer triplicata devido ao uso de três primers diferentes, fato que gera um custo inicial maior, foi realizado (com sucesso) um procedimento de fazer triplicata somente a partir do mix (etapa de fato, em que é adicionado os primers). O custo final foi de R\$ 55,27 para identificação das três espécies, conforme expresso no quadro 7.

Quadro 7 – Reagentes utilizados para PCR, com uma amostra e dois controles (positivo e negativo) e triplicata a partir do mix - São Paulo - 2009

REAGENTES	QUANTIDADE UTILIZADA (QUA) ¹			CUSTO (CUM _a) ² ou (CUM _b) ³
	A	C-	C+	
TE TRIS EDTA pH 8.0	80mL	-	80mL	30,6912
Solução de GT	600µL	600µL	600µL	2,42293
Clorofórmio	100µL	100µL	100µL	0,02418
Propanol	600µL	600µL	600µL	2,2239
Solução de Etanol a 70%	500µL	500µL	500µL	0,17076
Água destilada ultrapura	20µL	220 µL	20 µL	0,0494
Solução dNTP SET	12µL	12µL	12µL	1,17864
x dos primers forward reverse	3,75µL	3,75µL	3,75µL	0,13785
	3,75µL	3,75µL	3,75µL	0,13776
Taq DNA polimerase	0,75µL	0,75µL	0,75µL	0,13041
Cloreto de magnésio	2,25µL	2,25µL	2,25µL	0,39123
Tampão Buffer	7,5µL	7,5µL	7,5µL	1,3041
DEPC	37,5µL	37,5µL	37,5µL	0,05028
Solução Agarose 1,5%	30mL			10,9995
Solução Brometo de etídio	500mL			5,04895
Solução 100BP DNA Ladder	3µL			0,31005
TOTAL (R\$)				55,27 (SCUM)⁴

Mix

¹ QUA: quantidade utilizada por amostra

² CUM_a: custo unitário médio da solução

³ CUM_b: custo unitário médio dos produtos p.a

⁴ SCUM: somatória dos custos unitários médios

A: amostra, C-: controle negativo, C+: controle positivo

O cálculo da remuneração da mão de obra (RMO) do técnico nível IA, foi realizado com base no salário, encargos sociais e benefícios. Sendo salário bruto considerado de R\$ 1.678,75 (Anexo D).

- INSS, Fundo de garantia, PIS e outros: 28,5% do salário bruto = R\$ 478,44.
- Insalubridade: 20% do salário mínimo (R\$ 465,00) = R\$ 93,00.
- Auxílio transporte: R\$ 9,40 dia útil x qtde de dias/mês (abatimento de 6% no salário bruto). Média de 20 dias: R\$ 188,00 (abatimento de R\$ 100,73 mês).
- Vale-alimentação = R\$ 400,00 / mês.
- Décimo-terceiro: 8% do salário bruto / mês = R\$ 134,30.
- Férias: 8% do salário bruto + 1/3 desse valor = R\$ 179,07.

Pelos cálculos citados, a remuneração da mão de obra é de R\$ 3.050,83, com este valor foi calculado a remuneração da mão de obra por hora R\$ 12,71 (RTH).

Foi estimada a média do tempo gasto total (tabela 2) para a realização de toda a análise, em todas as etapas: da triagem à elaboração do laudo.

Tabela 2 – Determinação do tempo, em horas, para a realização de PCR de uma amostra e dois controles (positivo e negativo) nos Laboratórios de Higiene Alimentar e LABMAS, com triplicata a partir do mix, no período de julho a novembro de 2009 – São Paulo – 2009

DATA	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	TOTAL(TG _t) ¹
22/07/09	4'05"	4'59"	12'28"	2h44'13"	7'24"	10'04"	5'22"	3h27'55"
28/08/09	4'17"	5'12"	11'57"	2h38'59"	8'56"	10'38"	4'59"	3h23'38"
16/11/09	7'14"	5'53"	13'05"	2h56'39"	8'27"	11'44"	5'34"	3h47'56"

Média do tempo gasto total (MTG_t): 3h33'23"

T1: recebimento da amostra, T2: triagem, T3: preparo da amostra, T4: extração do DNA, T5: amplificação, T6: eletroforese, T7: elaboração do laudo.

¹ (TG_t): tempo gasto total

Com a média do tempo gasto total (MTG_t) foi calculado o custo da mão de obra (CCMO) em relação ao tempo (3h33'23"), obtendo-se R\$45,20.

Para o custo total direto médio do teste (CTDM) foi realizada a somatória do custo da mão de obra (CCMO) e dos reagentes através da somatória dos custos unitários médios (SCUM), totalizando R\$ 100,47.

7. DISCUSSÃO

Para a realização da padronização de uma técnica laboratorial é indispensável que sejam seguidas as Boas Práticas Laboratoriais. São considerados pontos críticos de controle: o preparo da amostra, dos reagentes e soluções, além dos equipamentos e utensílios.

Em relação às amostras: devem ser coletadas com a utilização de luvas e sacos plásticos estéreis. Quando a amostra vier congelada, o descongelamento deve ser realizado separadamente para cada carne (para evitar “contaminação” pelo exsudato).

É importante garantir que os reagentes sejam preparados dentro dos limites pré-estabelecidos e que os resultados sejam reprodutíveis e confiáveis (GARFIELD, 1994). Todas as soluções devem ser rotuladas com nome, concentração, data do preparo / validade, responsável pelo fracionamento / preparação e condições de armazenamento.

Os equipamentos necessitam ser periodicamente inspecionados, limpos e mantidos calibrados. Todo utensílio que tiver contato com as amostras deve ser autoclavado (vidraria) e, se possível, deve ser utilizado somente material descartável.

Outros cuidados sugeridos:

- Para diminuir o risco de contaminação na etapa de preparo, é recomendável a utilização do stomacher em relação ao mixer.
- No mix é desejável utilizar um controle negativo para verificar contaminação dos reagentes (tampão Buffer, dNTP, $MgCl_2$, DEPC e Taq DNA polimerase), visto ser de uso coletivo no Laboratório;
- Na eletroforese, é importante observar quando o brometo de etídio foi preparado e qual a frequência de sua utilização no laboratório (quanto mais frequentemente é utilizado, maior o tempo necessário para corar).

A capacitação técnica é fator fundamental, pois há grande quantidade de etapas e procedimentos. O técnico de laboratório deve ter cuidado para evitar qualquer contaminação do material (por qualquer outro tipo de DNA), possuir capacidade para avaliar os resultados e rastrear possíveis falhas.

Na padronização da PCR para a espécie canina, o limite mínimo de detecção foi de 10%. Algumas tentativas para reduzir esse limite foram realizadas, como: alteração da concentração de alguns reagentes do mix (o dobro da quantidade de Taq DNA polimerase e diminuição do volume de água DEPC), alteração no ciclo (mesma temperatura programada no termociclador para as espécies bovina e suína), mas não houve mudança no resultado.

No início da padronização, para as espécies bovina e suína o limite mínimo de detecção foi de 1% e 0,1%, respectivamente; após as tentativas para redução do limiar de detecção de canino houve alteração nos resultados de bovino e de suíno, correspondente há uma diluição seriada (10^{-1}) através da utilização de 0,25µL de Taq DNA polimerase. Os limites mínimos de detecção foram considerados satisfatórios.

Para estudos posteriores, recomendam-se algumas alterações no protocolo utilizado para espécie canina para obtenção de um melhor resultado ou até a mudança de primer. É provável que, numa fraude, a troca de uma espécie por outra, na matéria-prima ou produto final, seja maior que 10%. Porém é necessário alcançar um limite de detecção menor, como os alcançados nas espécies bovina e suína. Alguns autores como Calvo, Osta e Zaragoza (2001) e Calvo et al. (2002) acreditam que o valor deve ser o mais baixo possível; já Meyer, Candrian e Luth (1994) não consideram desejável um limite de detecção abaixo de 0,1% para alimentos, devido à detecção de contaminações.

Ainda em relação ao primer canino, foram notadas várias reações inespecíficas, com tamanhos de bandas variados, mas que não afetaram a interpretação dos resultados, visto serem bandas com tamanhos bem divergentes de 213 pb (figura 11).

