



# **CENTRO UNIVERSITÁRIO LUTERANO DE PALMAS**

---

COMUNIDADE EVANGÉLICA LUTERANA "SÃO PAULO"  
*Recredenciado pela Portaria Ministerial nº 3.607 - D.O.U. nº 202 de 20/10/2005*

**WILZIMAR PINTO MATOS**

**RESÍDUOS DE ANTIBIÓTICOS NO LEITE**

PALMAS – TO

2014

**WILZIMAR PINTO MATOS**

**RESÍDUOS DE ANTIBIÓTICOS NO LEITE**

Monografia apresentada com requisito parcial da disciplina TCC em ciências farmacêuticas do curso de farmácia do Centro Universitário Luterano de Palmas, sob coordenação da Prof<sup>a</sup> MSc. Grace Priscila Pelissari Setti.

Orientadora: Prof. M.Sc. Marta Cristina de Menezes Pavlak.

Palmas – TO

2014

**WILZIMAR PINTO MATOS**

**RESÍDUOS DE ANTIBIÓTICOS NO LEITE**

Monografia apresentada com requisito parcial da disciplina TCC em ciências farmacêuticas do curso de farmácia do Centro Universitário Luterano de Palmas, sob coordenação da Prof<sup>a</sup> M.Sc. Grace Priscila Pelissari Setti.

Orientadora: Prof. M.Sc. Marta Cristina de Menezes Pavlak.

Aprovado em: \_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 2014.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof. M.Sc. Marta Cristina de Menezes Pavlak  
Centro Universitário Luterano de Palmas – CEULP

---

Prof. Esp. Elisângela Luiza Vieira L. B. dos Santos  
Centro Universitário Luterano de Palmas – CEULP

---

Prof. Msc. Isis Prado Meirelles de Castro  
Centro Universitário Luterano de Palmas – CEULP

Palmas – TO  
2014

## DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho primeiramente a Deus, aos meus pais Wilton (in memorian) e Joana, as minhas irmãs Wilma e Fabiane e aos meus irmãos Fábio, Welton e Wanderlei por todo apoio e compreensão de sempre. Amo vocês.

## **AGRADECIMENTOS**

Primeiramente a Deus, minha fortaleza, aquele que me guiou, fortaleceu e iluminou em toda trajetória. A Deus pela minha existência.

À Professora Msc. Marta Cristina de Menezes Pavlak que me ajudou na escolha do tema, pelos conhecimentos transmitidos, pela orientação, incentivo, confiança, carinho, pelas horas dedicadas para realização deste trabalho. Pelo exemplo da incansável luta pelo saber.

A minha mãe Joana, por toda a paciência, apoio e ajuda; seu amor e amizade me dão forças para não desistir. Pelas orações para que tudo desse certo. Amo você!

As minhas queridas irmãs Wilma e Fabiane por me incentivar e acreditar na minha capacidade.

Aos meus irmãos Welton, Wanderlei e Fábio pela força, carinho, paciência, atenção e ajuda.

A minha grande amiga e conselheira pastora Maria Divina pelo carinho, atenção, paciência, pelos ensinamentos e suas orações para que tudo desse certo. Agradeço a Deus por ter colocado você em meu caminho. Você é uma pessoa muito especial!

A família do Pastor Raimundo Avelino pelo carinho, incentivo e apoio incondicional e também pelas orações que sempre me fortaleceram.

A minha avó, Maria Constância, pela demonstração de persistência e amor pela vida

A minha cunhada Synarah pelo carinho, atenção e amizade.

Aos amigos que fiz ao longo desse curso, que me mostraram a importância da amizade principalmente nos momentos de maior pressão ao longo do curso.

Ao CEULP/ULBRA, seus servidores e professores.

A todos aqueles que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho.

“O sucesso torna as pessoas modestas, amigáveis e tolerantes; é o fracasso que as faz ásperas e ruins.”

William Maugham

## RESUMO

**MATOS, Wilzimar Pinto. Resíduos de Antibióticos no Leite. 2014. TCC (Graduação em Farmácia). 44 p. Centro Universitário Luterano de Palmas, Palmas - TO.**

O leite é o alimento mais consumido pela população brasileira e desempenha importante papel na alimentação humana. Para garantir que este produto chegue ao consumidor com qualidade, devem ser avaliadas as características físicas, químicas e microbiológicas, além de ser analisada a adição de substâncias adulterantes e conservantes, bem como a presença de antibióticos, pesticidas e outras drogas. Este estudo teve como objetivo realizar um levantamento bibliográfico sobre a presença de resíduos no leite, além de analisar o risco do uso de medicamentos veterinários e seus mecanismos de controle sanitário no Brasil, bem como citar e comparar a eficácia dos principais métodos utilizados para detectá-los. A presença de resíduos de antibióticos no leite na maioria das vezes é proveniente do processo inflamatório da glândula mamária denominada de mastite, sendo esta a causa principal para o surgimento dos resíduos no leite. Esses resíduos ocorrem devido ao uso incorreto de antimicrobianos em animais doentes, não respeitando o prazo de carência previsto. Com isso o leite contendo resíduos de antibióticos pode causar sérios problemas à saúde do consumidor, como choque anafilático em indivíduos alérgicos, teratogenia, resistência microbiana e desequilíbrio da microbiota intestinal. Na indústria desencadeia prejuízos financeiros por interferirem na inibição de microrganismos benéficos na produção de derivados do leite. Existem no Brasil legislações específicas e rígidas que estabelecem limites máximos recomendados de resíduos de antibióticos no leite. Através das diversas análises disponíveis no mercado é possível determinar a presença desses resíduos de forma qualitativa e quantitativa, onde estas apresentam resultados rápidos e confiáveis que permitem o destino correto de um determinado lote do produto dentro do próprio laticínio. Para obter resultados com níveis de resíduos de antibióticos abaixo do limite preconizado pela legislação é preciso que medidas sanitárias sejam atendidas, com a finalidade de oferecer produtos de qualidade à população, minimizando assim o problema relacionado aos resíduos de antibióticos no leite.

**Palavras – chaves:** Métodos. Legislação. Drogas. Controle sanitário.

## LISTAS DE ABREVIações

ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária.
CBT	Contagem Total de Bactérias
CCS	Contagem de Células Somáticas.
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência.
FAO	Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação
FDA	Food and Drug Administration
LMR	Limite Máximo de Resíduos
MAPA	Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento.
MS	Ministério da Saúde
OMS	Organização Mundial de Saúde
ONU	Organização das Nações Unidas
PAMVet	Programa de Análise de Resíduos de Medicamentos Veterinários em Alimentos de Origem Animal.
PCRL	Programa de Controle de Resíduos no Leite
PNCRL	Programa Nacional de Controle de Resíduos no Leite
UHT	Ultra Alta Temperatura

## LISTAS DE FIGURAS

<b>Figura 01:</b> Teste microbiológico comercial utilizado para detectar resíduos de antibióticos no leite.....	27
<b>Figura 02:</b> Teste comercial Sharm Cowside <sup>®</sup> Test II, imunoreceptor utilizado para detectar resíduos de antibióticos no leite.....	30
<b>Figura 03:</b> Dispositivo do kit SNAP <sup>®</sup> Beta Test e interpretação dos resultados.....	32
<b>Figura 04:</b> Interpretação dos resultados do kit Penzyme <sup>®</sup> Milk Test.....	33

## LISTAS DE TABELAS

<b>Tabela - 1</b> – Limite Máximo de Resíduos (LMR) estabelecidos pelos órgãos fiscalizadores – em µg/kg (ppb).....	24
---	----

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>12</b>
<b>2. OBJETIVOS.....</b>	<b>14</b>
2.1 Objetivo Geral .....	14
2.2 Objetivo Específico .....	14
<b>3. METODOLOGIA.....</b>	<b>15</b>
<b>4. REFERENCIAL TEÓRICO.....</b>	<b>17</b>
4.1 Leite.....	17
4.2 Qualidade do leite e legislação.....	18
4.3 Mastite .....	18
4.4 Antimicrobianos .....	20
4.5 Resíduos de antimicrobianos no leite .....	21
4.6 Limite máximo de resíduos (LMR) de antimicrobianos no leite.....	23
<b>5. Métodos para Detecção e Quantificação de Resíduos de Antibióticos no leite.....</b>	<b>25</b>
5.1 Métodos de Inibição Microbiológicos.....	25
5.2 Métodos Imunoquímicos (Receptores, Enzimas e Imunológicos).....	29
5.3 Métodos Físico-químicos.....	35
<b>6. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>38</b>
<b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>39</b>

## 1. INTRODUÇÃO

O leite é o alimento mais consumido pela população brasileira, além de possuir importante papel na alimentação de alguns grupos populacionais, tais como crianças e idosos (TRONCO, 2010). É constituído de, aproximadamente, 87% de água e 13% de elementos sólidos, como gordura, proteínas, vitaminas e sais minerais (principalmente o cálcio) essenciais à dieta humana. É um produto proveniente da glândula mamária de mamíferos sadios durante o período de lactação, a partir do transporte de substâncias do sangue para as células específicas da glândula. Qualquer tipo de agressão causada na glândula por traumas físicos ou outros tipos de agentes como microrganismos, substâncias químicas irritantes pode desencadear um processo inflamatório denominado de mastite ou mamite (BRASIL, 2012).

Mastite ou mamite pode ser classificada sob duas formas: clínica ou subclínica, responsáveis por alterações nas propriedades físicas e químicas do leite. No tratamento preventivo ou cura da mastite, são empregados medicamentos veterinários aos animais enfermos, sendo esta, uma das principais fontes de resíduos de antibióticos em animais na fase de lactação (BRASIL, 2012). “O período de carência é o tempo necessário para eliminação do antibiótico no leite, após a última aplicação do medicamento, variando de acordo com cada medicamento” (BRASIL, 2005).

A presença de resíduos de antibióticos no leite deve ser evitada, pois pode provocar graves problemas de saúde no consumidor, entre os quais: hipersensibilidade, choque anafilático em indivíduos alérgicos, teratogenia, resistência microbiana e desequilíbrio da microbiota intestinal, e ainda, desencadeando prejuízos financeiros na indústria, por interferirem na inibição de microrganismos benéficos na produção de derivados do leite (BASTOS, 2012).

Para detectar a presença de resíduos de medicamentos veterinários no leite e em seus derivados, existem diversos tipos de testes disponíveis no mercado, tanto qualitativo como quantitativo. Estes testes podem ser classificados de acordo com seu princípio ou mecanismo de ação em inibição de crescimento bacteriano, imunológicos, enzimáticos, e cromatografia líquida de alta eficiência (TRONCO, 2010).

Em 2002, com objetivo de controlar e fiscalizar resíduos de medicamentos veterinários em alimentos foi criado o Programa de Análise de Resíduos de Medicamentos Veterinários em Alimentos de Origem Animal – PAMVet, onde o leite bovino foi selecionado como primeira matriz de análise para a pesquisa de medicamentos veterinários em animais

produtores de alimentos, devido ser o alimento de origem animal mais consumido pela população brasileira (BRASIL, 2002).

