

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

ESCOLA DE VETERINÁRIA

Colegiado dos Cursos de Pós-graduação

Luiz Paulo Freire de Bastos

**Avaliação da capacidade de detecção de
resíduos de antimicrobianos no leite por um
método de inibição microbiana**

Belo Horizonte

Escola de Veterinária da UFMG

2012

Luiz Paulo Freire de Bastos

Avaliação da capacidade de detecção de resíduos de antimicrobianos no leite por um método de inibição microbiana

Dissertação apresentada à Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciência Animal.

Área de concentração: Tecnologia e Inspeção de Produtos de Origem Animal.


Orientadora: Mônica Maria Oliveira Pinho Cerqueira

Belo Horizonte
Escola de Veterinária da UFMG
2012

Dissertação defendida e aprovada em 28 de fevereiro de 2012, pela Comissão Examinadora constituída por:



Prof.ª Mônica Maria Oliveira Pinho Cerqueira
Presidente



Prof. Luiz Simeão do Carmo



Prof.ª Cláudia Freire de Andrade Morais Penna

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela presença constante em minhas conquistas e por colocar tantas pessoas especiais em minha vida.

Aos meus pais e meus irmãos pelo apoio, incentivo e pelas orações para que tudo desse certo. Amo vocês!

À minha orientadora, Profa. Mônica Cerqueira, pela oportunidade do mestrado, ensinamentos, amizade e pelos bons conselhos recebidos.

Aos componentes da banca avaliadora, Prof. Luiz Simeão e Profa. Cláudia Penna pela disponibilidade e contribuição à dissertação.

Às amigas Naiara e Carol pelo ajuda essencial na execução do experimento.

Aos meus amigos da veterinária pela amizade e pelos momentos de diversão que passamos juntos. Agradecimento especial à Naiara e Mônica (trio inspeção) pelo companheirismo também nos estudos, trabalhos, eventos da área e pelas dicas na dissertação e na apresentação da defesa.

Aos colegas do Laboratório de Resíduos de Medicamentos Veterinários do LANAGRO/MG, representados pela Dra. Andrea Garcia, pelo auxílio no preparo e doação das soluções de antimicrobianos utilizadas no experimento e pelo apoio na obtenção do leite isento de resíduos.

Aos professores do DTIPOA, Cláudia, Marcelo, Mônica Leite, Wagner, Leorges, Afonso, Renaldo e Silvana, pelos ensinamentos e momentos de descontração.

A todos os funcionários do DTIPOA, em especial à Maura e Marco Antônio, pelo suporte ao meu experimento.

SUMÁRIO

RESUMO	10
ABSTRACT	11
1. Introdução	12
2. Revisão de Literatura	12
2.1. Antimicrobianos	12
2.2. Resíduos de antimicrobianos no leite	13
2.3. Consequências da presença de resíduos de antimicrobianos no leite	14
2.4. Legislação referente a resíduos de antimicrobianos	15
2.5. Método microbiológico para detecção de resíduos de antimicrobianos no leite	17
2.6. Situação no Brasil	18
3. Objetivos	21
3.1. Objetivo Geral	21
3.2. Objetivos Específicos	21
4. Material e Métodos	21
4.1. Preparo das Soluções-Padrão	23
4.2. Obtenção do leite isento de resíduos de inibidores	23
4.3. Controles analíticos	24
4.4. Análises no Kit Eclipse 50 [®]	24
4.5. Avaliação dos resultados e análise estatística	24
5. Resultados e Discussão	25
5.1. Qualidade do leite utilizado no experimento e controles analíticos	25
5.2. Avaliação da eficiência do kit Eclipse 50 [®]	25
5.2.1. Beta-lactâmicos	26
5.2.2. Tetraciclina	27
5.2.3. Macrolídeos	29
5.2.4. Aminoglicosídeos	30
5.2.5. Sulfonamidas	31
5.2.6. Lincosamidas	32
5.2.7. Comparação de resultados entre os grupos de antimicrobianos	33
5.3. Avaliação dos resultados com base na Decisão 2002/657/CE	34

5.4. Considerações sobre o Kit Eclipse 50®	36
6. Conclusões	37
7. Considerações finais.....	37
8. Referências Bibliográficas	38
ANEXO 1 – Manual Kit Eclipse 50®	42
ANEXO 2 – Lista com os limites mínimos de detecção declarados pelo fabricante	43

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Persistência de eliminação (em horas) de medicamentos no leite de acordo com a via de administração utilizada.....	13
Tabela 2. Resultados médios da qualidade do leite utilizado no experimento em comparação com a qualidade estabelecida pela legislação brasileira.....	25
Tabela 3. Detecção de antimicrobianos do grupo dos beta-lactâmicos em leite em dois níveis de concentração.....	26
Tabela 4. Sensibilidade e especificidade (%) na detecção do nível 1 para os antimicrobianos do grupo dos beta-lactâmicos.....	27
Tabela 5. Sensibilidade e especificidade (%) na detecção de concentrações de antimicrobianos do grupo dos beta-lactâmicos referentes aos LMR (Nível 2).....	27
Tabela 6. Detecção de antimicrobianos do grupo das tetraciclinas em leite em dois níveis de concentração.....	28
Tabela 7. Sensibilidade e especificidade (%) na detecção do nível 1 para os antimicrobianos do grupo das tetraciclinas.....	28
Tabela 8. Sensibilidade e especificidade (%) na detecção de concentrações de antimicrobianos do grupo das tetraciclinas referentes aos LMR (Nível 2).....	28
Tabela 9. Detecção de antimicrobianos do grupo dos macrolídeos em leite em dois níveis de concentração.....	29
Tabela 10. Sensibilidade e especificidade (%) na detecção do nível 1 para os antimicrobianos do grupo dos macrolídeos.....	30
Tabela 11. Sensibilidade e especificidade (%) na detecção de concentrações de antimicrobianos do grupo dos macrolídeos referentes aos LMR (Nível 2).....	30
Tabela 12. Detecção de antimicrobianos do grupo dos aminoglicosídeos em leite em dois níveis de concentração.....	30
Tabela 13. Sensibilidade e especificidade (%) na detecção do nível 1 para os antimicrobianos do grupo dos aminoglicosídeos.....	31
Tabela 14. Sensibilidade e especificidade (%) na detecção de concentrações de antimicrobianos do grupo dos aminoglicosídeos referentes aos LMR (Nível 2).....	31
Tabela 15. Detecção de antimicrobianos do grupo das sulfonamidas em leite em dois níveis de concentração.....	31
Tabela 16. Sensibilidade e especificidade (%) na detecção do nível 1 para os antimicrobianos do grupo das sulfonamidas (Nível 1).....	32
Tabela 17. Sensibilidade e especificidade (%) na detecção de concentrações de antimicrobianos do grupo das sulfonamidas referentes aos LMR (Nível 2).....	32
Tabela 18. Detecção da lincomicina em leite em dois níveis de concentração.....	32
Tabela 19. Sensibilidade e especificidade (%) na detecção de lincomicina (Nível 1 e 2).....	33

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Limites Máximos de Resíduos de antimicrobianos no leite (LMR) em µg/kg (ppb).....	16
Quadro 2. Testes microbiológicos para pesquisa de resíduos de antimicrobianos em leite.....	18
Quadro 3. Ocorrência de resíduos de antimicrobianos (%) em leite no Brasil nos últimos anos.....	20
Quadro 4. Antimicrobianos utilizados no experimento e suas respectivas concentrações expressas em partes por bilhão (ppb)	22
Quadro 5. Avaliação dos resultados de detecção de resíduos de antimicrobianos no leite pelo Kit Eclipse 50 [®] de acordo com a Decisão 657/2002 da Comunidade Europeia para o nível declarado pelo fabricante.....	35
Quadro 6. Avaliação dos resultados de detecção de resíduos de antimicrobianos no leite pelo Kit Eclipse 50 [®] de acordo com a Decisão 657/2002 da Comunidade Europeia para o nível do LMR..	36

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Porcentagem de detecção de resíduos de antimicrobianos no leite pelo kit Eclipse 50 [®] no nível declarado pelo fabricante	33
Figura 2. Porcentagem de detecção de resíduos de antimicrobianos no leite pelo do kit Eclipse 50 [®] no nível do LMR	34

RESUMO

Este trabalho teve como objetivo avaliar a eficiência e sensibilidade do kit de inibição microbiana Eclipse 50[®] (Zeu Inmunotec) na detecção de resíduos de antimicrobianos em leite cru. Foram analisadas amostras de leite cru isento de resíduos inoculado experimentalmente com diferentes antimicrobianos em duas concentrações, o limite mínimo de detecção declarado pelo fabricante (Nível 1) e o limite máximo de resíduos estabelecido pela legislação brasileira (Nível 2). Para os antimicrobianos que não possuem limite estabelecido no país, limites legais estabelecidos pelo *Codex Alimentarius* ou pela legislação da União Europeia foram adotados. Foram utilizadas 19 bases de antimicrobianos de seis classes diferentes, além de amostras controle positivas e negativas, com 30 repetições para cada nível. Em relação ao nível 1, o kit foi eficiente (erro $\beta < 5\%$) na detecção de 16 antimicrobianos, sendo os não conformes: a gentamicina, neomicina e lincomicina. Estes resultados indicam a necessidade do fabricante em rever estes níveis de detecção declarados. Para o nível 2 (LMR), cinco dos 19 antimicrobianos testados apresentaram-se não conformes, sendo eles a eritromicina, estreptomicina, gentamicina, neomicina e lincomicina. Os três antimicrobianos testados do grupo dos aminoglicosídeos (estreptomicina, gentamicina e neomicina) não foram detectados no LMR, mostrando a baixa sensibilidade do *Geobacillus stearothermophilus* var. *calidolactis* frente à esta classe de antimicrobiano.

Palavras-chave: leite, resíduos de antimicrobiano, kit de inibição microbiana, Eclipse 50[®]

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the efficiency and sensitivity of the kit based on microbial inhibition Eclipse 50[®] (Zeu Inmunotec) for detecting antimicrobial residues in raw milk. Samples from antimicrobial-free milk were inoculated with two different antimicrobial concentrations, the lower limit of detection by the manufacturer (Level 1) and the maximum residue limit established by Brazilian legislation (Level 2). For antimicrobials that have no limit in the country, legal limits established by the Codex Alimentarius or European Union legislation were adopted. The 19 antimicrobials from six different groups and positive and negative controls were tested with 30 repetitions/level. In relation to the level 1 the test was efficient (β error <5%) in the detection of 16 antimicrobials, and it was not for three antimicrobials: gentamicin, neomycin and lincomycin. These results indicate the need for the manufacturer to review these detection levels reported. For the level 2 (MRL) of 19 antimicrobials tested five presented unsatisfactory results, and they were erythromycin, streptomycin, gentamicin, neomycin and lincomycin. The three antimicrobials tested from the group of aminoglycosides (streptomycin, gentamicin and neomycin) were not detected in the MRL, showing the low sensitivity of Geobacillus stearothermophilus var. calidolactis front of this class of antimicrobials.

Keywords: milk, antimicrobial residues, kit based on microbial inhibition, Eclipse 50[®]

1. Introdução

A produção de leite e derivados no Brasil é considerada uma atividade importante na geração de renda, tributos e empregos, além do suprimento de alimentos. Em 2010, o Brasil produziu 31.667.600 toneladas de leite, ficando como o quarto país de maior produção no mundo (FAO, 2012).

O Brasil apresentou um crescimento médio na produção de leite de 3,15% entre 1990 e 2007, taxa esta superior ao crescimento médio mundial (1,0%). Essa expansão é resultado da reestruturação do setor, com consequente aumento de produtividade. Neste período, o país passou de importador líquido de produtos lácteos para exportador líquido. A participação brasileira na produção mundial de leite aumentou de 3,1% para 4,5% (PRODUTOS..., 2008). Para conseguir exportar, é necessário que o país seja competitivo no mercado internacional, o que só é possível com a garantia da qualidade e inocuidade dos produtos. É preciso atender os requisitos de qualidade como a ausência de resíduos de drogas veterinárias no leite como, por exemplo, de resíduos de antimicrobianos.

Além de ser uma das barreiras sanitárias impostas para a exportação de produtos lácteos, a presença de resíduos de antimicrobianos no leite de consumo é preocupante por representar riscos à saúde do consumidor e por interferir na produção dos derivados. A principal fonte desses resíduos origina-se do manejo inadequado de medicamentos veterinários para o tratamento de doenças e infecções, tendo destaque a mastite. Essas substâncias são eliminadas no leite durante períodos variáveis, sendo necessário o descarte dessa produção.

A presença de resíduos de antimicrobianos em leite pode causar vários efeitos indesejáveis, como seleção de cepas bacterianas resistentes, no ambiente e no consumidor, hipersensibilidade e possível choque anafilático em indivíduos alérgicos a essas substâncias, desequilíbrio da microbiota intestinal, além de efeito teratogênico. O principal problema para a indústria é a inibição de culturas lácteas sensíveis

utilizadas na fabricação de queijos, iogurtes e outros produtos fermentados.

Devido à grande importância nutricional, econômica e social do leite e ao aspecto de saúde do consumidor, é indispensável o controle da presença de resíduos de antimicrobianos. Para isso, inúmeros testes qualitativos e quantitativos para detectar esses resíduos têm sido desenvolvidos, desde a década de 40. Os testes mais utilizados são os de inibição microbiana, que se baseiam no princípio geral de que todos os antimicrobianos inibem bactérias sensíveis. Neste contexto surgiu o interesse de se avaliar um destes testes para verificar sua real eficiência na detecção dos resíduos de antimicrobianos no leite.

