

revista Higiene Alimentar

setembro de 2002

Volume 16 - Nº 100



ISSN 0101-8171

Indexada nas seguintes

bases de dados:

CABI ABSTRACTS (Inglaterra)

LLACOS-OFIEME (Brasil)

PERI-ESALC-UBP (Brasil)

Affiliada à ABEC

Associação Brasileira de

Editores Científicos

A CENTÉSIMA EDIÇÃO



Neste número, que comemora 100 edições e 15 anos de existência, a revista homenageia autores e co-autores, responsáveis por sua qualidade e credibilidade científica.



LEIA TAMBÉM OUTROS
TRABALHOS INÉDITOS

FORTUNA, J. L.; SILVA, T. J. P.; BARCELLOS, V. C. Ocorrência de antibióticos em fígado, músculo e rim de suínos abatidos no estado do Rio de Janeiro. *Revista Higiene Alimentar*. v. 16, n. 100. 2002, p. 84-88.

Ocorrência de Resíduos de Antibióticos em Fígado, Músculo e Rim de Suínos Abatidos no Estado do Rio de Janeiro.

Prof MSc Jorge Luiz Fortuna
UNEB Ciências Biológicas - Campus X
Mat. 74.436.529-5 / CRBio 21.646-02

Jorge Luiz Fortuna
Teófilo José Pimentel Silva
Vinicius Cunha Barcellos

Universidade Federal Fluminense (UFF), Niterói, RJ.

RESUMO

Os antibióticos tornaram-se de uso rotineiro na criação de animais de produção, com função profilática e/ou promotora de crescimento; surgindo as preocupações dos resíduos ou riscos para o consumidor e, conseqüentemente, os programas de monitoramento higiênico-sanitários dos mercados mais exigentes (externo). Assim, com o objetivo de detectar e quantificar resíduos de antibióticos em fígado, músculo e rim de suínos abatidos em matadouros frigoríficos sob o serviço de Inspeção Estadual, no Estado do Rio de Janeiro e conhecer a distribuição destes resíduos segundo a origem do animal abatido, foram colhidas amostras de fígado, músculo e rim de 60 suínos tipo carne, provenientes de 10 produtores diferentes, sendo 05 do Rio de Janeiro e 05 de Minas Gerais, São Paulo e Paraná, no período de julho a dezembro de 1997. As amostras foram submetidas inicialmente a um teste de triagem ("Swab Test on Premises" - STOP), com cepas de *Bacillus subtilis* ATCC 6633 e *Bacillus cereus* var. *mycoides* ATCC 11778, e se o resultado fosse positivo, ao teste confirmativo ("Bioassay Test" -

Bioensaio), com cepas de sensibilidade específica para cada antibiótico: *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Bacillus cereus* var. *mycoides* ATCC 11778, *Micrococcus luteus* ATCC 9341a, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228, *Staphylococcus epidermidis* (estreptomicina resistente) e *Micrococcus luteus* ATCC 15957. Após as análises conclui-se que as amostras, ou não demonstraram a ocorrência destes resíduos de antibióticos nesses suínos, ou os níveis encontrados estavam dentro dos padrões permitidos pelos órgãos de saúde pública e de inspeção sanitária; produtores e Médicos Veterinários vêm observando os prazos de retirada e os limites de tolerância para essas drogas. Não houve diferença significativa ($p > 0,05$) entre os produtores do Estado do Rio de Janeiro e dos Estados de Minas Gerais, São Paulo e Paraná.

PALAVRAS-CHAVE: Antibióticos, suínos, resíduos.

SUMMARY

At the time that antibiotics have been used on a practice basis in animal breeding for food production with prophylaxis

function and/or to promote growth, appeared concerns about residues or risks for consumer and the sanitary-hygienic monitoring programs of the strictest market (external). To verify the residues occurrence of antibiotics in swines meat type slaughtered under State Inspection, were collected samples of liver, muscle and kidney of 60 swines meat type, deriving from 10 different producers, being 05 of Rio de Janeiro state and 05 of Minas Gerais, São Paulo and Paraná states, at the period of July for December of 1997. The samples were tested in a presumptive test ("Swab Test on Premises - STOP") using specific sensibility strain for *Bacillus subtilis* ATCC 6633 and *Bacillus cereus* var. *mycoides* ATCC 11778, and if the result of test were positive, tested for confirmation ("Bioassay Test"), using specific strain for each antibiotic: *Bacillus subtilis* ATCC 6633 e *Bacillus cereus* var. *mycoides* ATCC 11778, *Micrococcus luteus* ATCC 9341a, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228 and *Micrococcus luteus* ATCC 15957. The analyzed samples, either didn't demonstrate the occurrence of those residues of antibiotics in swines meat type, or the observed levels was in accordance with the permitted standards for the organs of public health and the