Figura 11 - Perfil das bandas no gel de agarose (bandas inespecíficas)

1 a 5. e 7 a 11. amostras COVISA; 6 e 12. Controle negativo (100% água DEPC); 13. Controle positivo (no caso: bovino e canino); L. Marcador de peso molecular

Em 4/53 amostras da COVISA (7,55%) apresentaram formação de banda para espécie bovina e suína. Uma das amostras (1,89%), sob lacre nº18704, existia a possibilidade de conter materiais de origem animal de espécies diferentes, por ser uma linguiça de fabricação caseira. As outras três amostras (5,66%) foram denominadas “contaminadas” porque apresentaram bandas de bovino e suíno, mas eram originárias de um único corte de carne (provenientes do mesmo restaurante). Para esse resultado, levantaram-se duas hipóteses: contaminação no estabelecimento de origem ou no Laboratório. A contaminação durante a coleta foi desconsiderada, pois houve orientação técnica de como proceder para evitá-la.

Para descartar uma possível contaminação no Laboratório, todo o processo foi repetido por três vezes desde as etapas iniciais (preparo da amostra, extração do DNA, amplificação e eletroforese). Na etapa de preparo foram utilizadas embalagens plásticas estéreis e houve a troca do equipamento de homogeneização (uso do stomacher). Não ocorreu alteração nos resultados.

Em relação à contaminação no estabelecimento de origem não houve interferência direta, visto que o presente estudo não previa tal ação, porém houve o acompanhamento de oito vistorias da COVISA em restaurantes do Bom Retiro (Anexo E).

A contaminação cruzada é uma irregularidade freqüente identificada nas vistorias da COVISA, relacionada aos equipamentos (ausência de separação entre grupos alimentares, higienização inadequada e presença de embalagens primárias

danificadas) e manipulação simultânea de carnes bovina, aves e lingüiça (SÃO PAULO, [2007]).

Em 6/53 amostras (11,32%) os resultados não foram conclusivos, devido à falta do primer específico. Em duas amostras (3,77%) foram relatadas como de espécie ovina e uma (1,89%) como carne de pato, durante as vistorias. Nas outras três amostras (5,66%) a espécie não foi informada. Durante o preparo das amostras para a extração observou-se semelhança macroscópica com carne de frango, peixe e avestruz, porém não foi possível concluir a identificação.

Não foi encontrado resultado confirmatório para carne de cão, nem nas 14/53 amostras (26,42%) provenientes dos restaurante suspeitos coletadas pela COVISA, conforme reportagens dos dias 13 e 14 de novembro de 2009 (Anexo F). As amostras recolhidas pela 2ª Delegacia de Saúde Pública do Departamento de Polícia de Proteção à Cidadania (DPCC) não foram enviadas para análise.

O fato de não ter encontrado resultado positivo para a espécie canina, não descarta a hipótese de existir utilização de carne de cão para o consumo humano. É possível afirmar que dentre as amostras enviadas pela COVISA, durante a realização deste estudo, nenhuma delas foi identificada como canina. Vale lembrar, que as amostras foram colhidas aleatoriamente, nos dois restaurantes suspeitos.

Em 18/53 das amostras (33,96%) da COVISA recebidas, foram encontradas diferentes estruturas: 2/53 (3,77%) tripa, 11/53 (20,76%) osso, 1/53 (1,89%) casco, 2/53 (3,77%) osso /cartilagem e em 2/53 (3,77%) pele. Diluições variadas foram realizadas para conseguir detectar banda, pois havia a formação de um rastro. A diluição menor utilizada foi de 5% de amostra e 95% de água DEPC, para as tripas.

Como na padronização só foi utilizado músculo de membro posterior, é indicado padronizar novas espécies e também utilizar diferentes cortes e/ou apresentações diversas.

Durante a fase de preparo da amostra, foram testadas concentrações diferentes de carne com a solução tampão: 50g / 50mL, 40g / 60mL, 30g / 70mL e 20g / 80mL. O objetivo era conseguir um preparo adequado com a menor quantidade possível de amostra, para analisar quantidades mínimas de material encaminhado pela Vigilância Sanitária. A concentração utilizada, tanto na padronização, quanto nas amostras da COVISA, foi de 20g de amostra / 80mL de TE TRIS EDTA pH 8.0.

No levantamento dos custos, a proporção de 20g de amostra e 80mL de TE TRIS EDTA pH 8.0, demonstrou ser uma concentração de alto custo, responsável por

55,53% do custo total (R\$ 55,27). Para estudos posteriores, é recomendável utilizar mais amostra e reduzir a quantidade de tampão.

A maioria dos reagentes e soluções utilizadas tiveram custo muito baixo. Três soluções: TE TRIS EDTA pH 8.0, agarose a 1,5% e brometo de etídio representaram 84,57% do custo.

Para a solução de agarose a 1,5% é impossível reduzir o custo, pois tanto no processamento de 1 ou no de 10 amostras, é necessário o mesmo tamanho de placa (para 14 a 28 poços) e a mesma quantidade da solução. Já o brometo de etídio poderia ser utilizado diretamente na agarose, juntamente com a amostra na corrida da eletroforese, mas há risco (substância altamente tóxica e mutagênica).

Como a quantidade é indispensável nas duas soluções (30mL de agarose a 1,5% e 500mL de brometo de etídio) é recomendável processar uma maior quantidade de amostras por reação, para redução do custo por amostra. Essa simulação consta no quadro 8, ficando o custo de R\$ 21,15 por amostra.

Quadro 8 – Reagentes utilizados para PCR, com dez amostras e três controles (um positivo e dois negativos) - São Paulo - 2009

REAGENTES	QUANTIDADE UTILIZADA (QUA) ¹			CUSTO (CUM _a) ² ou (CUM _b) ³
	10 A	2 C-	1 C+	
TE TRIS EDTA pH 8.0	800mL	-	80mL	168,8016
Solução de GT	6000µL	1200µL	600µL	10,49935
Clorofórmio	1000µL	200µL	100µL	0,10478
Propanol	6000µL	1200µL	600µL	9,6369
Solução de Etanol a 70%	5000µL	1000µL	500µL	0,73996
Água destilada ultrapura	200µL	440 µL	20 µL	0,1254
Solução dNTP SET	40µL	8µL	4µL	1,70248
$\bar{x}$ dos primers forward	12,5µL	2,5µL	1,25µL	0,196
Reverse	12,5µL	2,5µL	1,25µL	0,58784
Taq DNA polimerase	2,5µL	0,5µL	0,25µL	0,18837
Cloreto de magnésio	7,5µL	1,5µL	0,75µL	0,56511
Tampão Buffer	25µL	5µL	2,5µL	1,8837
DEPC	125µL	25µL	12,5µL	0,07263
Solução Agarose 1,5%	30mL			10,9995
Solução Brometo de etídio	500mL			5,04895
Solução 100BP DNA Ladder	3µL			0,31005
TOTAL (R\$)				211,46

¹ QUA: quantidade utilizada por amostra

² CUM_a: custo unitário médio da solução

³ CUM_b: custo unitário médio dos produtos p.a

A: amostra, C-: controle negativo, C+: controle positivo

Para mensuração do tempo total para realização da PCR não foram calculados tempos de espera maiores do que 10', como: - 20°C por 2h (mínimo), centrifugação por 20', secagem no termobloco por 15', amostras no termociclador 2h10', média de 30' para migração na eletroforese e média de 15' para corar no brometo de etídio. Estes tempos não computados totalizaram 5h30'.

Portanto, para obtenção dos resultados é necessário um tempo mínimo de 9h03'23" (valores contabilizados com uma amostra e dois controles, sem estimar qualquer contaminação ou etapa que necessitaria repetição).

Em relação ao custo final (R\$ 100,47) para identificação das três espécies, a maior parte 55,01% (R\$ 55,27) é representada pelos custos dos reagentes, ficando a mão de obra com 44,99% do custo (R\$ 45,20).

O único laboratório oficial que identifica a espécie (bovina e suína) no Estado de São Paulo, através de cromatografia gasosa e com limitações (necessidade do anti-soro específico e proteína crua) cobra R\$80,00 por espécie.

A PCR demonstrou ser um recurso aplicável em todos os tipos de apresentação de carne (crua, cozida, congelada, processada, adicionada de outros ingredientes ou defumada), viável economicamente e útil para esclarecimento e tomada de decisões para a Vigilância Sanitária de Alimentos.

CONCLUSÃO

8. CONCLUSÃO

- Foi possível padronizar a reação em cadeia pela polimerase para a identificação das espécies bovina, suína e cão, com os seguintes limites de detecção: 0,1%; 0,01% e 10%, respectivamente.
- É necessário aprimorar a técnica na identificação de cão e testar outros primers.
- Para a utilização da PCR para o controle de fraudes em alimentos é imprescindível padronizar outras espécies (ovino, felino, equino, pato, frango, avestruz, peixe), ampliando o espectro para permitir uma conclusão final sobre as amostras.
- O custo final para identificação das três espécies foi de R\$ 100,47, sendo R\$ 55,27 (55,01%) custos dos reagentes e R\$ 45,20 (44,99%) referente a mão de obra.
- O tempo médio para obtenção dos resultados contabilizados com uma amostra e dois controles (sem contaminação ou repetição de etapa) foi de 9h03'23".