2. Revisão de Literatura

2.1. Antimicrobianos

Os antimicrobianos são substâncias químicas inespecíficas ou específicas que atuam sobre os micro-organismos em geral, patogênicos ou não. Pertencem ao primeiro grupo, os desinfetantes e antissépticos; ao segundo, os quimioterápicos e os antibióticos, que são substâncias sintetizadas em laboratório e produzidas parcial ou totalmente por micro-organismos, respectivamente (SPINOSA, 2006).

A utilização de antimicrobianos em animais sempre acompanhou o desenvolvimento e o uso destes em medicina humana. Na década de 50, descobriu-se seu uso como aditivo alimentar, melhorando os indicadores de crescimento animal e a eficiência produtiva (MITCHELL *et al.*, 1998).

Na produção moderna de animais, cujo produto é destinado ao consumo humano, os antimicrobianos podem ser utilizados para diversas finalidades (AARESTRUP, 2005): terapêutica (tratamento de infecções em animais que apresentam sinais clínicos); metafílática (tratamento de animais clinicamente saudáveis que pertençam ao mesmo rebanho ou cercados dos animais com

sinais clínicos); profilática (antimicrobiano aplicado em animais saudáveis para a prevenção de doenças); promotores de crescimento (antimicrobiano adicionado continuamente na ração para aumentar o peso e melhorar a conversão alimentar).

De acordo com SPINOSA (2006), os mecanismos de ação dos antimicrobianos contra micro-organismos susceptíveis incluem: inibição da parede celular dos micro-organismos (beta-lactâmicos), inibição da síntese proteica (cloranfenicol, tetraciclina, macrolídeos, aminoglicosídeos), comprometimento da replicação do ácido desoxirribonucléico (DNA) (quinolonas), alteração da função normal da membrana celular (polimixinas) e inibição da síntese de alguns metabólitos essenciais (sulfonamidas e trimetoprim).

As classes de antimicrobianos mais comumente utilizados em animais de produção, segundo MITCHELL *et al.* (1998), são os beta-lactâmicos (penicilinas e cefalosporinas), as tetraciclina (oxitetraciclina, tetraciclina e clortetraciclina), os aminoglicosídeos (estreptomicina, neomicina e gentamicina), os macrolídeos (eritromicina e tilosina) e as sulfonamidas (sulfametazina).

2.2. Resíduos de antimicrobianos no leite

De acordo com o *Codex Alimentarius* FAO/WHO (citado por BRASIL, 1999), define-se resíduo de uma droga veterinária como a “fração da droga, seus metabólitos,

produtos de conversão ou reação e impurezas que permanecem no alimento originário de animais tratados”.

Segundo MITCHELL *et al.* (1998), pode-se detectar a presença de resíduo de drogas veterinárias, mais especificamente de antimicrobianos, em alimentos como leite, carne e ovos, a partir da administração destas drogas aos animais pelas vias intramuscular, intravenosa, subcutânea, oral (no alimento ou na água), topicamente sobre a pele e também por infusão intramamária ou intrauterina. Na Tabela 1 estão apresentadas as principais vias de administração dos medicamentos utilizados em vacas leiteiras e a duração média da sua eliminação pelo leite.

JONES e SEYMOUR (1988) relataram que a presença de resíduos de antimicrobianos no leite pode ter as seguintes causas: 1) tratamentos aleatórios; 2) problemas ou falhas na identificação dos animais tratados; 3) não separação de vacas em tratamento no momento da ordenha; 4) uso de dosagem acima da recomendada; 5) falhas na observação ou não cumprimento dos períodos de carência dos antimicrobianos administrados; 6) uso de medicamentos por períodos muito prolongados ou excessivos; 7) uso de medicamentos com períodos de excreção prolongados; 8) descarte do leite apenas dos quartos tratados; 9) mistura acidental de leite não contaminado com leite contaminado; 10) uso de equipamentos de ordenha contaminados; 11) vacas que tiveram seu período seco reduzido ou parto precoce; 12) uso indevido de medicamento destinado a vacas secas em vacas lactantes.

Tabela 1. Persistência de eliminação (em horas) de medicamentos no leite de acordo com a via de administração utilizada

Via de administração	Persistência média (horas)
Oral	86
Intramuscular	72 a 96
Intravenosa	44
Intrauterina	31
Intramamária	48 a 144

Fonte: COSTA (1996)

Após o término de um ciclo de lactação, inicia-se o período seco, cujo tempo mínimo necessário para uma nova lactação é de 60 dias. Quando o tratamento da mastite é realizado neste período, o medicamento é aplicado na glândula mamária com veículo oleoso tendo, portanto, sua ação prolongada. FAGUNDES (2003), após administrar o antimicrobiano para tratamento de mastite em 65 vacas no período seco, detectou a presença do resíduo do antimicrobiano 60 dias após sua administração em aproximadamente 29,1% dos animais. No período entre 60 e 70 dias após a administração, 19,4% dos animais continuavam excretando tais resíduos, e após 70 dias da administração havia resíduo no leite de 7,1% dos animais. Estes resultados mostram que o cumprimento do período de carência (60 dias), para tratamentos realizados no período seco pode não ser suficiente para que o leite esteja isento de resíduos. Neste sentido, é possível que os resíduos encontrados após 60 dias da aplicação, estejam abaixo dos Limites Máximos de Resíduos (LMR) fixados pelo *Codex Alimentarius* e/ou pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). De fato, a metodologia usada por FAGUNDES (2003) foi qualitativa. Ressalta-se, neste momento, que o autor defende, ainda, o fato de ser o período seco de fundamental importância para que se evite tal ocorrência.

2.3. Consequências da presença de resíduos de antimicrobianos no leite

Em relação à saúde pública, a presença de resíduos de antimicrobianos no leite é indesejável por várias razões, sendo as mais frequentes as reações de hipersensibilidade e a seleção de micro-organismos resistentes (COSTA, 1996).

Embora os níveis aceitáveis de resíduos de antimicrobianos sejam inferiores ao limite mínimo necessário para produzir reações alérgicas agudas, não se sabe se a exposição frequente a baixas concentrações de tais medicamentos possa causar efeitos nocivos ao consumidor. A maioria das informações relativas à hipersensibilidade está associada ao uso da penicilina e de outros beta-

lactâmicos, além de relatos de que aminoglicosídeos, cloranfenicol e novobiocina sejam, também, muito alergênicos em indivíduos sensíveis (DENOBILE, 2002).

As penicilinas são altamente alergênicas. Estima-se que 10% da população mundial apresentem reação de hipersensibilidade a essas substâncias (BRASIL, 1999; MARTINS e VAZ, 2000). COSTA (1996) relata que quando presentes no leite, mesmo em quantidades muito baixas, tais antimicrobianos podem provocar erupções eczematosas, ou vesículas e erupções orais e cutâneas.

O cloranfenicol é um antimicrobiano altamente eficaz no tratamento de um número considerável de doenças. Apesar disso, é uma droga extremamente tóxica, fato que a tem relacionado com o surgimento da anemia aplástica em indivíduos hipersensíveis. A legislação brasileira, por meio da Instrução Normativa nº 9/2003, proibiu seu uso, assim como dos nitrofuranos, em medicina veterinária (BRASIL, 1999; BRASIL, 2003).

PESSANHA e GONTIJO FILHO (2001), assim como BARBERIO *et al.* (2002), afirmaram que nos últimos anos a resistência dos micro-organismos frente aos antimicrobianos vem aumentando significativamente devido ao seu uso incorreto ou indiscriminado de antimicrobianos, tanto em medicina humana quanto na veterinária. BARBERIO *et al.* (2002) afirmaram, ainda, que quando do surgimento de cepas resistentes em uma determinada localidade, esta pode circular e se disseminar por um período de dois a três anos. A expressão de resistência depende de vários fatores, sendo de importância que o micro-organismo disponha de genes para tal e que tenha sido exposto ao antimicrobiano por um período de tempo prolongado. De fato, bactérias que possuem genes de resistência quando em contato persistente com antimicrobianos podem vir a expressar esta resistência transmitindo-a para gerações futuras de bactérias.

O aumento da resistência de micro-organismos aos antimicrobianos tem sido

considerado um problema global, sendo a resistência múltipla a drogas observada em muitas linhagens de bactérias, incluindo espécies de *Salmonella* e *Enterococcus*. O desenvolvimento de micro-organismos patogênicos resistentes pode decorrer do uso de antimicrobianos no homem, nos animais e no ambiente. Animais produtores de alimento são comumente expostos aos antimicrobianos por indicação terapêutica e, ainda, para aumentar a eficiência alimentar e o ganho de peso. A microbiota intestinal de animais que têm sido expostos aos agentes antimicrobianos pode servir como um reservatório de bactérias resistentes a estes micro-organismos que, por sua vez, podem estar presentes em alimentos de origem animal (CERQUEIRA, 2003; MATHUR e SINGH, 2005).

Deve-se considerar que o fator idade é extremamente relevante em relação a algumas das reações adversas aos antimicrobianos. Desta forma, a presença destes resíduos no leite, que é consumido principalmente na infância, assume particular importância. Também devem ser considerados os riscos pelo consumo do leite contendo níveis altos de resíduos de antimicrobianos por gestantes. Alguns antimicrobianos têm potencial teratogênico, como metronidazóis, rifampicina e trimetoprim; outros, como a estreptomicina, apresentam ototoxicidade; e as tetraciclina podem determinar alterações no desenvolvimento ósseo fetal (COSTA, 1996).

Em relação à qualidade dos derivados lácteos, a presença de resíduos de antimicrobianos, mesmo em pequenas concentrações, inibe as culturas lácteas, trazendo problemas na fabricação de leites fermentados, queijos e manteiga. Além disso, pode favorecer a multiplicação de micro-organismos indesejáveis como coliformes e bactérias putrefativas, que crescem em pH próximo à neutralidade (FAGUNDES e MOLIN, 1988; GIGANTE, 2004).

Os antimicrobianos retardam a acidificação do leite. Assim, de acordo com FAGUNDES (1997), no iogurte ocorre um desequilíbrio do fermento lácteo, fato que proporciona sabor desagradável de peptona e aspecto anormal

no produto, em virtude do excesso de soro que se acumula na superfície do mesmo. No queijo, estes antimicrobianos provocam dessoragem inadequada da coalhada, fermentação indesejável com produção de gás e maturação inadequada, além de sabor anormal, textura alterada, tornando o produto friável. Na manteiga, inibem a fermentação láctea parcial ou total, induzindo uma menor produção de diacetil que é responsável pelo aroma característico do produto. Entretanto, atualmente as indústrias adicionam esta substância ao produto, não havendo a fermentação.

2.4. Legislação referente a resíduos de antimicrobianos

No Brasil, a proibição do emprego de substâncias químicas na conservação do leite já era citada no Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal (RIISPOA) em seu artigo 514 (BRASIL, 1952), mas sem especificações e detalhamento.

Para assegurar a alta qualidade e a segurança dos produtos lácteos, foi determinado o Limite Máximo de Resíduos (LMR), que é a concentração máxima de resíduos presentes no alimento, resultante do uso de drogas veterinárias, expressa em ppb (partes por bilhão) ou ppm (partes por milhão). Estes limites, recomendados pelo *Codex Alimentarius*, são legalmente permitidos ou reconhecidos como aceitáveis no alimento. O LMR é baseado na Ingestão Diária Aceitável (IDA) de um resíduo, que é definida como a dose diária que, se ingerida durante toda a vida do indivíduo, não gera riscos aos consumidores, sendo expresso em mg da droga/kg de peso vivo (CODEX..., 1996; MITCHELL *et al.*, 1998; BRASIL, 1999). Os LMR, limite de tolerância ou limite de segurança, são determinados a partir de apurados estudos toxicológicos, de curto e médio prazos, realizados em animais de laboratórios, micro-organismos e genomas celulares. Após a conclusão destes estudos, são recomendados os LMR dos diferentes compostos aprovados à consideração dos países membros do *Codex Alimentarius* - Programa das Nações Unidas Sobre Harmonização de Normas Alimentares,

gerenciado pela FAO/WHO (BRASIL, 1999).

A Instrução Normativa nº 42, publicada em 1999 pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (BRASIL, 1999), estabelece os LMR em vigor no Brasil e altera o Plano Nacional de Controle de Resíduos em Produtos de Origem Animal – PNCR, no qual está inserido o Programa de Controle de Resíduos em Leite – PCRL. O PNCR foi instituído pela Portaria Ministerial nº. 51, de 06 de maio de 1986 e adequado pela Portaria Ministerial nº. 527, de 15 de agosto de 1995. O Quadro 1 mostra os valores estabelecidos para os LMR pelo *Codex Alimentarius*, pela União Europeia (UE) e pelo Brasil, e os valores de tolerância estabelecidos pelos Estados Unidos (EUA).

A Instrução Normativa nº 51 de 2002 do MAPA tornou compulsório o monitoramento da ocorrência de resíduos de antimicrobianos

no leite pelas indústrias de laticínios. O Anexo relativo ao leite tipo A especifica que a Pesquisa de Resíduos de Antibióticos deve ser feita pelo menos uma vez por mês, em Unidade Operacional da Rede Brasileira de Laboratórios para Controle da Qualidade do Leite, independentemente das análises realizadas na frequência estipulada pelo Programa de Controle de Qualidade interno da Granja Leiteira e que os métodos analíticos empregados nessa pesquisa devem apresentar sensibilidade para os LMR adotados pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento sobre o assunto (BRASIL, 2002).

