

CLARICE GEBARA MURARO SERRATE CORDEIRO TENÓRIO

**AVALIAÇÃO DA EFICIÊNCIA DO TESTE
COPAN (MICROPLATE E SINGLE) NA
DETECÇÃO DE RESÍDUOS DE
ANTIMICROBIANOS NO LEITE**

Dissertação apresentada à UFMG, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Medicina Veterinária.

Área de Concentração: Tecnologia e Inspeção de Produtos de Origem Animal

Orientadora: Professora Mônica Maria Oliveira Pinho Cerqueira

Belo Horizonte – MG
Escola de Veterinária – UFMG
2007.

T312a Tenório, Clarice Gebara Muraro Serrate Cordeiro, 1980-
Avaliação da eficiência do teste COPAN (Microplate e Single) na detecção de resíduos de antimicrobianos no leite / Clarice Gebara Muraro Serrate Cordeiro Tenório. – 2007.

71 p. : il.

Orientadora: Mônica Maria Oliveira Pinho Cerqueira
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária
Inclui bibliografia

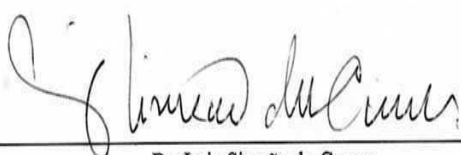
1. Leite – Análise – Teses. 2. Resíduos de antibióticos – Teses. I. Cerqueira, Mônica Maria Oliveira Pinho. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Escola de Veterinária. III. Título.

CDD – 637


Dissertação defendida e aprovada em 26 de fevereiro de 2007 pela Comissão Examinadora constituída por:



Prof. Mônica Maria Oliveira Pinho Cerqueira
Orientadora



Dr. Luiz Simeão do Carmo



Prof. Leorges Moraes da Fonseca

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a Deus em primeiro lugar, à minha amada filha Isabele e a meu esposo e companheiro Nino. Vocês são a razão do meu viver.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, meu Criador, Protetor e Ajudador, por me dar a vida e me conduzir até aqui, sem Ele, nada seria possível.

Ao meu esposo Nino, por toda a paciência, apoio e ajuda; seu amor e amizade me dão forças para não desistir!

À minha filhinha Isabele, que nasceu durante esse percurso, mas que só me ajudou a dar mais valor a tudo. Você é a maior alegria da minha vida, obrigada por existir!

À minha querida mãe, Tônia, sempre guerreira, cujo esforço de toda uma vida hoje tem dado frutos. Obrigada por ter me proporcionado e ensinado tudo o que sou.

À minha avó Rose Muraro, que sempre me ensinou, incentivou e investiu em minha educação, o que me possibilitou chegar até aqui.

Aos meus irmãos Lívia, Jonas e Maiara, e a meu pai Luiz, vocês são meus maiores amigos e me complementam com seu amor e ajuda. A toda a minha família, (Muraro e Tenório), pelo carinho, incentivo e apoio incondicional, e também pelas orações que sempre me fortaleceram.

À minha orientadora e amiga Mônica Cerqueira, pela oportunidade, ensinamentos, paciência e dedicação.

A todos os componentes da banca avaliadora, pela disponibilidade e contribuição.

Aos professores Cláudia Penna e Marcelo Resende, pela ajuda, amizade e por sempre estarem prontos a socorrer.

A todos os professores e funcionários do DTIPOA, pelo auxílio. À Maura, ao Milton e à Fatinha, pela paciência e por toda a ajuda, mesmo nos horários estendidos.

Aos funcionários do laboratório da Itambé, em especial a Fabiana dos Anjos, pela disponibilidade e ajuda.

Aos amigos e colaboradores deste trabalho Roane Viegas, Maria de Fátima Resende, Diogo Clinquart, Andréia Santos, Fernando Nogueira; sem os quais este trabalho não teria sido tão bem conduzido.

A meus amigos Cristiane, Cecília, Ricardo, Regina, Moisa, Joana e a todos meus colegas de mestrado pelas experiências e companheirismo.

A minhas amigas de coração Renilda, Lumena e Maria Luísa, cuja amizade e ajuda foram fundamentais na reta final deste trabalho.

A todos aqueles que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho, aqui está o fruto de um trabalho coletivo, que foi realizado com muita dedicação e carinho.

“A verdadeira viagem do descobrimento não consiste em buscar novas paisagens, mas em ter novos olhos”.

Marcel Proust

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	12
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	13
2.1 Os antimicrobianos.....	13
2.2 Resíduos de antimicrobianos no leite.....	14
2.3. Prejuízos à saúde do consumidor e às indústrias de laticínios.....	17
2.4. Legislação.....	18
2.5 Situação do Brasil.....	21
2.6. Métodos de detecção de resíduos de antimicrobianos em leite.....	24
2.6.1. <i>Métodos microbiológicos</i>	24
2.6.2. <i>Fatores que interferem nos testes microbiológicos</i>	25
2.6.3. <i>Kits comerciais para detecção de antimicrobianos no leite</i>	26
2.6.4. <i>Considerações sobre os métodos de detecção de resíduos de antimicrobianos</i>	28
2.7. Contagem de microrganismos em leite cru.....	29
2.7.1. <i>Contagem Bacteriana Total (CBT) por método eletrônico</i>	30
2.8. Objetivos.....	30
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	31
3.1 Avaliação do kit COPAN ATK P&S - Microplate e Single.....	31
3.2 Avaliação da estratégia de triagem de amostras de leite cru com baixa contagem bacteriana total.....	34
3.2.1 <i>Coleta de amostras</i>	34
3.2.2 <i>Pesquisa de resíduos de antimicrobianos</i>	34
3.2.3. <i>Análise Estatística</i>	34
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	34
4.1 Avaliação da eficiência do teste COPAN (Microplate e Single) na detecção de resíduos de antimicrobianos no leite.....	34
4.1.1. <i>Sensibilidade e Especificidade</i>	36
4.1.2. <i>Detecção dos antimicrobianos de diferentes grupos</i>	37
4.1.3. <i>Grupos de antimicrobianos</i>	38
4.1.4. <i>Comparação dos kits Microplate e Single</i>	44
4.1.5. <i>Considerações sobre os testes</i>	45
4.2. Avaliação da estratégia de triagem de amostras de leite com baixa contagem bacteriana total.....	46
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	50
6. CONCLUSÕES.....	53
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	53
ANEXOS.....	60
Anexo 1 – Manual de instruções do kit COPAN ATK P & S	60
Anexo 2 – Tabela de cores para verificação de resultado do kit COPAN	62
Anexo 3 – Limites de detecção do teste COPAN após revisão do fabricante	63
Anexo 4 – Protocolo de preparação de solução estoque	64
Anexo 5 – Resultados da avaliação dos testes COPAN ATK P & S Microplate e Single	68
Anexo 6 - Resultados da pesquisa de resíduos de antimicrobianos utilizando o teste COPAN ATK P & S Microplate e da Contagem Bacteriana Total realizada em equipamento eletrônico.....	70

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Persistência de eliminação (em horas) de medicamentos pelo leite de acordo com a via de administração utilizada.....	15
Tabela 2. Duração mínima (dias) de eliminação de alguns antimicrobianos pelo leite.....	15
Tabela 3. Número médio de ordenhas com vestígios detectáveis de antimicrobianos, após sua utilização.....	16
Tabela 4. Antimicrobianos que apresentam efeitos adversos para gestantes e fetos.....	17
Tabela 5. Concentração de lisozima e lactoferrina em µg/mL em amostras de leite normal, em leite de vacas com mastite e em colostro.....	26
Tabela 6. Kits para pesquisa de resíduos de antimicrobianos em leite.....	27
Tabela 7. Detecção (%) de diferentes concentrações de antimicrobianos em leite utilizando-se o teste COPAN Microplate.....	35
Tabela 8. Detecção (%) de diferentes concentrações de antimicrobianos em leite utilizando-se o teste COPAN Single.....	35
Tabela 9. Sensibilidade e especificidade (%) dos testes COPAN Microplate e Single na detecção de concentrações de antimicrobianos referentes aos LMR (Nível 2).....	36
Tabela 10. Sensibilidade e especificidade (%) dos testes COPAN Microplate na detecção de limites de concentrações de antimicrobianos declarados pelo fabricante (Nível 3).....	36
Tabela 11. Sensibilidade e especificidade (%) dos testes COPAN Single na detecção de limites de concentrações de antimicrobianos declarados pelo fabricante (Nível 3).....	37
Tabela 12. Detecção de resíduos de antimicrobianos pelo teste COPAN Microplate, em relação ao grupo de antimicrobianos analisado (Nível 2).....	38
Tabela 13. Detecção de resíduos de antimicrobianos pelo teste COPAN Single, em relação ao grupo de antimicrobianos analisado (Nível 2).....	38
Tabela 14. Detecção de resíduos de antimicrobianos do grupo dos beta-lactâmicos pelo teste COPAN Microplate (Nível 2).....	40
Tabela 15. Detecção de resíduos de antimicrobianos do grupo dos beta-lactâmicos pelo teste COPAN Single (Nível 2).....	40
Tabela 16. Detecção de resíduos de antimicrobianos do grupo das tetraciclinas pelo teste COPAN Microplate (Nível 2).....	42
Tabela 17. Detecção de resíduos de antimicrobianos do grupo das tetraciclinas pelo teste COPAN Single (Nível 2).....	43
Tabela 18. Comparação dos resultados da pesquisa de presença de resíduos de gentamicina entre os testes Microplate e Single no Nível 2 (LMR).....	43
Tabela 19. Comparação dos resultados da pesquisa de presença de resíduos de trimetoprim entre os testes Microplate e Single no nível 2 (LMR).....	44
Tabela 20. Comparação entre os kits Microplate e Single, quanto à detecção de resíduos de antimicrobianos no nível 2 (LMR).....	45
Tabela 21. Comparação entre os testes Microplate e Single, quanto à detecção de resíduos de antimicrobianos no nível 3.....	45

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Resultados da pesquisa de resíduos de antimicrobianos de amostras de leite cru de produtores previamente selecionados com CBT abaixo de 50.000 UFC/mL.....	42
--	----

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Limite Máximo de Resíduos (LMR) em leite estabelecidos pelo Programa de Controle de Resíduos em Leite – PCRL.....	20
Quadro 2. Limite Máximo de Resíduos (LMR) estabelecidos pelo <i>Codex Alimentarius</i> , pela União Européia (UE) e os limites de tolerância estabelecidos pelos Estados Unidos (EUA), em comparação com o LMR da legislação brasileira – em µg/kg (ppb).....	21
Quadro 3. Prevalência de resíduos de antimicrobianos (%) em leite tratado termicamente no Brasil nos últimos anos.....	24
Quadro 4. Níveis de concentração dos antimicrobianos (expressos em ppb) testados pelo teste COPAN ATK P & S Microplate.....	32
Quadro 5. Níveis de concentração dos antimicrobianos (expressos em ppb) testados pelo teste COPAN ATK P & S Single.....	33
Quadro 6. Prevalência de resíduos de antimicrobianos (%) em leite cru no Brasil nos últimos anos.....	49

RESUMO

Foi avaliada a eficiência dos testes microbiológicos COPAN (Microplate e Single) que são utilizados na detecção de resíduos de antimicrobianos em leite. Essa avaliação foi feita a partir de ensaios laboratoriais, de setembro a dezembro de 2004, utilizando 13 diferentes antimicrobianos em quatro concentrações inoculadas em leite isento de resíduos, além de amostras controle. Os testes apresentaram 100% de sensibilidade na detecção de penicilina G, ampicilina, cloxacilina, amoxicilina, sulfadiazina e sulfametoxazol; e 96,66% na detecção de oxacilina para as concentrações testadas. Em relação às concentrações estabelecidas pela legislação (LMR) verificou-se que os testes foram capazes de detectá-las para os antimicrobianos avaliados, exceto para eritromicina, oxitetraciclina, tetraciclina e trimetoprim. Os testes também foram capazes de detectar as concentrações declaradas pelo fabricante (limites de detecção) para todos os antimicrobianos testados. Utilizando o teste Microplate foram analisadas 136 amostras de leite cru, originadas de produtores com histórico de baixa contagem bacteriana total no leite, provenientes da região metropolitana de Belo Horizonte (MG), e a presença de resíduos de antimicrobianos ocorreu em 24,26% das amostras analisadas.

Palavras-chave: leite, antimicrobianos, resíduos.

ABSTRACT

The efficiency of COPAN (Microplate and Single) microbiological tests that are used to detect antimicrobial residues in milk was evaluated. This evaluation was conducted in laboratory from September to December 2004, with 13 different antimicrobials in 4 concentrations each, inoculated in free milk residues, besides control samples. COPAN tests showed 100% of sensibility to detect penicillin G, ampicillin, cloxacillin, amoxicillin, sulfadizine and sulfamethoxazole; and 96,66% detecting oxacillin for tested concentrations. COPAN tests are capable to detect concentrations established in legislation (MRL), for the evaluated antimicrobials, except to erythromycin, oxytetraciline, tetracycline and trimethoprim. COPAN tests can also detect concentrations around detection limits informed by the tests manufacturing for all tested antimicrobials. Using the Microplate test, we analyzed 136 samples of raw milk from producers that have historical data of low total bacterial count in milk. The selected producers were from metropolitan area of Belo Horizonte (MG). The presence of antimicrobial residues has occurred in 24,26% of analysed samples.

Keywords: milk, antimicrobials, residues.

1. INTRODUÇÃO

O leite é considerado o alimento mais perfeito da natureza. Apresenta composição rica em proteínas, vitaminas, gordura, carboidratos e sais minerais (principalmente cálcio), essenciais aos seres humanos. É produzido durante a lactação na glândula mamária da vaca, a partir de elementos que passam do sangue para as células especializadas da glândula. Durante este processo, podem passar também medicamentos ou drogas veterinárias que foram administrados às vacas para o controle de alguma doença. Portanto, sempre que for necessário administrar uma droga à vaca leiteira, deve-se estar alerta para a possibilidade de aparecimento de resíduos no leite (Brito, 2006).

Em relação aos medicamentos veterinários, os antimicrobianos (incluindo os antibióticos), os antiparasitários e os hormônios são os grupos de substâncias de maior importância quanto a seus resíduos em leite (Noa e Varcárcel, 2000).

Segundo o *Codex Alimentarius*, citado por Brasil (1999), resíduo de uma droga veterinária é fração da droga, de seus metabólitos, produtos de conversão ou reação, e impurezas que permanecem no alimento originário de animais tratados com tais drogas.

Existem muitas razões para estudar a presença de resíduos de antimicrobianos no leite. Os antimicrobianos utilizados na medicina veterinária são similares ou idênticos aos utilizados nos humanos (Schliephake, 1998; Brito, 2003). A presença desses resíduos no leite de consumo é derivada de sua utilização inadequada nas propriedades rurais, o que constitui grande preocupação, por representar risco à saúde do consumidor e por interferir na produção dos derivados, determinando prejuízos econômicos (Costa, 1996; Brito, 2003; Nero et al., 2004).

O uso de antimicrobianos na produção animal tem sido motivo de preocupação de autoridades de diversos países, especialmente quanto aos aspectos da segurança dos alimentos de origem animal para a saúde pública e para a comercialização (Brito, 2003).

O leite contendo tais resíduos é considerado inaceitável para utilização, podendo resultar em perda total para os produtores. Conseqüentemente, a disponibilidade de testes sensíveis, rápidos e baratos para a medição de resíduos de antimicrobianos no leite é uma necessidade (Schliephake, 1998).

Inúmeros testes qualitativos e quantitativos para detectar resíduos de antimicrobianos e drogas no leite e em derivados lácteos têm sido desenvolvidos, desde a década de 40. Os métodos mais usados são os de inibição do crescimento microbiano, ou microbiológicos, e se baseiam no princípio geral de que todos os antimicrobianos inibem bactérias sensíveis (Brito, 2000).

A condução de testes de triagem apropriados para determinar resíduos, assim como a adoção de práticas sanitárias, podem ajudar na manutenção da segurança do leite (Cullor, 1992). Devido à grande importância nutricional do leite e ao aspecto de saúde do consumidor, é necessário o controle da presença de resíduos de antimicrobianos nesse alimento visando, desta forma, a sua qualidade sanitária (Lopes et al., 1998).

O objetivo deste trabalho foi avaliar a eficiência do kit para pesquisa de resíduos de antimicrobianos em leite cru, COPAN ATK P & S (Microplate e Single), quanto à detecção de diferentes níveis dessas substâncias em leite. Avaliou-se também uma estratégia de triagem de amostras de leite cru com baixa Contagem Bacteriana Total (CBT), em relação à presença de resíduos de antimicrobianos nessas amostras.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. OS ANTIMICROBIANOS

Os antibióticos são substâncias químicas produzidas pelo metabolismo de determinadas linhagens de bactérias, de fungos e de actinomicetos. Podem, em soluções diluídas, impedir temporária ou definitivamente as funções vitais de outros microrganismos, determinando efeitos bacteriostático e bactericida. O uso dessas drogas no tratamento e prevenção de doenças e, como promotor de crescimento, melhorando a conversão alimentar, está amplamente difundido na pecuária (Brasil, 1999).

A palavra “antibiótico” deriva do termo *antibiosis*, que literalmente significa “contra a vida” (*anti* = contra; *bios* = vida). Os antimicrobianos incluem os compostos naturais (antibióticos) e seus derivados e também os compostos sintéticos (Robbers et al., 1997).

Os mecanismos de ação dos antimicrobianos contra microrganismos susceptíveis incluem: inibição da parede celular do microrganismo, inibição da biossíntese protéica, rompimento do metabolismo do ácido desoxirribonucléico (DNA), alteração da função normal da membrana celular e inibição da síntese de alguns metabólitos essenciais (Robbers et al., 1997).