Atualmente, existe uma preocupação dos consumidores quanto à qualidade dos alimentos. A terapia medicamentosa com antibióticos em vacas com mastite pode causar efeito adverso na microbiota intestinal humana e o consumo prolongado de leite com esses resíduos pode promover a produção de microrganismos com cepas resistentes. O risco que esses resíduos podem gerar a saúde dos consumidores decorre de infecções por microrganismos resistentes ou ainda pela transferência de genes resistente aos agentes patogênicos, que podem prejudicar um tratamento posterior.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo Geral**

Discutir a presença de resíduos de antibióticos no leite.

### **2.2 Objetivos Específicos**

- Apresentar os riscos da exposição do consumidor a resíduos de medicamentos veterinários em alimentos de origem animal;
- Mostrar os mecanismos de controle sanitário no Brasil;
- Citar os métodos de detecção de resíduos de antibióticos no leite.

### 3. METODOLOGIA

O presente trabalho trata-se de uma revisão bibliográfica e abrange as informações disponíveis em bibliografia pública. O conteúdo apresentado neste trabalho foi obtido por meio de artigos publicados em revistas indexadas entre os anos de 1993 a 2014 obtidos pelas bases SciELO, LILACS e dissertações de mestrado, documentos eletrônicos da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), Ministério de Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) e *Codex Alimentarius*, livros e trabalhos apresentados em eventos.

As informações foram escolhidas a partir das palavras-chave: Resíduos de Antibióticos, leite, controle sanitário no Brasil e métodos utilizados para detecção de substâncias químicas no leite. Após a identificação e análise dos documentos, foram realizadas interpretações de dados para posteriormente serem utilizadas no presente estudo.

## 4. REFERENCIAL TEÓRICO

### 4.1 Leite

“O leite é um produto oriundo da ordenha completa e ininterrupta da glândula mamárias de mamíferas sadias bem-alimentadas e descansadas” (BRASIL, 2002, pág. 3). O leite é considerado um dos mais completos alimentos in natura (TRONCO, 2010), por oferecer na sua composição nutrientes com elevado valor nutricional. Os componentes do leite consistem em água, gorduras, proteínas e sais minerais. A água está em maior proporção, sendo de 87,4% e de 12,6% para sólidos totais, possui 3,9% de gordura, 3,2% de proteína, 4,6% de lactose e 0,90% de minerais e outros sólidos (BRITO; BRITO apud MAGNAVITA, 2012). Tronco (2010) descreve que o leite bovino possui uma quantidade de minerais bem mais elevadas que o leite materno, por isso em fórmulas infantis, deve-se diminuir a concentração de minerais, a fim de que crianças com menos de dois anos de idade possam utilizá-lo sem sobrecarregar o funcionamento renal. Já nas demais faixas etárias (acima de 2 anos), quantidade maior de minerais é vantajosa.

O leite bovino pode ser classificado em tipo A, B ou C. Para cada um dos tipos, a legislação preconiza também métodos de higiene na ordenha, modo de transporte e de armazenamento antes do processo e local de pasteurização. De acordo com a legislação federal, o leite tipo A deve ser ordenhado mecanicamente, armazenado a frio e pasteurizado na própria fazenda. No tipo B, a ordenha é mecânica e tanto o armazenamento quanto o transporte devem ter refrigeração, mas a pasteurização não ocorre na fazenda (indústria). Já o leite tipo C, não deve ser submetido a qualquer tratamento térmico na propriedade leiteira, não é exigido o armazenamento a frio e nem tampouco transporte a frio. O transporte deste tipo de leite deve ocorrer até as dez horas do dia de sua obtenção da fazenda até a usina de pasteurização, fator que eleva demasiadamente a contagem de bactérias. Outra definição entre os tipos de leite é o teor de gordura. A legislação brasileira exige que os leites tipos A e B sejam vendidos quanto ao teor de gordura em integral, padronizado, semidesnatado e desnatado, enquanto o leite tipo C pode ser padronizado, desde que contenha 3% m/m de gordura (BRASIL, 2002).

Quando o leite chega à plataforma de recepção da indústria é retirada uma amostra e colocada em frascos de boca larga, limpos e secos e encaminhados ao laboratório para a realização de diversas análises físicas e químicas antes do seu processamento. Entre as

análises estão avaliação da temperatura, acidez titulável, índice crioscópico, densidade relativa (a 15 C°), porcentagem do teor de gordura, sólidos totais e sólidos não gordurosos, teste do álcool, prova do alizarol na concentração mínima de 72% v/v (leite resfriado) ou 76% (leite cru não resfriado), pesquisa de fosfatase alcalina, pesquisa de peroxidase, pesquisa de neutralizantes da acidez e de reconstituintes da densidade (TRONCO 2010).

De acordo com Tronco (2010), as análises físicas e químicas do leite apresentam importante papel para garantia da qualidade deste produto. Dentre estes parâmetros, é possível quantificar os teores de componentes como gordura, proteína, lactose e sólidos desengordurosos, estes testes permitem avaliar a integridade e qualidade do leite. Já o teste de determinação da densidade serve para controlar, até certos limites, fraudes no leite, no que se refere à desnatação prévia ou adição de água. O leite após a pasteurização deve apresentar teste qualitativo negativo para fosfatase alcalina e teste positivo para peroxidase. Estes testes são utilizados para controlar o processo de pasteurização e os demais componentes deve seguir os seguintes critérios para leite integral com mínimo de 3,0% de gorduras (g/100g), para o leite semidesnatado teores entre 0,6 a 2,9% (g/100g), já para o leite desnatado obter no máximo 0,5% (g/100g) de gorduras (BRASIL, 2011). Para os requisitos de estabilidade ao alizarol 72% v/v deve apresentar-se estável para todas as variedades quanto ao teor de gordura (BRASIL, 2011).

A produção de leite no Brasil cresceu 4,5% em 2011 em relação a 2010, atingindo o volume total de 32 bilhões de litros/ano, ocupando assim a quinta posição de destaque no cenário mundial. Entre as regiões, apenas a região norte apresentou uma diminuição em sua produção de 3,6%. No Tocantins a produção em 2011 foi de 267.305 litros/ano, que correspondeu a quase 16% de todo leite produzido na região norte, representando apenas 0,83% da produção nacional. No Brasil a produção sob inspeção cresceu em 4,4%, em comparação aos meses entre janeiro e junho de 2012 com o mesmo período de 2011, isso acontece graças aos diversos programas de incentivo à produção e a adoção de medidas que favorecem o aumento da produção e possibilitando maior controle na fiscalização do leite (SIQUEIRA; CARNEIRO, 2012).

Em 2012, a quantidade de leite adquirido sob inspeção foi superior a todos os anos anteriores. Isso sugere redução da informalidade na atividade leiteira no Brasil (SIQUEIRA; CARNEIRO, 2012).

## 4.2 Qualidade e Legislação do Leite

A qualidade do leite é influenciada, principalmente, pelo estado sanitário do rebanho, bem como pelo manejo dos animais e equipamentos durante a ordenha, genética animal e pela ausência de microrganismos, resíduos de drogas e odores estranhos (BRASIL, 2012). De acordo com Brito e colaboradores (2009) citado por Magnavita (2012), devido ao avanço na produção de leite no Brasil e o crescimento deste produto no mercado mundial, órgãos responsáveis pelo setor agropecuário, manifestaram uma preocupação em relação à qualidade do leite, onde este passou a ser um foco de discussão pelos órgãos fiscalizadores do governo, promovendo assim alterações nas legislações.

Em dezembro de 2000, foi publicada a Circular Técnica N° 60, com a finalidade de apresentar aspectos relacionados à presença de resíduos de antimicrobianos no leite, as conseqüências para a saúde do consumidor, a interferência com o processamento lácteo, as principais causas do aparecimento de resíduos, os testes de detecção destacando os principais pontos necessários para que estes sejam evitados.

Em 2002, a Instrução Normativa N° 51 do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA) entrou em vigor com o objetivo de monitorar a qualidade do leite, com o estabelecimento de pelo menos uma análise mensal do leite para todos os locais processadores de leite, a ser realizada em uma unidade Operacional da Rede Brasileira de Laboratórios para Controle da Qualidade do Leite (BRASIL, 2002).

Em 2011, foi publicada a Instrução Normativa N° 62, que alteraram os anexos I, IV, V e VI da Instrução Normativa n° 51 do MAPA, no que se refere ao regulamento técnico de produção, identidade e qualidade de leite. Apesar dessas alterações, foram mantidos os parâmetros de composição para avaliação da qualidade do leite e pesquisa de resíduos de antibióticos no leite (BRASIL, 2011).

As substâncias antimicrobianas são empregadas normalmente para tratamento e prevenção da mastite ou de outras doenças do gado leiteiro. Quando são administradas em vacas em lactação, existe o potencial para aparecimento de resíduos no leite (BRASIL, 2000).

## 4.3 Mastite

A mastite é um processo inflamatório da glândula mamária muito comum e que mais causa prejuízos aos rebanhos leiteiros, podendo ser desencadeada pela agressão da glândula

por diferentes tipos de agentes, como microrganismos, substâncias químicas e traumas físicos. É uma doença quase sempre causada por bactérias que invadem a glândula mamária e que se multiplicam, produzindo substâncias tóxicas que desencadeiam o processo inflamatório em vacas leiteiras (BRASIL, 2012).

A mastite pode ser classificada em mastite clínica e subclínica. A mastite clínica é de fácil detecção, porque apresenta alterações no aspecto do leite (presença de coágulos, grumos, flocos, aspecto aguado, com ou sem presença de sangue ou pus), bem como sinais de inflamação no úbere (inchado, vermelho ou dolorido) e sinais sistêmicos na vaca (desidratação, apatia, febre, diminuição brusca na produção de leite). A mastite subclínica é mais comum, porém caracteriza-se pela ausência de alterações visíveis no leite ou no úbere, em virtude de sua natureza oculta, provoca maiores perdas econômicas pela redução da produção de leite e por interferir na composição do mesmo aumentando o número de Contagem Células Somáticas CCS. Para detectar a presença de mastite subclínica é preciso realizar exame microbiológico do leite, para identificar o agente infeccioso. As bactérias produzem toxinas e outras substâncias que irritam e lesam as células da glândula, provocando uma resposta no sistema imunológico do animal como defesa contra a infecção bacteriana, conseqüentemente, essa inflamação promove dilatação das paredes dos vasos sanguíneos da glândula onde diversas substâncias do sangue passam para o leite, resultando no aumento de sódio e cloro que deixam o leite com sabor salgado e redução dos teores de lactose, caseína, gordura, cálcio e fósforo (BRASIL, 2012).

Os medicamentos normalmente empregados no tratamento da mastite são os antibióticos, preferencialmente por via intramamária ou mesmo por outras vias de aplicação em conjunto (BRASIL, 2012).

Segundo Cullor (1993) citado por Magnavita (2012), as principais metas da terapia antimicrobiana são: prevenção da mortalidade nos casos agudos, retorno à composição e produção normal do leite, eliminação das fontes de infecção e prevenção de novas infecções no período seco. O uso de antibióticos quando administrados e não respeitado o prazo de carência, ocasiona a presença de resíduos no leite podendo causar riscos à saúde do consumidor (BRASIL, 2012).