Recentemente, foi publicada a Instrução Normativa nº 62 de 29 de dezembro de 2011 do MAPA alterando partes do texto da IN nº 51, porém mantendo inalteradas as partes relativas aos resíduos de antimicrobianos no leite (BRASIL, 2011).

Quadro 1. Limites Máximos de Resíduos de antimicrobianos no leite (LMR) em µg/kg (ppb)

Grupo/Substância	Brasil	LMR Codex	LMR UE	EUA
<i>Beta-lactâmicos</i>				
Penicilina	4	4	4	5
Ampicilina	4	-	4	10
Amoxicilina	4	-	4	10
Cloxacilina	-	-	30	10
Ceftiofur	100	100	10	50
<i>Tetraciclínas</i>				
Tetraciclina	100	100	100	300
Oxitetraciclina	100	100	100	300
Clortetraciclina	100	100	100	300
<i>Macrolídeos</i>				
Eritromicina	40	-	40	50
Tilosina	-	100	50	50
<i>Aminoglicosídeos</i>				
Estreptomicina	200	200	200	125
Neomicina	500	1500	500	150
Gentamicina	-	200	100	30
<i>Sulfonamidas</i>				
Sulfametazina	100	-	-	10
Sulfadimetoxina	100	-	-	10
Sulfatiazol	100	-	-	10
Sulfadimidina	-	25	-	10
<i>Outros</i>				
Cloranfenicol	-	-	0	0
Trimetoprim	-	-	50	-

Fonte: Adaptado de BRASIL (1999); PEDERSEN E SUHREN (2000); OFFICIAL STANDARDS – *Codex Alimentarius* (2011)

2.5. Método microbiológico para detecção de resíduos de antimicrobianos no leite

Os efeitos indesejáveis de resíduos de antimicrobianos no leite tornaram necessário o desenvolvimento de vários testes para detectá-los. Estas técnicas encontram-se disponíveis no mercado sob a forma de conjuntos de kits prontos para uso em condição de campo. Os kits, inicialmente desenvolvidos para utilização em plataformas de recebimento de leite nas indústrias, têm sido aplicados também em propriedades rurais, para verificar a presença de resíduos no leite armazenado nos tanques ou proveniente de vacas mantidas sob tratamento.

Há várias metodologias disponíveis para a detecção de resíduos de antimicrobianos em produtos de origem animal. São exemplos, a inibição microbiológica, os testes enzimáticos, os testes imunológicos, a cromatografia gasosa, a cromatografia em camada delgada e a cromatografia líquida de alta eficiência (KANG e SEYMOUR, 2001). O Quadro 2 apresenta alguns exemplos de kits de detecção de antimicrobianos baseados na inibição microbiológica.

Os métodos microbiológicos baseiam-se usualmente na inibição de crescimento de micro-organismos empregados, percebida pela mudança de cor de um indicador de pH no meio-teste. As seguintes bactérias são amplamente utilizadas nos testes de inibição

de crescimento: *Geobacillus stearothermophilus*, *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus* e *Micrococcus luteus*. As concentrações detectadas dos vários antimicrobianos variam entre os diferentes testes (MITCHELL *et al.*, 1998; CERQUEIRA, 2003).

A maioria dos kits de inibição microbiana contém um meio de cultura com um indicador de pH (púrpura de bromocresol) e um número padrão de esporos de *Geobacillus stearothermophilus* var. *calidolactis*. Este micro-organismo foi selecionado porque é muito sensível a diversos antimicrobianos e, em particular, à penicilina e aos demais beta-lactâmicos. Em temperatura de 64 a 65°C, os esporos germinam e se multiplicam havendo a formação de ácido. Quando uma quantidade suficiente de ácido é formada, a cor do indicador de pH muda de violeta para amarelo. Porém, se a amostra de leite contiver uma substância inibidora, como um antimicrobiano, esta substância se difunde no meio de cultura e, quando presente em concentração suficiente, causa inibição do processo de multiplicação e, conseqüentemente, não há produção de ácido. A cor do meio-teste neste caso não muda para amarelo e permanece violeta. Quando a concentração do inibidor está acima do limite de detecção do teste para o mesmo, o meio-teste permanece com coloração violeta. Quando a concentração do inibidor está próxima do limite de detecção, a coloração fica entre violeta e amarelo (HOTTA, 2003).

Quadro 2. Testes microbiológicos para pesquisa de resíduos de antimicrobianos em leite

Princípio do teste	Nome do teste
Inibição do crescimento microbiano	Teste do disco BR-Test (Brilliant black reduction test) ¹ BR-Test “Blue Star”, BR-Test AS ¹ Charm Farm Test, Charm Inibition Assay ² Delvotest-P, Delvotest-SP ³ Copan ATK P & S Microplate ⁴ Copan ATK P & S Single ⁴ Charm Cowside II Test ² Charm Blue Yellow II Test ² Eclipse 50 ⁵ Eclipse 100 ⁵

Fonte: Adaptado de CULLOR (1992), TENÓRIO (2007), LINAGE *et al.* (2007)

Legenda:

¹BR- Test® – Idetek Inc., Sunnyvale, California, USA

²Charm Test® – Charm Sciences Inc., Malden, Mariland, USA

³Delvotest® - Gist-Brocades Food Ingredients Inc., King of Prussia, Pennsylvania, USA

⁴Copan® ATK P e S Microplate e Single – Copan, Itália

⁵ZEU-Immunotec, Zaragoza, Spain

2.6. Situação no Brasil

Há na literatura, vários trabalhos de autores que pesquisaram a presença de resíduos de antimicrobianos no leite utilizando diferentes metodologias (MAGALHÃES, 1995; PORTO *et al.*, 2002; RUELA, 2003; TENÓRIO, 2007; MATTOS *et al.*, 2010). Trabalhos desta natureza são necessários e importantes para o levantamento da qualidade do leite consumido no Brasil e para que se possa iniciar um programa de controle, definir estratégias, estabelecer prioridades e trabalhar de forma tal a obter resultados que sejam eficazes e eficientes.

Um dos aspectos mais importantes para assegurar a correta identificação da presença de antimicrobianos no leite é o tipo de metodologia utilizada para análise. No momento da escolha do teste, devem-se levar em consideração: o princípio do teste e os compostos que detecta os limites de detecção; a praticidade de realização, o tempo despendido com a análise e o custo; o fato de que só serão acusadas como positivas as amostras que contiverem resíduos que sejam detectáveis pela metodologia e que estejam presentes em concentrações superiores ao limite de detecção do teste. A

presença de resultados positivos não significa invariavelmente ilegalidade, pois a concentração dos mesmos, quando presentes no leite podem estar abaixo dos LMR estabelecidos pelo *Codex Alimentarius* ou pela legislação vigente para eles.

Embora utilizando diferentes métodos de detecção de resíduos de antimicrobianos no leite, os dados descritos abaixo mostram que o problema continua ocorrendo, independentemente do tipo de leite e da cidade de coleta. Estes dados foram compilados no Quadro 3 para melhor visualização da situação do Brasil em relação à presença de resíduos de antimicrobianos no leite tratado nos últimos anos.

MAGALHÃES (1995) analisou 120 amostras de leite pasteurizado (tipo A, B, C e “Integral/Fazenda”, sendo 30 amostras de cada) comercializados na Grande Belo Horizonte (MG), com o objetivo de verificar a ocorrência de resíduos de inibidores, no período de outubro a dezembro de 1994. Os resultados observados revelaram que o leite tipo B apresentou maior frequência de resíduos de inibidores (36,67%), seguido pelo leite “Integral/Fazenda” (20,00%) e pelo leite

tipo A (6,67%). Para o leite pasteurizado tipo C, nenhuma amostra positiva foi detectada. Do total de amostras analisadas, 15,83% apresentaram-se positivas para presença de inibidores.

LOPES *et al.* (1998) analisaram 178 amostras de leite pasteurizado tipos A, B e C comercializados na cidade de Campinas (SP) utilizando o teste Delvotest-P. Do total de amostras, 14 apresentaram resíduos de antimicrobianos, representando 7,9% das amostras coletadas. O maior número de amostras com presença de resíduos de antimicrobianos ocorreu, respectivamente, nos leites pasteurizados tipos A (14,1%) e B (2,5%). No leite pasteurizado tipo C não houve detecção desse tipo de substância.

BORGES *et al.* (2000) investigaram a presença de resíduos de antimicrobianos no leite utilizando 533 amostras de leite pasteurizado padronizado no estado de Goiás, no período de junho de 1997 a agosto de 1998. O método utilizado para a pesquisa baseou-se na difusão de resíduos de antimicrobianos em ágar, tendo o *Bacillus subtilis* e o *Geobacillus stearothermophilus* como micro-organismos teste. Encontraram-se resíduos em 9,95% das amostras, sendo que 32,5% das 98 marcas comerciais apresentaram-se positivas.

PORTO *et al.* (2002) avaliaram 10.464 amostras de leite cru produzido na região sudeste do Rio Grande do Sul, no período de abril de 1998 a março de 1999. Utilizou-se o teste Snap para detecção de resíduos de antibióticos beta-lactâmicos e resultados positivos foram observados em 1,16%. Porém, notou-se uma diferença em relação ao mês de coleta e análise, sendo que as épocas com maior índice de leite com resíduos de beta-lactâmicos foram maio, no final do outono, julho e agosto. Nesta época do ano, os rigores climáticos afetam os animais, os quais ficam mais sujeitos a enfermidades, o que é agravado pelas carências alimentares em propriedades onde os produtores não fazem reservas de alimentos para o período desfavorável. O maior uso de antimicrobianos, aliado à tentativa de incrementar o volume de produção de leite em um período de entressafra, pode ter

contribuído para a elevação dos índices de resíduos de antimicrobianos no leite nestes meses. No entanto, ALVES (2006) verificou que a presença dos resíduos de inibidores microbianos em leite cru em propriedades de Minas Gerais ocorreu somente na primavera e no verão (7,6% e 8,1%, respectivamente). Este período coincidiu com o período das chuvas, e também a maior ocorrência de casos de mastite nos rebanhos, ou seja, maior número de animais afetados e em tratamento.

HOTTA (2003) analisou 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 (beta-lactâmicos e tetraciclinas), Charm-SL (beta-lactâmicos e tetraciclinas), Delvotest-SP e Copan.

RUELA (2003), utilizando um método de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), analisou 53 amostras de leite comercializado no Brasil. O método utilizado apresentou limites de detecção de 10 ng/mL para oxitetraciclina, 15 ng/mL para tetraciclina e 40 ng/mL para clortetraciclina. Em apenas uma amostra (1,9%), foi detectada a presença de quantidade significativa de oxitetraciclina (22 ng/mL). Entretanto, BRITO (2004), também utilizando o método de CLAE, analisou 55 amostras de leite no estado de Minas Gerais e 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 µg/L para ampicilina e 3,0 µg/L para penicilina.

LEME *et al.* (2004) 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. Foi utilizado o método Delvotest-SP. Do total de amostras analisadas, 0,66% apresentou resultado positivo para presença de 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 Microplate. A presença de resíduos de antimicrobianos foi detectada em 24,26% das amostras analisadas.

Quadro 3. Ocorrência de resíduos de antimicrobianos (%) em leite no Brasil nos últimos anos

Autor	Ano	Cidade/Estado	Teste	Resultado positivo (%)	Tipo de leite	Nº amostras
MAGALHÃES	1995	Belo Horizonte/MG	TTC	15,83	A, B, C e Integral Fazenda	120
LOPES <i>et al.</i>	1998	Campinas/SP	Delvotest-P	7,90	A, B e C	178
BORGES <i>et al.</i>	2000	GO	Difusão em ágar	9,95	B e C	533
PORTO <i>et al.</i>	2002	RS	Snap β -lactâmicos	1,16	Cru	10.464
HOTTA	2003	MG	Snap, Charm-SL, Delvotest-SP e Copan	21,00	Cru	200
RUELA	2003	Vários estados	CLAE ^a	1,90	A, B, C e UHT	53
BRITO	2004	MG	CLAE ^b	40,00	A, B, C e UHT	55
LEME <i>et al.</i>	2004	São Paulo/SP	Delvotest-SP	0,66	A, B, C e UHT	1500
TENÓRIO	2007	Belo Horizonte/MG	Copan Microplate	24,26	Cru	136
BANDO <i>et al.</i>	2009	PR	Kits imuno-enzimáticos	41,30	Pasteurizado	151
MATTOS <i>et al.</i>	2010	PE	Charm MRL Test	1,89	Cru	53
BASTOS <i>et al.</i>	2010	MG	Delvotest Accelerator	1,00	Cru	300

Fonte: Adaptado de vários autores

Legenda:

^aCLAE: Cromatografia Líquida de Alta Eficiência utilizada na detecção de tetraciclinas, com limites de detecção de 10 ng/mL (oxitetraciclina), 15 ng/mL (tetraciclina) e 40 ng/mL (clortetraciclina).

^bCLAE: Cromatografia Líquida de Alta Eficiência utilizada na detecção de beta-lactâmicos, com limites de detecção de 4,0 μ g/L (ampicilina), e 3,0 μ g/L (penicilina G).