Segundo Mitchell et al. (1998), os antimicrobianos mais comumente utilizados em animais produtores de alimentos podem ser divididos em cinco principais grupos, de acordo com seu modo de ação: beta-lactâmicos (por exemplo, penicilinas e cefalosporinas); tetraciclina (oxitetraciclina, tetraciclina e clortetraciclina); aminoglicosídeos (estreptomicina, neomicina e gentamicina); macrolídeos (eritromicina) e sulfonamidas (sulfametazina).

Os antimicrobianos beta-lactâmicos compreendem as penicilinas, as cefalosporinas, o imipenem e o aztreonam. Têm como característica comum um anel de β -lactama, mas diferem no modo como esse anel fortemente contorcido é estabilizado. As penicilinas têm um anel de tazolidina de cinco membros ligado ao anel de β -lactama, e essa combinação configura o que se conhece como núcleo “penam” (Robbers et al., 1997).

As tetraciclina constituem um grupo de antibióticos produzidos pelo metabolismo de actinomicetos e possuem considerável utilidade terapêutica. As tetraciclina têm amplo espectro de ação, abrangendo bactérias Gram-negativo e Gram-positivo, rickettsias e alguns vírus. Atuam pela inibição da síntese de proteínas por interferirem na ligação do RNAt aos sítios aceptores da subunidade 30S dos ribossomos 70S dos microrganismos (Robbers et al., 1997).

As propriedades químicas e biológicas dos aminoglicosídeos são semelhantes, tendo em comum a hidrossolubilidade, forte caráter básico e estabilidade. Têm um espectro intermediário de atividade, abrangendo a maioria dos bacilos Gram-negativo e algumas bactérias Gram-positivo. Atuam sobre a subunidade 30S dos sistemas ribossômicos 70S induzindo à leitura errônea do códon e inibindo a formação de proteínas bacterianas essenciais, por interferir no complexo de início entre o RNA e a subunidade 30S ou por romper a translocação. A peculiaridade dos antibióticos aminoglicosídeos como inibidores da síntese protéica consiste no fato de serem bactericidas, o que aumenta muito sua utilidade no tratamento de infecções graves (Robbers et al., 1997).

Os antimicrobianos macrolídeos caracterizam-se por um anel de macrolactona glicosidicamente ligado a um açúcar ou mais. Todos os macrolídeos têm o

mesmo mecanismo de ação, ou seja, ligam-se reversivelmente à subunidade ribossômica 50S dos organismos susceptíveis, inibindo a síntese de proteínas dependente de RNA, por meio do bloqueio da translocação do RNAt peptídico do sítio acceptor para o sítio doador. Têm espectros bacterianos semelhantes, porém não idênticos, e seus efeitos colaterais diferem, sobretudo no que se refere à farmacocinética. São bacteriostáticos ou bactericidas, dependendo do organismo patogênico em questão e da concentração do antimicrobiano (Robbers et al., 1997).

As sulfonamidas têm seus compostos derivados da *p*-aminobenzenossulfonamida (sulfanilamida), com substituição do grupo amida ou *p*-amino para alterar as propriedades físico-químicas. São considerados anti-metabólicos por serem análogos do ácido *p*-aminobenzóico, substrato da biossíntese do ácido fólico, que é um metabólito essencial para algumas bactérias que o usam como fonte de unidades de carbono para a biossíntese dos aminoácidos, purinas e pirimidinas. As sulfonamidas são bacteriostáticas e inibem grande número de bactérias Gram-positivo e Gram-negativo (Robbers et al., 1997).

A trimetoprina é um composto sintético que inibe a diidrolotoredutase, penúltima etapa da síntese do tetraidrofolato (forma ativa do ácido fólico). Tem atividade sinérgica com o sulfametoxazol, sendo essa combinação ativa contra muitos cocos Gram-positivo e bastonetes Gram-negativo (Robbers et al., 1997).

Uma das limitações do uso terapêutico de um antimicrobiano é a sua toxicidade em mamíferos e as manifestações de tais reações indesejáveis variam muito. A toxicidade pode decorrer da falta de seletividade pelo agente patogênico associada ao mecanismo básico de ação, mas na maioria das vezes, decorre de hipersensibilidade, de alteração da

microbiota normal ou de uma ação farmacológica independente da atividade antimicrobiana da molécula. Pode-se também observar toxicidade indireta no uso desses agentes, sendo o tipo mais comum a que causa alteração no equilíbrio ecológico da microbiota intestinal. Esse problema é maior com os antimicrobianos de amplo espectro, visto que uma parte importante da microbiota pode ser suprimida (Robbers et al., 1997).

No Brasil, o uso de antimicrobianos é indiscriminado, não existindo um controle eficaz na comercialização destes produtos utilizados no tratamento de animais (Hotta, 2003). Para adoção de testes visando a detecção de antimicrobianos, é necessário saber, primeiramente, quais são os mais utilizados numa determinada região. Em 2001, as principais classes de antimicrobianos utilizadas em vacas em período de lactação foram: aminoglicosídeos e beta-lactâmicos; tetraciclina; macrolídeos; sulfonamidas e quinolonas. Já em vacas secas, os mais utilizados foram os aminoglicosídeos e beta-lactâmicos; os macrolídeos e as tetraciclina (Gorni e Cabrini, 2003).

Segundo Lopes et al. (2002) os antimicrobianos mais utilizados por produtores da região metropolitana de Curitiba (PR) em vacas leiteiras foram a penicilina associada (24,7%), seguida de aminoglicosídeo associado, oxitetraciclina e pirlimicina.

2.2. RESÍDUOS DE ANTIMICROBIANOS NO LEITE

Os produtos veterinários utilizados em animais produtores de alimentos são muitos, variando de produtos para desinfecção de tetos a hormônios. Aproximadamente 42% desses produtos são utilizados como aditivos alimentares, 19% contra infecções (antimicrobianos, antifúngicos e antivirais), 13% como parasiticidas, 11% de uso

biológico e 15% representam outras drogas (Miller, 1993 – citado por Mitchell et al., 1998).

A antibioticoterapia tem sido amplamente empregada pelos produtores e veterinários no tratamento de doenças infecciosas de vacas leiteiras, principalmente da mastite, que é a doença mais comumente encontrada nesses animais. Assim, o tratamento de mastite utilizando antimicrobianos é uma prática veterinária comum (Silva e Sena, 1984; Brady e Katz, 1988; Zeng et al., 1998).

Estas drogas também têm sido incorporadas na alimentação animal como suplemento de dietas. Estes usos, às vezes indiscriminados, têm levado à veiculação de resíduos de antimicrobianos pelo leite e, conseqüentemente, constituem problemas de saúde pública, tecnológicos, além de econômicos. Logo, há uma preocupação por parte dos órgãos de inspeção de alimentos no controle deste problema (Silva e Sena, 1984).

Os antimicrobianos podem ser administrados aos animais por vias intramuscular, intravenosa, subcutânea, oral (no alimento ou na água), topicamente sobre a pele e também por infusão intramamária ou intrauterina. Teoricamente todas essas vias podem levar ao aparecimento de resíduos nos alimentos originados dos animais tratados, como o leite, a carne e ovos (Mitchell et al., 1998).

Os antimicrobianos podem persistir no leite por períodos variados, dependendo de alguns fatores como, por exemplo: a droga selecionada e sua solubilidade, a dose aplicada e a via de administração, o peso corporal do animal tratado, o excipiente utilizado, a intensidade do processo inflamatório, entre outros (Brady e Katz, 1988; Luthman, 1993; Costa, 1996; Zeng et al., 1998, Brito, 2006). 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. Nas Tabelas 2 e 3 é mostrada a duração mínima de eliminação pelo leite de alguns antimicrobianos mais freqüentemente utilizados no tratamento da mastite, em dias e em número de ordenhas (Costa, 1996).

Outras condições que podem determinar a presença de resíduos no leite são a higienização de equipamentos e dos utensílios da indústria e, até mesmo, a adição intencional de drogas para encobrir a deficiência na qualidade higiênica do leite, visando aumentar seu tempo de vida útil (Borges et al., 2000).

Tabela 1 – Persistência de eliminação (em horas) de medicamentos pelo leite de acordo com a via de administração utilizada.

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

Fonte: Costa (1996)

Tabela 2 – Duração mínima (dias) de eliminação de alguns antimicrobianos pelo leite.

<i>Antimicrobiano (via intramamária)</i>	<i>Período mínimo de eliminação (dias)</i>
Penicilina (procaína)*	2
Clortetraciclina	6
Oxitetraciclina	4
Cloranfenicol	3
Estreptomicina	4

Fonte: Costa (1996)

*Este período varia também com o excipiente utilizado, assim, penicilina em solução aquosa é eliminada no mínimo por três dias, mas em forma de pomada, o mínimo é de seis dias.

Tabela 3 – Número médio de ordenhas com vestígios detectáveis de antimicrobianos, após sua utilização.

<i>Antimicrobiano</i>	<i>Forma</i>	<i>Excipiente</i>	<i>Posologia (Via IM)</i>	<i>N° médio de ordenhas</i>
Oxitetraciclina (HCl)	Aquosa	Polivinilpirrolidona	10 mg/kg/8h	7
Tetraciclina (HCl)	Aquosa	-	5 mg/kg/8h	5
Cloranfenicol	Solução	Propilenoglicol	10 mg/kg/8h	2
Penicilina procaína	Aquosa	Polivinilpirrolidona	2 milhões UI/12h	8
Colistina (sulfato)	Aquosa	-	25.000 UI/kg/4h	3
Ampicilina	Oleosa	Polisorbato 80 + estearato de alumínio + oleato de etila	12 mg/kg/8h	5

Fonte: Costa (1996)

O cloranfenicol é um antibiótico altamente eficaz no tratamento de várias doenças. Apesar disso, é uma droga extremamente tóxica, fato que o tem relacionado com o surgimento da anemia aplástica em indivíduos hipersensíveis (Aspenström-Fagerlund, 1993; Brasil, 1999). A FAO/OMS recomendou esforços para proibir ou substituir o seu uso para tratamento de animais destinados à alimentação humana, particularmente vacas em lactação (Brito, 2006). A legislação brasileira por meio da Portaria Ministerial 448/98 proibiu seu uso, assim como da Furazolidona e da Nitrofurazona para animais produtores de alimentos (Brasil, 1999).

Segundo o artigo 514 do RIISPOA, é proibido o emprego de substâncias químicas na conservação do leite e, quando um antibiótico for utilizado para tratamento de enfermidades em vacas leiteiras, a comercialização do leite somente poderá ser efetuada depois de transcorridas 72 horas da última aplicação destes produtos (Regulamento..., 1980).

Estudos realizados por Fagundes (1981) comprovaram que em vacas com mastite, a PPD (dihidroestreptomicina + penicilina procaína) permanece no leite 117 horas quando aplicada por via intramuscular e 126 horas quando aplicada por via intramamária. A clortetraciclina, quando inoculada por via intramuscular, permanece 96 horas e por via

intramamária perdura por 141 horas no leite (Fagundes e Molin, 1988).

Para Fagundes (1981), o tempo de eliminação de resíduos de antimicrobianos pode variar de 66 a 96 horas em animais sadios, porém Lopes et al. (1998) citam período de até 96 a 141 horas em animais com mastite.

O período de carência de um antimicrobiano é o prazo de eliminação deste no leite, após a última aplicação (Brito, 2006). Esse período de eliminação da substância administrada deve ser respeitado para prevenir resíduos de drogas e aditivos alimentares nos alimentos provenientes dos animais tratados, que durante esse período não devem ser utilizados para consumo humano (Aspenström-Fagerlund, 1993; Brito, 2006).

Segundo o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento - MAPA (Brasil, 2002), não é permitido o envio de leite a Posto de Refrigeração ou estabelecimento industrial adequado, quando oriundo de animais que estejam sendo submetidos a tratamento com drogas e medicamentos de uso veterinário em geral, passíveis de eliminação pelo leite, motivo pelo qual devem ser afastados da produção pelo período recomendado pelo fabricante, de forma a assegurar que os resíduos da droga não sejam superiores aos níveis fixados em normas específicas.

2.3. PREJUÍZOS À SAÚDE DO CONSUMIDOR E ÀS INDÚSTRIAS DE LATICÍNIOS

A presença de inibidores bacterianos no leite de consumo como sanitizantes, antimicrobianos ou quimioterápicos, resulta em grande preocupação para a indústria laticinista, além de representar um risco para a saúde do consumidor (Borges et al., 2000). Uma vez que a presença de resíduos de antimicrobianos constitui tal risco, o veterinário e o produtor devem estar preparados para detectar e tomar as medidas cabíveis para evitar este tipo de contaminação (Costa, 1996).

Os antimicrobianos possuem grande variação em relação à sua toxicidade (Brasil, 1999), sendo o risco à saúde do consumidor representado por reações alérgicas, que se manifestam geralmente como urticárias, dermatites ou rinites e asma brônquica, que podem, até mesmo, desencadear choque anafilático em indivíduos particularmente sensíveis (Brady e Katz, 1988; Johnsson, 1993; Aspenström-Fagerlund, 1993; Costa, 1996; Borges et al., 2000; Brito, 2006). Segundo Schliephake (1998), o aparecimento de reações alérgicas causadas por esses resíduos estão aumentando, sendo estimado que 2 a 4 % da população são afetados. Além das reações alérgicas, outros problemas como anemia aplástica,

associados ao cloranfenicol podem ocorrer (Aspenström-Fagerlund, 1993; Costa, 1996, Mitchell et al., 1998). Os efeitos tóxicos nos seres humanos incluem, também, problemas auditivos, causados, por exemplo, pela estreptomicina (Brasil, 1999). Alguns antimicrobianos possuem potencial carcinogênico, podendo desenvolver tumores em animais de laboratório (como a sulfametazina e os nitrofuranos) (Brito, 2006).

Deve-se considerar que o fator idade é extremamente relevante em relação a algumas das reações adversas aos antimicrobianos, portanto, 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 altos níveis 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. Na Tabela 4 estão reunidos alguns antimicrobianos que apresentam efeitos adversos para gestantes e fetos (Costa, 1996).

Tabela 4 – Antimicrobianos que apresentam efeitos adversos para gestantes e fetos.

<i>Antimicrobiano</i>	<i>Efeitos em gestantes e fetos</i>
Tetraciclina	Alteração no desenvolvimento ósseo do feto e alteração na coloração dos dentes, posteriormente
Sulfonamidas	Hemólise no recém-nascido, podem apresentar desordens do sistema nervoso central
Quinolonas	Anormalidade na formação das cartilagens
Aminoglicosídeos	Ototoxicidade
Vancomicina	Possível ototoxicidade
Eritromicina	Hepatite colestática
Trimetoprim	Possível teratogenicidade
Metronidazol	Possível teratogenicidade
Nitrofurantoína	Anemia hemolítica

Fonte: Costa (1996).

Além de reações alérgicas e de indução de quadros patológicos, os resíduos de antimicrobianos possibilitam o risco de indução de resistência bacteriana e, posteriormente, a transferência de resistência múltipla entre os microrganismos através de plasmídios ou de outros mecanismos como, por exemplo, os transposons (Johnsson, 1993; Mitchell et al., 1998; Schliephake, 1998; Brasil, 1999; Borges et al., 2000).

O aumento de resistência de microrganismos 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 microrganismos patogênicos resistentes pode decorrer do uso de antimicrobianos no homem, nos animais e no ambiente. Animais produtores de alimento são comumente expostos a 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 microrganismos que, por sua vez, podem estar presentes em alimentos de origem animal (Cerqueira, 2003).

Considera-se indesejável a presença de resíduos de antimicrobianos, em relação aos aspectos de produção, devido à sua interferência no crescimento dos cultivos iniciadores durante a elaboração de queijos e leites fermentados, podendo resultar em coagulação inadequada do leite e maturação inadequada de queijos durante sua produção; redução na produção de ácido e “flavor” durante a produção de leites fermentados. A presença de antibióticos no leite, mesmo em pequenas quantidades, pode assim gerar perdas na produção de derivados lácteos, causando prejuízos econômicos (Brady e Katz, 1988; Johnsson, 1993; Varnam e Sutherland, 1994; Gallina, 1997; Gigante, 2004).

Uma vez que o leite contaminado com resíduo de antimicrobiano dê entrada na indústria, praticamente nada pode ser feito para evitar sua presença no leite fluido ou nos produtos lácteos. Os tratamentos usuais aos quais o leite é submetido, como filtração, resfriamento e tratamento térmico na faixa de 72-75°C por 15 a 20 segundos, têm pouca ou nenhuma influência sobre o conteúdo de antimicrobianos. Mesmo o tratamento UHT a 130-140°C por 2 a 4 segundos não é suficiente para destruir 100% dos antimicrobianos (Gigante, 2004). Gallina (1997) ressalta que os tratamentos térmicos usualmente empregados pelas indústrias de laticínios não inativam totalmente os resíduos de antimicrobianos.

Na grande maioria das vezes, a simples presença de resíduo de antibióticos ou inibidores é motivo para descarte automático do produto e, portanto, não pagamento do mesmo aos produtores. No entanto, algumas indústrias adotam programas de incentivo na forma de bonificação para produtores que mantêm um padrão de isenção de resíduos de drogas por um longo período (Picinin, 2003).

Devido a todos esses fatores, é recomendada a monitorização da presença de resíduos de antimicrobianos em leite, sendo adotados como referência os valores estabelecidos pela legislação brasileira e internacional.

2.4. LEGISLAÇÃO

A partir da década de 1950, a preocupação com as substâncias químicas presentes nos alimentos foi manifestada pela Organização Mundial da Saúde (OMS). Atualmente, diversas organizações internacionais estão envolvidas no desenvolvimento de mecanismos de controle das substâncias químicas (antibióticos, hormônios, pesticidas e parasiticidas) usadas na produção animal. Esses mecanismos incluem o controle da

distribuição e uso em animais, a determinação de níveis seguros de resíduos nos alimentos de origem animal e as tecnologias de detecção de resíduos (Mitchell et al., 1998; Brito, 2003).