REFERÊNCIAS

ABRAHÃO, R. M. C. M.; NOGUEIRA, P. A.; MALLUCCELI, M. I. C. O comércio clandestino de carne e leite no Brasil e o risco da transmissão de tuberculose e de outras doenças ao homem: um problema de saúde pública. **Archives of Veterinary Science**, v. 10, n. 2, p. 1-17, 2005.

ANDERSON, R. M.; DONNELLY, C. A.; FERGUSON, N. M.; WOOLHOUSE, M. E. J.; WATT, C. J.; UDY, H. J.; MAWHINNEY, S.; DUNSTAN, S. P.; SOUTHWOOD, T. R. E.; WILESMITH, J. W.; RYAN, J. B. M.; HOINVILLE, L. J.; HILLERTON, J. E.; AUSTIN, A. R.; WELLS, G. A. H. Transmission dynamics and epidemiology of BSE in British cattle. **Nature**, 382, 779-788, 1996.

ALVES, E. C. **Toxoplasma gondii**: soroprevalência, isolamento e virulência de cepas obtidas de galinhas caipiras (*Gallus domesticus*) comercializadas em feiras livres do município de Goiânia. 2007. 90 f. (Mestrado em Medicina tropical na área de concentração de parasitologia) - Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2007.

AZEVEDO, P. F. ; BANKUTI, F. I. Na Clandestinidade: o mercado informal da carne bovina. In: INTERNACIONAL CONFERENCE ON AGRI-FOOD CHAIN/NETWORKS ECONOMICS AND MANAGEMENT, 3., 2001, Ribeirão Preto. **Anais...**, v. 1, p. 1-12.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Decreto-Lei nº 30.691, de 29 de março de 1952 – Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal. Estabelece as normas que regulam em todo território nacional, a inspeção industrial e sanitária de produtos de origem animal. **Diário Oficial da União**, Rio de Janeiro: 7 jul.1952. Sec. 1, pt.10785.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Portaria Nº 5, de 08 de novembro de 1988. Aprova a Padronização dos Cortes de Carne Bovina, proposta pela Divisão de Padronização e Classificação de Produtos de Origem Animal (DIPAC). **Diário Oficial da União**, Brasília: 18 nov. 1988. Sec. 1, pt. 22291.

BRASIL. Ministério da Justiça. Decreto-Lei nº 2.848, de 07 de dezembro de 1940. Código Penal do Brasil. Estabelece o código penal brasileiro. **Diário Oficial da União**, Rio de Janeiro: 31 dez.1940. Sec. 1 , pt. 2391.

BRASIL. Ministério da Justiça. Lei nº 8.078, de 11 de setembro de 1990 – Código de defesa do Consumidor. Dispõe sobre a proteção do consumidor e dá outras providências. **Diário Oficial da União**, Brasília: 13 set. 1990b, Sec. 1, pt. 176

BRASIL. Ministério da Justiça. Lei nº 8.137, de 27 de dezembro de 1990. Define crimes contra a ordem tributária, econômica e contra as relações de consumo, e dá outras providências. **Diário Oficial da União**, Brasília: 28 dez. 1990, 1990a, Sec. 1, pt. 25534

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. Lei Federal nº 9.605, de 12 de fevereiro de 1998 – Lei Contra Crimes Ambientais. Dispõe sobre as sanções penais e administrativas derivadas de condutas e atividades lesivas ao meio ambiente, e dá outras providências. **Diário Oficial da União**, Brasília: 13 fev. 1998. Sec. 1, pt. 25

BRASIL. Receita Federal. Atos Declaratórios. Atos Declaratórios Cosit. Valor do dólar para fins fiscais. Brasil, [2009]. Disponível em: <<http://www.receita.fazenda.gov.br/legislação/legisassunto/cotadolar.htm>>. Acesso em 30 de novembro de 2009.

BUSO, G. **Análise do perfil do consumidor de carne bovina na cidade de São Paulo**. 2000. 174 f. (Mestrado em Administração) - Departamento de Engenharia de Produção, Universidade Federal de São Carlos, São Paulo, 2000.

CALDWELL, J. M.; RALEY, M. E.; LEVINE, J. F. Mitochondrial Multiplex Real-Time PCR as a Source Tracking Method in Fecal-Contaminated Effluents. **Environmental Science & Technology**, v. 41, n. 9, p. 3277-3283, 2007.

CALVO, J. H.; OSTA, R.; ZARAGOZA, P. Quantitative PCR detection of pork in raw and heated ground beef and pâté. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, n. 19, p. 5265-5267, Sep. 2002.

CALVO, J. H.; RODELLAR, C.; ZARAGOSA, P.; OSTA, R. Beef-and bovine- derived material identification in processed and unprocessed food and feed by PCR amplification. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, n. 19, p. 5262-5264, 2002.

CALVO, J. H.; ZARAGOZA, P.; OSTA, R. Technical note: a quick and more sensitive method to identify pork in processed and unprocessed food by PCR amplification of a new specific DNA fragment. **Journal of Animal Science**., v. 79, n. 8, p. 2108-12, Aug. 2001.

CARRIERI, M. L.; TAKAOKA, N. Y.; KOTAIT, I.; GERMANO, P. M. L. Diagnóstico clínico-epidemiológico da raiva humana: dados do Instituto Pasteur de São Paulo do período de 1970-2002. **Boletim Epidemiológico Paulista (BEPA)**, v. 29, n. 3, Maio 2006. Disponível em: <http://www.cve.saude.sp.gov.br/agencia/bepa29_raiva.htm>. Acesso em: 17 jan. 2008.

CARVALHO, M. S.; BARROSO, M. R.; PINHAL, F.; TAVARES, F. M. Brucelose: alguns aspectos epidemiológicos. **Medicina Interna**, v. 2, n. 4, p. 259-261, 1995.

CAWTHRAW, S.; SAUNDERS, G. C.; MARTIN, T. C.; SAWYER, J.; WINDL, O. REANEY, S. D. Real-time PCR detection and identification of prohibited mammalian and avian material in animal feeds. **Journal of Food Protection**, v. 72, n. 5, p.1055-62, May 2009.

CENTRO DE VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA - CVE. Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo – SES/SP. **Manual das doenças transmitidas por alimento e água**. São Paulo, [2002a]. Disponível em: <<http://www.cve.saude.sp.gov.br/html/hidrica/BRUCELOSE.htm>>. Acesso em: 17 jan. 2008.

CENTRO DE VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA - CVE. Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo – SES/SP. **Manual das doenças transmitidas por alimento e água**. São Paulo, [2002b]. Disponível em: <http://www.cve.saude.sp.gov.br/html/hidrica/Toxoplasma_gondii.htm>. Acesso em: 17 jan. 2008.

CHEN, F-C; HSIEH, Y-H. PEGGY. Detection of pork in heat-processed meat products by monoclonal antibody-based ELISA. **Journal of AOAC International**, v. 83, n. 1, p. 79-85, 2000.

CHOMCZINSKY, P. A. A reagent for the single-step simultaneous isolation of RNA, DNA and protein from the cell and tissues samples. **Biotechniques**, v.15, p. 532-537. 1993.

DALMASSO, A.; FONTANELLA, E.; PIATTI, P.; CIVERA, T.; ROSATI, S.; BOTTERO, M. T. A multiplex PCR assay for the identification of animal species in feedstuffs. **Molecular and Cellular Probes**, v. 18, n. 2, p. 81-87, 2004.

DONE, S. H.; GOODY, P. C.; EVANS, S. A; STICKLAND, N. C. **Atlas colorido de anatomia veterinária do cão e do gato**. São Paulo: Manole, 2002. v. 3.

FAJARDO, V.; GONZÁLEZ, I.; LÓPEZ-CALLEJA, I.; MARTÍN, I.; ROJAS, M.; GARCÍA, T.; HERNÁNDEZ, P. E.; MARTÍN, R. PCR identification of meta from chamois (*Rupicapra rupicapra*), pyrenean bies (*Capra pyrenaica*) and mouflon (*Ovis ammon*) targeting specific sequences from the mitochondrial D-loop region. **Meat Science**, v. 76, p. 644-652, 2007.

FISCHLER, C. Classification second les culture (mangeable pas de mangeable) de sùr espèce animaux. **L'homnivore**. Paris: Poche Odile Jacob, 2001. p. 28.