BANDO *et al.* (2009) analisaram 151 amostras de leite pasteurizado coletadas em cidades do Paraná, no período de março de 2005 a abril de 2006. Para a detecção de resíduos de beta-lactâmicos, tetraciclinas e gentamicina, foram utilizados kits Snap específicos para as respectivas drogas. Os resíduos de neomicina, estreptomicina-diidroestreptomicina e cloranfenicol foram determinados por kits imunoenzimáticos quantitativos sendo encontrados resíduos em três, duas e quatro amostras, respectivamente.

Destas, nenhuma das amostras que continham neomicina estavam acima do LMR (500 ppb), 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.

MATTOS *et al.* (2010) coletaram 53 amostras de propriedades rurais do agreste de Pernambuco e analisaram quanto a presença de antimicrobianos beta-lactâmicos utilizando o kit Charm MRL Test. Os autores observaram a presença de 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.

BASTOS *et al.* (2010) 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 equipamento Delvotest[®] 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.

3. Objetivos

3.1 Objetivo Geral

Avaliar a eficiência do kit de inibição microbiana Eclipse 50[®] (Zeu Inmunotec) na detecção de resíduos de antimicrobianos em leite cru.

3.2. Objetivos Específicos

- Avaliar a eficiência, sensibilidade e especificidade do kit Eclipse 50[®] na detecção de resíduos de antimicrobianos em leite inoculado com a concentração declarada pelo fabricante como limite mínimo de detecção do kit;

- Avaliar a eficiência, sensibilidade e especificidade do kit Eclipse 50[®] na detecção de resíduos de antimicrobianos em leite inoculado com a concentração referente ao Limite Máximo de Resíduos (LMR);
- Avaliar a facilidade de manipulação e execução do kit Eclipse 50[®].

4. Material e Métodos

Os procedimentos de avaliação do kit Eclipse 50[®] (Zeu Inmunotec) seguiram as recomendações prescritas no Guia para Validação de Métodos EURACHEM (1998). As análises foram realizadas seguindo criteriosamente as recomendações e cuidados do fabricante, descritos no manual de instruções do respectivo kit (ANEXO 1). Todos os procedimentos foram realizados em capela de fluxo laminar sob condições assépticas, utilizando material esterilizado, no Laboratório de Microbiologia de Alimentos do Departamento de Tecnologia e Inspeção de Produtos de Origem Animal da Escola de Veterinária da UFMG em Belo Horizonte - MG.

Foram utilizadas soluções-padrão preparadas com 19 diferentes antimicrobianos que foram adicionadas em amostra de leite isento de resíduos, em duas concentrações. As soluções-padrão utilizadas na adição das amostras foram preparadas em solvente compatível com o kit (ANEXOS 3 e 4), seguindo recomendações descritas internacionalmente (CEN standard, 1999).

A adição de amostras consistiu na inoculação de soluções-padrão dos analitos pesquisados em uma amostra branca da matriz (amostra de leite isenta de resíduos de antimicrobianos). Os níveis de adição foram estabelecidos considerando o limite mínimo de detecção declarado pelo fabricante (ANEXO 2) e o limite máximo de resíduo estabelecido pela legislação brasileira (Instrução Normativa nº42/1999/MAPA), conforme BRASIL (1999). Para os antimicrobianos que não possuem limite estabelecido no País, limites legais estabelecidos pelo *Codex Alimentarius* ou por

legislação da União Europeia foram adotados.

Os testes foram analisados em dois níveis de concentração do antimicrobiano com 30 repetições para cada nível. O nível 1 (N1) foi equivalente ao limite mínimo de detecção declarado pelo fabricante e o nível 2 (N2) equivalente ao limite máximo de resíduos estabelecido pela legislação brasileira

(LMR). Alguns antimicrobianos tinham o limite de detecção declarado pelo fabricante (N1) colocado com uma faixa de concentração, sendo testados o limite inferior (N1 I) e o limite superior (N1 S) dessa faixa.

O Quadro 4 mostra a relação dos antimicrobianos e as concentrações estabelecidas para cada nível.

Quadro 4. Antimicrobianos utilizados no experimento e suas respectivas concentrações expressas em partes por bilhão (ppb)

Antimicrobiano	Concentrações (ppb)	
	Nível 1	Nível 2
β-lactâmicos		
Penicilina G	4	4*
Amoxicilina	4	4*
Ampicilina	4 –5	4*
Cloxacilina	25	30**
Ceftiofur	100	100*
Tetraciclina		
Tetraciclina	100	100*
Doxiciclina	100	100*
Oxitetraciclina	100	100*
Clortetraciclina	ND	100*
Macrolídeos		
Eritromicina	400 -- 800	40*
Tilosina	80 -- 100	100***
Aminoglicosídeos		
Estreptomicina	2000	200*
Gentamicina	400	200***
Neomicina	1500	500*
Sulfonamidas		
Sulfadiazina	100	100*
Sulfatiazol	100	100*
Sulfametoxazol	100	100*
Sulfametoxipiridazina	100	100*
Lincosamidas		
Lincomicina	150 -- 300	150***

Nível 1= Limite de detecção declarado pelo fabricante (Zeu Immunotec[®]); ND= Não declarado pelo fabricante

Nível 2= Limite máximo de resíduos – LMR: * IN42 (Brasil, 1999); ** Regulamento (UE) nº 37/2010 (UNIÃO...,2010); *** OFFICIAL STANDARDS – Codex Alimentarius (2011)

4.1. Preparo das Soluções-Padrão

O preparo das soluções-padrão foi feito no Laboratório de Resíduos de Medicamentos Veterinários do LANAGRO-MG em Pedro Leopoldo - MG. Foram utilizados 19 padrões de antimicrobianos de seis classes distintas, todos da marca Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA).

Foram utilizados da classe dos beta-lactâmicos: penicilina G, amoxicilina, ampicilina, cloxacilina e ceftiofur; das tetraciclina: tetraciclina, oxitetraciclina, doxiciclina e clortetraciclina; dos macrolídeos: eritromicina e tilosina; dos aminoglicosídeos: estreptomicina, gentamicina e neomicina; das sulfonamidas: sulfadiazina, sulfametoxipiridazina, sulfametoxazol e sulfatiazol; e das lincosamidas: lincomicina.

As soluções-estoque foram preparadas pela pesagem do composto em balança analítica com sensibilidade de 0,00001g e dissolução em solvente apropriado, considerando-se sempre, a potência declarada pelo fabricante ou, na falta desta, a pureza do sal e seu conteúdo de água, e calculando-se a quantidade de padrão que contivesse somente a base seca do antimicrobiano. Como foram as mesmas soluções utilizadas nos métodos cromatográficos confirmatórios do LANAGRO/MG, fatores como o solvente utilizado e as condições de armazenamento foram aqueles indicados na metodologia própria para cada classe: assim, beta-lactâmicos foram dissolvidos em mistura de água:acetonitrila 50:50; aminoglicosídeos, em água destilada e deionizada; macrolídeos, lincosamidas, tetraciclina e sulfonamidas em metanol. Todas as soluções foram armazenadas em freezer a -15°C, pelo período máximo adequado para cada classe: beta-lactâmicos, por um mês; tetraciclina, macrolídeos, lincosamidas e sulfonamidas, por seis meses; e aminoglicosídeos, por um ano.

As soluções de trabalho foram preparadas no dia anterior ao uso, diluindo-se suas respectivas soluções-estoque em água destilada e deionizada. Quando utilizadas por

mais de um dia, as soluções eram armazenadas em freezer a -18°C.

4.2. Obtenção do leite isento de resíduos de inibidores

O leite cru isento de resíduos de inibidores utilizado no experimento foi proveniente de uma propriedade localizada nas proximidades do LANAGRO/MG em Pedro Leopoldo - MG, sendo o mesmo leite também utilizado pelo LANAGRO/MG em suas análises.

Em cada dia da coleta, o leite foi ordenhado manualmente em recipiente de vidro estéril, refrigerado e acondicionado em caixa isotérmica até a chegada ao Laboratório de Microbiologia de Alimentos do Departamento de Tecnologia e Inspeção de Produtos de Origem Animal da Escola de Veterinária da UFMG. Duas alíquotas do leite (40 mL do leite) foram coletadas, acondicionadas em frascos contendo os conservantes azidiol para análise de CBT (contagem bacteriana total) e bronopol para análises de CCS (contagem de células somáticas) e de composição do leite, e enviadas ao Laboratório de Análise da Qualidade do Leite (LabUFMG). A CBT foi realizada no equipamento eletrônico BactoCount IBC[®] (Bentley Instruments Incorporated; Chaska, EUA) segundo IDF (1991), e a CCS segundo IDF (1995), determinada pelo princípio de citometria de fluxo no equipamento eletrônico CombiScope FTIR 400[®] (Delta Instruments; Drachten, Holanda). A composição do leite (determinação dos teores de gordura, proteína, lactose, extrato seco desengordurado e total) também foi realizada no equipamento eletrônico CombiScope FTIR 400[®], segundo IDF (2000) por absorção de comprimento de onda no infravermelho médio. O restante do leite foi mantido sob refrigeração a 4°C e utilizado na preparação das soluções dos diferentes antimicrobianos.

4.3. Controles analíticos

Durante o experimento, controles analíticos foram realizados para garantir a confiabilidade dos resultados. Estes controles foram: aferição periódica da temperatura do banho-maria; análises de amostras de leite isento de resíduos de antimicrobianos (controle negativo ou branco), análises de amostras de leite adicionado de três vezes a concentração de antimicrobiano que o kit é capaz de detectar (controle positivo); análises de amostras de leite adicionadas dos solventes utilizados em algumas soluções de antimicrobianos (metanol e acetonitrila) na concentração máxima utilizada nas soluções para verificar se esses solventes gerariam alguma inibição ou interferência no kit; e determinação da acidez titulável (°D) do leite utilizado. A acidez titulável foi determinada segundo a Instrução Normativa n° 68 (BRASIL, 2006).

4.4. Análises no Kit Eclipse 50[®]

Para a realização das análises no kit Eclipse 50[®], o banho-maria foi ligado aproximadamente 30 minutos antes e mantidos a $65^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$. Após a preparação das concentrações (leite + solução de trabalho) 50 μL de cada diluição foram transferidos, com o auxílio de pipeta automática, para os orifícios da placa teste até completar 30 orifícios. As amostras foram devidamente identificadas e as placas foram então incubadas em banho-maria por 2 horas e 15 minutos, tempo este recomendado pelo fabricante. Após esse período, conferiu-se se os controles negativos (branco) realmente estavam negativos e então, foi realizada a leitura visual dos resultados pela observação de coloração. Quando o orifício permanecia violeta, a amostra era considerada positiva para presença de resíduos de antimicrobianos, quando houve alteração para amarelo, a amostra foi considerada negativa. A coloração entre violeta e amarelo determina resultado suspeito, que no presente trabalho considerou-se como resultado positivo, por haver presença de resíduos em concentrações próximas dos limites de detecção dos testes.

4.5. Avaliação dos resultados e análise estatística

A avaliação do Kit Eclipse 50[®] foi realizada no presente trabalho pela observação dos resultados (positivos/suspeitos e negativos) e as respostas obtidas foram submetidas à análise estatística descritiva (SAMPAIO, 2002) e não paramétrica, utilizando-se o teste de MacNemar (SIEGEL e CASTELLAN, 1988).

Para a avaliação da especificidade foram utilizadas amostras brancas preparadas com o leite isento de resíduos. Para a determinação da sensibilidade, amostras brancas (do mesmo leite) foram adicionadas de diferentes concentrações dos antimicrobianos citados. Considerou-se a sensibilidade do kit como a capacidade do mesmo apresentar resultado positivo na presença de resíduos de antimicrobianos na concentração conhecida; e a especificidade como a capacidade do kit apresentar resultado negativo na ausência de resíduos de antimicrobianos.

Além dos parâmetros citados acima, também foi feita uma avaliação dos resultados com base na Decisão 657/2002 da Comunidade Europeia (CE, 2002). Esta decisão prevê normas para os métodos a serem utilizados nas análises de amostras oficiais. Para métodos qualitativos de triagem, a decisão exige apenas que a técnica esteja validada e apresente uma taxa de resultados falso-negativos ($\text{CC}\beta$) abaixo de 5% no nível de resíduos requerido, além da especificidade, que é um requisito geral. A capacidade de detecção ($\text{CC}\beta$) refere-se ao teor mais baixo de uma substância que pode ser detectado, identificado e/ou quantificado numa amostra com uma probabilidade de erro β que é definido como 5%. Este erro refere-se à probabilidade de a amostra analisada ser, na realidade, não conforme, apesar de se ter obtido um resultado conforme (falsa decisão conforme).

5. Resultados e Discussão

5.1. Qualidade do leite utilizado no experimento e controles analíticos

Os resultados de qualidade do leite utilizado encontram-se na Tabela 2. Os baixos valores de CCS e CBT podem ser explicados pelo modo de criação dos animais e pela coleta asséptica do leite. O leite foi proveniente de uma primípara criada com poucos animais, ordenha manual e bezerro ao pé que mamava a primeira porção do leite em todos os tetos.

Após a retirada do bezerro, o leite era ordenhado diretamente num recipiente de vidro estéril e imediatamente refrigerado.

Os valores de acidez titulável variaram de 14,2 a 16,2 °D, não extrapolando os valores estabelecidos pela Instrução Normativa nº 62, segundo BRASIL (2011). A acidez titulável é uma importante análise a ser executada ao se trabalhar com kits de inibição microbiana, pois o leite com acidez elevada leva à mudança de cor do indicador de pH do kit, podendo gerar resultados falso-negativos.