Em nível internacional essas organizações incluem a Comissão do *Codex Alimentarius* (*Codex Alimentarius Commission*), cujas diretrizes são fixadas pelo *Codex Committee on Residues of Veterinary Drugs in Food* (CCRVDF), que por sua vez é baseado cientificamente pelo *Joint WHO/FAO Expert Committee on Food Additives* (JECFA). Outros grupos internacionais incluem a *European Agency for the Evaluation of Medicinal Products* (EMA), *Office International des Epizooties* (OIE) e a *Consultation Mondiale de l'Industrie de la Santé Animale* (COMISA). Muitos países possuem grupos especializados envolvidos no assunto como o *Food and Drug Administration* (FDA) nos Estados Unidos, o *Bureau of Veterinary Drugs* no Canadá e o *Veterinary Products Committee of the Ministry of Agriculture, Fisheries and Foods* no Reino Unido (Mitchell et al., 1998).

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 limites máximos de resíduos (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, microorganismos 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). O Quadro 1 mostra os LMR em vigor no Brasil, estabelecidos pela legislação (Instrução Normativa nº42 de 1999 – MAPA). Já o Quadro 2 mostra os valores estabelecidos para os LMR pelo *Codex Alimentarius*, pela União Européia (UE) e pelo Brasil, e os valores de tolerância estabelecidos pelos Estados Unidos (EUA)

Quadro 1 – Limite Máximo de Resíduos (LMR) em leite estabelecidos pelo Programa de Controle de Resíduos em Leite – PCRL.

<i>Antimicrobianos</i>	<i>Método Analítico</i>	<i>LQ/MIC (µg/kg)</i>	<i>LMR/NA* (µg/kg)</i>	<i>Amostras</i>	<i>Laboratório</i>
Penicilina	ELISA CLAE-UV	NE	4	100	LARA/RS LARA/MG
Ampicilina		NE	4		
Amoxicilina		NE	4		
Estreptomicina		NE	200		
Tetraciclina ^a		20	100		
Oxitetraciclina ^a		10	100		
Clortetraciclina ^a		50	100		
Eritromicina		NE	40		
Neomicina		NE	500		
Ceftiofur		NE	100		
Sulfametazina ^b	CL-EM/EM	25	100	60	LARA/RS LARA/MG LARA/SP
Sulfadimetoxina ^b	CLAE	25	100		
Sulfatiazol ^b		25	100		
Cloranfenicol	ELISA CLAE – UV	5 (i)	5* (ii)	100	LARA/MG LARA/RS LARA/SP
Ivermectina	CLAE - DF	10	10	120	LARA/MG LARA/RS LARA/SP
Doramectina		10	10		
Abamectina		10	10		
Eprinomectina		10	10		

Fonte: Instrução Normativa n° 42/1999 – MAPA (Brasil, 1999); Portaria n° 50/2006 – MAPA (Brasil, 2006)

(*) NA - Nível de ação; NE - Não estabelecido, LQ - Limite de Quantificação; MIC - Concentração Mínima Inibitória

^a Somatório de todas as Tetraciclinas; ^b Somatório de todas as Sulfonamidas

MÉTODOS DE ANÁLISE

ELISA – Enzima imunoensaio

CLAE - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

UV - Detector Ultra Violeta

EM – Espectrometria de Massa

DF – Detector de Fluorescência

(i) Para aquelas substâncias que possuem LMR igual a ZERO ou aquelas sem LMR estabelecidos, o Nível de Ação é igual ao Limite de Detecção do método de confirmação.

(ii) Para drogas proibidas não se estabelecem LMR

Quadro 2 – Limite Máximo de Resíduos (LMR) estabelecidos pelo *Codex Alimentarius*, pela União Européia (UE) e os limites de tolerância estabelecidos pelos Estados Unidos (EUA), em comparação com o LMR da legislação brasileira – em µg/kg (ppb).

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

Fonte: Adaptado de Brasil (1999); Pedersen e Suhren (2000); Official Standards – *Codex Alimentarius* (2006).

Segundo o proposto no Regulamento Técnico de Produção, Identidade e Qualidade do Leite tipo C (Brasil, 2002), no que se refere aos procedimentos específicos para o controle de qualidade da matéria-prima no estabelecimento beneficiador, deve ser realizada a colheita de amostra, por produtor, no mínimo uma vez por mês, para análise completa, que incluirá a pesquisa de resíduos de antimicrobianos, cujos métodos analíticos empregados devem apresentar sensibilidade para os LMR adotados pelo MAPA (Quadro 1).

O leite contendo substâncias inibitórias acima dos limites legais é considerado inaceitável para utilização, podendo resultar em perda total para os produtores.

Conseqüentemente, a disponibilidade de testes sensíveis, rápidos e baratos para a medição de resíduos de antimicrobianos no leite é uma necessidade (Schliephake, 1998).

2.5. SITUAÇÃO DO BRASIL

Diante do estabelecimento dos limites máximos de resíduos em leite (LMR), diversos estudos têm sido realizados para a pesquisa da presença desses resíduos em leites comerciais, por meio de testes variados. Tais estudos são importantes para o levantamento da qualidade do leite consumido no Brasil, principalmente no que se refere aos riscos à saúde do consumidor.

Persistência de resíduos de antimicrobianos em leite tratado termicamente

Quanto à persistência de resíduos de antimicrobianos no leite, estudo realizado por Fagundes (1980) revelou a prevalência de 5,49% para o leite tipo B e 1,25% para o leite tipo C, comercializados em Belo Horizonte (MG), de agosto a novembro de 1978. Já Barros e Perches (1981), em estudo realizado na cidade de São Paulo (SP), observou-se uma prevalência de 21,87% das amostras do leite B empacotado e distribuído ao consumo.

No estudo de Silva e Sena (1984) analisou-se amostras de leite pasteurizado tipo B (96 amostras) e Especial – 3,2% de gordura (288 amostras), de três marcas comerciais, na cidade de Belo Horizonte (MG), no período de abril de 1982 a março de 1983. Utilizou-se quatro métodos diferentes para a pesquisa: método clássico com disco de papel filtro (utilizando o *Bacillus subtilis*), método do TTC, Delvotest-P e um método que estava em pesquisa (utilizando o *Bacillus stearothermophilus* var. *calidolactis*). Observou-se resultado positivo para presença de resíduos de antimicrobianos em 4,16 % no leite tipo B, e 1,04% no leite Especial.

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.

Albuquerque et al. (1996) investigaram a presença de resíduos de antimicrobianos em leite comercializado na região metropolitana de Fortaleza (CE), analisando 251 amostras de leite (leite pasteurizado tipo A e tipo C). Os resultados indicaram que das amostras analisadas, 71,31% (179 amostras) apresentaram resíduos de inibidores, sendo o maior índice de positividade encontrado no leite tipo A (86,9%). Os autores presumem que este índice se deve ao maior uso de antibióticos pelo produtor de leite e a não obediência do período de carência dos medicamentos utilizados nas vacas.

Machado (1998), com o objetivo de determinar a incidência da contaminação com resíduos de antimicrobianos no leite pasteurizado tipo C e “Integral/Fazenda” comercializados na região Norte-Nordeste do Estado do Rio de Janeiro, analisou 300 amostras de leite, sendo 130 do tipo C e 170 do Integral/Fazenda, no período de abril de 1996 a abril de 1997. Observou-se uma incidência total de 4,33% de contaminação com resíduos de antimicrobianos no leite, utilizando o método Delvotest-P e o Snap-test para beta-lactâmicos.

Lopes et al. (1998) analisaram 178 amostras de leite pasteurizado tipo A, tipo B e tipo 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 tipo A (14,1%) e tipo B (2,5%). No leite pasteurizado tipo C não houve detecção desse tipo de substância nas amostras testadas.

Souza (1998) pesquisou a presença de resíduos de antimicrobianos em 384 amostras de leite, sendo 322 do tipo C e 62

UHT, provenientes das cinco regiões do estado de Santa Catarina. Utilizou-se o teste Delvotest-P e as amostras foram coletadas e analisadas no período de setembro de 1996 a setembro de 1997. O resultado encontrado foi de alta prevalência desses resíduos (50,52% de amostras positivas e 44,01% suspeitas).

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 antibióticos em Ágar, tendo o *Bacillus subtilis* e o *Bacillus stearothermophilus* como microrganismos-teste. Encontraram-se resíduos em 9,95% das amostras, sendo que 32,5% das 98 marcas comerciais apresentaram-se positivas.

Barros et al. (2001) realizaram pesquisa de resíduos de antimicrobianos em leite pasteurizado tipo C, comercializado na cidade de Salvador (BA), no período de outubro de 1998 a março de 1999. Analisaram-se 26 amostras, utilizando o teste *Antimicrobial Diffusion Method* com o *Bacillus stearothermophilus* var. *calidolactis*. Do total de amostras, 38,5% encontraram-se positivas para resíduos.

Nascimento et al. (2001) avaliaram 96 amostras de leite de seis diferentes marcas comerciais (leite tipo A, tipo B, tipo C e UHT) na cidade de Piracicaba (SP). Utilizou-se o método do disco de papel filtro em meio de cultura contendo *Bacillus stearothermophilus*. Os dados demonstraram que das 96 amostras analisadas, 50% (48 amostras) apresentaram resultados positivos.

Rosário (2002) avaliou a presença de resíduos de antimicrobianos no leite comercializado no município de

Pirassununga (SP), com o SNAP test. Foram coletadas amostras de leite tipo A, B, C e UHT, sendo uma amostra de cada marca de leite do comércio. No total, foram analisadas 193 amostras, sendo que 8,2% apresentaram-se positivas para presença de resíduos.

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). Já 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 a ampicilina e 3,0 µg/L para a 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% apresentaram resultado positivo para presença de resíduos de antimicrobianos.

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

Quadro 3 - Prevalência de resíduos de antimicrobianos (%) em leite tratado termicamente no Brasil nos últimos anos.

<i>Autor</i>	<i>Ano</i>	<i>Cidade/Estado</i>	<i>Teste</i>	<i>Resultado positivo (%)</i>	<i>Tipo de leite</i>	<i>N° amostras</i>
Barros e Perches	1981	São Paulo/SP	TTC	21,87	B	32
Silva e Sena	1984	Belo Horizonte/MG	4 métodos	4,16	B	96
Silva e Sena	1984	Belo Horizonte/MG	4 métodos	1,04	Especial (3,2 % de gordura)	288
Magalhães	1995	Belo Horizonte/MG	TTC	15,83	A, B, C e Integral Fazenda	120
Albuquerque et al.	1996	Fortaleza/CE	Disco de papel filtro	71,31	A e C	251
Machado	1998	RJ	Delvotest e Snap β -lactâmicos	4,33	C e Integral Fazenda	300
Lopes et al.	1998	Campinas/SP	Delvotest-P	7,9	A, B e C	178
Souza	1998	SC	Delvotest-P	50,52	C e UHT	384
Borges et al.	2000	GO	Difusão em agar	9,95	B e C	533
Barros et al.	2001	Salvador/ BA	<i>Antimicrobial Diffusion Method</i>	38,5	C	26
Nascimento et al.	2001	Piracicaba/SP	Disco de papel filtro	50,0	A, B, C e UHT	96
Rosário	2002	Pirassununga/SP	Snap β -lactâmicos e tetraciclina	8,2	A, B, C e UHT	193
Ruela	2003	Vários estados	CLAE ^a	1,9	A, B, C e UHT	53
Brito	2004	MG	CLAE ^b	40	A, B, C e UHT	55
Leme et al.	2004	São Paulo/SP	Delvotest-SP	0,66	A, B, C e UHT	1500

Fonte: adaptado de vários autores.

^aCLAE: Cromatografia Líquida de Alta Eficiência utilizada na detecção de tetraciclina, 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).

2.6. MÉTODOS DE DETECÇÃO DE RESÍDUOS DE ANTIMICROBIANOS NO LEITE

Para a detecção de antimicrobianos em leite podem ser utilizados três tipos de métodos de análise: microbiológicos, físico-químicos e imunoenzimáticos. Cada um destes métodos possui vantagens e desvantagens em relação ao custo, tempo de resposta e especificidade, o que os qualifica como adequados ou não para cada fim proposto (Ramírez, et al., 2001).

Os métodos utilizados para a determinação de resíduos de medicamentos veterinários, devem estar baseados em um conjunto de critérios como: sensibilidade, especificidade, precisão, limite de detecção, limite de quantificação, praticidade e aplicabilidade em condições normais de laboratório e susceptibilidade a interferentes (Noa e Varcárcel, 2000).

2.6.1. Métodos microbiológicos

O princípio destes testes baseia-se usualmente na inibição de crescimento de microrganismos 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: *Bacillus 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).

Nesses testes, o inóculo padrão de um organismo-teste (por exemplo, o *Bacillus stearothermophilus*) é incubado em amostras de leite por um período de algumas horas. Se o leite contiver concentração suficiente de substâncias inibidoras, o crescimento bacteriano é reduzido ou eliminado. A presença de substâncias inibidoras é indicada por zonas de inibição ou por indicadores coloridos (Cullor, 1992).

Os testes de inibição microbiana são sensíveis aos inibidores naturais presentes, em grande quantidade, no leite de animais com mastite, causando um resultado de teste positivo, quando não há resíduos de antimicrobianos. Por estas razões, a Federação Internacional de Laticínios (FIL) iniciou diretrizes para a descrição padronizada de testes de inibição microbiana e para a validação destes métodos (Honkanen-Buzalski e Reybroeck, 1997; Cerqueira, 2003).

2.6.2. Fatores que interferem nos testes microbiológicos

Os fatores que podem interferir no resultado dos testes microbiológicos podem estar relacionados à composição da amostra ou à susceptibilidade durante os procedimentos do teste. De forma generalizada, pode-se dizer que a influência da composição da amostra diminuirá com o aumento da sensibilidade para a detecção de uma variedade de antimicrobianos (Suhren, 1995).

Além de seletividade e sensibilidade, outros parâmetros podem interferir no desempenho dos testes como: elevada contagem de células somáticas (CCS), elevada contagem bacteriana total (CBT), possível interferência de outras classes de drogas, fatores antibacterianos presentes no leite da vaca com mastite e no colostro (lactoferrina e lisozima). Esses fatores podem interferir com o crescimento do microrganismo presente no teste, determinando falsa positividade (Cullor, 1992; Andrews et al., 1997; Mitchell et al., 1998; Brito, 2003; Cerqueira, 2003).

A mastite clínica é a responsável por diversos problemas de saúde que requerem tratamento com antimicrobianos durante a lactação. Mesmo quando o leite está aparentemente normal, pode-se seguir um episódio de mastite clínica durante a fase de recuperação devido à persistência de mastite sub-clínica. Conseqüentemente a avaliação dos resultados do teste de pesquisa de resíduos deve levar em consideração a CCS e a CBT do leite dessas vacas individualmente, já que esses fatores podem estar associados com resultados falso-positivos (Andrew et al., 1997).

Para se evitar a influência de microrganismos contaminantes sobre o microrganismo-teste, quando microrganismos mesófilos são usados no método, recomenda-se o pré-aquecimento da amostra para inativar a maior parte da microbiota do leite e também os inibidores naturais ali presentes. No caso de se usar um microrganismo-teste termófilo como o *Bacillus stearothermophilus*, recomenda-se a incubação dos sistemas de teste em temperaturas $\geq 50^{\circ}\text{C}$, faixa de temperatura que somente alguns microrganismos da microbiota do leite podem se multiplicar e realizar suas atividades metabólicas (Suhren, 1995). Fatores como reagente utilizado, condições de incubação e volume da amostra podem também interferir

durante a realização dos testes (Cerqueira, 2003).

Inibidores naturais

Os fluidos excretados pelo corpo como lágrimas, saliva e leite contêm substâncias antimicrobianas. Provavelmente, o objetivo é manter, razoavelmente baixo, o nível de infecção dos locais produtores desses fluidos. Esses chamados inibidores naturais também agem contra as bactérias presentes nos testes microbiológicos, sendo assim essencial que seja feito um controle em relação à presença desses inibidores naturais

para que níveis normais não sejam confundidos com resíduos de antimicrobianos no leite, prejudicando deste modo os produtores (Beukers, 1993).

Os mais importantes inibidores naturais do leite são as proteínas, incluindo a lactoferrina, a lisozima e o sistema lactoperoxidase. A concentração de lactoferrina e lisozima no leite varia muito com o estágio da lactação, havendo altos valores no colostro e no leite proveniente de vacas com mastite, conforme mostrado na Tabela 5 (Cullor, 1992; Beukers, 1993; Mitchell et al., 1998).

Tabela 5 – Concentração de lisozima e lactoferrina em $\mu\text{g/mL}$ em amostras de leite normal, em leite de vacas com mastite e em colostro.

<i>Proteína</i>	<i>Leite</i>	<i>Leite de vacas com mastite</i>	<i>Colostro</i>
Lisozima ($\mu\text{g/mL}$)	0,1-0,2	0,5-3	0,4
Lactoferrina ($\mu\text{g/mL}$)	20-350	Mais de 8000	2000-5000

Fonte: Beukers (1993)

2.6.3. Kits comerciais para detecção de antimicrobianos no leite

Existem vários kits comerciais disponíveis para a pesquisa de resíduos de antimicrobianos em leite (Tabela 6). Esses kits permitem fácil realização das análises, de uma forma mais ou menos mecanizada para análise em massa, sem a necessidade de instrumentos sofisticados e pessoal treinado,

e são relativamente baratos. Estes incluem: BRT (*Black Reduction Test*), Charm AIM, Delvo e Valio T101 (Suhren, 1995). Outro teste microbiológico disponível inclui o COPAN ATK P & S que detecta simultaneamente, resíduos de antimicrobianos do grupo β -lactâmicos e tetraciclina, além de sulfonamidas (Costa, 1996; Cerqueira, 2003).