FREITAS, G. P. C. de. **Contribuição para o estudo do custo unitário das análises laboratoriais e sua comparação com a tabela de procedimentos da Associação Médica Brasileira - AMB 92, em um laboratório de pequeno porte**. 2005. 186 f. (Mestrado em Análises Clínicas) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.

FREITAS, J. A.; GALINDO, G. A. R.; SANTOS, E. J. C.; SARRAF, K. A.; OLIVEIRA, J. P. Risco de brucelose zoonótica associado a suínos de abate clandestino. **Revista Saúde Pública**, v. 35, n. 1, p. 101-102, 2001.

FREITAS, J. A.; GALINDO, G. A. R.; SARRAF, K. A.; OLIVEIRA, J. P. Situação atual e aspectos higiênicos e sanitários do abate clandestino, na região metropolitana de Belém, Pará. **Revista Higiene Alimentar**, v. 20, n. 143, p. 45-49, Ago 2006.

GAO, H. W.; XU, B. L.; LING, C. Z.; ZHANG, Y. B; ZHU, L. H. Polymerase Chain Reaction method to detect canis materials by amplification of species-specific DNA fragment. **Journal of AOAC International**, v. 87, n. 5, p. 1195-1199, 2004.

GARFIELD, F. M.; KLESTA, E.; HIRSCH, J. **Quality assurance principles for analytical laboratories**. Arlington: Association of Official Analytical Chemistry International; 1994. p. 220.

GERMANO, P. M. L.; GERMANO, M. I. S. Agentes bacterianos de Toxinfecções. In: **Higiene e Vigilância Sanitária de Alimentos**. São Paulo: Varela, 2003, p. 215-275.

GERTH, E. R. **Análise de custos na comparação dos métodos laboratoriais para avaliação da resistência do Mycobacterium tuberculosis**. 2001. 58 f. (Mestrado em Epidemiologia) - Faculdade de Saúde Pública, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2001.

GIOVANNACCI, I.; GUIZARD, C.; CARLIER, M.; DUVAL, V.; MARTIN, J. L.; DEMEULEMESTER, C. Species identification of meat products by ELISA. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 39, n. 8, p. 863-867, 2004.

GIRISH, P. S.; ANIANEYULU, A. S.; VISWAS, K. N.; SANTHOSH, F. H.; BHILEGAONKAR, K. N.; AGARWAL, R. K.; KONDAJAH, N.; NAGAPPA, K. Polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism of mitochondrial 12S rRNA gene: a simple method for identification of poultry meat species. **Veterinary Research Communications**, v. 31, n. 4, p. 447-55, May 2007.

GONÇALVES, D. D.; TELES, P. S.; REIS, C. R.; LOPES, F. M. R.; FREIRE, R. L.; NAVARRO, I. T.; ALVES, L. A.; MULLER, E. E.; FREITAS, J. C. Soroepidemiologia e variáveis ocupacionais e ambientais relacionadas à leptospirose, brucelose e toxoplasmose em trabalhadores de frigorífico do Estado do Paraná, Brasil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical**, v. 48, n. 3, p. 135-140, 2006.

JANNSEN, F. W.; HÄGELE, G. H.; BUNTJER, J. B.; LENSTRA, J. A. Species identification in meat by using PCR-generated satellite probes. **Journal of Industrial & Biotechnology**, v. 21, n. 6, p. 115-120, 1998.

LAWRIE, R. A. **Ciência da carne**, 6.ed. Porto Alegre: Artmed, 2005. 384 p.

LIMA, M. M. L. **Contribuição para o estudo dos custos em laboratórios de saúde pública do estado de São Paulo**. 2007. 142 f. (Mestrado em Saúde Pública) - Faculdade de Saúde Pública, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

LÓPEZ-ANDREO, M.; LUGO, L.; GARRIDO-PERTIERRA, A.; PRIETO, M. I.; PUYET, A. Identification and quantitation of species in complex DNA mixtures by real-time polymerase chain reaction. **Analytical Biochemistry**, v. 1, n. 339, p. 73-82, 2005.

LOSIO, M. N.; FERRANDO, M. L.; DAMINELLI, P.; CHEGDANI, F. Setting up a PCR based method to trace animal species in processed meat products. **Veterinary Research Communications**, v. 28, n. 1, p. 253-255, 2004.

MACIEL, B. M.; FILHO, R. C. A.; FREITAS, E. S.; KRUSCHEWSKY, F. F.; SANTOS, B. F.; ROCHA, G. D.; WETLER, R. M. C.; MARTINS, L. A. F. Ocorrência de sorotipos exóticos de *Salmonella* encontrados em cães assintomáticos nos distritos do município de Ilhéus / BA – Brasil. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 41, n. 4, p. 247-253, 2004.

MACIEL, M. E. Cultura e Alimentação ou o que têm a ver macaquinhos de Koshima com Brillat-Savarin? **Horizontes Antropológicos**, v. 7, n. 16, p. 145-156, Dez. 2001.

MARTINS, E. A. **Contabilidade de custos**. 9. ed. São Paulo: Atlas, 2003. 370 p.

MEYER, M. J.; FRIEDMAN, S. L.; FARRELL, D. E.; DOVE-PETTIT, D. A.; BUCKER, M. F.; KELLY, S.; MADZO, S.; CAMPBELL, W.; WANG, R.; PAINE, D.; CERNIGLIA, C. E. Validation of a polymerase chain reaction method for the detection of rendered bovine-derived materials in feedstuffs. **Journal of Food Protection**, v. 64, n. 4, p. 564-566, 2001.

MEYER, R.; CANDRIAN, U. PCR-based DNA analysis for the identification and characterization of food components. **Lebensmittel Wissenhard Und Technology**, v. 29, n. 1, p. 1-9, 1996.

MEYER, R.; CANDRIAN, U.; LÜTH, J. Detection of pork in heated meat products by the polymerase chain reaction. **Journal of AOAC International**, v. 77, n. 3, p. 617-622, 1994.

PARDI, M. C.; DOS SANTOS, F.; DE SOUZA, E. R.; PARDI, H. S. **Ciência, higiene e tecnologia da carne**. 2.ed. Goiânia: Editora UFG, 2006, v. 1, p. 43, 613-616.

POPESKO, P. **Atlas de anatomia topográfica dos animais domésticos**. São Paulo: Manole, 1997. v. 3, 205 p.

RODRIGUEZ, M. A.; GARCIA, T.; GONZALEZ, I.; ASENSIO, L.; MAYORAL, B.; LOPEZ-CALLEJA, I.; HERNANDEZ, P. E.; MARTIN, R. Identification of goose, mule, duck, chicken, turkey, and swine in foie gras by species-specific polymerase chain reaction. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, n. 6, p. 1524-1529, 2003.

RODRIGUEZ, M. A.; GARCIA, T.; GONZALEZ, I.; ASENSIO, L.; HERNANDEZ, P. E.; MARTÍN, R. PCR identification of beef, sheep, goat, and pork in raw and heat-treated meat mixtures. **Journal of Food Protection**, v. 67, n. 1, p. 172-177, 2004.

SANNAZZARO, C. A. C. **Contribuição para o estudo dos custos unitários de análises bioquímicas quantitativas realizadas pelo processo manual e pelo processo automático no laboratório de análises clínicas do Hospital Universitário**. 1993. 216 f. (Doutorado em Saúde Pública) - Faculdade de Saúde Pública, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1993.

SÃO PAULO (Estado). Secretaria Municipal da Saúde. Coordenadoria Vigilância à Saúde. **Estudo das irregularidades mais frequentes em estabelecimentos que comercializam alimentos na cidade de São Paulo**. São Paulo, [2007]. Disponível em: <http://www.prefeitura.sp.gov.br/cidade/secretarias/saude/vigilancia_em_saude/vigilancia_sanitaria/alimentos/index.php?p=7082>. Acesso em: 30 de nov. de 2009.

SÃO PAULO (Estado). Secretaria Municipal da Saúde. Instituto Adolfo Lutz. Laboratório de Saúde Pública. **Tabela de preços fedial – Divisão de bromatologia e química**. São Paulo, [2010]. Disponível em: http://www.ial.sp.gov.br/index.php?option=com_wrapper&view=wrapper&Itemid=12>. Acesso em: 10 de jan. de 2010.

SÃO PAULO (Estado). Secretaria Municipal da Saúde. Portaria nº1210 de 02 de agosto de 2006. Aprova o Regulamento Técnico de Boas Práticas, que estabelece os critérios e parâmetros para a produção/fabricação, importação, manipulação, fracionamento, armazenamento, distribuição, venda para o consumo final e transporte de alimentos e bebidas. Secretaria Municipal de Saúde – São Paulo. **Diário Oficial da Cidade de São Paulo**, São Paulo, 3 ago 06, n. 146, pg. 21.