Tabela 2. Resultados médios da qualidade do leite utilizado no experimento em comparação com a qualidade estabelecida pela legislação brasileira

Parâmetros	1ª coleta	2ª coleta	Valores de Referência*
CBT (UFC/mL)	1.000	1.000	600.000 (máx.)
CCS (cél./ mL)	29.000	5.000	600.000 (máx.)
GORDURA (g/100 g)	2,51	3,04	3,0 (mín.)
PROTEÍNA (g/100 g)	3,00	2,84	2,9 (mín.)
LACTOSE (g/100 g)	4,72	4,59	4,3**(mín.)
ESD (g/100 g)	8,78	8,65	8,4 (mín.)
EST (g/100 g)	11,29	11,69	11,4 (mín.)
ACIDEZ TITULÁVEL (°D)	14,3	16,2	14 a 18

* Instrução Normativa nº 62 (BRASIL, 2011)

** RIISPOA

A temperatura do banho-maria foi aferida constantemente durante todo o experimento e manteve-se sempre entre 64,5 e 65,5°C. Na leitura do resultado, que foi feita após 2 horas e 15 minutos de incubação (tempo indicado no manual de instruções do kit), 100% dos controles negativos (branco) foram negativos, 100% dos controles positivos foram positivos e 100% das amostras adicionadas dos solventes utilizados nas soluções dos antimicrobianos foram negativas, indicando que as concentrações utilizadas nas soluções não são capazes de provocar inibição do micro-organismo do kit.

capaz de detectar a presença da maioria dos antimicrobianos nas concentrações mínimas declaradas pelo fabricante (Nível 1). Em relação ao LMR (Nível 2), o kit apresentou bons resultados, com exceção para os aminoglicosídeos, a eritromicina e a lincomicina.

Em relação à especificidade, todas as amostras brancas testadas geraram resultado negativo derivando, então, em uma especificidade de 100% para o kit estudado.

A seguir, os resultados serão apresentados e discutidos por grupo de antimicrobianos. Para os cálculos estatísticos e para o cálculo da sensibilidade, os resultados suspeitos foram considerados positivos, visto que se trata de um teste de triagem no qual resultados suspeitos indicam a presença de resíduos de antimicrobiano em concentrações próximas ao limite de detecção do kit.

5.2. Avaliação da eficiência do kit Eclipse 50®

O Kit Eclipse 50® foi avaliado quanto à detecção de vários antimicrobianos em duas concentrações. Verificou-se que este teste foi

Entretanto, optou-se por expor os resultados suspeitos separadamente dos positivos nas tabelas para permitir uma melhor comparação da eficiência do teste entre os diferentes antimicrobianos.

5.2.1. Beta-lactâmicos

Em relação aos antimicrobianos do grupo dos beta-lactâmicos, o teste detectou as

concentrações testadas nos dois níveis em todas as amostras. O kit foi sensível para detectar as concentrações informadas pelo fabricante (nível 1) e as concentrações estabelecidas pelo LMR (nível 2), como está colocado na Tabela 3. Todos os resultados foram estatisticamente significativos ($p < 0,05$) quando comparados com o controle negativo (branco).

Tabela 3. Detecção de antimicrobianos do grupo dos beta-lactâmicos em leite em dois níveis de concentração

Antimicrobiano	Nível	ppb	Positivo		Suspeito		Negativo		Resultado (Branco x Nível)
			Nº	%	Nº	%	Nº	%	
Penicilina G	N1	4	28	93,3	2	6,7	0	0	$p < 0,05$
	N2	4	28	93,3	2	6,7	0	0	$p < 0,05$
Amoxicilina	N1	4	30	100	0	0	0	0	$p < 0,05$
	N2	4	30	100	0	0	0	0	$p < 0,05$
Ampicilina	N1 S	5	30	100	0	0	0	0	$p < 0,05$
	N1 I	4	30	100	0	0	0	0	$p < 0,05$
	N2	4	30	100	0	0	0	0	$p < 0,05$
Cloxacilina	N1	25	30	100	0	0	0	0	$p < 0,05$
	N2*	30	30	100	0	0	0	0	$p < 0,05$
Ceftiofur	N1	100	30	100	0	0	0	0	$p < 0,05$
	N2	100	30	100	0	0	0	0	$p < 0,05$

N1= Limite de detecção declarado pelo fabricante S: Superior I: Inferior

N2= LMR; N2*= LMR UE

Como era esperado, o kit Eclipse 50[®] apresentou uma ótima sensibilidade para a classe dos beta-lactâmicos nos dois níveis testados (Tabelas 4 e 5). Para os cinco antimicrobianos testados, obteve-se uma sensibilidade de 100%. Resultados semelhantes foram encontrados por TENÓRIO *et al.* (2009) que trabalharam com duas versões do kit COPAN ATK P & S (Microplate e Single). Este teste utiliza o mesmo princípio do Eclipse 50[®] e também tem como micro-organismo teste o *Geobacillus stearothermophilus* var.

calidolactis. Para a penicilina G, inclusive para o nível declarado pelo fabricante que era inferior ao LMR (2,5 ppb), ambas as versões do kit COPAN apresentaram 100% de sensibilidade. Já LAGE (2010), avaliando os kits Charm[®] Cow Side II Test e Charm[®] Blue Yellow II Test obteve resultado semelhante apenas com o primeiro. O segundo kit apresentou uma sensibilidade inferior, principalmente para a penicilina G que foi detectada em apenas 50% das amostras testadas com a concentração do LMR (4 ppb).

Tabela 4. Sensibilidade e especificidade (%) na detecção do nível 1 para os antimicrobianos do grupo dos beta-lactâmicos

Antimicrobiano	Nível 1 (ppb)	Sensibilidade (%)	Especificidade (%)
Penicilina G	4	100	100
Amoxicilina	4	100	100
Ampicilina	4 - 5	100	100
Cloxacilina	25	100	100
Ceftiofur	100	100	100

Tabela 5. Sensibilidade e especificidade (%) na detecção de concentrações de antimicrobianos do grupo dos beta-lactâmicos referentes aos LMR (Nível 2)

Antimicrobiano	Nível 2 (ppb)	Sensibilidade (%)	Especificidade (%)
Penicilina G	4	100	100
Amoxicilina	4	100	100
Ampicilina	4	100	100
Cloxacilina	30	100	100
Ceftiofur	100	100	100

A alta sensibilidade dos kits de inibição microbiana em relação aos beta-lactâmicos é de extrema importância, visto que, os antimicrobianos dessa classe são um dos mais utilizados na pecuária leiteira, com destaque para a penicilina (LOPES *et al.*, 2002; PONTES NETO *et al.*, 2005).

5.2.2. Tetraciclina

Os métodos de inibição do crescimento microbiano encontrados no mercado eram falhos para a detecção de resíduos de antimicrobianos do grupo das tetraciclina em leite em concentrações estabelecidas pela legislação brasileira (LMR), fato este preocupante devido as tetraciclina serem bastante utilizadas pelos produtores de leite. HOTTA (2003) testou diferentes kits para detecção de resíduos de antimicrobianos em leite e observou que os métodos imunoenzimáticos (Snap tetraciclina) e de receptores (Charm SL tetraciclina) detectaram os resíduos de tetraciclina na concentração de 100 ppb, que é o limite

máximo de resíduos (LMR) permitido pela legislação brasileira. No entanto, os kits baseados no método de inibição microbiana (Delvotest SP, COPAN ATK P&S Single e COPAN ATK P&S Microplate) não detectaram os resíduos nessa concentração. Da mesma forma, TENÓRIO *et al.* (2009) realizaram um estudo com os testes de inibição microbiana COPAN Microplate e COPAN Single e observou que a sensibilidade de ambos foi baixa na concentração do LMR e na concentração indicada pelo fabricante (100 ppb para o COPAN Microplate e 150 ppb para o COPAN Single).

Diferentemente do que foi colocado acima, o Kit Eclipse 50[®] foi eficaz na detecção dos resíduos de tetraciclina na concentração estabelecida pela legislação, que coincide com o limite de detecção declarado pelo fabricante (100 ppb), como pode ser observado nas tabelas 6, 7 e 8.

Como foi colocado na tabela 6, o fabricante não inclui a clortetraciclina na lista dos

antimicrobianos que o kit é capaz de detectar em determinadas concentrações (ANEXO 2). Entretanto, no presente trabalho, o teste apresentou resultado positivo em 100% das amostras adicionadas da mesma concentração

colocada para os outros antimicrobianos do grupo (100 ppb), indicando que a clortetraciclina poderia entrar para a lista declarada pelo fabricante.

Tabela 6. Detecção de antimicrobianos do grupo das tetraciclinas em leite em dois níveis de concentração

Antimicrobiano	Nível	ppb	Positivo		Suspeito		Negativo		Resultado (Branco x Nível)
			Nº	%	Nº	%	Nº	%	
Tetraciclina	N1	100	25	83,3	5	16,7	0	0	p<0,05
	N2	100	25	83,3	5	16,7	0	0	p<0,05
Doxiciclina	N1	100	29	96,7	1	3,3	0	0	p<0,05
	N2	100	29	96,7	1	3,3	0	0	p<0,05
Oxitetraciclina	N1	100	26	86,7	4	13,3	0	0	p<0,05
	N2	100	26	86,7	4	13,3	0	0	p<0,05
Clortetraciclina	N1	*	30	100	0	0	0	0	p<0,05
	N2	100	30	100	0	0	0	0	p<0,05

N1= Limite de detecção declarado pelo fabricante * Não declarado pelo fabricante
N2= LMR

Tabela 7. Sensibilidade e especificidade (%) na detecção do nível 1 para os antimicrobianos do grupo das tetraciclinas

Antimicrobiano	Nível 1 (ppb)	Sensibilidade (%)	Especificidade (%)
Tetraciclina	100	100	100
Doxiciclina	100	100	100
Oxitetraciclina	100	100	100
Clortetraciclina	100	100	100

Tabela 8. Sensibilidade e especificidade (%) na detecção de concentrações de antimicrobianos do grupo das tetraciclinas referentes aos LMR (Nível 2)

Antimicrobiano	Nível 2 (ppb)	Sensibilidade (%)	Especificidade (%)
Tetraciclina	100	100	100
Doxiciclina	100	100	100
Oxitetraciclina	100	100	100
Clortetraciclina	100	100	100

LAGE (2010) obteve resultados semelhantes testando os kits Charm® Cow Side II Test e Charm® Blue Yellow II Test para a tetraciclina e para a oxitetraciclina.

5.2.3. Macrolídeos

Na avaliação do kit para a detecção dos resíduos de eritromicina, um dos antimicrobianos do grupo dos macrolídeos, o teste não apresentou uma boa sensibilidade na concentração do LMR (N2), como mostrado nas Tabelas 9 e 11. A sensibilidade foi de apenas 63,3% com 12 amostras consideradas suspeitas, sete positivas e 11 negativas. Este resultado já era esperado, visto que a faixa de detecção declarada pelo fabricante é a partir de 400 ppb (10 vezes superior ao LMR). Nesta faixa de detecção

declarada pelo fabricante (N1), o kit obteve uma sensibilidade de 100% (Tabela 10). Estes resultados mostram que o kit cumpre o que é declarado pelo fabricante, mas não é eficaz na detecção de resíduos de eritromicina na concentração exigida na legislação brasileira. De acordo com a Decisão 657/2002 da Comunidade Europeia (CE, 2002), para ser eficaz o teste deve apresentar uma sensibilidade de 95%, ou seja, um erro β de 5%.

Os kits testados por TENÓRIO *et al.* (2009) e LAGE (2010) também não foram eficazes na detecção da eritromicina no nível do LMR, confirmando a baixa sensibilidade do *Geobacillus stearothermophilus* var. *calidolactis* frente a este antimicrobiano.

Tabela 9. Detecção de antimicrobianos do grupo dos macrolídeos em leite em dois níveis de concentração

Antimicrobiano	Nível	ppb	Positivo		Suspeito		Negativo		Resultado (Branco x Nível)
			Nº	%	Nº	%	Nº	%	
Eritromicina	N1 S	800	30	100	0	0	0	0	p<0,05
	N1 I	400	30	100	0	0	0	0	p<0,05
	N2	40	7	23,3	12	40,0	11	36,7	p<0,05
Tilosina	N1 S	100	30	100	0	0	0	0	p<0,05
	N1 I	80	30	100	0	0	0	0	p<0,05
	N2*	100	30	100	0	0	0	0	p<0,05

N1= Limite de detecção declarado pelo fabricante S: Superior I: Inferior

N2= LMR; N2*= LMR *Codex Alimentarius*

Em relação à tilosina, a faixa mínima de detecção declarada pelo fabricante é de 80 a 100 ppb, sendo o limite superior (100 ppb) correspondente ao LMR do *Codex Alimentarius* para este antimicrobiano. O kit Eclipse 50® foi capaz de detectar as duas concentrações de resíduos em 100% das amostras analisadas. Os testes COPAN ATK P&S Single e COPAN ATK P&S Microplate testados por TENÓRIO *et al.* (2009) foram

capazes de detectar as concentrações de 100 ppb e 75 ppb de tilosina, respectivamente. O fabricante dos kits Charm® Cow Side II Test e Charm® Blue Yellow II Test testados por LAGE (2010) colocaram como limite de detecção para tilosina a concentração de 20 ppb, porém apenas o primeiro foi capaz de detectar tal concentração. O segundo kit foi eficaz na detecção apenas na concentração de 50 ppb.