Tabela 6 – Kits 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 inhibition assay ² Delvotest-P, Delvotest-SP ³ Copan® ATK P & S Microplate ⁴ ; Copan® ATK P & S Single ⁴
Receptor	Charm Cowside Test ² ; Charm I Test, Charm II Test ²
Ligação à proteína	CITE Probe (β-lactâmico) ⁵ CITE Probe® (Tetraciclina) ⁵ ; CITE Probe® (Gentamicina) ⁵ ;
ELISA	CITE® Sulfa-trio (sulfametazina, sulfatiazol, sulfametazina) ⁵ Lactek (Beta-lactâmicos); Lactek (sulfametazina) ⁶ ; Lactek (Gentamicina) ⁶ Signal (gentamicina); Signal (sulfametazina) ⁷ ; Signal (neomicina) ⁷
Enzima	Penzyme ® ⁸ Snap™ (Beta-lactâmicos) ⁹ ; Snap™ (Tetraciclina) ⁹ Método de bioluminescência (ATP) ¹⁰

Fonte: Adaptado de Cullor (1992), Costa (1996) e Andrew et al. (1997).

¹BR-test – Idetek Inc., Sunnyvale, California, USA

²Charm Test – Charm Sciences Inc., Malden, Md, USA

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

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

⁵CITE Probe® - IDEXX Laboratories Inc., Portland, Maine, USA

⁶Lactek – Idetek Inc. Sunnyvale, California, USA

⁷Signal – Signal ForeSite

⁸Penzyme® - UCB-Bioproducts S. A., Chemin du Foriest, Belgium.

⁹Snap - IDEXX Laboratories Inc., Portland, Maine, USA

¹⁰Método de bioluminescência (ATP) – Biosys S.A., Compiègne, France.

Copan® – ATK Single e Microplate

O princípio deste teste é semelhante ao do Delvotest SP. O meio de cultura contém um número padrão de esporos de *Bacillus stearothermophilus* var. *calidolactis* C953. Esta amostra foi selecionada porque é muito sensível a diversos antimicrobianos e, em particular, à penicilina e aos beta-lactâmicos. Na adição de nutrientes selecionados e de um aumento da temperatura para 64°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; e atinge uma coloração entre violeta e amarelo, quando a concentração do inibidor está próxima do limite de detecção (Hotta, 2003).

2.6.4. Considerações sobre os métodos de detecção de resíduos de antimicrobianos

De modo geral, os métodos microbiológicos têm habilidade para analisar grande número de amostras ao mesmo tempo, mas esses métodos detectam somente a presença de substâncias inibidoras e não necessariamente seus metabólitos ou seus produtos de degradação. Um resultado positivo fornece pouca ou nenhuma informação a respeito da identidade da substância inibidora presente (Crosby, 1991; Moats, 1997; Mitchell, 1998). Estes testes possuem níveis de detecção dos antimicrobianos limitados, e

também necessitam de muito tempo (algumas horas) para a determinação do resultado (Mitchell et al., 1998).

Por outro lado, os métodos químicos podem detectar tanto os componentes ativos quanto qualquer produto de degradação, mas seu significado pode não ser conhecido em termos de perigos à saúde humana. Os métodos químicos são específicos para componentes ou grupos (Crosby, 1991).

Nos testes microbiológicos podem ocorrer resultados falso-negativos se estiverem presentes resíduos de substâncias às quais o teste não é sensível, ou em concentrações inferiores às detectadas pelos testes (Crosby, 1991). Resultados falso-violativos ocorrem quando há presença de resíduos de antimicrobianos no leite em limites inferiores aos de segurança ou tolerância, porém detectáveis pelos testes (Andrew et al., 1997).

Resultados falso-positivos retiram equivocadamente o leite do uso para alimentação humana, enquanto que resultados falso-negativos permitem que leite contaminado com antimicrobianos entre no mercado para consumo humano (Zeng et al., 1998; Mitchell et al., 1998).

No Brasil, os métodos oficiais para determinação de resíduos de antimicrobianos em leite são os métodos físico-químicos de Cromatografia em Camada Delgada (CCD) e Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), que são mais precisos, porém têm custo mais elevado, são mais demorados e necessitam de equipamentos caros e pessoal treinado. Esses testes devem ser realizados por laboratórios credenciados pelo Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA) como os Laboratórios de Referência Animal (LARA) localizados em diversos estados do país, conforme mostra o Quadro 1.

A condução de testes de triagem apropriados para determinar resíduos e a adoção de práticas sanitárias podem ajudar na manutenção da segurança do leite (Cullor, 1992). Devido a grande importância nutricional do leite e ao aspecto de saúde do consumidor, é necessário o controle da presença de resíduos de antimicrobianos nesse alimento visando, desta forma, a sua qualidade sanitária (Lopes et al., 1998).

A presença de resíduos de antimicrobianos no leite é uma questão à qual se deve dar grande importância devido aos prejuízos que pode causar, tanto econômicos quanto à saúde dos consumidores que ingerem alimentos (em especial leite e derivados) contendo tais substâncias. Os testes microbiológicos são, portanto, de grande importância para a indústria de alimentos e, conseqüentemente, para a saúde pública, garantindo assim a saúde do consumidor e a redução dos prejuízos no processamento dos derivados lácteos.

A pesquisa de presença de resíduos de antimicrobianos em leite é muito importante de ser realizada, seja por métodos microbiológicos, físico-químicos ou imunológicos, para que seja atestada a segurança do alimento, no caso o leite, que é consumido em grande quantidade por crianças. As crianças por sua vez, são mais susceptíveis aos riscos que essas substâncias constituem para a saúde humana. Por tudo isso é indispensável a conscientização dos profissionais relacionados à produção de leite e à inspeção, além do consumidor, que deve ser o principal interessado na segurança dos alimentos que são oferecidos à sua família.

Além da pesquisa de resíduos de antimicrobianos em leite, outra análise de grande importância é a contagem de microrganismos em leite cru que também está relacionada com a qualidade do leite e

conseqüentemente com a saúde do consumidor.

2.7. CONTAGEM DE MICRORGANISMOS EM LEITE CRU

Devido ao alto conteúdo de água, pH próximo ao neutro e variedade de nutrientes, o leite constitui excelente meio de crescimento para muitos microrganismos. O leite cru pode ser contaminado com grande variedade de microrganismos provenientes de diversas fontes. O número e os tipos de microrganismos presentes no leite cru refletem a saúde da vaca, além das condições higiênicas nas quais o leite foi obtido e armazenado (Broutin, 2004).

A qualidade microbiológica do leite cru resulta de um conjunto de fatores, como a saúde da glândula mamária; as condições de manejo do rebanho; a higiene na obtenção do leite, da sala e dos equipamentos e utensílios de ordenha; o estado de saúde do ordenhador e as condições de estocagem e transporte do leite enviado à indústria (Cerqueira et al., 1999a).

A enumeração de microrganismos no leite cru é um importante instrumento de auxílio no controle da qualidade por permitir uma avaliação da higiene de ordenha, da saúde do animal e das condições de estocagem e transporte do leite produzido. A elevada população bacteriana é indesejável para o consumidor, pois coloca em risco a saúde do mesmo devido à maior probabilidade de veiculação de microrganismos patogênicos. Para a indústria, a elevada contagem bacteriana é responsável por problemas na estocagem e no processamento do leite, além de características sensoriais indesejáveis (Picinin, 2003; Fonseca, 2005).

Segundo relatos de Cerqueira et al. (1999b), o leite ao sair do úbere, possui uma microbiota variável de $5,0 \times 10^2$ a $1,0 \times 10^3$ UFC/mL, podendo atingir $1,0 \times 10^4$, representada por micrococcos e bacilos não patogênicos.

A Instrução Normativa 51 do MAPA (Brasil, 1999) que aprova o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade (RTIQ) do leite cru refrigerado, estabelece requisitos microbiológicos, físicos, químicos, de CCS, e de resíduos químicos a serem avaliados pela Rede Brasileira de Laboratórios de Controle de Qualidade de Leite. No que se refere à contagem de microrganismos (contagem padrão em placas) em leite cru a legislação estabeleceu o máximo de $1,0 \times 10^6$ UFC/mL até 1º de julho de 2008 na região sudeste, devendo a análise ser realizada no mínimo uma vez por mês para todos os estabelecimentos processadores de leite.

2.7.1. Contagem Bacteriana Total (CBT) por método eletrônico

A busca de melhoria na pecuária leiteira envolve a qualidade do leite, o que tem sido uma motivação mundial visando à obtenção de uma matéria-prima de qualidade, na propriedade rural e na indústria, e de um produto seguro e saudável na mesa do consumidor. Vários métodos para análise desta qualidade foram desenvolvidos nas últimas décadas, a exemplo da citometria de fluxo e da radiação infravermelha, ambos empregados com sucesso na análise de diferentes componentes do leite. O estado de saúde do animal e da glândula mamária pode ser estimado com base nos resultados de diversas análises, que já são rotina em laboratórios automatizados no Brasil (Fonseca, 2005).

A contagem bacteriana do leite pode ser feita por meio de vários métodos, como a contagem padrão em placas e a contagem eletrônica. A contagem padrão em placas é

amplamente adotada em todo o mundo e auxilia na avaliação da contaminação bacteriana do leite, podendo estimar microbiota diversificada, dependendo da temperatura de incubação utilizada na técnica. É um método simples, sem necessidade de equipamentos sofisticados, entretanto é pouco preciso e demorado, necessitando de 48 a 72 horas de incubação para a obtenção dos resultados (Suhren e Walte, 2000; Fonseca, 2005).

Os métodos eletrônicos são mais rápidos (aproximadamente 150 amostras por hora). Na determinação da contagem bacteriana por citometria de fluxo utilizada na rotina laboratorial para análise de leite não há distinção entre células vivas e mortas. A técnica de marcação por imunofluorescência, utilizando corantes que permitem diferenciação da viabilidade celular, pode ser uma alternativa futura para contornar este problema (Suhren e Walte, 2000; Fonseca, 2005).

No equipamento eletrônico que tem como princípio de funcionamento a citometria de fluxo, um corante fluorescente, o brometo de etídio, se liga ao DNA das células, que são levadas por meio de um fluido carreador a um compartimento de passagem. Neste compartimento há a incidência de um feixe de laser sobre a amostra com DNA corado, que ao incidir no brometo de etídio resulta na emissão de fluorescência, que é captada como pulso eletrônico. A intensidade e a amplitude dos pulsos de fluorescência captados são traduzidos em contagens individuais de bactérias e então transformados estatisticamente em UFC/mL por meio de uma curva de calibração previamente elaborada (Bactocount..., 2002, citado por Alves, 2006).

2.8. OBJETIVOS

Frente à importância da realização de testes para pesquisa da presença de resíduos de

antimicrobianos no leite que chega às indústrias, é necessária a realização de trabalhos de pesquisa para avaliar a eficiência desses testes na detecção de tais resíduos. Diante disso o objetivo do presente trabalho foi avaliar a eficiência do kit COPAN ATK P & S – Microplate e Single – na detecção de resíduos de antimicrobianos em leite inoculado experimentalmente com diferentes concentrações de vários grupos de antimicrobianos (beta-lactâmicos, tetraciclina, sulfonamidas, macrolídeos, aminoglicosídeos e trimetoprim). Também foi avaliada uma estratégia de triagem para a realização da pesquisa de resíduos de antimicrobianos em leite cru, utilizando-se a baixa contagem bacteriana total como requisito básico, além do histórico dos produtores.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 AVALIAÇÃO DO KIT COPAN ATK P & S – MICROPLATE E SINGLE

O teste qualitativo para detecção de substâncias inibitórias no leite, COPAN ATK P & S, nas versões Microplate e Single, baseia-se no crescimento do *Bacillus stearothermophilus* var. *calidolactis*, que promove mudança de pH detectada como uma alteração da cor do meio-teste de violeta para amarelo, por produção de ácido no meio e conseqüente diminuição do pH. Quando as substâncias inibitórias estão presentes, não há crescimento do microrganismo e o pH não se altera, assim a cor do meio permanece a mesma (violeta).

Os procedimentos de avaliação do kit COPAN ATK P & S seguiram as recomendações prescritas na Guia para validação de métodos EURACHEM (Eurachem, 1998). As análises foram feitas seguindo criteriosamente as recomendações e cuidados do fabricante, descritos no manual para os kits Microplate e Single

(Anexo 1), e foram realizadas no período de setembro a dezembro de 2004. Todos os procedimentos foram realizados em capela de fluxo laminar sob condições assépticas e com material estéril no Laboratório de Microbiologia de Leite e Derivados do Departamento de Tecnologia e Inspeção de Produtos de Origem Animal (DTIPOA) da Escola de Veterinária da UFMG, em Belo Horizonte (MG).

Soluções-padrão, preparadas com 13 antimicrobianos (Sigma Aldrich Brasil Ltda.), foram adicionadas em amostras de leite em diferentes concentrações desses antimicrobianos. As soluções-padrão utilizadas na adição das amostras foram preparadas em solvente compatível com o kit, seguindo recomendações internacionais (CEN Standard, 1999) (Anexo 4).

A adição de amostras consistiu na inoculação de soluções-padrão dos analitos pesquisados em uma amostra branca da matriz em questão (amostra de leite isento de resíduos de antimicrobianos - *Skim milk* da DIFCO - Becton Dickinson and Company - Sparks, Maryland - USA). Os níveis de adição foram estabelecidos considerando o limite de detecção declarado pelo fabricante e o limite máximo de resíduo (LMR) estabelecido pela legislação brasileira através da Instrução Normativa nº 42 de 1999, conforme Brasil (1999), ou por órgãos internacionais como a OMS e o *Codex Alimentarius* (quando a legislação brasileira não estabelece os limites para determinada droga). Foram estabelecidos quatro níveis de concentrações (Quadros 4 e 5):

- o primeiro nível equivalente à metade do limite de detecção declarado pelo fabricante;
- o segundo nível equivalente ao limite máximo de resíduos (LMR) estabelecido pela legislação brasileira;

- o terceiro nível equivalente ao limite de detecção declarado pelo fabricante;
- o quarto nível equivalente ao dobro do limite de detecção declarado pelo fabricante.

As amostras foram inoculadas utilizando esses quatro níveis de concentração diferentes de antimicrobianos dos grupos: **beta-lactâmicos**: penicilina G, ampicilina,

amoxicilina, cloxacilina, oxacilina; **tetraciclínas**: oxitetraciclina e tetraciclina; **sulfonamidas**: sulfadiazina e sulfametoxazol; **macrolídeos**: eritromicina e tilosina; **aminoglicosídeos**: gentamicina,; **vários**: trimetoprim. Foram realizadas 30 repetições de cada nível para o teste Microplate e 8 repetições de cada nível para o teste Single.

Quadro 4. Níveis de concentração dos antimicrobianos (expressos em ppb) testados pelo teste COPAN ATK P & S Microplate.

Antimicrobiano	Níveis de Concentração (ppb)			
	Nível 1	Nível 2	Nível 3	Nível 4
Amoxicilina cristalina	1,75	4,0	3,5	7,0
Ampicilina anidra cristalina	2,0	4,0	4,0	8,0
Cloxacilina sódica monohidratada	12,5	30 (OMS)	25	50
Oxacilina sódica monohidratada	7,5	30 (OMS)	15	30
Penicilina G sódica	1,25	4,0	2,5	5,0
Cloridrato de Tetraciclina	50	100	100	200
Oxitetraciclina dihidratada Sigmaultra	75	100	150	300
Estearato de Eritromicina	150	40	300	600
Tartarato de Tilosina	37,5	-	75	150
Sulfadiazina	25	100	50	100
Sulfametoxazol	-	100	-	-
Sulfato de Gentamicina	100	200 (Codex)	200	400
Trimetoprim	100	50 (OMS)	200	400

Nível 1 = Metade do limite de detecção declarado pelo fabricante; Nível 2 = Limite Máximo de Resíduos – LMR (IN 42, OMS e *Codex Alimentarius*); Nível 3 = Limite de detecção declarado pelo fabricante; Nível 4 = Dobro do limite de detecção declarado pelo fabricante.

Quadro 5. Níveis de concentração dos antimicrobianos (expressos em ppb) testados pelo teste COPAN ATK P & S Single.

Antimicrobiano	Níveis de Concentração (ppb)			
	Nível 1	Nível 2	Nível 3	Nível 4
Amoxicilina cristalina	2,0	4,0	4,0	8,0
Ampicilina anidra cristalina	2,0	4,0	4,0	8,0
Cloxacilina sódica monohidratada	12,5	30 (OMS)	25	50
Oxacilina sódica monohidratada	7,5	30 (OMS)	15	30
Penicilina G sódica	1,25	4,0	2,5	5,0
Cloridrato de Tetraciclina	50	100	100	200
Oxitetraciclina dihidratada Sigmaalta	75	100	150	300
Estearato de Eritromicina	100	40	200	400
Tartarato de Tilosina	50	-	100	200
Sulfadiazina	25	100	50	100
Sulfametoxazol	-	100	-	-
Sulfato de Gentamicina	125	200 (Codex)	250	500
Trimetoprim	100	50 (OMS)	200	400

Nível 1 = Metade do limite de detecção declarado pelo fabricante; Nível 2 = LMR (IN 42, OMS e *Codex Alimentarius*); Nível 3 = Limite de detecção declarado pelo fabricante; Nível 4 = Dobro do limite de detecção declarado pelo fabricante.

Para a realização do teste na versão Microplate, conforme recomendação do fabricante descrita no Anexo 1, 100 µL de leite contendo as concentrações de antimicrobianos (Quadro 4) foram transferidos para cada orifício da placa-teste, sendo todos os níveis repetidos 30 vezes. Já para a versão Single, foram realizadas oito repetições de cada nível, conforme descrito no Quadro 5. Também foram utilizadas amostras para controle negativo (leite em pó isento de resíduos e reconstituído com água estéril) e controle positivo (leite adicionado de concentração significativa de antimicrobiano). Após a inoculação do leite no kit, o mesmo foi incubado em banho-maria a $64^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ por três horas. A leitura foi feita observando-se a presença ou não de alteração na coloração do kit (violeta – positivo, amarelo - negativo), como mostra a tabela de cores para a verificação de resultado (Anexo 2), ressaltando que coloração entre o violeta e o amarelo é resultado suspeito, que é considerado positivo, já que essa coloração indica que há presença de inibidores, porém

essa concentração existente está próxima do nível de detecção do teste.