SHINODA, N.; KUSAMA, T.; YOSHIDA, T.; SUGIURA, T.; KADOWAKI, K.; ONODERA, T.; SUGIURA, K. Developing PCR primers using a new computer program for detection of multiple animal-derived materials in feed. **Journal of Food Protection**, v. 71, n. 11, p. 2257-2262, 2008.

SILVA, A. M.; BARBOSA, S. F. C.; ALKIMIN, M. G. A.; VAZ, A. J.; SHIMOKOMAKI, M.; TENURA, A. Hamburger meat identification by dot-ELISA. **Meat Science**, v. 56, n. 2, p. 189-192, 2000.

STROBEL, J.; HASTREITER, S. T.; DEGASPARI, C. H.; BAPTISTA, P. P. Hábitos de consumo alimentar dos Curitibanos. **Revista Visão**, v. 6, n. 2, p. 24-37, 2005.

TANABE, S.; HASE, M.; YANO, T.; SATO, M.; FUJIMURA, T.; AKIYAMA, H. A real-time quantitative PCR detection method for pork, chicken, beef, mutton, and horseflesh in foods. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v. 71, n. 12, p. 3131-3135, Dec. 2007.

TAO, XIAO YAN; TANG, QING; LI, HAO; MO, ZHAO-JUN; ZHANG, HONG; WANG, DING-MING; ZHANG, QIANG.; SONG, MIAO.; VELASCO-VILLA, ANDRES; WU, XIANFU.; RUPPRECHT, CHARLES E.; LIANG, G-D. Molecular Epidemiology of Rabies in Southern People's Republic of China. **Emerging Infectious Diseases**, v. 15, n. 8, p. 1192-1198, Aug. 2009.

TARTAGLIA, M.; SAULLE, E.; PESTALOZZA, S.; MORELLI, L.; ANTONUCCI, G.; BATTAGLIA, P. A. Detection of Bovine Mitochondrial DNA in Ruminant Feeds: A Molecular Approach to Test for the Presence of Bovine-Derived Materials. **Journal of Food Protection**, v. 61, n. 5, p. 513-518, 1998.

TELETCHÉA, F.; MAUDET, C.; HANNI, C. Food and Forensic molecular identification: update and challenges. **Trends in Biotechnology**, v. 23, n. 7, p. 359-366, 2005.

TOGINHO FILHO, D. O.; ANDRELLO, A. C. **Catálogo de experimentos do laboratório integrado de física geral**. Londrina: Universidade Estadual de Londrina, [2009]. Disponível em: <http://www.uel.br/cce/fisica/docentes/dari/d3_material10_6ce2c61b.pdf>. Acesso em: 20 de nov. 2009.

TOOROP, R. M.; MURCH, S. J.; BALL, R. O. Methodology and development of prediction equations for the determination of pork substitution in veal. **Food Research International**, v. 30, p. 629-636, 1997.

TOYODA, A.; NAKAJO, M.; KAWACHI, H.; MATSUI, T.; YANO, H. PCR detection of bovine mitochondrial DNA derived from meat and bone meal in feed. **Journal of Food Protection**, v. 67, n. 12, p. 2829-2832, 2004.

UNGAR, M. L.; GERMANO, P. M. L. Prevalência da cisticercose bovina no Estado de São Paulo (Brasil). **Revista Saúde Pública**, v. 26, n. 3, p. 167-172, 1992.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO. Departamento de Recursos Humanos (DRH). **Tabela de vencimento de funcionários**. São Paulo, [2009]. Disponível em: http://www.usp.br/drh/novo/carreiras/tabsalfunc05_2009.html>. Acesso em: 21 set. 2009.

VALLEJO, B.; GONZÁLEZ, A. F.; MAZORRA, M. A.; RODRÍGUEZ, R. Capillary electrophoresis for the analysis of meat authenticity. **Food of Separation Science**, v. 28, p. 826-836, 2005.

VELOSO, A. C. A.; TEIXEIRA, N.; FERREIRA, I. M.P.L.V.O. Detecção de adulterações em produtos alimentares contendo leite e/ou proteínas lácteas. **Química Nova**, v. 25, n. 4, 2002. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422002000400016&lng=en&nrm=iso>. Acesso: 03 mar. 2009.

WANG, Z. Q.; CUI, J. Outbreaks of human trichinellosis caused by consumption of dog meat in China. **Parasite**, v. 8, n.2, p. 74-77, 2001.

YOSHIDA, T.; NOMURA, T.; SHINODA, N., KUSAMA, T.; KADOWAKI, K.; SUGIURA, K. Development of PCR primers for the detection of porcine DNA in feed using mtATP6 as the target sequence. **Journal of the food Hygienic Society of Japan**, v. 50, n. 2, p. 89-92, 2009.

ZENG, SHAO LING.; QIN, Z.; RUAN, Z.; HUA, Q.; LU, T.; LU, J.; CHEN, S.; CAO, C.; ZHANG, C.; SUN, J.; CHEN, B.; WU, S. Multiplex fluorescent real-time PCR detection of bovine, goat and sheep derived materials in animal products. **Chinese Journal of Biotechnology**, v. 25, n. 1, p. 139-146, 2009.

APÊNDICE A – Planilha de coleta de amostras

Data: ____/____/____	Amostra n°: _____
Local da Coleta:	
Amostras: <div style="margin-left: 20px;"> ☐ CRUA ☐ COZIDA ☐ TEMPERADA </div>	
Observações:	
Acondicionamento: <div style="margin-left: 20px;"> ☐ REFRIGERADA ☐ CONGELADA ☐ TEMPERATURA AMBIENTE </div>	
Observações:	

USO FMVZ/USP:

Aspecto:

Data de recebimento: ____/____/____

Data de processamento: ____/____/____

Resultado:

Observações:

APÊNDICE B – Laudo

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
Cidade Universitária “Armando de Salles Oliveira”

LAUDO

Nº do Termo de coleta de amostra COVISA		Laudo de análise nº...../.....
Produto descrito como..... Amostra: () crua () cozida () temperada () refrigerada () congelada () em temperatura ambiente		
Data de fabricação e validade..... Data da coleta/...../..... Lacre nº..... Acondicionamento da amostra.....		
Estabelecimento: Nome..... Logradouro.....		
Características macroscópicas..... Data de recebimento:/...../..... Data de processamento:/...../..... e/...../.....		
Resultado da PCR Observações.....		

São Paulo, ____ de _____ de _____

Fernanda de Melo Lima Brugnano
 Médica Veterinária / Pós-graduanda FMVZ/USP

Simone de Carvalho Balian
 Profa. Dra. FMVZ/USP

DEPARTAMENTO DE MEDICINA VETERINÁRIA PREVENTIVA E SAÚDE ANIMAL-VPS

Av. Prof. Dr. Orlando Marques de Paiva, 87 - Cidade Universitária / SP – CEP. 05508-270

Fone: (11) 3091-7653/ 3091-7930 - Fax (11) 3091-7928

APENDICE C - Especificações de reagentes

Tabela 3 – Especificações de reagentes utilizados na PCR para identificação da espécie - São Paulo - 2009

REAGENTES	UNID ADE	QTDE	ESPECIFIC. (QpT)
Tiocianato de Guanidina	fr.	1	500g
Tris base	fr.	1	100g
Tris HCl	fr.	1	100g
EDTA sal dissódico (Na ₂ EDTA)	fr.	1	100g
Fenol	fr.	1	100mL
Hidróxido de sódio	fr.	1	250g
Glicogênio	fr.	1	100µL
Clorofórmio p.a.	L	1	1000mL
Propanol p.a.	L	1	1000mL
Etanol p.a.	L	1	1000mL
Acido Bórico	fr.	1	500g
Água destilada	fr.	1	1000mL
Água destilada ultrapura (livre de DNase e RNase)	fr.	1	1000mL
Água DEPC (dietilpirocarbonato)	L	1	1000mL
dNTP SET (100mM): dATP, dCTP, dGTP, dTTP	fr.	1	0,25mL ou 250µL cd
Primers (f/r) Bovino	fr.	1 par	31,6nmol e 36,3nmol
Primers (f/r) Suíno	fr.	1 par	34,1nmol e 35,3nmol
Primers (f/r) Canino	fr.	1 par	23,7nmol e 36,4nmol
Taq DNA polimerase (500U) / Cloreto de magnésio (50mM) / Tampão Buffer 10X PCR	fr.	1 kit	100µL / 1mL / 2,5mL (3600 µL)
Agarose para eletroforese	fr.	1	100g
Brometo de etídio	fr.	1	30mL
100BP DNA Ladder / Corante 6 X Loading	fr.	1 kit	1050µL (50µL / 1mL)

* valores expressos em reais (R\$)

QpT: quantidade do produto total

ANEXO A – Modo de preparo das soluções

Solução de TE TRIS EDTA pH 8.0:

- 5mL TRIS HCl 1M (121,1g TRIS HCl + 800mL água destilada) ,
- 1mL Na₂ EDTA 0,5M pH 8.0 (186,1g Na₂ EDTA + 800mL água destilada + 20g de NaOH para ajustado pH).
- 494mL de água destilada

Solução de IsoTiocianato de guanidina 5M/ Fenol pH 7,5:

Etapa 1:

- 60g GT (Isotiocianato de guanidina) ,
- 5 mL TRIS-HCl 1M pH 7,5,
- 10mL EDTA 0,25M pH 8,0,
- água destilada qsp 100 mL.