Tabela 10. Sensibilidade e especificidade (%) na detecção do nível 1 para os antimicrobianos do grupo dos macrolídeos

Antimicrobiano	Nível 1 (ppb)	Sensibilidade (%)	Especificidade (%)
Eritromicina	400 – 800	100	100
Tilosina	80 – 100	100	100

Tabela 11. Sensibilidade e especificidade (%) na detecção de concentrações de antimicrobianos do grupo dos macrolídeos referentes aos LMR (Nível 2)

Antimicrobiano	Nível 2 (ppb)	Sensibilidade (%)	Especificidade (%)
Eritromicina	40	63,3	100
Tilosina	100	100	100

5.2.4. Aminoglicosídeos

A classe dos aminoglicosídeos foi a que apresentou os piores resultados na detecção pelo kit Eclipse 50[®]. Os níveis mínimos de detecção declarados pelo fabricante para os três antimicrobianos testados são bem superiores ao LMR (Tabela 12). Entretanto, apenas para a estreptomicina o teste apresentou 100% de sensibilidade para o

nível 1. Para a detecção da gentamicina e neomicina os valores para sensibilidade foram de 90% e 80%, respectivamente (Tabela 13). Estes resultados indicam a necessidade do fabricante em rever estes níveis de detecção, uma vez que eles deveriam ser de no mínimo 95%, de acordo com a Decisão 657/2002 da Comunidade Europeia (CE, 2002).

Tabela 12. Detecção de antimicrobianos do grupo dos aminoglicosídeos em leite em dois níveis de concentração

Antimicrobiano	Nível	ppb	Positivo		Suspeito		Negativo		Resultado (Branco x Nível)
			Nº	%	Nº	%	Nº	%	
Estreptomicina	N1	2000	28	93,3	2	6,7	0	0	p<0,05
	N2	200	0	0	12	40,0	18	60	p>0,05
Gentamicina	N1	400	16	53,3	11	36,7	3	10	p<0,05
	N2*	200	4	13,3	18	60	8	26,7	p<0,05
Neomicina	N1	1500	21	70,0	3	10,0	6	20	p<0,05
	N2	500	5	16,7	14	46,7	11	36,7	p<0,05

N1= Limite de detecção declarado pelo fabricante

N2= LMR; N2*= LMR *Codex Alimentarius*

Em relação à detecção de concentrações referentes aos LMR (Nível 2) a sensibilidade foi baixa para os três antimicrobianos

testados. Os valores para a estreptomicina, gentamicina e neomicina foram de 40%, 73,3% e 63,4%, respectivamente (Tabela 14).

Tabela 13. Sensibilidade e especificidade (%) na detecção do nível 1 para os antimicrobianos do grupo dos aminoglicosídeos

Antimicrobiano	Nível 1 (ppb)	Sensibilidade (%)	Especificidade (%)
Estreptomicina	2000	100	100
Gentamicina	400	90	100
Neomicina	1500	80	100

Tabela 14. Sensibilidade e especificidade (%) na detecção de concentrações de antimicrobianos do grupo dos aminoglicosídeos referentes aos LMR (Nível 2)

Antimicrobiano	Nível 2 (ppb)	Sensibilidade (%)	Especificidade (%)
Estreptomicina	200	40	100
Gentamicina	200	73,3	100
Neomicina	500	63,4	100

5.2.5. Sulfonamidas

O teste em estudo foi eficaz na detecção dos quatro antimicrobianos testados no grupo das sulfonamidas, como exposto na tabela 15.

Para os quatro antimicrobianos a sensibilidade de detecção foi de 100% para a concentração de 100 ppb, concentração esta que coincide para os dois níveis estudados (Tabelas 16 e 17).

Tabela 15. Detecção de antimicrobianos do grupo das sulfonamidas em leite em dois níveis de concentração

Antimicrobiano	Nível	ppb	Positivo		Suspeito		Negativo		Resultado (Branco x Nível)
			Nº	%	Nº	%	Nº	%	
Sulfadiazina	N1	100	25	83,3	5	16,7	0	0	p<0,05
	N2	100	25	83,3	5	16,7	0	0	p<0,05
Sulfatiazol	N1	100	30	100	0	0	0	0	p<0,05
	N2	100	30	100	0	0	0	0	p<0,05
Sulfametoxazol	N1	100	30	100	0	0	0	0	p<0,05
	N2	100	30	100	0	0	0	0	p<0,05
Sulfametoxipiridazina	N1	100	30	100	0	0	0	0	p<0,05
	N1	100	30	100	0	0	0	0	p<0,05

N1= Limite de detecção declarado pelo fabricante

N2= LMR

Como explicado anteriormente, para o cálculo da sensibilidade, os resultados suspeitos foram considerados positivos, visto que se trata de um teste de triagem no qual

resultados suspeitos indicam a presença de resíduos de antimicrobiano em concentrações próximas ao limite de detecção do kit. Analisando a Tabela 15, pode-se afirmar que

o kit foi ligeiramente menos sensível para a sulfadiazina comparado aos outros três antimicrobianos, pois apresentou cinco

resultados suspeitos, enquanto os outros três tiveram as 30 amostras consideradas positivas.

Tabela 16. Sensibilidade e especificidade (%) na detecção do nível 1 para os antimicrobianos do grupo das sulfonamidas (Nível 1)

Antimicrobiano	Nível 1 (ppb)	Sensibilidade (%)	Especificidade (%)
Sulfadiazina	100	100	100
Sulfatiazol	100	100	100
Sulfametoxazol	100	100	100
Sulfametoxipiridazina	100	100	100

Tabela 17. Sensibilidade e especificidade (%) na detecção de concentrações de antimicrobianos do grupo das sulfonamidas referentes aos LMR (Nível 2)

Antimicrobiano	Nível 2 (ppb)	Sensibilidade (%)	Especificidade (%)
Sulfadiazina	100	100	100
Sulfatiazol	100	100	100
Sulfametoxazol	100	100	100
Sulfametoxipiridazina	100	100	100

5.2.6. Lincosamidas

A faixa mínima de detecção para lincomicina declarada pelo fabricante vai de 150 a 300 ppb sendo o limite inferior (150 ppb) correspondente ao LMR do *Codex Alimentarius* para este antimicrobiano.

Em relação ao limite superior da faixa de detecção declarada pelo fabricante (300 ppb), o kit foi eficaz na detecção, alcançando uma

sensibilidade de 100% (Tabelas 18 e 19). Para o limite inferior que coincide com o LMR do *Codex Alimentarius* (150 ppb) a sensibilidade foi de 80%, mas com 22 resultados considerados suspeitos (Tabelas 18 e 19). Como explicado anteriormente, esses resultados suspeitos entram no cálculo da sensibilidade como positivos. Este resultado indica que o fabricante deve rever os níveis de detecção declarados no manual do kit.

Tabela 18. Detecção da lincomicina em leite em dois níveis de concentração

Antimicrobiano	Nível	Ppb	Positivo		Suspeito		Negativo		Resultado (Branco x Nível)
			Nº	%	Nº	%	Nº	%	
Lincomicina	N1 S	300	30	100	0	0	0	0	p< 0,05
	N1 I	150	2	6,7	22	73,3	6	20	p<0,05
	N2*	150	2	6,7	22	73,3	6	20	p<0,05

N1= Limite de detecção declarado pelo fabricante S: Superior I: Inferior
N2= LMR; N2*= LMR *Codex Alimentarius*

Tabela 19. Sensibilidade e especificidade (%) na detecção de lincomicina (Nível 1 e 2)

Antimicrobiano	Nível 1 (ppb)	Sensibilidade (%)	Especificidade (%)
Lincomicina	150*	80	100
	300	100	100

*Limite que coincide com o nível 2

5.2.7. Comparação de resultados entre os grupos de antimicrobianos

percentual de detecção dos resíduos de antimicrobianos no limite mínimo de detecção declarado pelo fabricante (Nível 1).

A Figura 1 apresenta a comparação entre os grupos de antimicrobianos em relação ao

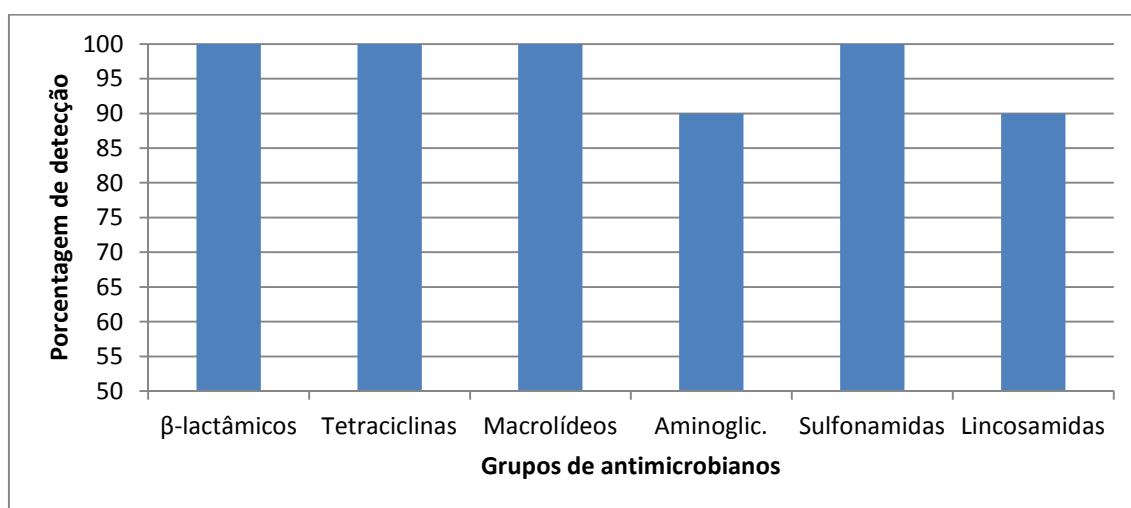


Figura 1. Porcentagem de detecção de resíduos de antimicrobianos no leite pelo kit Eclipse 50® no nível declarado pelo fabricante

Observa-se que neste nível de detecção, os grupos dos beta-lactâmicos, das tetraciclina, dos macrolídeos e das sulfonamidas apresentaram 100% de resultados positivos/suspeitos, ou seja, 100% de detecção. O grupo dos aminoglicosídeos e a lincomicina representando o grupo das lincosamidas apresentaram 90% de detecção (Figura 1).

A Figura 2 mostra a comparação entre os grupos de antimicrobianos em relação ao percentual de detecção dos resíduos de antimicrobianos no LMR (Nível 2). Neste nível três grupos apresentaram 100% de detecção, sendo eles os beta-lactâmicos, as tetraciclina e as sulfonamidas. Os grupos dos macrolídeos, lincosamidas e aminoglicosídeos apresentaram porcentagens de detecção de 85%, 80% e 58,9 %, respectivamente.

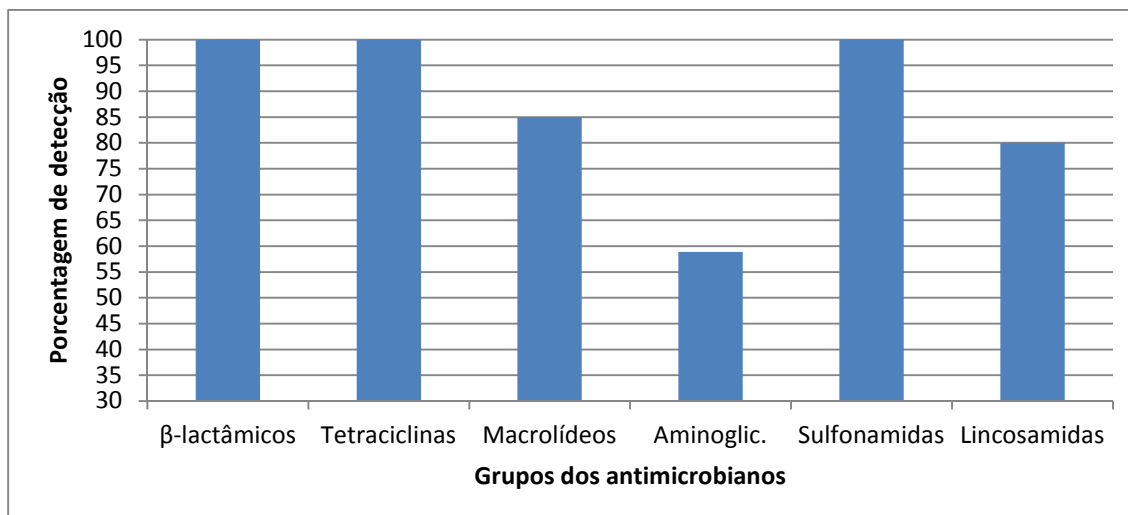


Figura 2. Porcentagem de detecção de resíduos de antimicrobianos no leite pelo do kit Eclipse 50[®] no nível do LMR

5.3. Avaliação dos resultados com base na Decisão 2002/657/CE

Como explicado anteriormente, a Decisão 657/2002 da Comunidade Europeia prevê normas para os métodos a serem utilizados nas análises de amostras oficiais. Para métodos qualitativos de triagem, a decisão exige apenas que a técnica esteja validada e apresente uma taxa de resultados falso-negativos ($CC\beta$) abaixo de 5% no nível de resíduos requerido, além da especificidade, que é um requisito geral. A capacidade de detecção ($CC\beta$) refere-se ao teor mais baixo de uma substância que pode ser detectado, identificado e/ou quantificado numa amostra com uma probabilidade de erro β que é

definido como 5%. Este erro refere-se à probabilidade de a amostra analisada ser, na realidade, não conforme, apesar de se ter obtido um resultado conforme (falsa decisão conforme).