Para a avaliação da especificidade foram utilizadas amostras brancas preparadas com leite isento de resíduos (*Skim milk* da DIFCO - Becton Dickinson and Company - Sparks, Maryland - USA). 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.

3.2 AVALIAÇÃO DA ESTRATÉGIA DE TRIAGEM DE AMOSTRAS DE LEITE CRU COM BAIXA CONTAGEM BACTERIANA TOTAL

3.2.1. Coleta das amostras

Amostras de leite cru de produtores rurais da região metropolitana de Belo Horizonte foram coletadas em tanques refrigerados e analisadas em laboratório, para contagem bacteriana total (CBT), em equipamento eletrônico por método de citometria de fluxo (Foss Electric), no período de outubro a novembro de 2005.

Foram observados os resultados obtidos no equipamento eletrônico para CBT e o leite dos produtores que apresentaram amostras com histórico de CBT abaixo de $5,0 \times 10^4$ UFC/mL foram selecionados para nova coleta, no dia subsequente da mesma. Essa nova coleta foi realizada por funcionário do laticínio, em frasco estéril.

A partir desta triagem, 136 amostras de leite cru foram coletadas em frascos estéreis (sem adição de Azidiol) e transportadas sob refrigeração até o Laboratório de Microbiologia do DTIPOA da Escola de Veterinária da UFMG onde foram submetidas à pesquisa de resíduos pelos testes COPAN ATK P & S Microplate.

3.2.2. Pesquisa de resíduos de antimicrobianos

Para a realização do teste COPAN Microplate, 100 µL de cada amostra (leite cru) foram transferidos para os orifícios da placa-teste. As amostras foram devidamente identificadas e as placas foram então incubadas em banho-maria a $64^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ por 3 horas. Após esse período, realizou-se a leitura dos resultados pela observação de coloração, seguindo uma tabela que varia de violeta a amarelo (Anexo 2). 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.

Na realização desse teste, utilizaram-se também controles negativo e positivo. O controle negativo foi preparado utilizando leite em pó isento de resíduos (leite isento de resíduos de antimicrobianos - *Skim milk* da DIFCO - Becton Dickinson and Company - Sparks, Maryland - USA) reconstituído com água destilada estéril. O controle positivo foi preparado com este mesmo leite, adicionado de antimicrobiano (Neomicina).

3.2.3. Análise Estatística

A avaliação dos kits COPAN ATK P & S – Microplate e Single – foi realizada no presente trabalho pela observação dos resultados (positivos/suspeitos e negativos) e os resultados obtidos foram submetidos à análise estatística. Realizou-se o estudo de dispersão de frequência por meio do teste de Qui-quadrado (χ^2) e o teste exato de Fisher, conforme Sampaio (1998). Para a realização dos cálculos utilizou-se o programa estatístico *Epi Info 6* (Dean et al., 1992).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. AVALIAÇÃO DA EFICIÊNCIA DO TESTE COPAN ATK P & S (MICROPLATE E SINGLE) NA DETECÇÃO DE RESÍDUOS DE ANTIMICROBIANOS NO LEITE

Os kits para detecção de resíduos de antimicrobianos COPAN, Microplate e Single, foram avaliados, quanto ao limite de

detecção de diferentes antimicrobianos. Em verificado que os testes foram capazes de detectar a presença dos antimicrobianos nas concentrações declaradas pelo fabricante (nível 3). Para alguns antimicrobianos, os

relação aos níveis de detecção testados, foi testes detectaram níveis abaixo destes (nível 2), conforme mostrado nas Tabelas 7 e 8 e Anexo 5.

Tabela 7. Detecção (%) de diferentes concentrações de antimicrobianos em leite utilizando-se o teste COPAN Microplate.

Antimicrobiano	Nível 1 (%)			Nível 2 (%)			Nível 3 (%)			Nível 4 (%)		
	P	N	S	P	N	S	P	N	S	P	N	S
Amoxicilina	100	0	0	100	0	0	100	0	0	100	0	0
Ampicilina	100	0	0	100	0	0	100	0	0	100	0	0
Cloxacilina	96,66	0	3,34	100	0	0	100	0	0	100	0	0
Oxacilina	100	0	0	100	0	0	96,66	0	3,34	100	0	0
Penicilina	100	0	0	100	0	0	100	0	0	93,33	0	6,67
Oxitetraciclina	0	100	0	0	100	0	0	100	0	100	0	0
Tetraciclina	0	100	0	0	96,66	3,34	0	96,66	3,34	0	0	100
Eritromicina	10	0	90	0	100	0	100	0	0	100	0	0
Tilosina	0	100	0	NR	NR	NR	100	0	0	100	0	0
Sulfadiazina	100	0	0	100	0	0	100	0	0	100	0	0
Sulfametoxazol	NR	NR	NR	100	0	0	NR	NR	NR	NR	NR	NR
Gentamicina	0	100	0	6,66	93,34	0	6,66	93,34	0	100	0	0
Trimetoprim	0	30	70	0	96,66	3,34	100	0	0	100	0	0

P: Positivo, N: Negativo, S: Suspeito, NR: Não Realizado

Nível 1 = Metade do limite de detecção declarado pelo fabricante; Nível 2 = LMR (IN 42, OMS e *Codex Alimentarius*); Nível 3 = Limite de detecção declarado pelo fabricante; Nível 4 = Dobro do limite de detecção declarado pelo fabricante.

Tabela 8. Detecção (%) de diferentes concentrações de antimicrobianos em leite utilizando-se o teste COPAN Single.

Antimicrobiano	Nível 1 (%)			Nível 2 (%)			Nível 3 (%)			Nível 4 (%)		
	P	N	S	P	N	S	P	N	S	P	N	S
Amoxicilina	0	100	0	100	0	0	100	0	0	100	0	0
Ampicilina	100	0	0	100	0	0	100	0	0	100	0	0
Cloxacilina	100	0	0	100	0	0	100	0	0	100	0	0
Oxacilina	100	0	0	100	0	0	100	0	0	100	0	0
Penicilina	100	0	0	100	0	0	100	0	0	100	0	0
Oxitetraciclina	0	100	0	0	100	0	0	100	0	100	0	0
Tetraciclina	0	100	0	0	0	100	0	0	100	100	0	0
Eritromicina	0	100	0	0	100	0	100	0	0	100	0	0
Tilosina	0	100	0	NR	NR	NR	100	0	0	100	0	0
Sulfadiazina	0	100	0	100	0	0	100	0	0	100	0	0
Sulfametoxazol	NR	NR	NR	100	0	0	NR	NR	NR	NR	NR	NR
Gentamicina	0	0	100	100	0	0	100	0	0	100	0	0
Trimetoprim	0	87,5	12,5	0	87,5	12,5	100	0	0	100	0	0

P: Positivo, N: Negativo, S: Suspeito, NR: Não Realizado

Nível 1 = Metade do limite de detecção declarado pelo fabricante; Nível 2 = LMR (IN 42, OMS e *Codex Alimentarius*); Nível 3 = Limite de detecção declarado pelo fabricante; Nível 4 = Dobro do limite de detecção declarado pelo fabricante.

No Brasil, ainda existem poucos trabalhos realizados comparando os diferentes métodos existentes no mercado. Isto dificulta a avaliação dos kits e a adoção de um método padrão. Pouco se sabe sobre estes kits em relação a sua sensibilidade e especificidade devido à falta de pesquisas e de metodologias capazes de avaliar a eficiência dos mesmos no Brasil. Muitos são

ainda novos no mercado e necessitam de avaliações para sua validação no país (Hotta, 2003).

4.1.1. Sensibilidade e Especificidade

As avaliações da sensibilidade e da especificidade dos kits COPAN Microplate e Single estão descritas nos Tabelas 9 a 11.

Tabela 9. Sensibilidade e especificidade (%) dos testes COPAN Microplate e Single na detecção de concentrações de antimicrobianos referentes aos LMR (Nível 2).

<i>Antimicrobiano</i>	LMR (ppb)	<i>Microplate</i>		<i>Single</i>	
		Sensibilidade (%)	Especificidade (%)	Sensibilidade (%)	Especificidade (%)
Amoxicilina	4	100	100	100	100
Ampicilina	4	100	100	100	100
Cloxacilina	30	100	100	100	100
Oxacilina	30	100	100	100	100
Penicilina	4	100	100	100	100
Oxitetraciclina	100	0	100	0	100
Tetraciclina	100	0	100	0	100
Eritromicina	40	0	100	0	100
Tilosina	SP	NR	100	NR	100
Sulfadiazina	100	100	100	100	100
Sulfametoxazol	100	100	100	100	100
Gentamicina	200	6,66	100	100	100
Trimetoprim	50	0	100	0	100

NR: Não realizado;

SP: Sem Padrão

Tabela 10. Sensibilidade e especificidade (%) dos testes COPAN Microplate na detecção de limites de concentrações de antimicrobianos declarados pelo fabricante (Nível 3).

<i>Antimicrobiano</i>	Nível 3 (ppb)	<i>Microplate</i>	
		Sensibilidade (%)	Especificidade (%)
Amoxicilina	3,5	100	100
Ampicilina	4,0	100	100
Cloxacilina	25	100	100
Oxacilina	15	96,66	100
Penicilina	2,5	100	100
Oxitetraciclina	150	0	100
Tetraciclina	100	0	100
Eritromicina	300	100	100
Tilosina	75	100	100
Sulfadiazina	50	100	100
Sulfametoxazol	SP	NR	100
Gentamicina	200	6,66	100
Trimetoprim	200	100	100

NR: Não realizado;

SP: Sem Padrão

Tabela 11. Sensibilidade e especificidade (%) dos testes COPAN Single na detecção de limites de concentrações de antimicrobianos declarados pelo fabricante (Nível 3).

<i>Antimicrobiano</i>	<i>Nível 3</i> (<i>ppb</i>)	<i>Single</i>	
		Sensibilidade (%)	Especificidade (%)
Amoxicilina	4,0	100	100
Ampicilina	4,0	100	100
Cloxacilina	25	100	100
Oxacilina	15	100	100
Penicilina	2,5	100	100
Oxitetraciclina	150	0	100
Tetraciclina	100	0	100
Eritromicina	200	100	100
Tilosina	100	100	100
Sulfadiazina	50	100	100
Sulfametoxazol	SP	NR	100
Gentamicina	250	100	100
Trimetoprim	200	100	100

NR: Não realizado;

SP: Sem Padrão

Observou-se que os testes apresentaram excelente especificidade e boa sensibilidade para os antimicrobianos testados, exceto para as tetraciclina, eritromicina, gentamicina e trimetoprim. Segundo Gorni e Cabrini (2003), os testes microbiológicos, como o Delvotest SP e o COPAN, abrangem as principais classes de antibióticos utilizados em gado leiteiro, como os beta-lactâmicos, tetraciclina, sulfas e aminoglicosídeos. Possuem excelente limite de detecção para cada penicilina, cefalosporina e sulfas, razoável para as tetraciclina, questionável para o aminoglicosídeo gentamicina e péssimo para cloranfenicol.

4.1.2. Detecção dos antimicrobianos de diferentes grupos

Os antimicrobianos podem ser divididos em grupos, de acordo com seu modo de ação, e os utilizados no presente trabalho podem ser assim agrupados: beta-lactâmicos (amoxicilina, ampicilina, cloxacilina, oxacilina e penicilina); tetraciclina (oxitetraciclina e tetraciclina); macrolídeos (eritromicina e tilosina); sulfonamidas

(sulfadiazina e sulfametoxazol); aminoglicosídeos (gentamicina) e outros (trimetoprim).

Observando-se os resultados obtidos na pesquisa de resíduos de antimicrobianos, utilizando-se o teste COPAN Microplate, em relação ao grupo de drogas testado, nota-se que há diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) (Tabela 12). Esse resultado comprova que a sensibilidade do teste é diferente para cada grupo de antimicrobiano, e por isso os limites de detecção indicados pelo fabricante (Anexo 1) diferem em relação a cada grupo e até entre antimicrobianos pertencentes ao mesmo grupo. Utilizou-se o estudo de dispersão de frequência, por meio do teste do Qui-quadrado (χ^2) conforme Sampaio (1998), e o programa estatístico *Epi Info 6* (Dean et al., 1992).

Tabela 12 – Detecção de resíduos de antimicrobianos pelo teste COPAN Microplate, em relação ao grupo de antimicrobianos analisado (Nível 2).

Grupo de Antimicrobiano	Presença de resíduos de antimicrobianos		Total	% positivos e suspeitos
	Positivo e suspeito	Negativo		
Beta-lactâmicos	150	0	150	100
Tetraciclínas	1	59	60	1,67
Sulfonamidas	60	0	60	100
Macrolídeos (Eritromicina)	0	30	30	0
Aminoglicosídeos (Gentamicina)	2	28	30	6,67
Vários (Trimetoprim)	1	29	30	3,33
TOTAL	214	146	360	59,44

$\chi^2 = 344,17$; gl = 5; significativo para $p < 0,05$

Analisando os resultados da Tabela 13, que se refere à detecção de resíduos de antimicrobianos pelo teste COPAN Single testados nas concentrações do nível 2 (LMR), observa-se que não há diferença significativa ($p > 0,05$) na detecção dos antimicrobianos dos grupos beta-lactâmicos, sulfonamidas e

aminoglicosídeos, onde todas as amostras apresentaram resultado positivo ou suspeito. Porém houve diferença estatisticamente significativa, pelo teste exato de Fisher ($p < 0,05$) na detecção dos antimicrobianos desses grupos em relação aos outros grupos.

Tabela 13 – Detecção de resíduos de antimicrobianos pelo teste COPAN Single, em relação ao grupo de antimicrobianos analisado (Nível 2).

Grupo de Antimicrobiano	Presença de resíduos de antimicrobianos		Total*	% positivos e suspeitos
	Positivo e suspeito	Negativo		
Beta-lactâmicos	40	0	40 ^a	100
Tetraciclínas	8	8	16 ^b	50
Sulfonamidas	16	0	16 ^a	100
Macrolídeos (Eritromicina)	0	8	8 ^c	0
Aminoglicosídeos (Gentamicina)	8	0	8 ^a	100
Vários (Trimetoprim)	1	7	8 ^{bc}	12,5
TOTAL	73	23	96	70,08

Avaliação pelo Teste Exato de Fisher

*Valores seguidos de letras distintas indicam valores estatisticamente diferentes ($p < 0,05$)

4.1.3. Grupos de antimicrobianos

Beta-lactâmicos

Em relação aos antimicrobianos do grupo beta-lactâmicos, os testes detectaram as concentrações testadas em todos os níveis, em praticamente todas as amostras. Os

testes foram sensíveis para detectar as concentrações informadas pelo fabricante (nível 3), as concentrações estabelecidas pelo LMR (nível 2) e também metade da concentração informada pelo fabricante (nível 1), conforme mostrado nas Tabelas 7 e 8.

O teste Microplate foi capaz de detectar a concentração de 1,75 ppb para amoxicilina; 2,0 ppb para a ampicilina; 12,5 ppb para a cloxacilina (em 96,66% das amostras); 7,5 ppb para a oxacilina e 1,25 ppb para a penicilina. Esses resultados mostram que o teste é capaz de detectar concentrações abaixo do que é informado pelo fabricante e abaixo do LMR estabelecido pela legislação brasileira, fato que pode gerar resultados falso-violativos.

O teste Single foi capaz de detectar as seguintes concentrações: 4,0 ppb para a amoxicilina; 2,0 ppb para a ampicilina; 12,5 ppb para a cloxacilina; 7,5 ppb para a oxacilina; e 1,25 ppb para a penicilina.

Em relação ao resultado obtido por grupo de antimicrobiano testado no nível 2 (LMR), observou-se que entre os antimicrobianos testados do grupo dos beta-lactâmicos, não houve diferença, indicando que a resposta (detecção de resíduos) é semelhante para todos os antimicrobianos pertencentes a esse grupo, utilizando o teste Microplate (Tabela 14) ou o teste Single (Tabela 15). Uma vez que os resultados encontrados apresentaram 100% de positividade para todos os antimicrobianos testados deste grupo não foi aplicado teste estatístico para análise de dispersão de frequência.

A estrutura química do núcleo da penicilina é pouco comum, e caracteriza-se por um anel de β -lactama de quatro membros fundidos a um anel de tiazolidina. Qualquer desorganização desse arranjo provoca a perda completa da atividade antimicrobiana. Do ponto de vista

microbiológico há microrganismos resistentes à ação da penicilina G que produzem uma β -lactamase (penicilinase) capaz de hidrolisar o anel de β -lactama e formar ácido penicilóico inativo. Do ponto de vista químico, a penicilina G é rapidamente inativada quando o pH é mais ácido que 5,0 ou mais alcalino que 8,0, tendo máxima estabilidade em pH 6,8, e é considerada o agente de primeira escolha contra muitas bactérias gram-positivo patogênicas. As penicilinas atuam pela inibição da formação de mucopeptídeos na parede celular das bactérias. A penicilina G sódica é normalmente formulada com sistema tampão adequado. A penicilina G sódica pura é usada como padrão de referência para ensaios microbiológicos das penicilinas, sendo 1 mg equivalente a 1667 unidades (Robbers et al., 1997).

A amoxicilina é o derivado *p*-hidroxílico da ampicilina. Tem atividade anti-bacteriana semelhante à da ampicilina que é uma penicilina semi-sintética estável em meio ácido e rapidamente absorvida. A ampicilina é inativada pela penicilinase, mas tem um espectro de atividade muito grande. É ativa contra a maioria das bactérias sensíveis à penicilina G, mas contra certos bacilos Gram-negativo sua atividade é maior. Cloxaciclina e Oxacilina são penicilinas semi-sintéticas não inativadas pela penicilinase. São recomendadas principalmente para o tratamento de infecções causadas por estafilococos resistentes a outras penicilinas (Robbers et al., 1997).