#### 4.4 Antimicrobianos

De acordo com Brasil (1999, p. 08):

Os antibióticos são substâncias químicas produzidas pelo metabolismo de determinadas cepas bacterianas, fungos e actinomicetos. Podem, em soluções diluídas, impedir temporariamente ou definitivamente as funções vitais de outras bactérias, determinando os conhecidos efeitos bacteriostáticos e/ou bactericida.

Os antimicrobianos apresentam mecanismos de ação contra microrganismos susceptíveis, tais como: ação inibitória da síntese da parede celular, alteração da permeabilidade da membrana citoplasmática, inibição da síntese protéica (RNA – polimerase) e atuação nos ácidos nucléicos (DNA - girase) (SILVA; SILVA; RIBEIRO, 2012; BASTOS, 2012).

A administração de antibióticos em vacas leiteiras por via intramamária, intramuscular, intrauterina, oral, através da dieta ou de uso tópico, pode resultar em resíduos no leite. Isso ocorre devido ao uso incorreto de antibióticos utilizados em animais produtores. Estes resíduos podem ter efeitos tóxicos diretos aos consumidores, como reações alérgicas em indivíduos hipersensíveis, ou podem ainda causar problemas indiretamente pela indução de cepas de bactérias resistentes (STOLKER; BRINKMAN, 2005 apud MAGNAVITA, 2012).

Segundo Robbers e colaboradores (1997) citados por Tenório (2007), destacam-se as tetraciclina, que são antibióticos produzidos pelo metabolismo de actinomicetos e possuem considerável utilidade terapêutica. As tetraciclina possuem amplo espectro de ação, tanto em bactérias Gram-negativas com em bactérias Gram-positivas, clamídias, riquetsias e até sobre alguns protozoários. Estas atuam inibindo a síntese de proteínas dos microrganismos sensíveis, ligando-se à subunidade 30S dos ribossomas impedindo que o RNA transportador se fixe ao mesmo.

Além das tetraciclina, outras classes de antimicrobianos podem ser utilizadas em vacas em leiteiras como, os aminoglicosídeos (estreptomicina, neomicina, gentamicina),  $\beta$ -lactâmicos (penicilinas e cefalosporinas), tetraciclina (oxitetraciclina, tetraciclina e clortetraciclina), macrolídeos (eritromicina), sulfonamidas (sulfametazina) e quinolonas (GORNI; CABRINI, 2003 apud MAGNAVITA, 2012).

Algumas dessas substâncias podem causar em pacientes grávidas ou mães que estão amamentando, riscos a bebê, pois a maioria dos antibióticos atravessa a placenta podendo causar efeitos tóxicos e teratogênicos, como no caso dos metronidazóis, a rifampicina e o trimetoprim. A estreptomicina pode causar toxicidade auditiva no feto, já as tetraciclina em mulheres gestantes podem ocasionar alterações ósseas tanto fetais como em crianças em fase de desenvolvimento. A ingestão de resíduos de sulfonamidas em mulheres grávidas pode ocasionar deslocamento de bilirrubina dos locais de ligação da albumina e causar toxicidade no sistema nervoso central do feto (BRODY et al, 1997). Portanto, deve-se levar em conta que a presença de altos de níveis de resíduos no leite pode ser considerada um risco quando consumido por gestantes e crianças principalmente na infância (COSTA, 1996 apud TENÓRIO, 2007).

Outro risco à saúde do consumidor pode ser representado por reações alérgicas, que se manifestam geralmente como urticárias, dermatites ou rinites e asma brônquica, que podem, até mesmo, desencadear choque anafilático em indivíduos particularmente sensíveis (BRADY E KATZ, 1988; JOHANSSON, 1993; ASPENSTRÖM-FAGERLUND, 1993; COSTA, 1996; BORGES et al., 2000; BRITO, 2006 apud TENÓRIO, 2007). Schliephake (1998) apud Tenório (2007) relata que de 2 a 4% da população manifestaram reações alérgicas causadas por resíduos de antimicrobianos no leite e que este número vem aumentando a cada dia.

#### **4.5 Resíduos de antimicrobianos no leite**

Santos (2003) citado por Magnavita (2012, p. 23) citam a definição de resíduos de antibióticos como:

Fração da droga administrada, seus metabólitos, produtos de conversão ou reação e impurezas que permanecem no alimento de origem animal, sendo determinados em mg/Kg (ppm) ou  $\mu\text{g/Kg}$ .

O uso incorreto de antibióticos utilizados na medicina veterinária pode gerar resíduos de antimicrobianos no leite, devido ao não cumprimento de indicação de receituário e tempo de eliminação do medicamento, bem como adição destes na alimentação animal ou até mesmo quando as boas práticas veterinárias não são atendidas. A mastite é a causa principal de resíduos de antibióticos em leite (COSTA, 2002; SANTOS; FONSECA, 2007; BANSAL et al., 2011 apud MAGNAVITA, 2012).

Brito (2006) citado por Tenório (2007) relata que o “período de carência de um antibiótico é o prazo de eliminação deste no leite, após a última aplicação do medicamento”. Esse período varia conforme a via de administração e o estado que o animal se encontra. Em animais sadios esse tempo pode variar de 66 a 96 horas, já em animais com mastite esse período pode variar em até 96 a 141 horas (FAGUNDES, 1981; LOPES et al, 1998 apud TENÓRIO, 2007).

Os antibióticos administrados por via intramamária podem variar entre 48 a 144 horas, por via oral pode ocorrer em até 86 horas, por via intramuscular pode variar de 72 a 96 horas, por via intravenosa pode ser eliminado em até 44 horas e por via intrauterina pode variar em até 31 horas (COSTA, 1996 apud TENÓRIO, 2007; SOUZA, 2013). Por isso é importante respeitar o tempo de eliminação do medicamento administrado em animais tratados, para evitar a presença de resíduos nos alimentos (BRASIL, 2002). O uso de antimicrobianos administrados via intramamária apresentam período mínimo de eliminação de: 2 dias para a penicilina (procaína), 6 dias clortetraciclina, 4 dias para oxitetraciclina e estreptomicina (COSTA, 1996 apud TENÓRIO, 2007).

Os antibióticos possuem característica de resistência térmica variável e mesmo quando submetidos a tratamentos térmicos na faixa de 72 – 75°C por 15 a 20 segundos, como pasteurização, fervura ou até mesmo a esterilização, que é um tratamento a ultra alta temperatura (UHT) a 130 – 140°C por 4 segundos não inativam os resíduos de antimicrobianos supostamente presentes no leite (TRONCO, 2010).

Brito e Dias (1998) citados por SOUZA (2013) relatam em sua pesquisa que após o processo de fervura houve inativação de até 50% das penicilinas e 66% das estreptomicinas, 90% das oxitetraciclinas e tetraciclinas. Sobre o clorafenicol esse processo não demonstrou qualquer ação, o que comprova a resistência de resíduos de antibióticos a tratamento térmico.

Rapini e colaboradores (2004), realizaram uma pesquisa sobre o perfil de resistência antimicrobiana de 45 cepas de *Staphylococcus spp.* isoladas de dez amostras de queijo tipo coalho comercializado nas praias nordestinas. Os resultados mostraram perfil de resistência em 100% para penicilina, 91% para tetraciclina, 75,5% para vancomicina, 71,1% para gentamicina, 66,7% para oxacilina, 60% para eritromicina, 48,9% para cefalotina e 26,7% para sulfazotrin. Para avaliação do perfil de sensibilidade encontraram para cefalotina (22,2%), gentamicina (11,1%), vancomicina (4,5%), oxacilina e sulfazotrin (2,2%) e eritromicina, tetraciclina e penicilina (0%). Foram observados também alto perfil de sensibilidade para as cepas de *Staphylococcus sp.* isoladas de leite cru, queijo e manipuladores de alimentos (narinas, mãos e orofaringe) frente aos antimicrobianos utilizados.

#### 4.6 Limite máximo de resíduos (LMR) de antimicrobianos no leite

O *Codex Alimentarius* é um conjunto de normas alimentares adotadas internacionalmente com objetivo de proteger a saúde dos consumidores e garantir práticas igualitárias ao comércio de alimentos (CODEX ALIMENTARIUS, 1993). Esta comissão executa em conjunto com outros órgãos como Organização das Nações Unidas (ONU), Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação (FAO), Organização Mundial de Saúde (OMS) e o *Food and Drug Administration* (FDA), medidas que estabelecem limites máximos de resíduos de antimicrobianos em alimentos através de testes e análises, que obedecem aos protocolos e as exigências definidas pelo *Codex Alimentarius* (FAO/OMS, 2002).

A competência para estabelecer limites máximos de resíduos em alimentos, seja de medicamentos veterinários, pesticidas, contaminantes e aditivos, é do Ministério da Saúde através da Agência de Vigilância Sanitária – ANVISA (BRASIL, 2006). No Brasil, foi criado Programa de Análise de Resíduos de Medicamentos Veterinários em Alimentos de Origem Animal (PAMVet), com o objetivo de operacionalizar sua competência legal de controlar e fiscalizar resíduos de medicamentos veterinários em alimentos. O acontecimento deste programa foi graças ao trabalho em conjunto do ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA) com o Ministério da Saúde (MS) e ANVISA (BRASIL, 2006).

O Programa Nacional de Controle de Resíduos em Leite (PNCRL) tem como principal objetivo o controle e a vigilância de substância em alimentos de origem animal em níveis seguros para os consumidores. Este programa se subdivide em subprograma de monitoramento, investigação e controle de produtos importados. As amostras de leite são colhidas pelo Serviço de Inspeção Federal e encaminhadas aos laboratórios da rede oficial ou credenciados. As escolhas dessas amostras são feitas de forma aleatórias por sorteio semanal por estabelecimentos envolvidos no Programa de Controle de Resíduos no Leite (PCRL) e de procedimentos exclusivos do Serviço de Sanidade animal (BRASIL, 1999).

O PCRL implementou ações que permitem regulamentar os casos onde não existe legislação específica. Por meio dessas ações é possível a identificação da propriedade de origem do leite, bem como a visita a estabelecimento leiteiro para a investigação, orientação e colheita de amostras em duplicata para análise no subprograma de investigação. Quando a análise representar negatividade nenhuma ação é recomendada. Deste modo, a confirmação de testes quanto à presença de resíduos em limite máximo no leite, deve-se notificar o proprietário, o serviço de inspeção federal e a defesa animal. Logo a propriedade fica

impedida de comercializar o produto até que os testes apresentem negatividade. Uma vez confirmada a presença de substâncias, cabe notificar o proprietário e recurso de contraprova para análise em até 15 dias após a notificação. Com isso a propriedade fica impedida de comercializar seu produto durante 2 meses (BRASIL, 1999).

Os Limites Máximos de resíduos de antibióticos no leite foram estabelecidos no Brasil, por meio do PAMVet, com o objetivo de oferecer produtos de qualidade ao consumidor, como mostra a Tabela 01.