Agitador aquecido por 30 minutos.

Etapa 2:

Produto da etapa 1 + 100 mL de fenol pH 7,5. Agitador em temperatura ambiente.

Etapa 3: 20µL de glicogênio (1,4mg).

Aguardar 24 horas. Armazenamento sob refrigeração.

Solução de DNTP 10mM:

- 10µL de cada dNTP (dATP, dGTP, dCTP, dTTP),
- 60µL de água destilada.

Tampão TBE 10X:

- 10,8g de TRIS Base
- 5,5g de Ácido bórico
- 0,83g de Na₂ EDTA
- 500mL de água destilada

Misturar com agitador magnético, até dissolver completamente, filtrar a solução através de uma membrana $\leq 0.45\mu\text{m}$ utilizando bomba à vácuo. Medir o pH (8,2 – 8,6) e armazenar em temperatura ambiente).

Solução de Agarose 1,5% (Grau técnico genético):

- 1,5g de agarose
- 100mL de TBE 0,5X

Dissolver a garose no TBE em banho-maria ou microondas (sob monitoramento) até ficar translúcido.

Solução de Marcador de peso molecular (Ladder)

- 10 μ L de Ladder
- 10 μ L de 6X DNA Loading Dye
- 40 μ L de água destilada.

Solução de Brometo de etídio

- 25 μ L de brometo de etídio
- 500mL de água destilada.

ANEXO B – Fotos de algumas amostras encaminhadas pela COVISA

Figura 12 – Tripas

Lacre: 15756

Lacre: 18703

Figura 13 – Carnes defumadas

Lacre: 10499

Lacre: 10501

Figura 14 – Carnes tipo “carpaccio”

Lacre: 18702

Lacre: 15753

Figura 15 – Lingüiça de fabricação caseira

Lacre: 18704

Figura 16 – Carne com gordura, cartilagem, casco, crua, refrigerada

Lacre: 15744

Figura 17 – Presença de várias apresentações

Lacre: 18710

Figura 18 – Carne previamente moída

Lacre: 17425

Figura 19 – Carnes com osso, cruas, refrigeradas e sem tempero

Lacre: 18083

Lacre: 19813

Figura 20 – Carnes com osso, gordura, cartilagem, cruas e refrigeradas

Lacre: 15757

Lacre: 15745

Figura 21 – Carnes desconhecidas macroscopicamente

Lacre: 7312

Lacre: 7309

ANEXO C – Descrição das atividades do técnico de Laboratório IA

Quadro 9 – Plano de classificação de funções do grupo técnico da Universidade de São Paulo, aprovado pelo CCRH em 08.06.2009 - São Paulo - 2009

TÉCNICO DE LABORATÓRIO		TÉCNICO DE LABORATÓRIO II		TÉCNICO DE LABORATÓRIO III	
FAIXA: (Início: IA Fim: IK)	Código: 680	FAIXA: (Início: IIA Fim: IIK)	Código: 1123	FAIXA: (Início: IIIA Fim: IIIC)	Código: 1124
DESCRIÇÃO: Sumária: Desenvolver e executar atividades de apoio técnico, destinados ao ensino, pesquisa e extensão.		DESCRIÇÃO: Além do conhecimento e desenvolvimento das atividades da faixa I, o funcionário deve:		DESCRIÇÃO: Além do conhecimento e desenvolvimento das atividades das faixas I e II, o funcionário deve:	
Detalhada: <ul style="list-style-type: none"> • Colaborar, com profissionais da área e docentes, no planejamento e execução de experimentos destinados ao ensino, pesquisa, extensão e prestação de serviços, dentro do campo da ciência em que estiver envolvido. • Preparar, instalar, manipular, controlar, armazenar materiais e equipamentos próprios de laboratório, bem como conhecer e manipular reagentes, solventes, equipamentos, ferramentas e instrumentos manuais, mecânicos, elétricos e eletrônicos, necessários para o desenvolvimento do trabalho. • Auxiliar, sob orientação de docentes ou técnicos de nível superior, na padronização e desenvolvimento de técnicas laboratoriais, colaborando na análise de resultados e preparação de relatórios. • Preparar pacientes e realizar exames dependendo da área de atuação. • Preparar solicitações de compras, organizar e controlar o almoxarifado da área de atuação. • Auxiliar nas atividades de apoio à pesquisa, extensão e saúde, executando os procedimentos requeridos para o desenvolvimento dos trabalhos, colaborando nas aferições dos resultados das análises. • Auxiliar docentes nas atividades de ensino, preparando materiais e equipamentos necessários para aulas (práticas e teóricas), fazendo acompanhamento nas aulas práticas laboratoriais. • Regular, controlar e operar os aparelhos de acordo com os tipos de testes solicitados, adequando-os aos objetivos do trabalho. • Executar o tratamento e descarte de resíduos e solventes, defensivos, com base em normas padronizadas de segurança ou métodos e técnicas indicadas por profissionais da área. • Executar ou promover, conforme o caso, atividades de manutenção preventiva e corretiva, necessárias à conservação de equipamentos, instrumentos e outros materiais da área de atuação. • Receber, coletar, preparar, examinar e distribuir materiais, efetuando os testes necessários, procedendo aos registros, cálculos e demais procedimentos pertinentes, para subsidiar os trabalhos. • Preparar e utilizar soluções, amostras, substratos, reagentes, solventes, empregando aparelhagem e técnicas, de acordo com a determinação dos profissionais da área de atuação. • Realizar análise de materiais e substâncias em geral, utilizando métodos específicos para cada caso, observando e efetuando a leitura dos resultados obtidos. Em procedimentos experimentais, registrar os dados observados. 		<ul style="list-style-type: none"> • Purificar solventes especiais e reagentes que exijam tratamento químico para eliminação de impurezas. • Preparar, montar o material e equipamentos empregados em experimentações animais, em operações que requeiram conhecimentos especializados na área. • Realizar acasalamentos programados, e sacrificar animais conforme normas específicas de eutanásia. • Auxiliar no treinamento dos funcionários da faixa I do grupo Técnico e os do Grupo Básico. • Orientar os serviços dos técnicos da faixa I de sua área de atuação. 		<ul style="list-style-type: none"> • Colaborar com os técnicos do grupo superior na elaboração de relatórios dos seus setores de atuação. • Supervisionar e executar tarefas de maior complexidade que envolvam conhecimentos especializados na área. • Auxiliar pesquisadores nas práticas de procedimentos técnicos com animais de laboratório. • Participar sob orientação de cursos para formação dos recursos humanos visando simplificar e aumentar a eficácia das atividades funcionais. • Contatar as oficinas de manutenção e participar de projetos de expansão, modernização, adaptação e reforma de laboratórios, acompanhando os serviços. • Realizar sob orientação treinamentos de técnicos das faixas I e II e dos básicos de sua área de atuação. 	