Tabela 14 – Detecção de resíduos de antimicrobianos do grupo dos beta-lactâmicos pelo teste COPAN Microplate (Nível 2).

<i>Antimicrobiano</i>	<i>Presença de resíduos de antimicrobianos</i>		<i>Total</i>	<i>% positivos e suspeitos</i>
	Positivo e Suspeito	Negativo		
Amoxicilina	30	0	30	100
Ampicilina	30	0	30	100
Cloxacilina	30	0	30	100
Oxacilina	30	0	30	100
Penicilina	30	0	30	100
TOTAL	150	0	150	100

Tabela 15 – Detecção de resíduos de antimicrobianos do grupo dos beta-lactâmicos pelo teste COPAN Single (Nível 2).

<i>Antimicrobiano</i>	<i>Presença de resíduos de antimicrobianos</i>		<i>Total</i>	<i>% positivos e suspeitos</i>
	Positivo e Suspeito	Negativo		
Amoxicilina	8	0	8	100
Ampicilina	8	0	8	100
Cloxacilina	8	0	8	100
Oxacilina	8	0	8	100
Penicilina	8	0	8	100
TOTAL	40	0	40	100

Pode-se observar que os testes, tanto o Microplate quanto o Single, apresentaram elevada sensibilidade para os antimicrobianos do grupo beta-lactâmicos, podendo então ser indicados como adequados para a detecção desses resíduos, conforme mostrado nas Tabelas 14 e 15.

Macrolídeos

A eritromicina tem um espectro principalmente Gram-positivo, mas também inibe alguns outros agentes patogênicos. Não inibe, porém, nenhum bacilo entérico Gram-negativo (Robbers et al., 1997).

Quanto aos macrolídeos, os kits detectaram as concentrações informadas pelo fabricante e o dobro desse valor (níveis 3 e 4, respectivamente) em 100% das amostras (Tabelas 7 e 8). Porém esse limite de detecção do teste, descrito em seu manual de instrução, é superior ao LMR estabelecido pela legislação para ambos antimicrobianos.

Para a eritromicina o teste Microplate foi capaz de detectar 300 ppb e o Single 200 ppb (nível 3), enquanto que o LMR para essa substância é 40 ppb. Já para a Tilosina, o teste Microplate detectou 75 ppb e o Single 100 pp (nível 3); entretanto não há LMR estabelecido para esta droga na legislação brasileira, e as organizações internacionais estabelecem limite de 50 ppb (Quadro 2) (Pedersen e Suhren, 2000). Pode-se observar que esses testes detectam níveis acima do permitido pela legislação, o que pode gerar resultados falso-negativos para essas drogas.

Em relação ao resultado obtido por grupo de antimicrobiano, observou-se que não houve diferença entre os antimicrobianos testados do grupo dos macrolídeos no nível de detecção declarado pelo fabricante (nível 3), onde foi encontrado 100% de positividade para as amostras testadas, tanto no teste Microplate quanto no teste Single. Isso indica que a detecção de resíduos é

semelhante para as substâncias pertencentes a esse grupo, utilizando-se tais testes.

Entretanto, os testes detectaram níveis acima do permitido pela legislação brasileira, o que pode gerar resultados falso-negativos para esses antimicrobianos, situação que não é nada favorável ao consumidor e às indústrias, e assim os kits não podem ser considerados adequados para a detecção desse grupo de drogas.

Sulfonamidas

As sulfonamidas são agentes tireostáticos, podendo causar reações alérgicas em indivíduos sensíveis. Detentoras de atividade bacteriostática são utilizadas em todas as espécies animais com a finalidade de curar ou prevenir doenças, ou ainda, via ação sinérgica com outras drogas, visando manter o ganho de peso do animal, mesmo quando estejam debilitados. São drogas administradas pelas mais diferentes vias (Brasil, 1999).

Os testes apresentaram elevada sensibilidade (100%) para antimicrobianos do grupo das sulfonamidas, detectando os limites estabelecidos pela legislação brasileira (nível 2) (Tabela 9).

Para a sulfadiazina, o teste Microplate foi capaz de detectar a concentração de 25 ppb, sendo este valor metade do informado pelo fabricante e um quarto do LMR estabelecido pela legislação (100 ppb). O teste Single foi capaz de detectar 50 ppb desta droga, que é o limite de detecção informado pelo fabricante (nível 3), e também metade do LMR. Ou seja, os testes detectaram limites inferiores ao permitido pela legislação brasileira, podendo assim gerar resultados falso-violativos, o que não é favorável aos produtores.

Em relação ao sulfametoxazol, ambos os testes detectaram 100 ppb, que é o LMR para esta droga. Após a revisão dos limites de detecção realizada pelo fabricante (Anexo

3), este indicou que os testes são sensíveis para detectar concentrações de sulfametoxazol entre 50 e 100 ppb, porém neste trabalho testou-se a concentração de 100 ppb.

Ao avaliar o resultado referente ao grupo das sulfonamidas, observou-se que utilizando os testes Microplate e Single, 100% das amostras foram positivas para presença de resíduos destas drogas no nível 2 (LMR), e por isso não foi aplicado teste estatístico. Frente aos resultados avaliados, pode-se afirmar que os testes Microplate e Single são adequados para a pesquisa de resíduos de sulfonamidas em leite.

Tetraciclina

O cloridrato de Tetraciclina é o menos caro e o mais usado desses antibióticos. Está presente em grande número de fórmulas, como base, sal de HCl e complexo de fosfato. A oxitetraciclina é comercializada em várias fórmulas para uso oral, parenteral e tópico (Robbers et al., 1997).

Em relação à tetraciclina e oxitetraciclina, os resultados observados no presente estudo indicam que a sensibilidade dos testes foi baixa nos níveis 2 e 3, demonstrando dificuldades na utilização destes métodos para detecção destes antimicrobianos, especificamente. No entanto, analisando-se os limites de detecção revistos pelo fabricante (Anexo 3), verifica-se que os testes realmente não detectam os LMR, mas sim, concentrações mais elevadas. Isto indica coerência com os resultados encontrados e reforça a necessidade de rever as informações contidas no manual dos kits.

Esse resultado é coerente com o encontrado por Hotta (2003), que utilizando estes métodos microbiológicos para detecção de resíduos de antimicrobianos em leite cru, não encontrou resultados positivos para detecção de 100 ppb para tetraciclina no controle positivo. Isto é um indicativo que

estes métodos não foram capazes de detectar resíduos de tetraciclina no limite estabelecido pela legislação brasileira (LMR) e no limite estabelecido pelo fabricante para os respectivos métodos.

Nas amostras testadas para tetraciclinas, o teste Single foi capaz de detectar a concentração de 200 ppb (nível 4), resultado este coerente com os limites de detecção informados pelo fabricante após a revisão (de 200 a 300 ppb). Porém esse valor é superior ao estabelecido pela legislação brasileira (100 ppb). Já para o teste Microplate, na concentração de 200 ppb (nível 4) as amostras testadas apresentaram resultado suspeito, o que ainda pode ser coerente com a informação do fabricante após a revisão que indica a detecção de 200 a 300 ppb; porém novas análises devem ser realizadas para que se possa confirmar esses limites.

Para a oxitetraciclina, ambos os testes detectaram concentrações de 300 ppb, o que também é condizente com a informação do fabricante após a revisão que indica a detecção de 250 a 300 ppb desta droga. Porém este limite também é superior ao

LMR estabelecido pela legislação, que é de 100 ppb.

O fato de os testes Microplate e Single detectarem valores superiores aos estabelecidos pela legislação brasileira, para resíduos de tetraciclinas, pode gerar resultados falso-negativos. Assim, quando laboratoristas de indústrias de laticínios utilizam esses testes, amostras com resultados negativos, podem na verdade, estar positivas, veiculando resíduos deste antimicrobiano no leite. As conseqüências da presença desses resíduos no leite podem ser caracterizadas por problemas tecnológicos para as indústrias e de saúde pública.

Ao avaliar os resultados obtidos entre os antimicrobianos testados do grupo das tetraciclinas pelo teste Microplate, observa-se que não houve diferença estatisticamente significativa ($p > 0,05$) entre eles pelo Teste Exato de Fisher. Isso indica que a resposta (presença de resíduos) não depende do antimicrobiano presente (Tabelas 16 e 17), ressaltando-se que a detecção das tetraciclinas pelos testes não foi considerável.

Tabela 16 – Detecção de resíduos de antimicrobianos do grupo das tetraciclinas pelo teste COPAN Microplate (Nível 2).

<i>Antimicrobiano</i>	<i>Presença de resíduos de antimicrobianos</i>		<i>Total*</i>	<i>% positivos e suspeitos</i>
	Positivo e Suspeito	Negativo		
Tetraciclina	1	29	30 ^a	3,33
Oxitetraciclina	0	30	30 ^a	0
TOTAL	1	59	60	1,67

Avaliação pelo Teste Exato de Fisher, não significativo para $p < 0,05$.

*Valores seguidos de letras iguais em uma mesma coluna determinam equivalência entre grupos.

Em relação ao teste Single, para o grupo de antimicrobianos em questão pode-se observar que houve diferença estatisticamente significativa para a presença dos mesmos nas amostras avaliadas pelo kit, pelo Teste Exato de Fisher para $p < 0,05$.

Observa-se na Tabela 17 que houve inversão dos valores, sendo a tetraciclina detectada em todas as amostras e a oxitetraciclina em nenhuma.

Tabela 17 – Detecção de resíduos de antimicrobianos do grupo das tetraciclinas pelo teste COPAN Single (Nível 2).

<i>Antimicrobiano</i>	<i>Presença de resíduos de antimicrobianos</i>		<i>Total*</i>	<i>% positivos e suspeitos</i>
	Positivo e Suspeito	Negativo		
Oxitetraciclina	0	8	8 ^a	0
Tetraciclina	8	0	8 ^b	100
TOTAL	8	8	16	50

Avaliação pelo Teste Exato de Fisher, significativo para $p < 0,05$.

*Valores seguidos de letras diferentes em uma mesma coluna determinam que não há equivalência entre os grupos.

Diante da análise destes resultados pode-se indicar que os testes Microplate e Single não são adequados para a detecção de resíduos de tetraciclinas dentro do Limite Máximo de Resíduos estabelecido pela legislação brasileira (Brasil, 2002).

Aminoglicosídeos – Gentamicina

A gentamicina é produzida por *Micromonospora purpurea*, um actinomiceto. A mistura antibiótica usada consiste, sobretudo das gentamicinas C₁, C_{1A} e C₂. A gentamicina C₁ é o principal componente. Essas substâncias antibióticas contêm dois resíduos de amino-açúcar e uma unidade de 2-desoxiestreptamina (Robbers et al., 1997).

O teste Microplate foi capaz de detectar 400 ppb em 100% das amostras testadas com essa concentração de gentamicina, que é o dobro do LMR estabelecido pelo *Codex Alimentarius* (200 ppb). Nas amostras

analisadas o teste detectou a concentração de 200 ppb apenas em 6,66 % dos resultados. Entretanto, o limite de detecção informado pelo fabricante após revisão (Anexo 3) foi de 250 a 350 ppb, e como esses valores não foram testados no presente trabalho, não pode-se afirmar que o teste não está condizente com o manual de instruções, apesar do teste não ter detectado o LMR.

Já o teste Single foi capaz de detectar 200 ppb de gentamicina, que é a concentração estabelecida pelo *Codex Alimentarius* como LMR. Observou-se que houve diferença estatisticamente significativa entre o teste Single e o Microplate (Tabela 18) em relação à detecção de resíduos de gentamicina em leite na concentração testada no nível 2 (LMR). Assim pode-se afirmar que o teste Single é mais eficiente que o Microplate na detecção de resíduos desse antimicrobiano em leite, de acordo com os valores estabelecidos pela legislação.

Tabela 18 – Comparação dos resultados da pesquisa de presença de resíduos de gentamicina entre os testes Microplate e Single no Nível 2 (LMR).

<i>Teste</i>	<i>Presença de resíduos de antimicrobianos</i>		<i>Total*</i>	<i>% positivos e suspeitos</i>
	Positivo e suspeito	Negativo		
Microplate	2	28	30 ^a	6,66
Single	8	0	8 ^b	100
TOTAL	10	28	38	26,31

Avaliação pelo Teste Exato de Fisher significativo para $p < 0,05$.

*Valores seguidos de letras diferentes em uma mesma coluna determinam que não há equivalência entre os grupos.

Outros antimicrobianos – Trimetoprim

Na pesquisa de resíduos de trimetoprim, o teste Microplate foi capaz de detectar 200 ppb em 100% das amostras testadas, sendo essa concentração quatro vezes maior que o LMR estabelecido pela OMS – Organização Mundial da Saúde (50 ppb), que é o valor de referência utilizado, uma vez que a legislação brasileira não estabelece LMR para esta droga. Para essa concentração de 50 ppb (nível 2) foram observados resultados suspeitos em 3,34% das amostras testadas. Já para a concentração de 100 ppb, 70% das amostras foram consideradas suspeitas para a presença de resíduos. A observação de resultados suspeitos indica que o teste detecta concentrações próximas às das amostras analisadas.

O teste Single também detectou a concentração de 200 ppb em 100% das

amostras. Porém, nas concentrações de 50 ppb e 100 ppb foram encontrados resultados suspeitos em 12,5% das amostras.

Em relação à detecção de resíduos de trimetoprim em leite, observou-se que não houve diferença estatisticamente significativa entre o teste Single e o Microplate ($p > 0,05$), utilizando-se o Teste Exato de Fisher (Tabela 19).

Embora os kits não tenham detectado os valores do LMR, os resultados foram coerentes, uma vez que os mesmos detectaram os limites estabelecidos no manual do fabricante (Anexo 1). Porém esses testes não são adequados para a pesquisa desse antimicrobiano em leite por detectar concentrações acima do permitido pela legislação.

Tabela 19 – Comparação dos resultados da pesquisa de presença de resíduos de trimetoprim entre os testes Microplate e Single no nível 2 (LMR).

Teste	Presença de resíduos de antimicrobianos		Total*	% positivos e suspeitos
	Positivo e suspeito	Negativo		
Microplate	1	29	30 ^a	3,33
Single	1	7	8 ^a	12,5
TOTAL	2	36	38	5,26

Avaliação pelo Teste Exato de Fisher, não significativo para $p < 0,05$.

*Valores seguidos de letras iguais em uma mesma coluna determinam equivalência entre grupos.

4.1.4. Comparação dos kits Microplate e Single

Comparando-se os dois kits testados (Microplate e Single), observou-se que há diferença estatisticamente significativa entre

eles utilizando-se o teste do Qui-quadrado ($p < 0,05$) em relação à detecção de resíduos de antimicrobianos em leite nas concentrações estabelecidas pela legislação (nível 2) (Tabela 20).

Tabela 20 – Comparação entre os testes Microplate e Single, quanto à detecção de resíduos de antimicrobianos no nível 2 (LMR).

<i>Teste</i>	<i>Positivo e suspeito</i>	<i>Negativo</i>	<i>Total</i>	<i>% positivos e suspeitos</i>
Microplate	215	175	390	55,13
Single	73	23	96	76,04
TOTAL	288	198	486	59,26

$\chi^2=13,10$ (correção de Yates), gl = 2, significativo para $p < 0,05$.

Em relação às concentrações estabelecidas no manual de instruções do kit (nível 3) observa-se que também houve diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$)

entre os testes Microplate e Single, pelo teste do Qui-quadrado (Tabela 21).

Tabela 21 – Comparação entre os testes Microplate e Single, quanto à detecção de resíduos de antimicrobianos no nível 3.

<i>Teste</i>	<i>Positivo e suspeito</i>	<i>Negativo</i>	<i>Total</i>	<i>% positivos e suspeitos</i>
Microplate	303	87	390	77,69
Single	88	8	96	91,67
TOTAL	391	95	486	80,45

$\chi^2 = 8,70$ (correção de Yates), gl = 2, significativo para $p < 0,05$.

Observando-se os resultados (Tabelas 20 e 21) pode-se dizer que o teste Single foi mais eficiente na detecção de antimicrobianos nas concentrações testadas no nível 2 (LMR) e no nível 3 (indicadas pelo fabricante).

Hotta (2003) comparando diversos métodos de detecção de resíduos de antimicrobianos no leite cru observou que o método COPAN ATK P & S Single identificou 9,5% de amostras com resíduos de antimicrobianos, seguido do Microplate, que identificou 8,5% das mesmas amostras. Pelos resultados obtidos pela autora, qualquer um dos kits pode ser utilizado na detecção de resíduos de antimicrobianos, pois estatisticamente são iguais. Apesar de apresentarem limites de detecção diferentes para alguns antimicrobianos, estes kits possuem algumas semelhanças, sendo de fácil execução e leitura, no entanto, são mais demorados.

Segundo Surhen (1995), alguns cuidados devem ser tomados ao se utilizar testes microbiológicos, pois os seus resultados

podem ser influenciados por alta contagem de células somáticas, inibidores naturais, variação na temperatura de incubação, viabilidade da cultura microbiana utilizada e assepsia durante a realização do teste. O número elevado de resultados suspeitos sugere que os fatores anteriormente mencionados podem influenciar os resultados, dificultando a decisão na indústria de receber ou descartar o leite.

4.1.5. Considerações sobre os testes

A determinação efetiva de risco inaceitável da presença de resíduos de antimicrobianos em alimentos somente pode ser alcançada fazendo-se, após um teste de triagem, a identificação do composto e sua quantificação no produto. A constatação de 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 princípios ativos não detectáveis pelo

teste ou estarem em níveis aquém de sua capacidade de detecção (Leme et al., 2004).

A detecção de concentrações abaixo do LMR pelos testes pode ser vantajosa para o consumidor, mas não para os produtores, pois em amostras de leite com concentrações destes antimicrobianos permitidas pela legislação, o teste pode apresentar resultado positivo, levando à penalização desse produtor ou até mesmo ao descarte desse leite, quando na verdade as concentrações estão dentro dos padrões legais. Esses resultados são considerados falso-violativos, já que o teste detecta a concentração de antimicrobiano existente, mesmo que essa concentração esteja dentro do limite permitido pela legislação brasileira, o que não seria uma violação.