sanitary inspection. The conclusion is that these producers observe the retired and tolerance time for the veterinary drugs of those swines meat type, slaughtered under State Inspection in Rio de Janeiro state, now that the majority of the slaughter animals producers, use additives in the alimentation like growth promoters, and the most used are the antibiotics. There wasn't significative difference ($p > 0,05$) between the producers of Rio de Janeiro state and of Minas Gerais, São Paulo and Paraná states.

INTRODUÇÃO

O uso de drogas, em animais de produção, no tratamento de doenças é uma prática antiga da Medicina Veterinária. Porém nos últimos anos a utilização de antibióticos, como promotores de crescimento, vem aumentando, tornando-se parte integrante do manejo da criação como função de prevenir doenças e/ou aumentar a produção do rebanho (9 e 12). Estas drogas têm sido utilizadas principalmente como aditivos em rações, melhorando a eficiência dos alimentos e proporcionando maior desenvolvimento e produtividade dos animais. Entretanto, os agentes antimicrobianos, caso não sejam corretamente utilizados (terapia indiscriminada com antibióticos, superdosagem e não observância do período de retirada do antibiótico antes do abate) podem acarretar a presença de resíduos de antibióticos nas vísceras e músculos dos animais. Resultando, assim, em risco ao consumidor, pois estes resíduos, quando presentes, podem prejudicar a saúde humana, acarretando reações alérgicas, podendo ocorrer choque anafilático e inclusive morte (4). Além disso, o uso de forma indireta e a longo prazo, devido à grande exposição de microrganismos a essas drogas, pode dar origem a uma seleção de cepas resistentes que poderá ser

transferida entre as bactérias (8). O monitoramento realizado pelo "Food Safety Inspection Service" (FSIS) / "United State Department of Agriculture" (USDA) no ano de 1985; analisou 356 amostras de rins de suínos, encontrando-se resíduos de antibióticos em 1,7% destas amostras (5). Mais tarde, o "Food and Drug Administration" (FDA) relatou uma ocorrência de resíduos de antibióticos de 13,1% em suínos (13). No Brasil, o programa de monitoramento de resíduos de antibióticos é feito somente em estabelecimentos com o serviço de Inspeção Federal, cuja carne é destinada à exportação, tendo um custo operacional elevado. Este programa de controle prevê uma amostragem de fígado, músculo e rim de 60 suínos/ano, para que tenhamos 95% de probabilidade de detectar uma violação, caso ela ocorra em 5% ou mais da população. Utiliza-se o "Swab Test on Premises" (STOP) e o "Bioassay" (Bioensaio) como métodos analíticos (3). As concentrações de resíduos de antibióticos, variam consideravelmente de tecido para tecido, observando-se mais elevados em tecidos de estocagem ou em órgãos que metabolizam e excretam antibióticos, como fígado e rins (1 e 7). Devido aos fatos expostos, observou-se a necessidade de se conhecer a realidade deste problema, e assim sendo, este trabalho teve como objetivos: detectar e quantificar resíduos de antibióticos em fígado, músculo e rim de suínos abatidos em matadouros frigoríficos sob serviço de Inspeção Estadual, no Estado do Rio de Janeiro e conhecer a distribuição destes resíduos segundo a origem do animal abatido.

MATERIAL E MÉTODOS

1. Método de amostragem

As amostras foram colhidas em matadouros exclusivos para o aba-

te de suínos, sob o serviço de Inspeção Estadual (SIE nº 428, 505 e 582) no Estado do Rio de Janeiro. A colheita foi realizada no período de julho à dezembro de 1997 com um total de 60 suínos, sendo escolhido, aleatoriamente, 6 suínos para cada um dos 10 produtores, procedentes de 5 municípios diferentes do Estado do Rio de Janeiro e 5 municípios diferentes dos Estados de São Paulo, Minas Gerais e Paraná. Considerou-se uma amostra fígado, músculo e rim procedentes do mesmo animal. Cada tecido foi embalado individualmente em saco de polietileno de baixa densidade com fecho hermético, mantido em uma geladeira portátil, com gelo, até a chegada ao laboratório, onde eram estocadas em freezer (-30°C) até o instante da análise, no máximo 4 dias após a colheita.