**Tabela 01** – Limite Máximo de Resíduos (LMR) estabelecidos pelos órgãos fiscalizadores – em µg/kg (ppb).

<b>Grupo/ Substâncias</b>	<b>Codex</b>	<b>EU</b>	<b>EUA</b>	<b>Brasil</b>
<b>Beta-lactâmicos:</b>				
Penicilina	4	4	5	4
Ampicilina	-	4	10	4
Amoxicilina	-	4	10	4
Cloxacilina	-	30	10	-
Ceftiofur	100	10	50	100
<b>Tetraciclinas</b>				
Tetraciclina	100	100	300	100
Oxitetraciclina	100	100	300	100
Clortetracilina	100	100	300	100
<b>Macrolídeos</b>				
Eritromicina	-	40	50	40
Tilosina	-	50	50	-
<b>Aminoglicosídeos</b>				
Estreptomicina	200	200	125	200
Neomicina	1500	500	150	500
Gentamicina	200	100	30	-
<b>Sulfonamidas</b>				
Sulfametazina	-	-	10	100
Sulfadimetoxina	-	-	10	100
Sulfatiazol	-	-	10	100
Sulfadimidina	25	-	10	-
<b>Vários</b>				
Cloranfenicol	-	-	-	-
Trimetoprim	-	50	-	-

**Fonte:** adaptação de Tenório (2007); Santos; Duarte; Pozzi, (2011); Bastos, (2012);

Ramírez et al. (2001) citado por Magnavita (2012) destacam que a presença de antibióticos acima do limite máximo recomendado no leite torna o produto inaceitável ao consumo humano, podendo acarretar em prejuízo total da produção para os produtores. Deste modo, há uma necessidade de criar testes mais sensíveis, rápidos e baratos para detecção de resíduos de antibióticos no leite.

## **5. Métodos para Detecção e Quantificação de Resíduos de Antibióticos no leite**

Tendo em vista, que o uso de medicamentos veterinários em animais produtores de alimentos pode causar riscos à saúde da população, foi necessário o estabelecimento de legislações específicas para monitorar a qualidade dos alimentos. Com isso, a Instrução nº 51 do MAPA estabeleceu análise mensal do leite quanto à ocorrência de resíduos de antimicrobianos, sendo esta de responsabilidade das indústrias. As amostras positivas devem ser encaminhadas pela indústria a laboratórios oficiais ou credenciada pelo MAPA para a realização de análise de monitoramento oficial (BRASIL, 2002).

Para detectar a presença de resíduos de antibióticos no leite, são utilizados diferentes tipos de métodos, sendo a maioria deles reconhecidos pela *Association of Official Analytical Chemists* (AOAC) e *American Public Health Association* (APHA) (NASCIMENTO et al., 2001). Esses métodos abrangem desde os testes mais simples, como os de inibição microbiológica, imunológicos, enzimáticos até os mais complexos como os de cromatografia em camada delgada e líquida de alta eficiência, espectrometria de massa (NASCIMENTO et al., 2001; MAGNAVITA, 2012). Por sua vez, todo método de detecção apresenta custo, tempo de execução, limites de detecção, resposta, exatidão e especificidade diferente, tornando-os como adequados ou não para cada fim proposto (RAMÍREZ, et al., 2001 apud TENÓRIO, 2007).

### **5.1 Métodos de Inibição Microbiológicos**

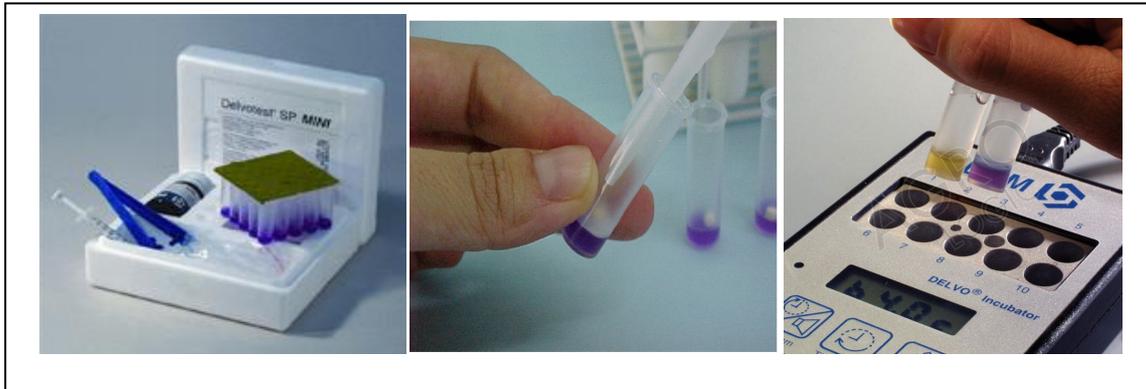
Os testes de inibição de crescimento bacteriano baseiam-se na incubação de um microrganismo sensível às baixas concentrações de antibióticos conhecidos (geralmente o *Bacillus stearothermophilus*, entre outros como *Streptococcus salivarius* sub sp. *thermophilus*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus* e *Micrococcus luteus*), com uma amostra de

leite por 24 a 72 horas; e, caso haja uma concentração de antibióticos suficiente, o crescimento bacteriano será reduzido ou eliminado. Essa inibição pode ser observada através de um halo de inibição no caso do método do disco em placas contendo ágar triptona com microrganismo ativo. Os testes disponíveis comercialmente para detecção de resíduos de antibióticos no leite através dos métodos de inibição microbianos são: Teste do disco BR<sup>®</sup>-Test; BR<sup>®</sup> Test “Blue Star<sup>®</sup>”; BR<sup>®</sup>- Test AS; Charm<sup>®</sup> Farm Test; Charm<sup>®</sup> inhibition assay; Delvotest<sup>®</sup>-P; Delvotest<sup>®</sup>-SP (CULLOR, 1992 apud ZOETIS, 2014; SANTOS; DUARTE; POZZI, 2011). Entre os mais empregados na rotina dos laticínios destacam-se o Delvotest<sup>®</sup> e Copan<sup>®</sup> CH ATK (FOLLY; MACHADO, 2001; SOUZA, 2013).

Os kits Charm<sup>®</sup> são exemplos de testes que atuam na inibição de crescimento bacteriano. Este teste utiliza um indicador de pH (bromocresol púrpura), que indica a presença ou ausência de crescimento bacteriano. Quando houver crescimento bacteriano, representa que a amostra é negativa. Logo, a formação de ácido no meio permite a mudança da cor do indicador de púrpura para amarelo. O kit BR<sup>®</sup>-Test atua de modo semelhante (ZOETIS, 2014).

O kit Delvotest<sup>®</sup> é um teste de difusão que mede a inibição de microrganismos. Ele foi reconhecido pela AOAC em 1982, onde estabeleceu um limite de detecção para a penicilina de 7 UI penicilina/ mL. Apresenta-se na forma de ampolas contendo meio de cultura com microrganismos na forma não esporulada. Após a abertura das ampolas adiciona-se uma pastilha de glicose no frasco ampola já contendo a amostra de leite e incuba-se para posterior visualização da coloração da amostra (FAGUNDES, 2003). O resultado da análise dá-se através da visualização da coloração, sendo considerado positivo quando não houver o crescimento do microrganismo, logo a solução mantém a cor violeta-púrpura. Já a mudança na coloração da solução para amarela, representa um resultado negativo, ou seja, indica que houve o crescimento de microrganismos, portanto, a modificação da cor do indicador decorre da redução de pH (Figura 01). O kit Devoltest<sup>®</sup> possui amplo espectro de ação de inibição de microrganismos, desta forma são utilizados para detecção de cinco classes de antimicrobianos:  $\beta$ -lactâmicos, Sulfonamidas, Tetraciclinas, Macrolídas, Aminoglicosídeos (MAGNAVITA, 2012).

Figura 01: Teste microbiológico comercial utilizado para detectar resíduos de antibióticos no leite.



Fonte: FAGUNDES, (2003).

Outro exemplo de kit de inibição microbiano é Copan<sup>®</sup>, que está disponível no mercado em duas versões: Microplate<sup>®</sup> e Single ATK<sup>®</sup>, cujo mecanismo baseia-se no crescimento de microrganismo como o *Bacillus stearothermophilus var calidolactis* que atua promovendo a redução do pH do meio, conseqüentemente, essa redução provoca a mudança da cor do meio de violeta para amarelo (TENÓRIO, 2007; SOUZA, 2013). Para a realização do procedimento do kit Copan<sup>®</sup>, uma amostra de leite é adicionada ao tubo contendo a matriz (cultura bacteriana e indicador púrpura de bromocresol) e transferido para incubadora por três horas a uma temperatura de 64,5°C (MACEDO; FREITAS, 2009 apud SOUZA, 2013). O período de incubação permite que os esporos germinem, logo, a multiplicação dos microrganismos promove a produção de ácido e alteração da cor do meio. Após esse período a leitura é feita visualmente, a cor amarela representa negatividade da amostra para resíduos de antibióticos e a cor violeta indica positividade da amostra (TENÓRIO, 2007; SOUZA, 2013).

De acordo com Tenório et al. (2009), os kits Copan<sup>®</sup> Microplate e Single mostraram-se também eficazes para detectar resíduos de antibióticos do grupo  $\beta$ -lactâmicos e sulfonamidas com 100% de sensibilidade na detecção de amoxicilina, ampicilina, cloxacilina, penicilina, sulfadiazina, sulfametoxazol (sulfonamidas) e 96,7% para oxacilina. Quanto à tetraciclina (oxitetracilina e tetraciclina), Macrolídeos (tilosina e eritromicina), trimetoprim e gentamicina, os testes não se mostraram eficientes para a pesquisa desses antimicrobianos em leite por detectar apenas concentrações acima do permitido pela legislação.

Existem diversos estudos abrangendo os testes de inibição do crescimento da população de microrganismos. De acordo com a pesquisa de Hotta (2003) citado por Bastos (2012), foram analisadas amostras de leite coletadas em tanques refrigeradores de 200 propriedades leiteiras de Minas Gerais. Os resultados indicaram que 21% das amostras apresentaram resíduos de antimicrobianos em pelo menos um método testado. Nesse experimento, foram utilizados os testes Snap<sup>®</sup> (beta-lactâmicos e tetraciclinas), Charm-SL<sup>®</sup> (beta-lactâmicos e tetraciclinas), Delvotest<sup>®</sup>- SP e Copan<sup>®</sup>.

Já Leme e colaboradores (2005), analisaram 1500 amostras de diferentes tipos de leite (A, B, C e UHT) comercializados na cidade de São Paulo (SP), no período de abril de 2003 a março de 2004, utilizando o método Delvotest<sup>®</sup>-SP, onde observou que do total de amostras analisadas, 0,66% apresentou resultado positivo para resíduos de antimicrobianos.

Tenório (2007) analisou 136 amostras de leite cru originadas de produtores com histórico de baixa contagem bacteriana total no leite da região metropolitana de Belo Horizonte (MG) pelo teste COPAN<sup>®</sup> Microplate. A presença de resíduos de antimicrobianos foi detectada em 24,26% das amostras analisadas.