A determinação do limite de detecção dos testes é importante para garantir à indústria, aos órgãos fiscalizadores e aos produtores que os resultados obtidos com as análises serão verdadeiros e confiáveis, permitindo uma correta tomada de decisão caso haja presença de resíduos no leite (Hotta, 2003).

Durante a realização dos ensaios laboratoriais, observou-se a facilidade de manipulação dos kits COPAN Microplate e Single, sem a necessidade de muito treinamento para a realização dos testes, e a vantagem do microrganismo já estar incorporado no meio com o indicador de pH. Para alguns antimicrobianos, houve dificuldades de interpretar os resultados, pelo fato da cor verificada ser intermediária entre o positivo (violeta) e o negativo (amarelo); desta forma, foram considerados como suspeitos.

Um ponto que merece atenção refere-se ao conteúdo do manual de instrução, pois o mesmo não é muito claro, podendo gerar dúvidas quanto à utilização dos kits, como a necessidade ou não de aquecimento do leite, da utilização de controles positivo e negativo e a dificuldade da determinação da

coloração para correta interpretação dos resultados. Sugere-se, portanto, uma revisão do mesmo, adequando-o rigorosamente à técnica proposta pelo fabricante e incluindo os novos limites de detecção dos testes COPAN.

Hotta (2003) observou que não houve diferença significativa ($p < 0,01$) na detecção de resíduos com leitura baseando-se na mudança da cor violeta para a amarela do controle negativo e no tempo real de leitura do método (três horas de incubação) recomendado pelo fabricante, quando se utilizava os métodos microbiológicos COPAN Single e Microplate, indicando que o tempo não interferiu nos resultados observados.

Portanto, na avaliação realizada no presente trabalho, os testes COPAN Microplate e Single mostraram-se eficientes na detecção dos antimicrobianos testados, exceto as tetraciclina, eritromicina e trimetoprim, sendo considerados excelentes para a detecção de resíduos de beta-lactâmicos e sulfonamidas.

4.2. AVALIAÇÃO DA ESTRATÉGIA DE TRIAGEM DE AMOSTRAS DE LEITE COM BAIXA CONTAGEM BACTERIANA TOTAL

Em uma cadeia alimentar básica como a do leite, resíduos de antimicrobianos devem ser mínimos. Níveis zero, no entanto, não são reais para todos os antimicrobianos, mas a concordância com os limites máximos de resíduos (LMR) presentes na legislação vigente é, no estado atual de conhecimento, o suficiente para salvaguardar os aspectos de segurança ligados ao seu consumo (Picinin, 2003).

A quantificação da ocorrência da presença de resíduos de antimicrobianos no leite cru entregue à indústria, bem como as épocas em que esta ocorrência é mais acentuada, são fundamentais para orientar programas de extensão visando esclarecer produtores

quanto ao uso dessas drogas, bem como fundamentar o reforço de medidas higiênico-sanitárias na produção do leite em determinadas épocas do ano (Porto et al., 2001).

Os resultados da análise de resíduos de antimicrobianos em amostras individuais de leite cru coletadas em tanques refrigeradores

indicaram, no presente trabalho, que em 136 amostras, 24,26% (33 amostras) apresentaram resultados positivos ou suspeitos para presença desses resíduos (Figura 1). Dessas 33 amostras, 18 apresentaram resultado positivo (13,23%) e 15, suspeito (11,03%).

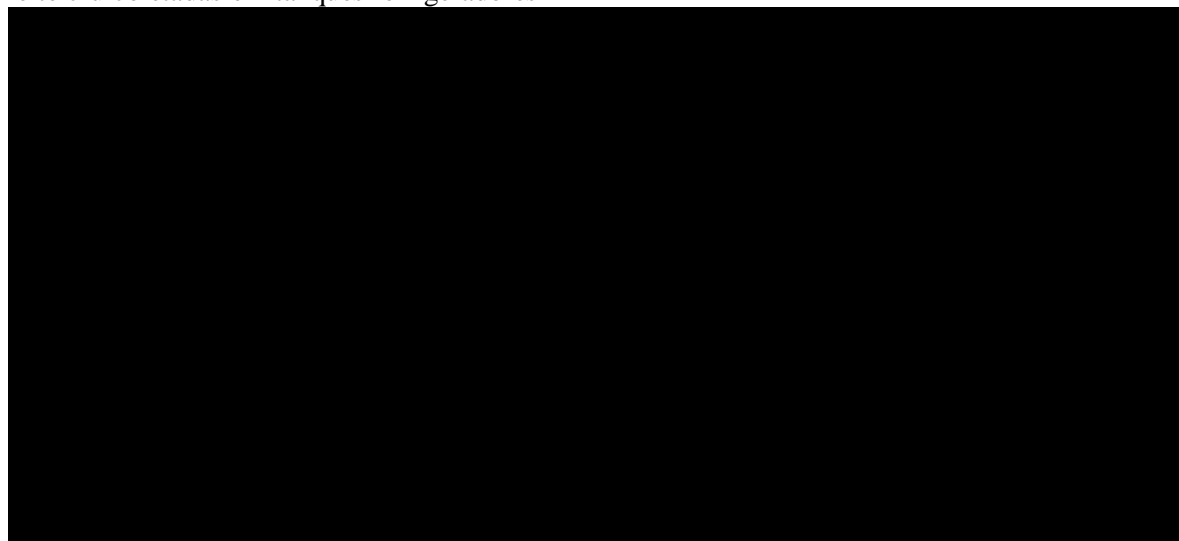


Figura 1 – Resultados da pesquisa de resíduos de antimicrobianos em amostras de leite cru de produtores previamente selecionados com CBT abaixo de 50.000 UFC/mL.

A frequência de 24,26% das amostras consideradas positivas para resíduos de antimicrobianos em leite cru, mostra que esse problema continua ocorrendo no Brasil. Meller et al. (1974) avaliaram 100 amostras de leite cru na cidade de Santa Maria (RS) e constataram presença de resíduos de penicilina em 1% das amostras, através de método cromatográfico.

Barros e Perches (1981), em estudo realizado na cidade de São Paulo (SP), observaram uma prevalência de 15,04% de antimicrobianos em 490 amostras de leite tipo B, analisado diretamente dos produtores, pelo método do TTC (pesquisa de cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazolium).

Albuquerque et al. (1996) investigaram a presença de resíduos de antimicrobianos em leite comercializado na região metropolitana

de Fortaleza (CE), analisando 33 amostras de leite cru, e encontraram resultado positivo em 81,8% das amostras. Utilizou-se o método clássico do disco de papel-filtro com cultura de *Bacillus stearothermophilus*.

Lopes et al (2002) investigaram a presença de resíduos de antimicrobianos no leite produzido na região metropolitana de Curitiba (PR), no período de janeiro a maio de 2001, utilizando o kit comercial Charm Farm Test – VIAL, que se baseia na inibição de crescimento bacteriano, utilizando o *Bacillus stearothermophilus* var. *calidolactis*. Foram detectados resíduos de antimicrobianos em 25,6% das 320 amostras de leite cru analisadas.

Porto et al. (2002) analisaram 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 resultado positivo em foi observado em 1,16% (121 amostras). 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, e agosto e julho. 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 estabelecimentos onde os produtores não fazem reservas de alimentos para o período desfavorável. O aumento no uso de antibióticos, 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 antibióticos no leite nestes meses. Já 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.

Picinin (2003) em seu trabalho detectou a presença de resíduos de inibidores e/ou conservantes no leite em 19,35 % das amostras de leite cru de propriedades rurais de Minas Gerais analisadas pelo teste do TTC.

Macedo (2003) analisou 103 amostras de leite colhidas diretamente em propriedades rurais de regiões produtoras de leite no estado do Pará, no período de setembro de 2002 a março de 2003. Utilizando os testes Snap, Charm-SL e COPAN, encontrou positividade para presença de resíduos de antimicrobianos em 10,67% das amostras. Hotta (2003) analisou amostras de leite coletadas em tanques refrigeradores de 200

propriedades leiteiras de Minas Gerais, e os resultados indicaram que 21,0% apresentaram resíduos de antimicrobianos em pelo menos um método testado. Nesse experimento foram utilizados diversos métodos de detecção de antimicrobianos e verificou-se que algumas amostras foram detectadas por mais de um método.

Nero et al. (2004) avaliaram 210 amostras de leite cru de pequenas e médias propriedades rurais de quatro importantes estados produtores de leite (MG, RS, PR e SP), utilizando o Charm-test. Em 11,5% das amostras, observou-se resultado positivo para presença de resíduos de antimicrobianos.

Barreira et al. (2004) analisaram amostras de leite cru de 199 tanques de refrigeração do município de Macuco (RJ) no período de 06 de maio a 06 de junho de 2004. Utilizou-se o kit Delvotest-SP e das amostras analisadas, 7,54% (15 amostras) apresentaram resultado positivo para presença de resíduos de antimicrobianos.

Alves (2006), em seu trabalho, analisou 41 amostras de leite cru provenientes de duas propriedades na região metropolitana de Belo Horizonte (MG), no período de outubro de 2004 a setembro de 2005. Observou-se uma frequência de 9,8% de amostras positivas e 17,1% de amostras suspeitas à contaminação por inibidores microbianos, utilizando o teste COPAN Microplate e o kit Delvotest-P. Do total das amostras analisadas, 26,9% apresentaram resultado positivo ou suspeito para presença de resíduos de antimicrobianos.

Os dados mostram que o problema da presença de resíduos de antimicrobianos em leite cru continua ocorrendo no país. Os dados acima descritos foram compilados no Quadro 6 para melhor visualização da situação do Brasil em relação à presença desses resíduos nos últimos anos.

Quadro 6 – Prevalência de resíduos de antimicrobianos (%) em leite cru no Brasil nos últimos anos.

Autor	Ano	Cidade/Estado	Teste	Resultado positivo (%)	N° amostras
Meller et al.	1974	Santa Maria/RS	CCD*	1,00	100
Barros e Perches	1981	São Paulo/SP	TTC	15,04	490
Albuquerque et al.	1996	Fortaleza/CE	Disco de papel filtro	81,8	33
Lopes et al.	2002	Curitiba/PR	Charm Farm Test	25,6	320
Porto et al.	2002	RS	Snap β -lactâmicos	1,16	10.464
Macedo	2003	PA	Snap, Charm e Copan	10,67	103
Hotta	2003	MG	Snap (β -lactâmicos e tetraciclinas), Charm-SL (β -lactâmicos e tetraciclinas), Delvotest-SP e Copan	21,0	200
Nero et al.	2004	MG, RS, PR, SP	Charm Test	11,5	209
Barreira et al.	2004	Macuco/RJ	Delvotest-SP	7,54	199
Alves	2006	Belo Horizonte/MG	Copan e Delvotest-P	26,9	41

*CCD – Cromatografia em Camada Delgada

Fonte: adaptado de vários autores.

A observação de um maior número de amostras positivas, detectadas pelos testes, pode estar relacionada a diversos fatores como a não observação do período de carência, ou ainda, ao relaxamento dos produtores em virtude da não fiscalização dos resultados exigidos pela Instrução Normativa nº 51 do MAPA. As indústrias precisam estar atentas a este fato, pois o envio de amostras contendo resíduos sem a devida detecção pode gerar nos produtores, a falsa idéia de que os métodos não são capazes de detectar as violações. A partir daí, os riscos à saúde pública e também os problemas tecnológicos, principalmente relacionados ao processamento de produtos fermentados, podem ocorrer (Hotta, 2003).

Atualmente o monitoramento dos resíduos de antimicrobianos em leite cru no Brasil, é realizado basicamente nos caminhões refrigerados que transportam esse leite para as indústrias, para posterior rastreamento de amostras individuais dos produtores quando o teste origina resultados positivos. Esse fato pode “mascarar” o resultado pela diluição do leite, ou seja, o leite de um produtor que contenha resíduos de inibidores pode ser diluído ao ser misturado aos leites de outros

produtores, assim a concentração final poderá ser inferior à detectada pelo teste utilizado.

Os antimicrobianos podem estar presentes no leite devido à introdução voluntária e/ou fraudulenta pelo criador, visando melhorar a qualidade bacteriológica do leite cru. Mas, o fato que mais contribui para o aparecimento destes produtos no leite é o tratamento de doenças infecciosas do gado de leite, especialmente a mastite, sem respeitar o período de carência dos antimicrobianos. Os antimicrobianos utilizados na alimentação animal para melhorar a conversão alimentar também contribuem para o aparecimento destas drogas no leite (Fagundes e Molin, 1988). A utilização inadequada, a não-observação do período de carência destes produtos, a falta de informação dos produtores e funcionários, a falta de assistência veterinária, a limpeza inadequada do equipamento de ordenha, a mistura accidental do leite sem resíduos e do leite com resíduos e a escassez de fiscalização da indústria e dos órgãos governamentais responsáveis, constituem fatores agravantes desta condição (Fagundes e Molin, 1988, Österás, 1993; Hotta, 2003). Além disso, o

pensamento das pessoas envolvidas na produção de leite de que uma pequena quantidade de antimicrobianos pode não causar dano é um problema que ocorre com frequência e também faz parte dos fatores que contribuem para a presença de resíduos no leite (Österás, 1993).

Tais resultados são conseqüências do que se têm observado no campo. Os produtores estão utilizando indiscriminadamente os antibióticos muitas vezes sem prescrição e acompanhamento de um médico veterinário e, muitos não descartam o leite contaminado com resíduos, utilizando-o na fabricação de queijos, ou na alimentação de animais (bezerros, cães e suínos), o que se observa com grande frequência (Hotta, 2003). Tal fraude pode ser evitada pela identificação do animal, pelo respeito ao período de carência do medicamento utilizado e pela eliminação do leite do animal sob tratamento (Picinin, 2003).

Considerando-se que o leite é a matéria-prima para a produção não só de leite fluido, mas também de ampla gama de derivados lácteos, é de grande relevância o monitoramento da qualidade do leite cru, que deverá estar livre de resíduos de antimicrobianos (Alves, 2006).

No presente trabalho foi testada uma estratégia de triagem das amostras de leite cru para a realização da pesquisa de antimicrobianos. Foram selecionadas amostras de produtores cujo leite apresentava contagem bacteriana total (CBT) abaixo de $5,0 \times 10^4$ UFC/mL em análise no dia anterior ao da coleta. Foi observada porcentagem relativamente alta no resultado de presença de resíduos de antimicrobianos no leite cru com essa baixa CBT. Havendo resíduos de antimicrobianos no leite, a microbiota contaminante será suprimida ou inibida, melhorando aparentemente a qualidade do leite (Fagundes e Molin, 1988). Esse fato poderia acarretar na diminuição da contagem

bacteriana total. A presença de resíduos de antimicrobianos pode interferir também sobre a contagem eletrônica de microrganismos, já que o equipamento não diferencia células vivas e mortas, e não se conhece ao certo o efeito desses resíduos sobre o DNA dessas células.

No trabalho realizado por Andrew et al. (1997), observou-se que altas contagens bacterianas (UFC/mL) tiveram associação com a menor incidência de resultados falso-positivos na pesquisa de resíduos de antimicrobianos utilizando diversos métodos. Nesse trabalho, o resultado de contagem bacteriana, o parto, e a quantidade de leite produzido mostraram associação com a taxa de resultados falso-positivos para os diferentes testes analisados, indicando que estes testes podem ser afetados por fatores relacionados à qualidade do leite e características de produção.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Como se pode observar, a ocorrência de resíduos de antimicrobianos existe. Então surge a dúvida sobre o que fazer com este leite contaminado. Isto é importante, pois além de ser um risco à saúde humana, pode ser também um risco ao meio ambiente. O leite é um alimento muito importante na alimentação humana, principalmente infantil, sendo também considerado sério poluente. A presença de resíduos de antimicrobianos no leite pode ser um agravante ambiental, considerando que o destino usual do leite contendo resíduos é o descarte inadequado no meio ambiente (Hotta, 2003).

A detecção da presença de resíduos em leite é realizada pela indústria, porém são os produtores e os veterinários quem controlam os tratamentos com utilização de medicamentos no gado leiteiro. Por isso, é necessária a implantação de programas de controle de resíduos em alimentos visando detectar a presença de níveis nocivos à saúde

no leite antes de seu beneficiamento e comercialização, porém não estão destinados a resolver os problemas de contaminação e sim monitorá-los (Noa e Varcárcel, 2000).

Em alguns países como Estados Unidos, França, Dinamarca e Inglaterra, o controle de resíduos de antimicrobianos no leite é constante, seguindo normas rígidas amparadas na legislação, com campanhas educacionais procurando conscientizar os produtores sobre a importância do controle da presença de qualquer agente antimicrobiano no leite (Fagundes, 1981; Vilela e Santos, 1981; Lopes et al., 1998).

Existem diversos sistemas de pagamento do leite que levam em consideração a presença de resíduos de antimicrobianos em países da Europa, como descrito por Johnsson (1993) na Suécia, por Harding (1993) no Reino Unido, por Madsen (1993) na Dinamarca, e por Österås (1993) na Noruega.

Madsen (1993) relata que na Dinamarca somente os veterinários podem administrar antimicrobianos aos animais de produção, sendo estabelecido na legislação e inspecionado pelos órgãos competentes, o que também foi relatado por Österås (1993) na Noruega. Devido a esse fato, a ocorrência de resíduos de antimicrobianos é muito baixa nesses países. Em 1987, na Dinamarca foram detectados apenas 0,03% de resíduos de penicilina em mais de 150.000 amostras analisadas. Em 1988, também 0,03% de amostras positivas em mais de 284.000 amostras e em 1989, somente 0,04% de resíduos em mais de 281.000 amostras (Madsen, 1993). Na Noruega, em 1990, verificou-se a ocorrência de resíduos em 0,75% das amostras analisadas. Já em 1991 e 1992, após um intensivo sistema de controle, esse valor caiu para 0,65% (Österås, 1993).