2. Análises laboratoriais

O método utilizado foi baseado na "Microbiology Laboratory Guidebook" do FSIS / USDA (6 e 10). Sendo este o método oficial adotado pelo Laboratório de Apoio de Referência Animal (LARA) Ministério da Agricultura (MA) Pedro Leopoldo-MG (2 e 3). Os microrganismos-teste usados para o STOP foram: *Bacillus subtilis* ATCC 6633; *Bacillus cereus* var. *mycoides* ATCC 11778. Bioensio: *Micrococcus luteus* ATCC 9341a (penicilina susceptível, eritromicina susceptível); *Bacillus cereus* var. *mycoides* ATCC 11778 (tetraciclina susceptível); *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228 (neomicina susceptível); *Bacillus subtilis* ATCC 6633 (estreptomicina susceptível); *Micrococcus luteus* ATCC 15957 (eritromicina resistente); *Staphylococcus epidermidis* (estreptomicina resistente).

2.1 "Swab test on premises" (STOP) - Teste presuntivo

- a) Cultivo e produção de esporos: Cultivou-se o *Bacillus subtilis*

ATCC 6633 à 30°C ± 1°C em Ágar nº 1 para antibiótico, após este período transferiu-se a cultura para garrafas de Roux e incubou-se à 35°C por 24 h. e estocou-se à temperatura ambiente para esporulação até alcançar taxa acima de 80%. A seguir a suspensão de esporos foi mantida sob refrigeração.

- b) Padronização da suspensão de esporos, determinação do número de esporos por ml de diluição e quantidade ótima de células: Este teste seguiu a metodologia oficial do LARA e mostrou-se sensível para as seguintes concentrações de antibióticos: eritromicina 0,025 ppm; penicilina 0,025 UI/ml; clortetraciclina 0,01 ppm; oxitetraciclina 0,08 ppm; neomicina 0,25 ppm; estreptomina 0,25 ppm e tetraciclina 0,08 ppm. Em seguida fez-se a preparação das placas para o ensaio, tendo sido

feito anteriormente o controle de qualidade das mesmas.

- c) Determinação: A amostra foi retirada do freezer e parcialmente descongelada à temperatura ambiente. Fez-se a desinfecção (álcool 68%) no local do saco plástico a ser perfurado. Com a ponta da haste do swab esterilizado perfurou-se o invólucro e o tecido, girando a haste do swab, pelo menos 5 vezes. Em seguida, introduziu-se o swab na amostra, mantendo-o por 30 minutos. O swab foi retirado e colocado na placa semeada. As placas foram incubadas à 30°C por 18 horas. Após este tempo, procedeu-se a leitura verificando a presença ou não de halo de inibição.

2.2 "Bioassay test" (Bioensaio) - Teste confirmativo

Este teste foi realizado sempre que o STOP apresentava resultado

positivo. Foram utilizados microrganismos sensíveis e resistentes aos diferentes antibióticos estudados, e as análises foram feitas após a extração destas substâncias através de soluções tamponadas. Os resíduos de antibióticos foram qualificados e quantificados.

3. Tratamento estatístico

Para a caracterização da ocorrência de determinada variável (resíduos de antibióticos em suínos) a qual ocorre x vezes num total de n amostras, a ocorrência $p = x/n$ teve como intervalo de confiança, para definição de seus limites de confiança, $p \pm 1,96 \sqrt{p(1-p)/n}$. Como não foram observados resultados positivos e nenhum tipo de correlação entre os resultados falso-positivos, produtor e tecidos dos animais, utilizou-se uma tabela de distribuição binomial (11), para determinação do intervalo de confiança.

TABELA 1. Diâmetro médio dos halos de inibição (mm) obtidos pela cultura de *Bacillus subtilis* ATCC 6633 na concentração de $3,0 \times 10^3$ esporos por placa, para as Concentrações Inibitórias Mínimas (MIC) de cada antibiótico (ppm).

Antibióticos	Concentração inibitória mínima	Diâmetro do halo de inibição
Neomicina	0,25	14,7
Estreptomina	0,25	13,3
Eritromicina	0,05	13,7
Penicilina (UI/ml)	0,025	13,7
Oxitetraciclina	0,08	10,5
Clortetraciclina	0,01	10,5
Tetraciclina	0,08	12,5

TABELA 2. Diâmetro médio dos halos de inibição (mm) nas diferentes Concentrações Inibitórias Mínimas (MIC) de Clortetraciclina, Oxitetraciclina e Tetraciclina, obtidos utilizando 3,0 ml da suspensão de *Bacillus cereus* var. *mycoides* ATCC 11778 na diluição de 10^{-4} em 100 ml de Ágar nº 8.