Nero e colaboradores (2007) realizaram estudo da presença de resíduos de antibióticos pelo kit *Charm-test*<sup>™</sup> (principalmente  $\beta$ -lactâmicos e sulfonamidas) em 210 amostras de leite cru, coletadas em quatro regiões produtoras de leite no Brasil: 47 em Viçosa - MG, 50 em Pelotas - RS, 63 em Londrina - PR e 50 em Botucatu - SP. Resíduos de antibióticos foram detectados em 24 amostras (11,4%), sendo 13 (20,6%) da região de Londrina - PR, 4 (8,0%) da região de Botucatu - SP, 4 (8,5%) da região de Viçosa - MG, e 3 (6,0%) da região de Pelotas - RS. Os resultados obtidos foram qualitativos, mas ficou evidenciado que resíduos de antibióticos podem ser considerados perigos químicos presentes no leite produzido no Brasil.

Bastos e colaboradores (2010) citado por Bastos (2012) analisaram amostras de leite cru coletadas em 300 propriedades rurais do Estado de Minas Gerais. A pesquisa de resíduos de antimicrobianos foi feita utilizando o teste Delvotest<sup>®</sup> Accelerator. Do total analisado, três amostras (1%) apresentaram resultado positivo para presença de resíduos de antimicrobianos. Pelo teste Charm MRL BL/TET, foi identificada a presença de resíduos do grupo dos  $\beta$ -lactâmicos nas três amostras. O equipamento utilizado detectou quatro amostras com suspeita de acidez elevada, o que poderia comprometer o resultado da pesquisa de resíduos de antimicrobianos pela geração de resultados falso-negativos.

Desta maneira, os kits de inibição do crescimento bacteriano também conhecido como testes de triagem, apresentam vantagens como baixo custo e facilidade no processo de

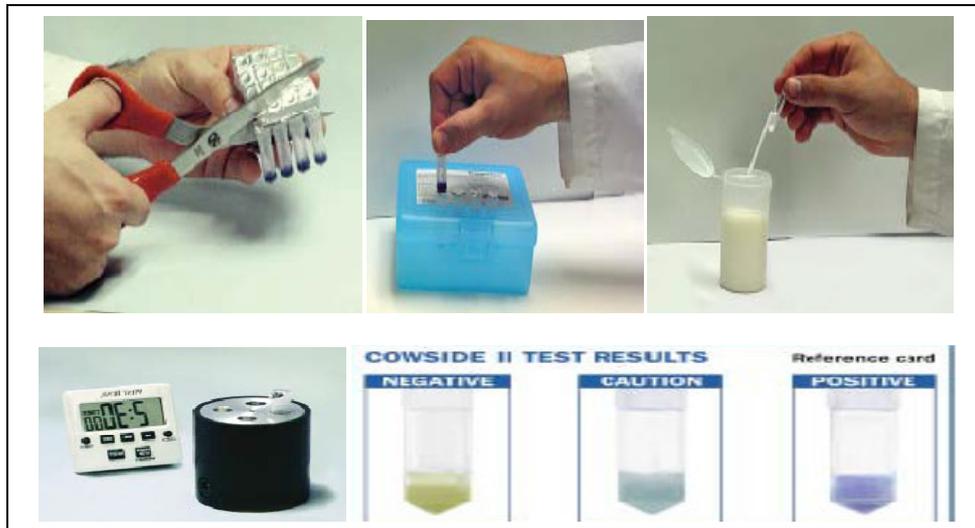
execução das análises. Como desvantagem cita-se a baixa especificidade para identificação de algumas classes de antibióticos e limites de detecção a presença de resíduos de antibióticos no leite, exigindo assim mais tempo (3 horas) para a realização do teste (ZOETIS, 2014).

Embora os kits de inibição do crescimento de microrganismos apresentem sensibilidade a alguns antibióticos, estes não os identificam de forma específica. Com isso, houve a necessidade de criar testes imunológicos para detecção específica de resíduos de antibióticos no leite (SANTOS; DUARTE; POZZI, 2011).

## **5. 2. Métodos Imunoquímicos (Receptores, Enzimas e Imunológicos)**

Os kits Charm Cowside<sup>®</sup> Test, Charm<sup>®</sup> I Test e Charm<sup>®</sup> II Test, são exemplos de testes que atuam em receptores e se baseiam na afinidade específica que os antimicrobianos têm com alguns locais de recepção na parede celular dos microrganismos. A amostra de leite junto com um antimicrobiano da classe a ser testado é adicionada com os receptores, que são marcados radioativamente. A ausência destes resíduos de antibióticos marcados no leite indica que todos os sítios dos receptores serão marcados com a droga não-marcada. Portanto, a quantidade de sítios de ligação ocupados pela droga não-marcada será proporcional à concentração de antibiótico na amostra (SANTOS; DUARTE; POZZI, 2011). Para a realização do procedimento do kit Sharm Cowside<sup>®</sup> Test II, a amostra de leite é adicionada na ampola do kit e levada à incubação por duas horas e trinta minutos. A leitura é feita visualmente, a cor amarela ou verde representa negatividade da amostra para presença de antibióticos e a cor roxa ou azul indica que é uma amostra positiva, conforme mostra a Figura 02. A cor obtida é estável por até 16 horas (CHARM SCIENCE INC, 2014).

Figura – 02: Teste comercial Sharm Cowside<sup>®</sup> Test II, imunoreceptor utilizado para detectar resíduos de antibióticos no leite.



Fonte: (CHARM SCIENCE INC, 2014).

Em estudos realizados por Macedo e Freitas (2009) foram analisadas 103 amostras de leite de mistura provenientes de diversas propriedades rurais, usinas de beneficiamento e mercado varejista do estado do Pará, coletadas durante o período de outubro de 2002 a novembro de 2004 utilizando dois testes enzimáticos (o BL Snap<sup>®</sup> Test para tetraciclina e o Charm<sup>®</sup> SL Test) e um de inibição microbiano (Teste Copan<sup>®</sup> CH ATK). Os resíduos de antibióticos foram detectados em 11 amostras de leite, o que corresponde a 10,68%, provavelmente de antibióticos  $\beta$ -lactâmicos e/ou sulfonamidas, duas eram procedentes de propriedades rurais da região de Conceição do Araguaia, uma amostra procedente da região de Tucuruí da usina de beneficiamento e oito de mercado varejista, sendo seis de Santarém e duas de Castanhal. Os resultados mostraram que 70 (67,96%) amostras foram detectadas como positivas, e 22 (21,36%) negativas.

Os kits CITE<sup>®</sup> Probe ( $\beta$ -lactâmicos), Charm<sup>®</sup> II e Spot<sup>®</sup> Test, são exemplos de testes que se baseiam na reação antígeno (antibiótico) com um anticorpo específico e que utilizam substâncias radioativas. Já o teste de ELISA (*Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay*) utiliza enzimas que permitem a visualização do resultado através da mudança de cor na solução supostamente positiva. Esta técnica tem sido muito utilizada para detectar resíduos de antibióticos no leite, além de avaliar o controle de qualidade de outros alimentos nas indústrias e diagnosticar patologia humana e vegetal. Isso se deve à alta sensibilidade que o teste apresenta, à rapidez na execução das amostras, número maior de amostras realizadas em

menor tempo. Quando uma amostra apresenta positividade para a presença de resíduos de antibióticos através deste método, outros testes mais específicos devem ser utilizados para sua confirmação (HANWAY, 2005 apud SANTOS; DUARTE; POZZI, 2011).

Segundo Hanway; Lequin (2005) citados por Santos; Duarte; Pozzi (2011), o teste de ELISA atua quando o antígeno desconhecido (antibiótico) é depositado sobre a superfície do orifício da placa contendo o anticorpo específico, de modo a ligar-se ao antígeno. Uma vez ligado o anticorpo à enzima, estes formarão um complexo de antígeno/anticorpo e que quando adicionado uma última substância no procedimento final do teste, esta irá fluorescer de modo que, a quantidade de antígeno na amostra pode ser inferida por meio da fluorescência.

Já no teste imunoenzimático Snap<sup>®</sup> ( Betalactâmicos e Tetraciclina), o antimicrobiano é capturado por uma proteína conjugada com receptor específico em um suporte sólido absorvente localizado em uma unidade plástica moldada que permite detectar no leite resíduos de tetraciclina, clortetraciclina, oxitetraciclina e penicilina G, amoxicilina, ampicilina, ceftiofur, cefapirina (ARAÚJO, 2010). Para realização do procedimento do kit Snap<sup>®</sup> (β-lactâmicos e Tetraciclina), a amostra de leite é adicionada até a linha indicadora, sendo transferido com uma pipeta do kit para um tubo com a enzima de reação azul. O processo de homogeneização do tubo permite dissolver o grânulo do conjugado, por sua vez, não deve ser ultrapassado o tempo de 15 segundos no tubo. Após esta etapa, o conteúdo do tubo deve ser para a cavidade do dispositivo SNAP<sup>®</sup>. Quando a amostra estiver escoada pela janela de resultados na direção de ativação do círculo azul e a borda deste do círculo começar a desaparecer, é pressionado para baixo com firmeza até ouvir um som de “Snp” claro, o tempo esperado é de seis minutos. A leitura do teste é feita visualmente, ou por meio de instrumentos (usando reflectance) para fornecer interpretações numéricas dos resultados visuais. A alteração na intensidade da cor no círculo de ativação da amostra e do controle, de azul escuro em ambos os orifícios representa teste negativo. Quando houver a cor azul claro ou ausência de coloração no círculo, mostra-se a positividade da amostra, como mostra a Figura 03. Esse kit permite testar o leite diretamente no campo ao pé da vaca, no caminhão, em tanques ou em qualquer lugar. As principais vantagens deste teste são: economia e rapidez para indústrias e produtores do leite, bem como aumento da segurança, além de não precisar de aquecimento ou incubação da amostra e menor tempo para execução (VERUS MADASA, 2014).

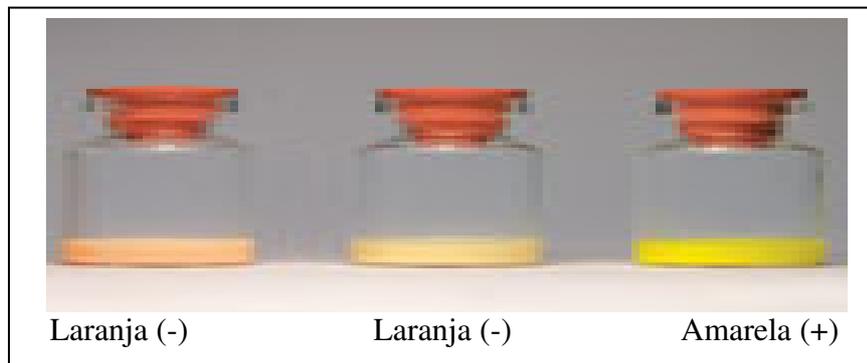
Figura – 03: Dispositivo do kit SNAP<sup>®</sup> Beta Test e interpretação dos resultados.



Fonte: (VERUS MADASA, 2014).