O Quadro 5 apresenta os antimicrobianos que estão conformes ou não conformes considerando o erro β máximo de 5% para o nível mínimo de detecção declarado pelo fabricante (nível 1). Para este nível, os antimicrobianos não conformes foram gentamicina, neomicina e lincomicina (no limite inferior da faixa de detecção declarada pelo fabricante). Estes resultados indicam a necessidade do fabricante rever os níveis de detecção declarados no manual.

Quadro 5. Avaliação dos resultados de detecção de resíduos de antimicrobianos no leite pelo Kit Eclipse 50[®] de acordo com a Decisão 657/2002 da Comunidade Europeia para o nível declarado pelo fabricante

Antimicrobiano	ppb	erro β (%)	Conclusão
β-lactâmicos			
Penicilina G	4	0	CONFORME
Amoxicilina	4	0	CONFORME
Ampicilina	4 -- 5	0	CONFORME
Cloxacilina	25	0	CONFORME
Ceftiofur	100	0	CONFORME
Tetraciclina			
Tetraciclina	100	0	CONFORME
Doxiciclina	100	0	CONFORME
Oxitetraciclina	100	0	CONFORME
Clortetraciclina	100	0	CONFORME
Macrolídeos			
Eritromicina	400 --800	0	CONFORME
Tilosina	80 -- 100	0	CONFORME
Aminoglicosídeos			
Estreptomicina	2000	0	CONFORME
Gentamicina	400	10	NÃO CONFORME
Neomicina	1500	20	NÃO CONFORME
Sulfonamidas			
Sulfadiazina	100	0	CONFORME
Sulfatiazol	100	0	CONFORME
Sulfametoxazol	100	0	CONFORME
Sulfametoxipiridazina	100	0	CONFORME
Lincosamidas			
Lincomicina	150	20	NÃO CONFORME
Lincomicina	300	0	CONFORME

Em relação ao nível 2 (LMR), os resultados de cinco dos 19 antimicrobianos testados apresentaram-se não conformes, sendo eles a eritromicina, estreptomicina, gentamicina, neomicina e lincomicina. (Quadro 6). O kit Eclipse 50[®] não foi capaz de detectar os três antimicrobianos testados do grupo dos

aminoglicosídeos (estreptomicina, gentamicina e neomicina) no nível do LMR, mostrando a baixa sensibilidade do *Geobacillus stearothermophilus* var. *calidolactis* frente à esta classe de antimicrobiano.

Quadro 6. Avaliação dos resultados de detecção de resíduos de antimicrobianos no leite pelo Kit Eclipse 50[®] de acordo com a Decisão 657/2002 da Comunidade Europeia para o nível do LMR

Antimicrobiano	ppb	erro β (%)	Conclusão
β-lactâmicos			
Penicilina G	4	0	CONFORME
Amoxicilina	4	0	CONFORME
Ampicilina	4	0	CONFORME
Cloxacilina	30	0	CONFORME
Ceftiofur	100	0	CONFORME
Tetraciclina			
Tetraciclina	100	0	CONFORME
Doxiciclina	100	0	CONFORME
Oxitetraciclina	100	0	CONFORME
Clortetraciclina	100	0	CONFORME
Macrolídeos			
Eritromicina	40	36,7	NÃO CONFORME
Tilosina	100	0	CONFORME
Aminoglicosídeos			
Estreptomicina	200	60	NÃO CONFORME
Gentamicina	200	26,7	NÃO CONFORME
Neomicina	500	36,6	NÃO CONFORME
Sulfonamidas			
Sulfadiazina	100	0	CONFORME
Sulfatiazol	100	0	CONFORME
Sulfametoxazol	100	0	CONFORME
Sulfametoxipiridazina	100	0	CONFORME
Lincosamidas			
Lincomicina	150	20	NÃO CONFORME

5.4. Considerações sobre o Kit Eclipse 50[®]

O kit avaliado neste experimento é um teste qualitativo, sendo capaz de estabelecer se há ou não antimicrobianos no leite analisado, não informando qual o composto detectado e qual a sua concentração no leite, sendo então classificado como um teste de triagem.

A determinação efetiva de risco inaceitável da presença de resíduos de antimicrobianos no leite somente pode ser alcançada fazendo-se, após um teste de triagem, a identificação do composto e sua quantificação no produto.

A constatação de resultados positivos pode não significar risco para o consumidor, bem como resultados negativos podem não significar ausência de resíduos, uma vez que a amostra analisada pode conter antimicrobianos não detectáveis pelo teste ou estarem em níveis aquém de sua capacidade de detecção (LEME *et al.*, 2004).

Durante a realização das análises, observou-se a facilidade de manipulação do Kit Eclipse 50[®], sem a necessidade de muito treinamento para a realização dos testes. Entretanto, deve-se prestar bastante atenção no volume de amostra pipetado, conferindo sempre se a

ponteira não apresenta bolhas no meio do leite. Outro fator a ser sempre observado e medido é a temperatura do banho-maria ou da placa aquecedora, que para este kit deve ser de 65°C.

Para alguns antimicrobianos, houve dificuldades na interpretação dos resultados, pelo fato da cor verificada ser intermediária entre o positivo (violeta) e o negativo (amarelo). Estes resultados foram considerados como suspeitos. As leituras visuais são, em geral, subjetivas. Todos os testes que dão respostas baseadas em coloração deveriam vir acompanhados de um leitor fotométrico que daria maior credibilidade aos resultados encontrados.

6. Conclusões

O Kit Eclipse 50[®] foi eficaz na detecção de quase todos os antimicrobianos testados no nível declarado pelo fabricante, exceto para a gentamicina, neomicina e lincomicina (no limite inferior da faixa de detecção declarada pelo fabricante), indicando assim a necessidade do fabricante em rever os níveis de detecção declarados para estes três antimicrobianos.

Na detecção do nível do LMR, o Kit Eclipse 50[®] foi eficaz na detecção de 14 dos 19 antimicrobianos testados. Dentre esses 14 antimicrobianos, quatro são do grupo das tetraciclinas, antimicrobianos que não eram detectados no nível do LMR por alguns testes disponíveis no mercado. O teste não foi eficaz na detecção da eritromicina, estreptomicina, gentamicina, neomicina e lincomicina.

O Kit Eclipse 50[®] é um teste de fácil manipulação e execução, mas o analista deve seguir criteriosamente todas as recomendações do fabricante.

7. Considerações finais

A presença de resíduos de antimicrobianos no leite continua sendo um problema no leite produzido em muitas localidades no Brasil. Todos os que estão envolvidos na cadeia

produtiva do leite devem se conscientizar quanto às consequências geradas na saúde pública, na economia do País e na qualidade dos produtos lácteos brasileiros devido à presença desses resíduos no leite.

Consumidores no mundo estão cada vez mais preocupados com a segurança alimentar, principalmente pelo fato de o leite e de seus derivados serem bastante consumidos por crianças. Por isso, deve-se empregar o máximo de esforço possível para garantir a qualidade dos produtos lácteos e manter a sua boa imagem como produtos saudáveis.

Embora haja legislação que regulamente a presença destes resíduos em alimentos, algumas vezes não há rigor dos produtores em cumpri-la e nem fiscalização eficiente de órgãos competentes, fato que compromete a qualidade deste alimento tão amplamente consumido pela população.

Para que um plano de monitoramento e seu resultado sejam eficazes, deve-se primeiramente elaborar um bom plano de amostragem que atenda todo o leite coletado pela indústria. O plano de amostragem deve garantir que o leite de todos os fornecedores seja avaliado duas vezes ao mês, na forma de pool de fornecedores que compõem a rota de um caminhão. No entanto, amostras individuais de fornecedores devem ser coletadas para rastreabilidade em caso de positivas, sendo ideal a coleta no tanque de leite da propriedade por um responsável da indústria, antes do leite ser colocado no caminhão. Os fornecedores devem estar informados sobre o programa de monitoramento e as respectivas ações a serem tomadas em caso de se detectar leite positivo para antimicrobiano. Essas ações podem ser, por exemplo, suspensão no fornecimento do leite à indústria, por tempo determinado, até que o fornecedor tenha adotado e comprovado à indústria as medidas corretivas. Em casos recorrentes, a suspensão pode ser definitiva.

Além do controle, é muito importante o trabalho de esclarecimento e informação aos produtores sobre as práticas que podem resultar em resíduos no leite, as boas práticas de higiene e controle da qualidade do produto

dentro da fazenda e o acompanhamento periódico de todos os parâmetros de qualidade do leite do produtor. Com informação adequada e conhecimento, o produtor terá melhores condições de interferir em seu próprio sistema de produção, atingindo as metas de qualidade exigidas pelo mercado.

A educação e conscientização do produtor, acompanhadas de uma intensa fiscalização dos órgãos competentes e do emprego de métodos de detecção eficientes são necessários para obter-se um produto de qualidade, saudável e sem resíduos de antimicrobianos.

8. Referências Bibliográficas

AARESTROP, F. M. Veterinary drug usage and antimicrobial resistance in bacteria of animal origin. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*, n. 96 p.271–281, 2005.

ALVES, C. *Efeito de variações sazonais na qualidade do leite cru refrigerado de duas propriedades de Minas Gerais*. 2006. 80 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

BANDO, E.; OLIVEIRA, R. C.; FERREIRA, G. M. Z. *et al.* Occurrence of antimicrobial residues in pasteurized milk commercialized in the State of Paraná, Brazil. *Journal of Food Protection*, v. 72, n. 4, p. 911-914, 2009.

BARBERIO, A.; GIELT, H.; DALVIT, P. *In vitro* sensibilidade aos antimicrobianos de *Staphylococcus aureus* e coliformes isolados de mastite bovina na região do Veneto, Itália, no período de 1996-1999. *Napgama*, v. 5, n. 1, p. 3-10, 2002.

BASTOS, L. P. F.; SILVA, N. M. A.; SALOMÃO, V. S. C.; COUTINHO, N. C.; FONSECA, L. M.; LEITE, M. O.; CERQUEIRA, M. M. O. P. Detecção de resíduos de antimicrobianos no leite por método de inibição microbiana e sua

associação com acidez titulável. In: Congresso Brasileiro de Qualidade do Leite, 4, 2010, Florianópolis – SC. *Anais...* Florianópolis, 2010.

BORGES, G. T.; SANTANA, A.P.; MESQUITA, A. J. *et al.* Ocorrência de resíduos de antibióticos em leite pasteurizado integral e padronizado produzido e comercializado no Estado de Goiás. *Ciência Animal Brasileira*, v.1, n.1, p.59-63, 2000.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Decreto nº 30.691, de 29 de março de 1952, que aprova o novo Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal *Diário Oficial da União* de 07 de julho de 1952, Seção 1, p.10785 Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br>>. Acesso em 25 jan. 2012.

BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 42, de 20 de dezembro de 1999, que altera o Plano Nacional de Controle de Resíduos em Produto de Origem Animal – PNCR. Publicado no *Diário Oficial da União* de 22 de dezembro de 1999, Seção 1, p. 13. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br>>. Acesso em: 25 jan.. 2012.

BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº51, de 18 de setembro de 2002, que aprova os Regulamentos Técnicos de Produção, Identidade e Qualidade do Leite tipo A, do Leite tipo B, do Leite tipo C, do Leite Pasteurizado e do Leite Cru Refrigerado e o Regulamento Técnico da Coleta de Leite Cru Refrigerado e seu Transporte a Granel. Publicado no *Diário Oficial da União* de 20 de setembro de 2002, Seção 1, p. 13. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br>>. Acesso em: 22 dez. 2011.

BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 9, de 27 de junho de 2003, que proíbe a fabricação, a manipulação, o fracionamento, a comercialização, a importação e o uso dos princípios ativos cloranfenicol e nitrofuranos

e os produtos que contenham estes princípios ativos, para uso veterinário e suscetível de emprego na alimentação de todos os animais e insetos. Publicado no *Diário Oficial da União* de 30 de junho de 2003, Seção 1, p. 4. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br>>. Acesso em: 25 jan. 2012.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa N° 68, de 12 de dezembro de 2006. Métodos Analíticos Oficiais Físico-Químicos, para Controle de Leite e Produtos Lácteos. *Diário Oficial da União*, 14 de dezembro de 2006. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br>>. Acesso em: 25 jan. 2012.

BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa n°62, de 29 de dezembro de 2011, que altera a Instrução Normativa n°51, 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.agricultura.gov.br>>. Acesso em: 25 jan. 2012.

BRITO, R. B. *Desenvolvimento e validação de método por cromatografia líquida de alta eficiência para determinação de resíduos de antibióticos beta-lactâmicos*. 2004. 84f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

CE. Comissão das Comunidades Europeias. Decisão da Comissão 2002/657/CE, de 12 de agosto de 2002. Dá execução ao disposto na Diretiva 96/23/CE do Conselho relativamente ao desempenho de métodos analíticos e à interpretação dos resultados. *Jornal Oficial das Comunidades Europeias* L221, 17/08/2002, pp. 8-36, 2002.