Concentração Inibitória Mínima (ppm)	HALOS DE INIBIÇÃO		
	CLORTETRACICLINA	OXITETRACICLINA	TETRACICLINA
0,01	12,3	---	---
0,08	---	14,5	15,0

RESULTADOS E DISCUSSÃO

As placas foram preparadas com sensibilidade para detectar quantidades de resíduos de antibióticos iguais ou menores aos limites máximos permitidos pela legislação (3). A única exceção foi a eritromicina, uma vez que seu nível máximo tolerado é zero e a Concentração Inibitória Mínima (MIC), portanto, foi a menor possível. Utilizou-se concentração de $3,0 \times 10^3$ esporos de *Bacillus subtilis* ATCC 6633 por placa, o que resultou nos diversos diâmetros médios dos halos de inibição para as MIC (Tabela 1).

Em relação às tetraciclina, a sensibilidade adequada foi obtida

com 3,0 ml da diluição-mãe de *Bacillus cereus* var. *mycoides* ATCC 11778 em 100 ml de Ágar nº 8 (Tabela 2).

Com a sensibilidade utilizada era possível detectar com margem de segurança qualquer resíduo, dos antibióticos pesquisados que estivesse presente acima dos níveis máximos permitidos (6). Foram colhidas amostras de 60 animais, de procedência variada, totalizando 180 peças analisadas pelo STOP. Considerando-se cada tipo de tecido (fígado, músculo e rim) separadamente, 4 peças, em 180 (2,22%) resultaram positivas: 3 rins, em 60 (5,00%) e 1 fígado, em 60 (1,67%). Nenhuma amostra de músculo a-

presentou resultado positivo (Tabela 3).

Ao se proceder o teste do bioensaio das quatro amostras positivas, provenientes do STOP, três apresentaram zona de inibição, porém os diâmetros dos halos de inibição foram menores do que os padrões obtidos nas diferentes concentrações inibitórias mínimas de referência para clortetraciclina, oxitetra-ciclina e tetraciclina, utilizando *Bacillus cereus* var. *mycoides* ATCC 11778 na concentração de 3,0 ml da diluição de 10^{-4} em 100 ml de Ágar nº 8 (Tabela 4).

A ocorrência de 2,22% de amostras positivas no STOP, concorda com os resultados do monito-

TABELA 3. Número de amostras analisadas e número e freqüência de amostras positivas, pelo STOP, segundo tipo de tecido e procedência dos suínos, colhidas no período de julho à dezembro de 1997.

Produtor / Procedência	Nº de suínos abatidos	Tipo de Tecido									TOTAL		
		Fígado			Músculo			Rim					
		n	+	%	n	+	%	n	+	%	n	+	%
1 / Ponte Nova-MG	150	6	0	0	6	0		6	0	0	18	0	0
2 / Arapoti - PR	145	6	0	0	6	0		6	0	0	18	0	0
3 / Torre da Pedra-SP	120	6	0	0	6	0		6	0	0	18	0	0
4 / Ponta Grossa-PR	120	6	1*	16,67	6	0		6	2**	33,33	18	3	16,67
5 / Palmeira - PR	150	6	0	0	6	0		6	1***	16,67	18	1	5,56
6 / Nova Friburgo-RJ	50	6	0	0	6	0		6	0	0	18	0	0
7 / Itaguaí - RJ	40	6	0	0	6	0		6	0	0	18	0	0
8 / Petrópolis- RJ	45	6	0	0	6	0		6	0	0	18	0	0
9 / Magé-RJ	50	6	0	0	6	0		6	0	0	18	0	0
10 / Cach. de Macacu-RJ	30	6	0	0	6	0		6	0	0	18	0	0
TOTAL	900	60	1	1,67	60	0	0	60	3	5,00	180	4	2,22

* Suíno nº 2; ** Suínos nº 2 e 6; *** Suíno nº 5.

TABELA 4. Diâmetros dos halos de inibição (mm) pelo teste do bioensaio por suíno e tipo de tecido positivo no STOP.