O teste comercial Penzyme<sup>®</sup> Milk Test, é um ensaio imunoenzimático que depende do processo de ativação de enzimas, para que ocorra mudança de cor na amostra que não possui resíduos de antibióticos betalactâmicos (Figura 04). Isso acontece, logo após a incubação a 47°C quando uma quantidade da enzima carboxipeptidase é adicionada à amostra de leite contendo antibiótico, promove a formação de complexos inativos e estáveis entre antibióticos e enzimas (BUZALSKI; HONKANENSANTOS, 1997 apud SANTOS; DUARTE; POZZI, 2011). Buzalski; Honkanen (1997) citados por Santos; Duarte; Pozzi (2011) ressaltam que se esta inativação ocorrer, ao adicionar-se um substrato da enzima na amostra e o frasco for incubado por mais 15 minutos, mais nenhuma reação poderá ocorrer. O conteúdo do frasco permanecerá amarelo, indicando a presença de antibióticos betalactâmicos. Se nenhum antibiótico estiver presente na amostra, a enzima se manterá ativa e reagirá com o substrato, resultando em um composto rosa ou laranja (Figura 04).

Figura - 04: Interpretação dos resultados do kit Penzyme<sup>®</sup> Milk Test.



Fonte: (NEOGEN<sup>®</sup> CORPORATION, 2014).

Em estudos recentes realizados no Brasil para a determinação de resíduos de antibióticos betalactâmicos e tetraciclina, foram utilizados os kits SNAP BL<sup>®</sup> e SNP TET<sup>®</sup>, que são métodos enzimáticos no formato ELISA de reativo de cor (SANTOS; DUARTE; POZZI, 2011). Este teste apresenta tempo total de análise de dez minutos, sendo esta a maior vantagem comparada aos tradicionais. Apesar de não ser considerado ainda um método oficial, seu uso já faz parte do sistema rotineiro de diversas indústrias na plataforma de recepção. Isso acontece devido os testes confirmatórios demonstrarem a precisão das reações do Snap<sup>®</sup> test (TRONCO, 2010).

O kit RIDASCREEN<sup>®</sup> Streptomycin é um teste imunoenzimático competitivo utilizado para determinação quantitativa de antibióticos como estreptomicina e resíduos de diidroestreptomicina em alimentos como carne, leite, mel e fígado. Já os kits imunoenzimáticos qualitativos são utilizados principalmente para triagem e seleção de amostras positivas, reduzindo assim o tempo e custos das análises confirmatórias (TRULLOLS et al., 2005; GALARINI et al., 2011 apud GONDIM, 2012).

Oliveira e colaboradores (2007) investigaram a ocorrência de cloranfenicol em amostras de leite comercializadas no Estado do Paraná. Foram analisadas 151 amostras de leite pasteurizado B e C de 61 marcas diferentes, comercializadas em 35 municípios. Os resíduos de cloranfenicol foram analisados por ensaio imunoenzimático (ELISA). Foram detectados resíduos de cloranfenicol em quatro (2,6%) das amostras analisadas, sendo duas amostras de leite tipo B e duas do tipo C. Esses dados demonstram que esse antimicrobiano continua sendo utilizado em animais destinados ao consumo humano ou há presença de contaminantes ambientais.

Segundo Bando e colaboradores (2009) citado por Bastos (2012) foram analisadas 151 amostras de leite pasteurizado coletadas em cidades do Paraná, no período de março de 2005 a abril de 2006. Nesta pesquisa foram utilizados kits Snap<sup>®</sup> específicos para a detecção de antibióticos  $\beta$ -lactâmicos, tetraciclinas e gentamicina. Já para detectar resíduos de neomicina, estreptomicina-diidroestreptomicina e cloranfenicol foram utilizados kits imunoenzimáticos quantitativos, através destes kits foram encontrados resíduos de antibióticos de neomicina em três amostras, estreptomicina em duas amostras e diidroestreptomicina em quatro amostras, Destas, nenhuma das amostras que continham neomicina estavam acima do LMR (500 ppb), apenas uma de estreptomicina estava acima do LMR (200 ppb) e as quatro de cloranfenicol tinham níveis acima da tolerância zero. Nas análises qualitativas, 41 de 151 amostras apresentaram resíduos de tetraciclinas, quatro de 82 amostras resíduos de gentamicina e cinco de 151 amostras tinham resíduos de  $\beta$ -lactâmicos. No geral, do total de 151 amostras, em 59 (41,3%) foram detectados resíduos de antimicrobianos.

Ao investigarem 53 amostras de leite de propriedades rurais do agreste de Pernambuco, Mattos et al. (2010) citados por Bastos (2012) verificaram a presença de antimicrobianos  $\beta$ -lactâmicos utilizando o kit Charm<sup>®</sup> MRL Test. Os resultados adquiridos mostraram a presença de antibióticos  $\beta$ -lactâmicos em apenas uma amostra (1,89%) e relacionaram os resultados observados à baixa frequência de tratamento e de mastite clínica, que pode estar relacionada à baixa produtividade dos animais.

De acordo com Vieira e colaboradores (2012) foi realizada uma pesquisa sobre resíduos de antibióticos em leite no estado do Paraná. Foram detectados resíduos de antibióticos em 79 amostras de leite pasteurizado do tipo B de diferentes fabricantes adquiridos em estabelecimentos comerciais do Estado. A detecção de resíduos de estreptomicina, cloranfenicol,  $\beta$ -lactâmicos, tetraciclina e gentamicina foi realizada utilizando kits comerciais de ensaio imunoenzimático. Foram detectados resíduos de antibióticos em 15/79 (19%), das quais 6/15 (40%) estavam contaminadas por cloranfenicol, 3/15 (20%) por tetraciclinas, 1/15 (6,7%) por gentamicina, 3/15 (20%) por estreptomicina 2/15 (13,3%) por  $\beta$ -lactâmicos e três amostras estavam contaminadas por dois tipos de resíduo simultaneamente.

Resultados positivos em amostras de leite, obtidos por meios de testes qualitativos, e semiquantitativos devem ser confirmados através de técnicas mais específicas. Por isso, para identificar e quantificar essas amostras, são utilizados métodos confirmatórios por meios de análises físicas e químicas que correspondem à cromatografia (SANTOS; DUARTE; POZZI, 2011).

### 5.3 Métodos Físicos e Químicos

“A cromatografia é um método físico e químico de separação dos componentes de uma mistura, que ocorre por meio da migração diferencial destes componentes através das interações entre duas fases imiscíveis, a fase móvel e a fase estacionária” (DEGANI; CASS; VIEIRA, 1998, p. 01). Quando uma das fases permanece estacionária a outra se move através dela, isso faz com que os componentes da mistura sejam distribuídos entre as duas fases, de forma tal que cada um dos componentes é seletivamente retido pela fase estacionária, resultando assim em migrações diferenciais (MAC, 1996 apud SANTOS; DUARTE; POZZI, 2011)

Esta técnica pode ser utilizada para identificação de compostos, por comparação com padrões previamente existentes, para purificação de compostos, separando as substâncias indesejáveis e os compostos de mistura. Existem diferentes formas de cromatografia e diversos critérios para sua classificação (DEGANI; CASS; VIEIRA, 1998).

Segundo Mac (1996) citado por Santos; Duarte; Pozzi (2011), a fase estacionária é considerada uma forma física desse método, e pode ser realizada em um tubo cilíndrico, ou disposta em superfície planar. Na cromatografia gasosa o estado físico da fase móvel encontra-se na forma de um gás, enquanto na cromatografia líquida apresenta na forma líquida e na cromatografia supercrítica esta fase encontra-se na forma de vapor pressurizado e em temperatura acima da crítica. Dividida em dois grupos, a cromatografia líquida pode ser classificada: em cromatografia líquida clássica e cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Sendo a primeira realizada em colunas de vidro, sob pressão atmosférica, com fluxo da fase móvel devido à força da gravidade e a segunda utiliza coluna metálica e pressão de fase móvel elevada, obtida com o auxílio de uma bomba de pressão.

“A cromatografia líquida de alta eficiência é uma técnica analítica sensível e específica”, muito utilizada para a identificação e quantificação de resíduos de antibióticos presentes em alimentos de origem animal (MAMANI, 2007, p.21). Portanto método como este são exigidos pelas agências governamentais, a fim de fiscalizar e monitorar de modo eficiente a concentração desses compostos em alimentos, garantindo assim maior segurança e confiança nos resultados alcançados (RUELA et al., 2005). Para a validação de métodos analíticos existem parâmetros que devem ser seguidos, como: a seletividade, linearidade, faixa de aplicação, precisão, exatidão, limite de detecção, limite de quantificação e robustez (RIBANI et al., 2004).

A determinação de resíduos de antimicrobianos no leite pelo método CLAE envolve procedimentos de extração, limpeza, identificação, quantificação e confirmação. O processo de extração consiste em retirar os possíveis interferentes presentes nas amostras, no caso do leite, a elevada quantidade de proteínas e lipídios. Os lipídios, por exemplo, podem obstruir a coluna de extração da fase sólida utilizada na etapa de limpeza, aumentando o tempo deste processo. Para realizar a retirada de gordura presente no leite pode se usar uma pipeta de Pasteur, centrifugação ou ainda pelo processo de congelamento e descongelamento da amostra em temperatura ambiente. No processo de desproteinização do leite utilizam-se ácidos, como o ácido tricloroacético, ácido acético e metano, ácido oxálico e acetonitrila, ácido perclórico, seguida de centrifugação (PRADO; MACHINSKI, 2011).

Para minimizar ainda mais a presença de interferentes no extrato, e escolher uma quantidade de analito de interesse, é preciso que os extratos passem pelo processo de limpeza antes de iniciar a determinação de antimicrobianos no leite. Esta fase é de suma importância na reprodutibilidade dos resultados (PRADO; MACHINSKI, 2011).

Na purificação de antibióticos os métodos mais utilizados são de extração líquido-líquido e extração por colunas de fase sólida. Portanto, a extração de fase sólida é a mais importante por realizar extração e purificação, ao mesmo tempo em matrizes biológicas devido a sua simplicidade, curto tempo de operação e utilização de quantidades menores de solventes orgânicos (PRADO; MACHINSKI, 2011).

Existem estudos envolvendo a CLAE que detecta de forma simultânea resíduos de tetraciclina, sulfonamidas e clorafenicol no leite (MAMANI, 2009 apud SANTOS; DUARTE; POZZI, 2011). Os antibióticos da classe das tetraciclina apresentam solubilidade em ácidos, bases, alcoóis e solventes orgânicos polares, desta forma podem ser extraídos com solventes orgânicos como n-butanol, acetato de etila, acetona e acetonitrila (OKA; ITO; MATSUMOTO, 2000 apud PRADO; MACHINSKI, 2011).

Em estudo realizado por Ruela et al. (2005) utilizou-se o método de CLAE, para análise de amostras de leite comercializados no Brasil. Os resultados adquiridos apresentaram limites de detecção de 10 ng/mL para oxitetraciclina, 15 ng/mL para tetraciclina e 40 ng/mL para clortetraciclina, e a quantificação foi de 10 ng/mL para oxitetraciclina, 20 ng/mL de tetraciclina, e 50 ng/mL para clortetraciclina, linearidade na faixa de 10 a 200 ng/mL para a oxitetraciclina e tetraciclina e de 30 a 250 ng/mL para a clortetraciclina, esses resultados contemplaram os limites máximos de resíduos permitidos pela legislação brasileira e internacional. Isso mostra que o método é eficiente para ser usado nas análises de monitoramento de resíduos de tetraciclina em leite do programa do MAPA. Em apenas uma

amostra (1,9%), foi detectada a presença de quantidade significativa de oxitetraciclina (22 ng/mL).