CEN Standard - Guidance for the standardized evaluation of microbial inhibitor tests. *International Dairy Federation – Standard 183*: 1999. Disponível em: <<http://www.fil-idf.org>>. Acesso em: 20 de nov. de 2011

CERQUEIRA, M. M. O. P. Detecção de resíduos de antibióticos em leite – Testes disponíveis e considerações. In: BRITO, J.R.F. (Ed.) *Diagnóstico da qualidade do leite, impacto para a indústria e a questão dos resíduos de antibióticos*. Juiz de Fora – MG: Embrapa Gado de Leite, 2003. Cap. 7, p. 77-87.

CODEX Committee on residues of veterinary drugs in food. IDF News – News from Codex. *Bulletin of the International Dairy Federation (IDF)*, n. 317, 1996, 9p.

COSTA, E. O. Resíduo de antibiótico no leite: um risco a saúde do consumidor. *Higiene Alimentar*, v.10, n.44, p.15-17, 1996.

CULLOR, J. S. Tests for identifying antibiotic residues in milk: How well do they work? *Veterinary Medicine*, v.87, n.12, p.1235-1241, 1992.

DENOBILO, M. *Análise de resíduos dos antibióticos oxitetraciclina, tetraciclina, clortetraciclina e doxiciclina, em leite, por cromatografia líquida de alta eficiência*. 2002. 121p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, USP.

EURACHEM Guide: The Fitness for Purpose of Analytical Methods. United Kingdom: LGC (Teddington). 1998. 61 p.

FAGUNDES, C. M.; MOLIN, L. Interferência dos resíduos de antibióticos no controle de qualidade do leite e derivados. *Informe Agropecuário*, v. 13, n. 155, p. 24-30, 1988.

FAGUNDES, C. M. *Inibidores e controle de qualidade do leite*. Pelotas: Editora Universitária, 1997. 128p.

FAGUNDES, H. *Ocorrência de resíduo de antibiótico utilizado no tratamento de interrupção de lactação no início da lactação subsequente em animais com período seco recomendado*. 2003. 76 f. Dissertação (Mestrado em Qualidade Produtiva Animal) - Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2003.

FAO - FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. *FAOSTAT database*, 2012. Disponível em <<http://faostat.fao.org/>>. Acesso em: 27 fev. 2012.

GIGANTE, M. L. Importância da qualidade do leite no processamento de produtos lácteos. In: DÜRR, J. W. et al. (Org.) *O compromisso com a qualidade do leite no Brasil*. Passo Fundo – RS. Universidade de Passo Fundo, 2004. p. 235-254.

HOTTA, J. M. *Monitoramento de resíduos de antimicrobianos em diferentes pontos da cadeia produtiva do leite, comparando diferentes métodos de detecção*. 2003. 90f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG.

International IDF Standard 100B:1991: Milk and milk products – Enumeration of microorganisms – Colony count technique at 30°C. Bruxells, 1991, 3 f.

International IDF Standard 148A:1995: Milk – Enumeration of somatic cell. Bruxells, 1995, 8 f

International IDF Standard 141C:2000: Whole milk – determination of milk fat, protein and lactose content. Guidance on the operation of mid-infrared instruments. Bruxells, 2000, 15 f.

JONES, G. M.; SEYMOUR, E. H. Cowside antibiotic residue testing. *Journal of Dairy Science*, v. 71, p. 1691-1699, 1988.

KANG, J. M.; SEYMOUR, E. H. Occurrence of false-positive results of inhibitor on milk samples using the Delvotest SP assay. *Journal Food Protection*, v. 64, n. 8, p. 1-5, 2001.

LAGE, A. D. *Avaliação do Charm. Cow Side II Test e Charm. Blue Yellow II Test para a detecção de resíduos de antimicrobianos em leite*. 2010. 44f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária). Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG.

LEME, F. B. P.; DIAS, R. A.; RAMOS E SILVA E. O. T. et al. Presença de antimicrobianos de uso veterinário em amostras de diferentes tipos de leite comercializados na cidade de São Paulo. In: Congresso Brasileiro de Qualidade do Leite, 1, 2004, Passo Fundo – RS. *Anais...* Passo Fundo, 2004.

LINAGE, B., GONZALO, C., CARRIEDO, J. A. et al. Performance of blue-yellow screening test for antimicrobial detection in ovine milk. *Journal of Dairy Science*, 90:5374–5379, 2007.

LOPES, L. T.; GANDARA, A. L. N.; CRISTIANINI, M. Detecção de resíduos de antibióticos em leite comercializado na cidade de Campinas. *Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes*, v. 53, n. 301- 303, p. 64-67, 1998.

LOPES, M.O.; CARRARO, C. N. M.; VEIGA, D.R. et al. Levantamento do uso e detecção de resíduos de antimicrobianos no leite produzido na região metropolitana de Curitiba-PR. *Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes*, v.57, n.32, p. 233-235, 2002.

MAGALHÃES, N. A. *Detecção de resíduos de inibidores bacterianos em leite pasteurizado tipos “A”, “B”, “C” e “Integral/Fazenda” comercializados na Grande Belo Horizonte*. 1995. 98 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

MARTINS, M. A.; VAZ, A. K. Comparação entre o Delvotest® e o teste de coagulação pelo fermento lácteo para detecção de substâncias inibidoras no leite. *Hora Veterinária*, v. 19, n. 113, p. 53-55. jan/fev, 2000.

MATHUR, S.; SINGH, R. Antibiotic resistance in food lactic acid bacteria—a review. *International Journal of Food Microbiology*, 105 p. 281-295, 2005.

MATTOS, M. R.; BELOTI, V.; TAMANINI, R. *et al.* Qualidade do leite cru produzido na região do agreste de Pernambuco, Brasil. *Semina: Ciências Agrárias*, v. 31, n. 1, p. 173-182, 2010.

MITCHELL, J. M.; *et al.* Antimicrobial drug residues in milk and meat: causes, concerns, prevalence, regulations, tests, and tests performance. *Journal Food Protection*, v. 61, n. 6, p. 742-756, 1998.

OFFICIAL Standards - Veterinary Drug Residues in Food, MRLs Maximum Residue Limits 2011. *Codex Alimentarius*. Disponível em: <<http://www.codexalimentarius.net>> Acesso em: 11 Jan. 2012.

PEDERSEN, M.; SUHREN, G. Chemicalphysical confirmation tests ("higher" validation levels) for the detection of residues of antimicrobials in milk. *Bulletin of the International Dairy Federation (IDF)*, n. 358, p. 29-35, 2000.

PESSANHA, R. P.; GONTIJO FILHO P. P. Uso de antimicrobianos como promotores de crescimento e resistência em isolados de *Escherichia coli* e de Enterobacteriaceae lactose-negativa da microflora fecal de frangos de corte. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v. 53, n. 1, 2001.

PONTES NETTO, D.; LOPES, M. O.; OLIVEIRA, M. C. S. *et al.* Levantamento dos principais fármacos utilizados no rebanho leiteiro do Estado do Paraná. *Acta Scientiarum Animal Sciences*, v. 27, n. 1, p. 145-151, 2005.

PORTO, C. R.; ANSELMO, M. S.; TIMM, C. D. *et al.* Ocorrência de resíduos de antibióticos beta-lactâmicos no leite cru entregue à indústria na região sudeste do Rio Grande do Sul. *Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes*, v. 57, n. 327, p. 313-316, 2002.

PRODUTOS DO AGRONEGÓCIO: exportações, importações mundiais e inserção brasileira. *Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Relações Internacionais do Agronegócio.*

Brasília, 2008. 136 p. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br>>. Acesso em: 07 nov. 2011.

RUELA, I. C. A. *Determinação múltipla de resíduos de oxitetraciclina, tetraciclina e clortetraciclina em leite por cromatografia líquida de alta eficiência*. 2003. 76 f. Dissertação (Mestrado em Ciências de Alimentos) – Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

SAMPAIO, I.B.M. *Estatística aplicada à experimentação animal*. 2.ed. Belo Horizonte: Fundação de Ensino e Pesquisa em Medicina Veterinária e Zootecnia, 2002. 265p.

SIEGEL, S; CASTELLAN Jr., N. J. Nonparametric statistics. 2. ed. New York: Mc Graw Hill, 1988, 399 p.

SPINOSA, H. S. Considerações gerais sobre os antimicrobianos. In: SPINOSA, H. S.; GÓRNIK, S. L.; BERNARDI, M. M. *Farmacologia Aplicada à Medicina Veterinária*. 4ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 379-385, 2006.

TENÓRIO, C. G. M. S. C. *Avaliação da eficiência do teste COPAN (Microplate e Single) na detecção de resíduos de antimicrobianos no leite*. 2007. 71f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária). Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG.

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.

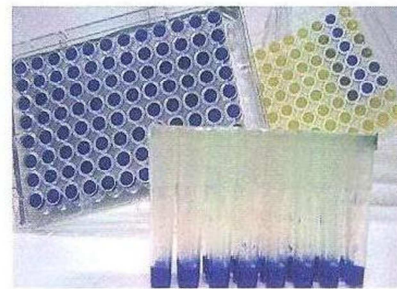
UNIÃO EUROPEIA. Regulamento (UE) nº 37/2010 da Comissão, de 22 de dezembro de 2009. Relativo a substâncias farmacologicamente ativas e respectiva classificação no que diz respeito aos limites máximos de resíduos nos alimentos de origem animal. *Jornal Oficial* nº L 15/1, 20 de janeiro de 2010, p.1-7

KIT ECLIPSE



Screening test for detection of antibiotic and sulfonamide residues in cow, sheep and goat milk

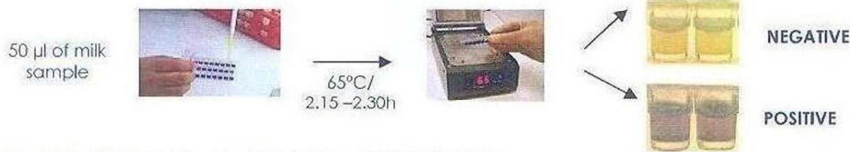
ECLIPSE is a broad-range screening test designed for the qualitative detection of antibiotics in milk, when present at levels above the recommended Maximum Residue Limits (MRLs). The method follows the European Commission Decision 91/180/EC and is based on the inhibition of *Geobacillus stearothermophilus* var. *calidolactis*. Samples are added to 96-well microplates containing a solid agar media, bacillus spores and a pH indicator. A colour change will occur when inhibitors are not present in the samples.



There are different ECLIPSE test kits available:

ECLIPSE 50: (Ref. : ZE/E50/96i, ZE/E50/288i)

- * One step kit producing results in about 2.30h.
- * Supplied in microtiter plates of 96 wells that can be split in singles.
- * Results interpretation by visual reading from the side of the well



ECLIPSE 100: (Ref. : ZE/E100/96i, ZE/E100/288i)

- * Test performed in two steps that take about 3.30 h
- * Supplied in microtiter plates of 96 wells that can be split into singles
- * Results interpretation by visual or photometrical reading

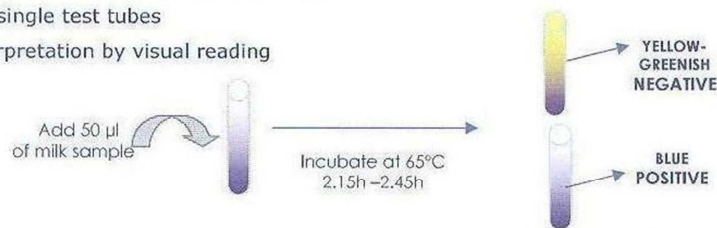


SCREENING PLUS: (Ref. : ZE/SC/96i, ZE/SC/288i)

- * Kit test optimized for detection of macrolides and aminoglycosides. Complementary to Eclipse 50/100
- * Test performed in two steps that take about 3.30 h. Supplied 96-wells microtiter plates

ECLIPSE FARM: (Ref. : ZE/EF25, ZE/E50)

- * One step kit producing results in about 2.30h.
- * Supplied in single test tubes
- * Results interpretation by visual reading



ANEXO 2 – Lista com os limites mínimos de detecção declarados pelo fabricante



INHIBIDOR	Eclipse 100 (ppb)	Eclipse 50 (ppb)	Eclipse Farm (ppb)	Screening Plus (ppb)
β-LACTAM				
Amoxicillin	4	4	4	4
Ampicillin	4	4-5	4-5	4
Cefalexin	100	75	100	80
Cefapirin	6	8	8	5
Cefalonium	20	20	-	-
Ceftifur	100	100	100	-
Cefazolin	50	35	-	-
Cloxacillin	35	25	35	25
Oxacillin	20	3-4	25	15
Penicillin G	3	4	4	4
TETRACYCLINES				
Doxycycline	100	100	100	50
Oxitetracline	100	100	100	100
Tetracycline	100	100	200	100
MACROLIDES				
Erytromicin	500	400-800	400-800	150
Tylosin	80	80-100	50	60
Spiramycin	>400	>400	>500	400
AMINOGLYCOSIDES				
Streptomycin	5.000	>2.000	>2.000	1500
Gentamycin	600	400	100	200
Neomycin	>2.000	1500	1.000	300
Kanamycin	5.000	>2.000	>2.000	3.000
SULFONAMIDES				
Sulfadiazine	100	100	200	-
Sulfamethacine	100	150	300	-
Sulfamethoxypridazine	100	100	-	-
Sulfanilamide	500	600	-	-
Sulfamethoxazole	50	100	-	-
Sulfathiazole	100	100	200	5.000
LICOSAMIDES				
Lincomycin	400	150-300	200	200
OTHERS				
Chloranphenicol	5.000	5.000	>5.000	3000