MICROORGANISMO TESTE	PRODUTOR 4		PRODUTOR 5	
	Suíno nº 2		Suíno nº 6	Suíno nº 5
	Rim	Fígado	Rim	Rim
<i>Bacillus cereus</i> var. ATCC 11778	9 mm	8 mm	---	10 mm

ramento realizado pelo FSIS/USDA no ano de 1985 (1,7%); e discorda das investigações do FDA que relataram uma frequência de 13,1% de resíduos de antibióticos em suínos tipo carne (5 e 13). Além disso, os resultados obtidos no teste do bioensaio estão em concordância com as 70 análises (STOP e Bioensaio) pelo LARA/Pedro Leopoldo - MG, em amostras de suínos destinados à exportação no ano de 1995, quando não foi observado nenhuma violação de resíduos de antibióticos (3).

CONCLUSÕES

As amostras analisadas, ou não demonstraram a ocorrência de resíduos de antibióticos nesses suínos, ou os níveis encontrados estavam dentro dos padrões permitidos pelos órgãos de saúde pública e de inspeção sanitária. Não houve diferença significativa na ocorrência de resíduos ($p > 0,05$) entre os produtores do Estado do Rio de Janeiro e dos Estados de Minas Gerais, Paraná e São Paulo. Embora seja um eficiente teste de referência, o STOP não pode ser o único utilizado na verificação da ocorrência de resíduos de antibióticos, devido à possibilidade de reações falso-positivas, sendo sempre necessário a utilização de uma técnica para a confirmação dos resultados, que neste caso foi o teste do bioensaio. Produtores e Médicos Veterinários vêm observando os prazos de retirada e os limites de tolerância para essas drogas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BOOTH, N. H. & McDONALD, L. E. *Farmacologia e Terapêutica em Veterinária*. 6ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 1992, 997 p.
- BRASIL. Ministério da Agricultura e Reforma Agrária. DAS, DIPOA. Portaria nº 51 de 06 de fevereiro de 1986. Institui o Plano Nacional de Controle de Resíduos Biológicos em Produtos de Origem Animal - PNCRB e o Programa de Controle de Resíduos Biológicos em Carne - PCRBC. *Diário Oficial*. Brasília. 07 de fevereiro de 1986, p.2228.
- _____. Ministério da Agricultura e do Abastecimento. DAS, DIPOA. Portaria nº 110 de 26 de agosto de 1996. Divulga o PNCRB e o PCRBC e dá conhecimento público sobre a programação anual de controle de resíduos no exercício de 1995. *Diário Oficial*. Brasília. 04 de setembro de 1996, p. 17298 - 17306.
- BRAZ, M. B. A toxicologia veterinária e a preservação da saúde pública. *Rev. Port. Ciênc. Veter.* Vol. LXXXI, nº 477. Lisboa, jan./mar. 1986, p. 45 - 46.
- CORDLE, M. K. USDA Regulation of residues in meat and poultry products. *J. Anim. Sci.* Vol. 66. Champaign-IL. 1988, p. 413 - 433.
- FUGATE Jr., H. G. Determination of antibiotic residues in animal tissues In: *Microbiology Laboratory Guidebook*. Washington D. C.: Scientific Service. APHIS. United States Department of Agriculture / Food Safety Inspection Service. 1974, n. p.
- GOODMAN, L. S. & GILMAN, A. G. *As Bases Farmacológicas da Terapêutica*. 8ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 1990, 1232 p.
- HOLMBERG, S. D., OSTERHOLM, M. T., SENER, K. et al. Drug resistant Salmonella from animals fed antimicrobials. *N. Engl. J. Med.* Vol. 311, nº 10. Massachusetts. 1984, p. 617 - 622.
- MERCER, H. D. Antimicrobial drugs in food - Producing animals. Control Mechanisms of Governmental Agencies. *Veterinary Clinics of North America*. Vol. 5, nº 1. Philadelphia. Fev. 1975, p. 3 - 34.
- REAMER, R. Laboratory communication nº 3 In: *Microbiology Laboratory Guidebook*. Washington D. C.: Scientific Service. APHIS. United States Department of Agriculture / Food Safety Inspection Service. 1974, n. p.
- SNEDECOR, G. W. & COCHRAN, W. G. *Statistical Methods*. 8ª ed. Ames: Iowa State University Press. 1989, 503 p.
- VALLE, R. P. Resíduos de antibióticos em alimentos. *Rev. Bras. Med. Vet.* Vol. 7, nº 7. Rio de Janeiro. 1985, p. 206 - 208.
- VAN DRESSER, W. R. & WILCKE, J. R. Drug residues in food animals. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* Vol. 194, nº 12. Schaumburg. Junho. 1989, p. 1700 - 1710.