Já Brito (2004) citado por Tenório (2007) ao realizarem o método de CLAE em 55 amostras de leite procedente do estado de Minas Gerais, encontrou 22 amostras positivas (40%) com valores acima do LMR estabelecido pela legislação brasileira para  $\beta$ -lactâmicos, sendo os limites de detecção do método de 4,0  $\mu\text{g/L}$  para ampicilina e 3,0  $\mu\text{g/L}$  para penicilina.

Denobile e Nascimento (2004) ao realizarem a otimização do método analítico utilizou-se um pool de leite pasteurizado tipo A, B, C e leite UHT desnatado, semi-desnatado e integral de diversas marcas obtidas comercialmente e submetidas à análise das tetraciclina para avaliação de possível resíduo. Utilizando o método por CLAE para a determinação simultânea verificou-se que o método apresentou limite de detecção e quantificação, respectivamente de 37,5 e 50 ng/mL, linearidade de 50-1600 ng/mL e coeficientes de determinação de 0,9996; 0,9994; 0,9996 e 0,9996 para oxitetraciclina, tetraciclina, clortetraciclina e doxiciclina, respectivamente, com valores de recuperação entre 66,6 e 89,6%, com precisão e exatidão adequadas.

Em estudos realizados por Mamani (2007) utilizaram o método de CLAE com detector de arranjo de diodos, e determinaram a presença de multiresíduos de tetraciclina, sulfonamidas e clorafenicol em amostras de leite bovino. Os limites de detecção e quantificação encontrados por este método foi de 20 e 60 ng/mL para todos os antibióticos pesquisados. Desta forma, conclui-se que o método desenvolvido foi eficaz para a determinação de resíduos de antimicrobianos no leite, e pôde-se verificar que a estabilidade das tetraciclina depende da estrutura química de cada uma, ou seja, a clortetraciclina sob condições de estresse alcalino foi a menos estável e a oxitetraciclina foi a menos estável ao ácido e oxidante.

No Brasil, há diversos estudos de autores que pesquisaram a presença de resíduos de antibióticos no leite, sendo estes realizados por diferentes metodologias. Portanto, diante dos LMR de antimicrobianos em leite, são necessários e importantes estudos para o levantamento da qualidade do leite consumido no Brasil, para que através deste possam ser desenvolvidos programas de controle, com intuito de tornar os resultados mais eficientes e eficazes, atendendo assim as exigências estabelecidas pela legislação, garantindo um produto de qualidade para o consumidor (BASTOS, 2012; TENÓRIO, 2007).

## 6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A presença de resíduos de antibióticos no leite em limites acima do preconizado pela legislação torna o produto inviável ao consumo humano e pode resultar em efeitos toxicológicos, teratogênicos, reações alérgicas em indivíduos sensíveis como dermatites, rinites, asma brônquica podendo causar choque anafilático, como também pode gerar prejuízos aos produtores, além de dificultar o processo de industrialização de derivados do leite.

Para monitorar a qualidade desse produto, órgãos de regulamentação de vários países, inclusive o Brasil, têm instituído limite máximo para resíduos de medicamentos de uso veterinários em animais produtores de alimentos, com a finalidade de proteger a saúde da população dos possíveis efeitos adversos dos antimicrobianos que de certa forma trazem perigo aos consumidores, além de testar e criar metodologias que assegurem a qualidade desse produto.

Com isso, o desenvolvimento de metodologias com níveis de sensibilidade, seletividade e especificidade maiores permitem quantificar a presença de resíduos de antibióticos nos alimentos de origem animal. Embora, existam diversos testes a respeito da pesquisa de resíduos de antimicrobianos no leite, é necessário maior rigor acerca dos serviços de inspeção no controle de animais tratados com antimicrobianos desde o processo de ordenha até a comercialização do leite, bem como intensificar a identificação de amostras positivas, a fim de oferecer um produto de qualidade à população sem que excedam os níveis de segurança e tolerância, sendo este processado ou usado como suprimento alimentar.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARAÚJO, M. M. P; **Validação de Métodos de Imunoenzimático para determinação de Resíduos de Antimicrobianos no Leite**. Dissertação (mestrado em ciência animal) – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2010. Disponível em: [http://www.bibliotecadigital.ufmg.br/dspace/bitstream/handle/1843/BUOS8EKH63/disserta\\_\\_o\\_corre\\_\\_o\\_final\\_m\\_nica.\\_11\\_agosto.pdf?sequence=1](http://www.bibliotecadigital.ufmg.br/dspace/bitstream/handle/1843/BUOS8EKH63/disserta__o_corre__o_final_m_nica._11_agosto.pdf?sequence=1). Acesso em 21 mar. 2014.

BASTOS, L. P. F.; **Avaliação da capacidade de detecção de resíduos de antimicrobianos no leite por um método de inibição microbiana**. 2012. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal, na área de concentração: Tecnologia e Inspeção de Produtos de Origem Animal) – Escola Veterinária, UFMG. Belo Horizonte, 2012. Disponível em: [http://www.bibliotecadigital.ufmg.br/dspace/bitstream/handle/1843/BUOS97CFJR/disserta\\_\\_o\\_final\\_luiz\\_paulo.pdf?sequence=1](http://www.bibliotecadigital.ufmg.br/dspace/bitstream/handle/1843/BUOS97CFJR/disserta__o_final_luiz_paulo.pdf?sequence=1) Acesso em: 06 set. 2013.

BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento – MAPA – Instrução Normativa nº 42, de 20 de dezembro de 1999, que altera o Plano Nacional de Controle de Resíduos em Produtos de Origem Animal – PNCR. Publicado no **Diário Oficial da União**: Brasília, Distrito Federal, em 22 de dezembro de 1999. Seção 1, página 13.

BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento - MAPA. Instrução Normativa nº 51, de 18 de setembro de 2002 a. Aprova os regulamentos técnicos de produção, identidade e qualidade do leite tipo... **Diário Oficial da União**, Brasília, p. 13, 20 set. 2002. Seção 1. Disponível em: <http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis-consulta/servlet/VisualizarAnexo?id=3335>. Acesso em: 06 set. 2013.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Cria Programa de Análise de Resíduos de Medicamentos Veterinários em Alimentos de Origem Animal – PAMVet Resolução nº 253, de 16 de setembro de 2002b. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 18 de setembro de 2003, Seção 1. Disponível em: [http://www.anvisa.gov.br/alimentos/pamvet/relat%F3rio\\_leite\\_2004-05.pdf](http://www.anvisa.gov.br/alimentos/pamvet/relat%F3rio_leite_2004-05.pdf). Acesso em: 22 set. 2013.

BRASIL. **Gado de Leite: o produtor pergunta a EMBRAPA responde**. 3<sup>a</sup>ed. rev. e ampl. - Brasília, DF: EMBRAPA, 2012.

BRASIL. **AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA- ANVISA**. Programa de Análise de Resíduos de Medicamentos Veterinários em Alimentos de Origem Animal (PAMVet). 2006. Brasília, DF. Acesso em: 22 set. 2013. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/d7ab358047458ad19443d43fbc4c6735/PAMVE T.pdf?MOD=AJPERES>

BRASIL. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - EMBRAPA. **Comunicado 44 Técnico: Resíduos de Antibióticos no Leite**. 2005. ISSN: 1678-3123. Juiz de Fora, MG. 1<sup>ª</sup> edição, Dez. 2005. Disponível em: <http://people.ufpr.br/~freitasjaf/artigos/antibiotico leite.pdf>. Acesso em: 17 Fev. 2014.

BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Desenvolvimento-MAPA. **Brasil Projeções do Agronegócio 2010/2011 a 2020/2021**. 2011. Disponível em:

[http://www.agricultura.gov.br/arq\\_editor/file/Ministerio/gestao/projecao/PROJECOES%20D O%20AGRONEGOCIO%202010-11%20a%202020-21%20-%202\\_0.pdf](http://www.agricultura.gov.br/arq_editor/file/Ministerio/gestao/projecao/PROJECOES%20D O%20AGRONEGOCIO%202010-11%20a%202020-21%20-%202_0.pdf) . Acesso em: 18 mar. 2014.

BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento - MAPA. Instrução Normativa N. 62 de 29 de dezembro de 2011, que altera a Instrução Normativa nº51, de 18 de setembro de 2002. Publicado no **Diário Oficial da União** de 30 de dezembro de 2011, Seção 1, p. 6-11. Disponível em: <http://www.jusbrasil.com.br/diarios/33395065/dou-secao-1-30-12-2011-pg-6>. Acesso em: 17 fev. 2014.

BRASIL. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - EMBRAPA. **Resíduos de antimicrobianos no leite. Circular Técnica, N.60**. Embrapa Gado de Leite, 2000. Juiz de Fora – MG.

Disponível em:

<http://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/594287/1/Residuodeantimicrobianos.pdf> f. Acesso em: 17 fev. 2014.

BRODY, T. M; LANER, J. MINNEMAN, K. P.; NEU, H.C. Farmacologia Humana: da Molecular à Clínica. 2<sup>o</sup> Edição. Rio de Janeiro, RJ. Editora Guanabara Koogan, 1997.

CODEX ALIMENTARIUS. Resíduos de medicamentos veterinários enlos alimentos. **Codex Alimentarius**, Roma, 2<sup>o</sup>ed., v. 3, 1993.

DEGANI; CASS; VIEIRA. Cromatografia um breve ensaio. **Química Nova Na Escola: Cromatografia**, São Paulo, n., p.21-25, 01 maio 1998. Disponível em: <<http://www.artigo-de-revisao-de-cromatografia.pdf>>. Acesso em: 26 mai. 2014.

DENOBILO, M; NASCIMENTO, E. S. Validação de método para determinação de resíduos dos antibióticos oxitetraciclina, tetraciclina, clortetraciclina e doxiciclina, em leite, por cromatografia líquida de alta eficiência. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas** vol. 40, n. 2, abr./jun., 2004. Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo. Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/rbcf/v40n2/10.pdf>. Acesso em: 30 Mar. 2014.

FAGUNDES, H. **Ocorrência de Resíduos de Antimicrobianos utilizados no tratamento de interrupção de lactação no início da lactação subsequente em animais com período seco recomendado**. 2003. Dissertação (Mestrado em Zootecnia, na área de concentração: Qualidade e Produtividade Animal) - Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, SP, 2003.

FOLLY, M. M.; MACHADO, S. C. A.; Determinação de Resíduos de Antibióticos, Utilizando-se Métodos de Inibição Microbiana, Enzimático e Imuno-Ensaio no Leite Pasteurizado Comercializado na Região Norte do Estado do Rio de Janeiro, Brasil. **Ciência Rural**, v.31 n.1, ISSN 0103-8478, Santa Maria, jan/fev. 2001. Disponível em: [http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0103-84782001000100015&script=sci\\_arttext](http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0103-84782001000100015&script=sci_arttext). Acesso em: 16 set. 2013.

FAO / WHO - Food and Agriculture Organization of the United Nations / World Health Organization. **Evolution of certain veterinary drug residues in food**. Geneva: FAO, 2002.