PLANO DE CLASSIFICAÇÃO DE FUNÇÕES				GRUPO: TÉCNICO	
TÉCNICO DE LABORATÓRIO		TÉCNICO DE LABORATÓRIO II		TÉCNICO DE LABORATÓRIO III	
FAIXA: (Início: IA Fim: IK)	Código: 680	FAIXA: (Início: IIA Fim: IIK)	Código: 1123	FAIXA: (Início: IIIA Fim: IIIC)	Código: 1124
DESCRIÇÃO: <ul style="list-style-type: none"> • Efetuar preservação das peças anatômicas e órgãos, mantendo-as em soluções específicas, para serem utilizadas em aulas práticas e estudos científicos. • Preparar peças anatômicas e órgãos para o desenvolvimento de aulas práticas, retirando-as dos arquivos e colocando-as a disposição dos docentes e alunos. • Elaborar relatórios das atividades desenvolvidas, abrangendo os métodos, materiais, equipamentos e resultados alcançados. • Participar da elaboração de manuais de procedimentos para operação de instrumentos e execução de técnicas laboratoriais e de experimentos. • Auxiliar na organização de arquivos, envio e recebimento de documentos, pertinentes a sua área de atuação para assegurar a pronta localização de dados. • Desenvolver suas atividades utilizando normas e procedimentos de biossegurança e/ou segurança do trabalho. • Zelar pela guarda, conservação, manutenção e limpeza dos equipamentos, instrumentos e materiais utilizados, bem como do local de trabalho. • Manter-se atualizado em relação às tendências e inovações tecnológicas de sua área de atuação e das necessidades do setor/departamento. • Executar outras tarefas correlatas, conforme necessidade ou a critério de seu superior. 		DESCRIÇÃO:		DESCRIÇÃO:	

ANEXO D – Vencimento de funcionários da Universidade de São Paulo

Quadro 10 – Vencimento de funcionários da Universidade de São Paulo, atualizada em 22 de junho de 2009 - São Paulo - 2009

Tabela de Vencimento - Funcionários

Validade : A partir de Maio/2009

Classe	Nível/ Faixa	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K
BÁSICO	I							1.136,24	1.193,05	1.252,70	1.315,34	1.381,11
BÁSICO	II	1.136,24	1.193,05	1.252,70	1.315,34	1.381,11	1.450,17	1.522,68	1.598,81	1.678,75	1.762,69	1.850,82
BÁSICO	III	1.450,17	1.522,68	1.598,81	1.678,75	1.762,69	1.850,82	1.943,36	2.040,53	2.142,56	2.249,69	2.362,17
TÉCNICO	I	1.678,75	1.762,69	1.850,82	1.943,36	2.040,53	2.142,56	2.249,69	2.362,17	2.480,28	2.604,29	2.734,50
TÉCNICO	II	2.249,69	2.362,17	2.480,28	2.604,29	2.734,50	2.871,23	3.014,79	3.165,53	3.323,81	3.490,00	3.664,50
TÉCNICO	III	2.871,23	3.014,79	3.165,53	3.323,81	3.490,00	3.664,50	3.847,73	4.040,12	4.242,13	4.454,24	4.676,95
SUPERIOR	I	3.323,81	3.490,00	3.664,50	3.847,73	4.040,12	4.242,13	4.454,24	4.676,95	4.910,80	5.156,34	5.414,16
SUPERIOR	II	4.242,13	4.454,24	4.676,95	4.910,80	5.156,34	5.414,16	5.684,87	5.969,11	6.267,57	6.580,95	6.910,00
SUPERIOR	III	5.156,34	5.414,16	5.684,87	5.969,11	6.267,57	6.580,95	6.910,00	7.255,50	7.618,28	7.999,19	8.399,15

Fonte: DRH/USP (SÃO PAULO, [2009]).

ANEXO E – Acompanhamento de vistorias da COVISA

Apontamentos de acordo com a Portaria 1210/06 - Estabelece os requisitos essenciais de boas práticas na produção de alimentos, a fim de subsidiar as ações da Vigilância Sanitária, estabelecendo os critérios de higiene, as boas práticas de fabricação e prestação de serviços, e os procedimentos operacionais padronizados para alimentos, visando prevenir e proteger a saúde do consumidor, a saúde do trabalhador e, ainda, preservar o meio ambiente (São Paulo, 2006).

Figura 22 – Falha na higienização

Art. 8.3. - As empresas deverão manter a organização, a limpeza e a desinfecção dos equipamentos, dos utensílios e do ambiente em todas as dependências, internas e externas. Art. 17.2.1. - Os equipamentos e utensílios devem ser higienizados antes e após o uso.

Figura 23 – Utensílios com sinais de ferrugem e sujidades

Art. 9.11. - Os utensílios devem ser em quantidade suficiente, construídos com material sanitário, devem ser mantidos bem conservados, livres de ponto escuro, furo, amassamento, limpos, protegidos de sujidades, de insetos e de pragas.

Figura 24 – Presença de produtos impróprios na área de manipulação

Presença de embalagens primárias vazias (abrigos pragas)

Art. 11, VIII - todo material de limpeza, higiene, perfumaria e material químico deve ser armazenado separadamente dos alimentos e Art. 13.1.7. - É proibida a colocação de caixas de madeira e de papelão dentro da área de preparo.

Figura 25 – Presença de alimentos no chão (câmara fria e área de manipulação)

Art. 11.1. - Os alimentos devem ser armazenados de forma organizada, em local limpo, livre de pragas e atender os seguintes critérios: II - dispostos longe do piso, sobre estrados fixos ou móveis.

Figura 26 – Alimentos abertos dentro do refrigerador e sem qualquer identificação

Presença de utensílio

Art. 11.6.2. - Os alimentos preparados e os pratos prontos para o consumo elaborados em cozinhas industriais, restaurantes, lanchonetes e similares, devem ser acondicionados em recipientes de material liso, impermeável, devidamente protegidos e identificados com nome do produto e validade e Art. 12.7.1. - Os alimentos devem ser porcionados com utensílios próprios, que devem ser removidos e lavados após sua utilização.

Figura 27 – Área de manipulação inadequada
(ambiente aberto e com presença de bicicleta pendurada).

Art. 8.7. - Não é permitida a permanência de materiais e equipamentos em desuso e/ou estranhos à atividade. (São Paulo, 2006).

Figura 28 – Prateleira inadequada e presença de produto de limpeza
(área de manipulação)

Art. 9.10. - As mesas, bancadas, prateleiras, pias, cubas, tanques, devem ser suficientes e feitas de material sanitário (material inerte que não favorece a migração de elementos para o alimento, não poroso, desenhado de forma a não permitir o refúgio de pragas e microrganismos e outras contaminações devendo, ainda, facilitar a sua limpeza e desinfecção), liso, resistente e impermeável, bem conservado e Art. 11, VIII - todo material de limpeza, higiene, perfumaria e material químico deve ser armazenado separadamente dos alimentos.

Figura 29 – Restos alimentares do dia anterior e presença de praga

Art. 16.1. - O programa de controle de pragas deve contemplar todas as medidas preventivas necessárias para minimizar a necessidade da aplicação de desinfestantes domissanitários.

Figura 30 – Riscos ao trabalhador

Instalação elétrica

Art. 20.18.1. - Não deverá existir, dentro das áreas de produção de alimentos, caixa de esgoto, Art. 20.10 - As instalações elétricas devem ser embutidas e Art. 3 - As boas práticas devem ser específicas para cada atividade desenvolvida, de acordo com as seguintes diretrizes: b. controle de situações de risco à saúde do empregado e c. controle de situações de risco ao meio ambiente.

ANEXO F – Reportagens sobre abate clandestino de cães – nov. 2009

FOLHA DE S. PAULO
SEXTA-FEIRA, 13 DE NOVEMBRO DE 2009 • C1

ABATEDOURO DE CÃES E GATOS Os clientes da carne eram restaurantes coreanos localizados no bairro do Bom Retiro

Como funcionava o esquema

- 1 Os donos de restaurantes ligavam para um casal e encomendavam a carne
- 2 Os cachorros de rua eram atraídos até a casa do casal com ossos e comidas
- 3 Os animais eram mortos a machadadas e tinham a carne queimada com um maçarico
- 4 Depois de limpa, a carne era resfriada e os clientes a buscavam em Suzano ou a entrega era feita em ruas próximas aos restaurantes. O que sobrava dos animais era incinerado

O preço de cada animal variava de R\$ 180 até R\$ 220

Polícia fecha matadouro de cães e gatos

Casal de Suzano, na Grande SP, foi preso sob suspeita de matar os animais e vendê-los para restaurantes coreanos do Bom Retiro

Legislação brasileira proíbe a comercialização desse tipo de produto, que era vendido por até R\$ 220, de acordo com a polícia

ANNA CAROLINA CARDOSO COLABORAÇÃO PARA A FOLHA APOINHO BENITES DA REPORTAGEM LOCAL

Uma casa onde vivem três poodles e um rottweiler era usada como abatedouro de cães e gatos na periferia de Suzano, na Grande SP. Após um mês de investigação, a polícia prendeu ontem um casal suspeito de matar e vender os animais para restaurantes coreanos.

Pela legislação brasileira, a venda desse produto é ilegal. Segundo o Ministério da Agricultura, só podem ser comercializados produtos descritos no decreto 30.691/1952. Lá constam carnes de bois, cavalos, suínos, aves e outros, mas não há nenhuma referência a

to Moraes, 41, e Roseli Nascimento, 39, foram encontrados 60 kg de carne canina resfriada, dois gatos mortos e equipamentos usados nos abates, como machado, ganchos e um maçarico.