GONDIM, C. S. **Validação de Métodos Qualitativos: delineamento de procedimento e aplicação na pesquisa de resíduos de sulfonamidas em leite cru**. 2012. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) - Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2012. Disponível em: <http://www.bibliotecadigital.ufmg.br/dspace/handle/1843/BUBD-92GF7B>. Acesso em: 18 mai. 2014.

LEME, F. B. P. **Presença de resíduos de antimicrobianos em amostras de diferentes tipos de leite comercializados no município de São Paulo**. 2005. Dissertação (Mestrado em Epidemiologia Experimental e Aplicada às Zoonoses) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005. Disponível em: [http://www.livrosgratis.com.br/arquivos\\_livros/cp013107.pdf](http://www.livrosgratis.com.br/arquivos_livros/cp013107.pdf). Acesso em: 18 set. 2013

MACEDO, L. C. S.; FREITAS, J. A. Ocorrência de resíduos de antimicrobianos em leite. **Revista ciências agrárias**, Belém, n. 52, p. 147-157, jul./dez. 2009. Disponível em: [http://www.ufra.edu.br/editora/revista\\_52/REVISTA%2052\\_artigo%2013.pdf](http://www.ufra.edu.br/editora/revista_52/REVISTA%2052_artigo%2013.pdf). Acesso em: 25 mai. 2014.

MAGNAVITA, A. P. A; **Avaliação das Características Físico-Químicas e da Presença de Antimicrobianos em Leite Pasteurizado nas Regiões Sudoeste e Sul Baiano**. 2012. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos, Área de concentração: Engenharia de processos de Alimentos) - Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia. Itapetinga – BA. Disponível em: <http://www.uesb.br/ppgengalimentos/dissertacoes/2012/Ana%20Prudencia%20A%20Magnavita.pdf>. Acesso em: 18 Fev. 2014.

MAMANI, M. C. V.; **Desenvolvimento e validação de Métodos para a Determinação de Antimicrobianos em Leite e Fármacos usando a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência e Eletroforese Capilar**. 2007. Tese de Doutorado (doutorado em Química Analítica - UNICAMP) - Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Química. Campinas, São Paulo, 2007. Disponível em: <http://biq.iqm.unicamp.br/arquivos/teses/vtIs000416794.pdf>. Acesso em: 15 mar. 2014.

NASCIMENTO, G. G. F.; MAESTRO, V.; CAMPOS, M. S. P. Ocorrência de resíduos de antibióticos no leite comercializado em Piracicaba, SP. **Revista de Nutrição**, Campinas, v.14, n. 2, p. 119-124, mai./ago. 2001. Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/rn/v14n2/7560.pdf> Acesso em 26 mai. 2014.

NERO, L. A.; MATTOS, M. R.; BELOTI, V.; BARROS, M. A. F.; FRANCO, B. D. G. M.; Resíduos de antibióticos em leite cru de quatro regiões leiteiras no Brasil. **Revista Ciência e Tecnologia de Alimentos**. vol.27 n.2 Campinas, SP. Abr/Jun. 2007. Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/cta/v27n2/30.pdf>. Acesso em: 16 set. 2013.

OLIVEIRA, R.C; BANDO, E; MACHINSKI JUNIOR, M. Ocorrência de cloranfenicol em leite pasteurizado comercializado no Estado do Paraná, Brasil no Estado do Paraná, Brasil. **Acta Science Health**. Maringá –PR v. 29, n. 1, p. 59-62, 2007. Disponível em: <<http://periodicos.uem.br/ojs/index.php/ActaSciHealthSci/article/view/107/100>>. Acesso em: 01 abr. 2014

PENZYME<sup>®</sup> MILK TEST. **Nelson Jameson Inc.** Imagem. Disponível em: <http://nelsonjameson.com/Penzyme-Milk-Test-p2671.html> Acesso em: 24 Mar. 2014.

PENZYME<sup>®</sup> MILK TEST Neogen<sup>®</sup> Corporation. **Food Safety Dairy Analysis Test Kits: Dairy**. Disponível em: [http://www.neogen.com/FoodSafety/FS\\_DA\\_Index.html](http://www.neogen.com/FoodSafety/FS_DA_Index.html). Acesso em: 24 Mar. 2014.

PRADO, C.K; MACHINSKI JÚNIOR, M; Metodologia analítica para determinação de resíduos de tetraciclina em leite: uma revisão. **Revista Instituto Adolfo Lutz**. São Paulo, 2011; 70(4): 448-56. Disponível em: <http://revistas.bvs-vet.org.br/rialutz/article/view/5523/4792>. Acesso em: 15 mar. 2014.

RAPINI, L. S; TEIXEIRA, J. P; MARTINS, N.E; CERQUEIRA, M. M. O. P; SOUSA, M.R; PENNA, C. F. A. M. Perfil de resistência antimicrobiana de cepas de *Staphylococcus* sp. isoladas de queijo tipo coalho. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária Zootecnia**, v.56, n.1, p.130-133, 2004. Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/abmvz/v56n1/a22v56n1.pdf>. Acesso em: 17 fev. 2014.

RIBANI, M., BOTTOLI, C. B. G.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F., MELO, L. F. C., Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, v.27, p. 771-780, 2004. Disponível em: <http://qnesc.yordan.com/qn/qnol/2004/vol27n5/16-RV03165.pdf>. Acesso em: 30 Mar. 2014.

**R-Biopharm AG.** Teste RIDASCREEN® Streptomycin. Disponível em: <http://www.r-biopharm.com/products/food-feed-analysis/residues/antibiotics/streptomycin/item/ridascreen-streptomycin#>. Acesso em: 25 Mar. 2014.

RUELA, I. C. A; LIMA, J. A; SOUZA, S. V.C; JUNQUEIRA, R.G. Otimização e validação de método para determinação de resíduos de oxitetraciclina, tetraciclina e clortetraciclina em leite por cromatografia líquida de alta eficiência. **Revista Ciência Tecnologia de Alimentos**, Campinas, 25(1): 139-146, jan.-mar. 2005.

Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/cta/v25n1/a22v25n1.pdf>. Acesso em: 30 Mar. 2014.

SANTOS, A. F. S; DUARTE, K. M. R; POZZI, C. R. Detecção de Resíduos de Antimicrobianos no Leite. Artigo de revisão: **UNOPAR Biologia Cientista Ciência Saúde** 2011. Curso de Produção Animal Sustentável, Instituto de Zootecnia, São Paulo- SP.

Disponível em:

[https://www.google.com.br/search?q=metodos+de+glutina%C3%A7%C3%A3o+em+latex+para+detectar+residuos+de+antibioticos+no+leite&oq=metodos+de+glutina%C3%A7%C3%A3o+em+latex+para+detectar+residuos+de+antibioticos+no+leite&aqs=chrome..69i57.32036j0j8&sourceid=chrome&epv=210&es\\_sm=93&ie=UTF-8](https://www.google.com.br/search?q=metodos+de+glutina%C3%A7%C3%A3o+em+latex+para+detectar+residuos+de+antibioticos+no+leite&oq=metodos+de+glutina%C3%A7%C3%A3o+em+latex+para+detectar+residuos+de+antibioticos+no+leite&aqs=chrome..69i57.32036j0j8&sourceid=chrome&epv=210&es_sm=93&ie=UTF-8)

SILVA, R. M.; SILVA, R. C.; RIBEIRO, A. B.; Resíduos de Antibióticos em Leite. **Revista Saúde e Biologia**, p., v.7, n.1.30-44, jan./abr., 2012. ISSN: 1980-0002. Disponível em: <http://revista.grupointegrado.br/revista/index.php/sabios2/article/viewFile/923/408>. Acesso em: 22 set. 2013.

SIQUEIRA, K. B; CARNEIRO, A.V; Conjuntura do Mercado Lácteo. Ano 5 n. 41 (abril/2012). Juiz de Fora – MG: **EMBRAPA Gado de Leite**, 2012. Disponível em: [http://www.cileite.com.br/sites/default/files/2012\\_10\\_Produ%C3%A7%C3%A3o\\_Leite.pdf](http://www.cileite.com.br/sites/default/files/2012_10_Produ%C3%A7%C3%A3o_Leite.pdf). Acesso em : 18 Mar. 2014.

SOUZA, E. E.; **Resíduos de Antimicrobianos no Leite: Revisão de Literatura**. 2013. Trabalho de Conclusão de curso. Centro Universitário de Formiga – UNIFOR. Formiga, MG.

Disponível em:

<http://bibliotecadigital.uniformg.edu.br:21015/jspui/bitstream/123456789/166/1/Elson-Elias-Vet.pdf>. Acesso em: 06 set. 2013.

SNAP® BETA TEST. Protocolo de Ensaio. **Verus Madasa**. Disponível em: <http://www.verusmadasa.com.br/-acell-linhasnap.html>. Acesso em: 20 Mar. 2014.

TENÓRIO, C. G. M. S. C.; **Avaliação da eficiência do Teste Copan (Microplate e Single) na Detecção de Resíduos de Antimicrobianos no Leite**. Dissertação (Mestre em Medicina Veterinária. Área de Concentração: Tecnologia e Inspeção de Produtos de Origem Animal) - Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2007.

Disponível em: [http://www.bibliotecadigital.ufmg.br/dspace/bitstream/handle/1843/MASA-7A\\_WP\\_N\\_D/disserta\\_\\_o\\_\\_clarice\\_g\\_\\_m\\_\\_s\\_\\_c\\_\\_tenorio.pdf?sequence=1](http://www.bibliotecadigital.ufmg.br/dspace/bitstream/handle/1843/MASA-7A_WP_N_D/disserta__o__clarice_g__m__s__c__tenorio.pdf?sequence=1) Acesso em: 06 set. 2013.

TENÓRIO, C.G.M.S.C.; CERQUEIRA, M.M.O.P., VIEGAS, R.P. et al . Eficiência dos testes COPAN (Microplate e Single) na detecção de resíduos de antimicrobianos no leite. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 61, n. 2, 2009. Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/abmvz/v61n2/a31v61n2.pdf>. Acesso em: 25 mai. 2014.

TESTE SHARM COWSIDE® TEST II. **SHARM SCIENC, IN.** 2014. Disponível em: <http://www.calibrecontrol.com/wp-content/uploads/MRK-003.pdf>. Acesso em 23 Mar. 2014.

TRONCO, V. M. **Manual para Inspeção da Qualidade do Leite.** 4ª ed. Santa Maria: Editora da UFSM, 2010.

VIEIRA, T. S. W. J.; RIBEIRO, M. R. R.; NUNES, M. P.; JÚNIOR, M. M.; NETTO, D. P.; Detecção de resíduos de antibióticos em amostras de leite pasteurizado do Estado do Paraná, Brasil. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 33, n. 2, p. 791-796, abr. 2012. Disponível em: <http://www.uel.br/revistas/uel/index.php/semagrarias/article/view/6561/10460> Acesso em: 22 set. 2013.

**ZOETIS** Indústria de Produtos Veterinários. Boletim Técnico. Resíduo de produtos antimicrobianos: Descarte zero x Resíduo zero. Disponível em: <http://187.108.194.18/~resolpec/UPLarquivos/0502201408201214.pdf>. Acesso em: 16 fev. 2014.