A carne, conforme a Polícia Civil, era vendida para restaurantes localizados no Bom Retiro (região central de SP) e custavam entre R\$ 180 e R\$ 220 por bicho.

Encomendas

O esquema funcionava há três anos. O casal recebia cerca de dez encomendas por semana. Quatro pessoas, proprietárias de dois restaurantes no Bom Retiro, também foram presas. Procurados pela **Folha**, seus advogados não quiseram comentar o assunto.

Na casa do casal, os animais eram engordados e mortos a machadadas. A carne era queimada com um maçarico. Como não eram vendidas, as cabeças e patas acabavam incineradas.

Segundo a polícia, os animais abatidos viviam nas ruas e eram atraídos com ossos e comida até a casa onde o casal vivia com três filhos.

A Vigilância Sanitária de Suzano acompanhou o trabalho da polícia e só não recolheu o rottweiler e os três poodles porque, segundo a família, eles não seriam abatidos. Quando ameaçaram levar os quatro cães, as crianças choraram e a mãe deles mostrou as carteiras de vacinação de cada bicho.

Os policiais chegaram até o abatedouro depois de uma denúncia sobre a venda de carne de cachorros em restaurantes coreanos. Na noite de quarta-feira, ligaram para o casal encomendando a carne dos animais. A entrega foi marcada para ontem, antes das 7h, quando o casal foi preso. Conforme a polícia, eles serão indiciados por crueldade contra animais, formação de quadrilha e crime contra o meio ambiente. "É um grave crime contra a saúde pú-

Adriano Vaccari / Futura Press

Fonte: Jornal Folha de São Paulo, Caderno Cotidiano, p. C1, 13 de novembro 2009.

FOLHA DE S. PAULO SEXTA-FEIRA, 13 DE NOVEMBRO DE 2009 cotidiano C3

Cardápio mostra prato com carne de cachorro a R\$ 30

Menu de restaurante coreano no Bom Retiro tinha também uma imagem de cão

Consumo é comum na Coreia do Sul e em parte da China; no Brasil, lei impede comércio por questão cultural, diz ministério

DA REPORTAGEM LOCAL COLABORAÇÃO PARA A FOLHA

A imagem de um cachorro acompanhada da frase "Quem sabe do prato entende o que está escrito". É assim que o cardápio de um dos restaurantes coreanos do Bom Retiro investigados pela Polícia Civil se refere à iguaria, que custava R\$ 30.

De acordo com a polícia, os donos do restaurante disseram que a foto foi colocada no cardápio por engano no lugar da imagem de um coelho.

Quatro coreanos donos de dois restaurantes foram presos sob a acusação de mata-trato a animais, formação de quadrilha e crime contra o consumidor. Um deles, Tae Ilwon Choi, estava com o visto de permanência vencido.

Até o início da noite de ontem, Choi e os empresários Mak Noadul, Ho Nam Park e Kun Ok Park Chung continuavam detidos no Departamento de Detenção de Imigrantes e Alienação.

Os advogados dos quatro coreanos estavam na noite de ontem na delegacia, mas não falaram com a **Folha** até a conclusão desta edição.

Costume

O consumo de carne de cachorro é comum na Coreia do Sul e em algumas regiões da China. No Brasil, a legislação impede o comércio por uma questão cultural, segundo

informou o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento.

Muitos como animais de companhia, não há produção legal de cães e gatos no país para o abate. Nem mesmo a importação do produto é permitida.

Desde julho do ano passado, o ministério analisava a revisão do Regulamento de Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal. Essas

regras tratam, dentre outros assuntos, do abate, do consumo e da comercialização de carnes no Brasil.

No entanto, por conta de uma questão cultural, segundo o ministério, não há previsão para que seja autorizado o consumo de carnes de cães e gatos.

Em São Paulo, a lei estadual 11.977 prevê que animais domésticos não podem ser criados para consumo.

Cardápio com imagem de cão em restaurante coreano em SP

Fonte: Jornal Folha de São Paulo, Caderno Cotidiano, p. C3, 13 de novembro 2009.

Restaurante coreano burla vigilância e reabre

Donos do estabelecimento no Bom Retiro estão presos sob a suspeita de vender pratos feitos com carne de cachorro

Reportagem flagrou consumidores no local por volta do meio-dia de ontem; acionada, fiscalização chegou depois e nada encontrou

AFONSO BENITES
DA REPORTAGEM LOCAL

Um dia após ter sua cozinha interditada pela Vigilância Sanitária, o restaurante coreano Por Que Chama, localizado na rua Guarani, no Bom Retiro, funcionou ontem e uma de suas quatro mesas estava ocupada por clientes. Os donos do estabelecimento estão presos desde anteontem sob a suspeita de comercializar pratos feitos com carne de cachorro.

Após a **Folha** constatar a reabertura do local, por volta das 12h de ontem, e entrar em contato com a Secretaria Municipal de Saúde, fiscais da vigilância foram até o restaurante, mas não encontraram nenhum alimento sendo consumido, conforme a secretaria.

O estabelecimento estava proibido de vender alimentos porque sua cozinha estava em condições precárias de uso e não respeitava uma série de normas, segundo a vigilância.

No documento que oficializou a interdição, o órgão informou que medidas de higienização precisariam ser tomadas antes da reabertura e, conforme os fiscais, era isso que esta-

ção de quadrilha, crimes contra o consumidor e maus tratos contra animais, não foram encontrados. A reportagem conversou com uma funcionária do local, pediu para que um responsável entrasse em contato, mas não teve resposta até a conclusão desta edição.

O outro restaurante coreano investigado pela polícia por também vender comida de cachorro estava funcionando ontem. Porém apenas clientes selecionados tinham acesso a ele.

O estabelecimento não chegou a ser interditado. Ele foi autuado anteontem por irregularidades na cozinha.

Sem nenhuma identificação em sua entrada, o restaurante Ho Nan Park, mesmo nome de seu proprietário, só aceita clientes previamente identificados. Brasileiros não entram, segundo comerciantes coreanos da redondeza. Os advogados desse estabelecimento não foram encontrados ontem. Park e o outro proprietário, Kun Ok Park Chung, continuavam presos, segundo a polícia.

Anteontem, a polícia achou em Suzano (Grande SP), um abatedouro de cães e gatos na casa de Roberto Moraes, 41, e Roseli Nascimento, 39. No local, foram apreendidos 60 quilos de carne canina e dois gatos mortos. O casal, segundo a polícia, tinha como clientes restaurantes do Bom Retiro. Os dois foram presos. O consumo

Leonardo Wen-12.nov.2009/Folha Imagem

ANÁLISE

Comer cachorro é um fato antropológico

HÉLIO SCHWARTSMAN
DA EQUIPE DE ARTICULISTAS

Que coreanos comam cachorros é um fato antropológico que não deveria causar maior surpresa nem revolta.

Franceses deliciam-se com cavalos e rãs, chineses devoram tudo o que se mexe — aí inclusive escorpiões e gafanhotos — e boa parte das coisas que não se mexem também. Os papuas da Nova Guiné, até algumas décadas atrás, fartavam-se no consumo ritual dos miolos de familiares mortos. Só pararam porque o hábito estava lhes passando o kuru, uma doença neurológica grave.

Nosso consolidadíssimo costume de comer vacas configura, aos olhos dos hinduístas, nada menos do que deicídio.

A não ser que estejamos prontos a definir e impor um universal alimentar, é preciso tolerar as práticas culinárias alheias, por mais exóticas ou repugnantes que nos pareçam.

Nada disso justifica o abate, por meios cruéis, de cães num matadouro clandestino em Su-

A cidade de São Paulo conta hoje com mais de 1,6 milhão de cachorros. Por mais que simpatizemos com os cães, eles chegaram a uma situação de descontrolado populacional, que precisa ser remediada.

É claro que não o faremos devorando os animais excedentes. Mas a solução tampouco virá de medidas populistas como a lei paulista nº 12.916/08, que, exceto em casos muito especiais, proibiu os órgãos de controle de zoonoses de proceder à eutanásia de cães e gatos.

O resultado foi que esses serviços praticamente pararam de recolher animais. Como a natureza segue seu curso, em vez de ser sacrificados sem dor, eles acabam morrendo vítimas de atropelamentos e doenças.

Pesquisa de veterinários de USP, Unip, Unicsul e Metodista mostrou que, mesmo antes da introdução da lei, os cães da região metropolitana de SP viviam só três anos, contra 9,9 nos EUA e 11 na Inglaterra.

O melhor caminho para resolver o problema é por meio da castração, que precisa che-

Fonte: Jornal Folha de São Paulo, Caderno Cotidiano, p. C4, 14 de novembro 2009.