Adesiyun et al. (1998) pesquisaram a ocorrência de resíduos de antimicrobianos em propriedades leiteiras de Trinidad entre

outubro de 1994 e fevereiro de 1995. Foram analisadas pelo Delvotest-SP 176 amostras de tanque de refrigeração, e encontrou-se resultado positivo em cinco amostras (2,84%).

A utilização dos testes para pesquisa de resíduos de antimicrobianos e a implantação de boas práticas de produção têm colaborado com a redução na ocorrência desses resíduos no leite (Andrew et al., 1997).

O estabelecimento de um programa de detecção e prevenção da presença de resíduos e contaminantes no leite é um instrumento útil para promover os níveis de qualidade necessários neste sentido, e constitui uma necessidade real do ponto de vista econômico atual (Noa e Varcárcel, 2000).

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 todos os fornecedores sejam avaliados 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, uma suspensão no fornecimento do leite à indústria, por um tempo determinado, até que o fornecedor tenha adotado e comprovado à indústria as medidas corretivas. Em casos reincidentes, a suspensão pode ser definitiva (Gorni e Cabrini, 2003).

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 (Gorni e Cabrini, 2003).

É necessário conhecer a farmacocinética das drogas utilizadas na medicina veterinária, especialmente as aplicadas no tratamento da mastite, seja durante a lactação ou o período seco. Esse conhecimento é de grande importância para o estabelecimento de esquemas efetivos de controle e monitoração da presença de resíduos de antimicrobianos no leite, com a definição do melhor método de pesquisa, dependendo da droga mais utilizada no local e dos fatores que possam interferir na situação (Johnsson, 1993).

Conhecer o modo de ação da droga é importante para determinar sua utilidade clínica. Quanto mais seletivo o antimicrobiano para o metabolismo do agente patogênico, menor a sua toxicidade para o hospedeiro humano. O mecanismo de ação também determinará se o antimicrobiano é bactericida ou bacteriostático, e se haverá sinergismo, ação independente ou antagonismo ao utilizar terapia combinada. O mecanismo de ação específico de um antimicrobiano, ao contrário do modo geral de ação, freqüentemente é uma característica do próprio antimicrobiano, observando-se muitas vezes mecanismos distintos de ação em dois antimicrobianos que têm o mesmo modo geral de ação (Robbers et al., 1997).

A problemática em relação aos resíduos de medicamentos de uso veterinário em

alimentos de origem animal ainda está sem solução. Uma grande quantidade de substâncias ainda não conta com um método analítico adequado e convenientemente validado, para a determinação de resíduos em alimentos de origem animal. A lista de substâncias que possuem estudos concluídos e apresentados pelo *Codex Alimentarius* é reduzida, em comparação com o número de medicamentos utilizados na prática veterinária no mundo. Mesmo entre essas substâncias com estudos concluídos, nem todas contam com métodos disponíveis de análise de resíduos em leite (Noa e Varcárcel, 2000).

Particularmente quanto à produção leiteira, os consumidores se preocupam com os efeitos sobre a saúde humana (inocuidade e funcionalidade), sobre o meio ambiente (degradação ambiental) e sobre o bem-estar dos animais. Os consumidores exigem sanidade e qualidade dos alimentos. Conseqüentemente, a reação dos fornecedores deve ser criar sistemas de controle e certificação de qualidade. Além disso, os padrões de qualidade e inocuidade deveriam ser uniformes através dos países, tranquilizando a percepção do público e facilitando o processamento dos alimentos, tanto no âmbito nacional como no internacional (Monardes, 2004).

Para garantir alta qualidade tecnológica e a segurança do leite para o consumidor, um sistema integrado deve ser desenvolvido compreendendo dois aspectos: aplicação de diferentes métodos dentro do sistema e a definição de responsabilidades compartilhadas entre os produtores, as indústrias beneficiadoras e as autoridades sanitárias. Esse sistema integrado pode ser considerado como um sistema de “barreira”, que combina diferentes métodos e a responsabilidade de todas as partes envolvidas. São utilizados elementos do conceito APPCC (Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle) para minimizar

os riscos e garantir a segurança dos produtos (Pedersen e Suhren, 2000).

A garantia de inocuidade do leite e de seus derivados é o produto do esforço combinado de todos os integrantes da cadeia produtiva, traduzindo-se em ações coordenadas e integradas de controle de qualidade dos alimentos e sua certificação através de todo o processo de produção, coleta, transporte, transformação, processamento, armazenagem e comercialização dos produtos (Monardes, 2004).

6. CONCLUSÕES

Os testes qualitativos COPAN Microplate e Single mostraram-se eficientes na detecção de antibióticos do grupo beta-lactâmicos apresentando 100% de sensibilidade na detecção de penicilina G, ampicilina, cloxacilina e amoxicilina e 96,66% para oxacilina;

Para a detecção de sulfadiazina e sulfametoxazol, a sensibilidade foi de 100%, indicando também que estes métodos são eficientes;

Em relação à detecção de gentamicina, observou-se que o teste Single foi mais eficiente do que o Microplate;

Os kits COPAN Microplate e Single detectaram todos os limites de detecção dos antimicrobianos testados, declarados pelo fabricante;

Considerando-se os padrões estabelecidos pela legislação brasileira e internacional, verificou-se que os kits COPAN Microplate e Single foram capazes de detectar os LMR para todos os antimicrobianos avaliados, exceto para eritromicina, oxitetraciclina, tetraciclina e trimetoprim.

Na comparação dos testes Microplate e Single, observou-se que o teste Single foi mais eficiente na detecção de resíduos de

antimicrobianos no nível 2 (LMR) e também no nível 3 (concentração informada no manual de instruções).

A presença de resíduos de antimicrobianos ocorreu em 24,26% (33 amostras) das 136 amostras de leite cru analisadas (com o teste Microplate), provenientes da região metropolitana de Belo Horizonte (MG), de produtores com histórico de baixa contagem bacteriana total no leite.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADESIYUN, A. A.; WEBB, L. A.; ROMAIN, H. T. Occurrence of clinical mastitis and antimicrobial residues on dairy farms in Trinidad. *Dairy, Food and Environmental Sanitation*. v. 18, n. 2, p. 83-88, 1998.

ALBUQUERQUE, L. M. B.; MELO, V. M. M.; MARTINS, S. C. S. Investigações sobre a presença de resíduos de antibióticos em leite comercializado em fortaleza – CE – Brasil. *Higiene Alimentar*, v. 10, n. 41, p. 29-32, 1996.

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.

ANDREW, S. M.; FROBISH, R. A.; PAAPE, M. J. et al. Evaluation of selected antibiotic residue screening tests for milk from individual cows and examination of factors that affect the probability of false-positive outcomes. *Journal of Dairy Science*. v. 80, p. 3050-3057, 1997.

ASPENSTRÖM-FAGERLUND, B. Determination of withdrawal of antibiotic substances in Sweden. *Bulletin of the International Dairy Federation (IDF)*, n. 283, p. 71-74, 1993.

BARREIRA, V. B.; MELO, L. H. M. S.; RISTOW, A. M. et al. Pesquisa de resíduos de antibióticos em amostras de leite da Cooperativa Regional Agropecuária de Macuco, município de Macuco, estado do Rio de Janeiro. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE QUALIDADE DO LEITE, 1, 2004, Passo Fundo - RS. *Anais...* Passo Fundo, 2004.

BACTOCOUNT 150 operator's manual. Chaska: Bentley Instruments Inc., 2002. 49 p.

BROUTIN, P. Individual bacteria counting in milk quality management. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE QUALIDADE DO LEITE, 1., 2004, Passo Fundo - RS. *Anais...* Passo Fundo, 2004.

BARROS, G. M. S.; JESUS, N. M.; SILVA, M. H. Pesquisa de resíduos de antibióticos em leite pasteurizado tipo C, comercializado na cidade de Salvador. *Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal*. v. 2, n. 3, p. 69-73, 2001.

BARROS, V. R. M.; PERCHES, E. M. C. Pesquisa de inibidores no leite tipo B distribuído ao consumo na grande São Paulo. *Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes*, v. 36, n. 216, p. 39-42, 1981.

BEUKERS, R. Some special aspects of Delvotest. *Bulletin of the International Dairy Federation (IDF)*. n° 283, p.20-23, 1993.

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.

BRADY, M. S.; KATZ, S. E. Antibiotic / Antimicrobial residues in milk. *Journal of Food Protection*. v. 51, n. 1, p. 8-11, 1988.

BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento – MAPA – Instrução Normativa n° 42, de 20 de dezembro de 1999, que altera o Plano Nacional de Controle de Resíduos em Produtos de Origem Animal – PNCR. Publicado no *Diário Oficial da União*: Brasília, Distrito Federal, em 22 de dezembro de 1999. Seção 1, página 13. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br>. Acesso em: 10 de abril de 2005.

BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento – MAPA – Portaria n°51, 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*: Brasília, Distrito Federal, em 20 de setembro de 2002. Seção 1, página 13. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br>. Acesso em: 10 de abril de 2005.

BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento – MAPA – Portaria n°50, de 20 de fevereiro de 2006, que aprova os Programas de Controle de Resíduos em Carne (Bovina, Aves, Suína e Equina), Leite, Mel, Ovos e Pescado do exercício de 2006. Publicado no *Diário Oficial da União*: Brasília, Distrito Federal, em 03 de março de 2006. Seção 1, página 15. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br>. Acesso em: 15 de maio de 2006.

BRITO, M. A. V. P. *Resíduos de antimicrobianos no leite*. Juiz de Fora: Embrapa Gado de Leite, 2000. 20 p. (Embrapa Gado de Leite. Circular Técnica, 60).

- BRITO, M. A. V. P. Normas Internacionais e exigências do *Codex Alimentarius* e comparação entre blocos comerciais sobre a adoção de testes para detecção de resíduos de antibióticos no leite. 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. 6, p. 65-76.
- BRITO, M. A. V. P. Resíduos de antibióticos no leite: um problema que tem solução. 2006. *Embrapa Gado de Leite*. Artigos. Disponível em: <http://www.cnp.gl.embrapa.br>. Acesso em 05/09/2006.
- 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.
- BROUTIN, P. Individual bacteria counting in milk quality management. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE QUALIDADE DO LEITE, 1., 2004, Passo Fundo. *Anais...* Passo Fundo, 2004.
- 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 05/09/2006.
- CERQUEIRA, M.M.O.P.; SENA, M.J.; SOUZA, M.R. et al. Avaliação da qualidade do leite estocado em tanque de imersão e expansão por 48 horas. *Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes*, v. 54, n. 309, p. 251-254, 1999a.
- CERQUEIRA, M. M. O. P.; SOUZA, M. R.; SENA, M. J. et al. Fatores determinantes na qualidade do leite: estudo de uma indústria de laticínios. *Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes*, v. 54, n. 304, p. 241-245, 1999b.
- 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, 9p, 1996.
- COSTA, E. O. Resíduos de antibióticos no leite: um risco à saúde do consumidor. *Revista Higiene Alimentar*, v.10, n. 44, p.15-17, 1996.
- COVA, W. G. Prática sensitiva de detecção de penicilina no leite. *Higiene Alimentar*, v. 3, n.3/4, p. 207-211.1984.
- CROSBY, N. T. *Determination of veterinary residues in food*. London: Ellis Horwood Limited, 1991, 233p.
- 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.
- DEAN, A. G.; DEAN, J. A.; BURTON, A. H. et al. *Epi info, version 6.04d: A word processing, database and statistic program for epidemiology on micro-computers*. Center for Disease Control & Prevention, Atlanta, Georgia, 1992.
- EURACHEM Guide: The Fitness for Purpose of Analytical Methods. United Kingdom: LGC (Teddington). 1998. 61 p.

- FAGUNDES, C. M. Persistência de antibiótico no leite bovino e em condições experimentais. *Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes*, v. 36, n. 216, p. 27-30, 1981.
- FAGUNDES, C. M. *Persistência de antibióticos no leite bovino em condições experimentais e prevalência no leite tipos B e C consumidos em Belo Horizonte*. 1980. 47 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.
- 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.
- FONSECA, C. S. P. *Qualidade do leite cru de tanques refrigeradores de Minas Gerais*. 2005. 62 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.
- GALLINA, D. A. *Avaliação de tratamentos térmicos industriais sobre resíduos inibidores presentes no leite utilizando o teste de inibição de iogurte*. 1997. 69 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos), Universidade Federal de Viçosa.
- 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.
- GORNI, R. e CABRINI, S. Dificuldades e demandas da indústria sobre testes para detecção de resíduos de antibióticos em leite. 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. 9, p. 97-102
- HARDING, F. Antibiotic testing in the United Kingdom, past and future. *Bulletin of the International Dairy Federation (IDF)*, n. 283, p. 61-62, 1993.
- HONKANEN-BUZALSKI, T.; REYBROECK, W. Antimicrobials. In: *Monograph on residues and contaminants in milk and milk products*. Brussels: International Dairy Federation, 1997, p. 26-34.
- HOTTA, J. M. *Monitoramento de resíduos de antimicrobianos em diferentes pontos da cadeia produtiva do leite, comparando diferentes métodos de detecção*. 2003. 90 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.
- JOHNSSON, G. Swedish scheme for the control of inhibitory substances. *Bulletin of the International Dairy Federation (IDF)*, n. 283, p.59-60, 1993.
- 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. (CDRoom)
- 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. 327, p. 233-235, 2002.
- LUTHMAN, J. Mastitis therapy in relation to antibiotic residues in milk. *Bulletin of the International Dairy Federation (IDF)*, n. 283, p. 69-70, 1993.
- MACEDO, L. C. *Resíduos de antibióticos no leite: ocorrência em leite produzido no estado do Pará e suas implicações tecnológicas e na saúde pública*. 2003. 41 f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Universidade Federal do Pará, Belém .
- MACHADO, S. C. A. *Utilização de métodos rápidos de análise para determinação da incidência da contaminação por resíduos de antibióticos no leite pasteurizado comercializado na região Norte-Noroeste do Estado do Rio de Janeiro*. 1998. 67 f. Dissertação (Mestrado em Produção Animal) – Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias, Universidade Estadual do Norte Fluminense, Campo dos Goytacazes – RJ.
- MADSEN, P. S. Antibiotic testing in Denmark, past and future. *Bulletin of the International Dairy Federation (IDF)*, n. 283, p. 63-64, 1993.
- MAGALHÃES, N. A. *Deteção 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.
- MELLER, A. C.; TERRA, N. N.; BRUM, M. A. R. et al. Antibióticos no leite cru consumido na cidade de Santa Maria, RS. *Revista do Centro de Ciências Rurais*. v. 4, n. 2, p. 169-172, 1974.
- MILLER, D. J. S. Present state and trends in the use of veterinary drugs. *Proceedings of the EuroResidue II conference*. Velhoven, The Netherlands, 3-5 may. 1993.
- MITCHEL, J. M.; GRIFFITHS, M. W.; McEWEN, S. A. et al. Antimicrobial Drug Residues in Milk and Meat: Causes, Concerns, Prevalence, Regulations, Tests, and Tests Performance. *Journal of Food Protection*, v. 61, n. 6, p. 742-756, 1998.
- MOATS, W. A. Advances in determination of antibiotic residues. *Journal of AOAC International*, v. 80, n. 1, p. 1-4, 1997.
- MONARDES, H. Reflexões sobre a qualidade do leite. In: DÜRR, J. W. et al. (Org.) *O compromisso com a qualidade do leite no Brasil*. Passo Fundo – RS. Universidade de Passo Fundo, p. 11-37. 2004
- NASCIMENTO, G. G. F.; MAESTRO, V.; CAMPOS, M. S. P. Ocorrência de resíduos de antibióticos no leite comercializado em Piracicaba, São Paulo, Brasil. *Revista de Nutrição da PUCCAMP*. v. 14, n. 2, p. 119-124, 2001.
- NERO, L. A.; MATTOS, M. R.; BELOTI, V. et al. Hazards in non-pasteurized milk on retail sale in Brazil: prevalence of *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes* and chemical residues. *Brazilian Journal of Microbiology*. v. 35, p. 211-215, 2004.
- NOA, M.; VARCÁRCCEL, L. Consideraciones actuales de la analítica de residuos de antibióticos y antiparasitarios en la leche. *Revista de Salud Animal*. v. 22, n. 2, p. 77-85, 2000.
- OFFICIAL Standards - Veterinary Drug Residues in Food, MRLs Maximum Residue Limits. *Codex Alimentarius*. Disponível em: <http://www.codexalimentarius.net>. Acesso em: 02/09/2006.

ÖSTERÁS, O. Antibiotic testing in Norway, past and future. *Bulletin of the International Dairy Federation (IDF)*, n. 283, p. 65-68, 1993.

PEDERSEN, M.; SUHREN, G. Chemical-physical 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.

PICININ, L. C. A. *Qualidade do leite e da água de algumas propriedades leiteiras de Minas Gerais*. 2003. 89 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

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.

RAMÍREZ, A.; GUTIÉRREZ, R.; GONZÁLEZ, C. et al. Detección de antibióticos en leche comercializada en la ciudad de México. *Revista de Salud Animal*. v. 23, n. 1, p. 37-41, 2001.

REGULAMENTO da inspeção industrial e sanitária de produtos de origem animal. Brasília – DF: MAPA, 1980, 166p.

ROBBERS, J. E., SPEEDIE, M. K., TYLER, V. E. *Farmacognosia e Farmacobiotechnologia*. Baltimore: Editorial Premier, 1997, 372 p.

ROSÁRIO, T. R. *Avaliação da presença de resíduos de antibióticos no leite comercializado no município de Pirassununga, SP*. 2002. 90 f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga.

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. 265 p.

SCHLIEPHAKE, A. A comparative study of a newly developed Ágar-Diffusion Test and the Brilliant-Black Reduction Tests in conjunction with an ELISA-reader to measure antibiotic residues in milk. *Milchwissenschaft*, v. 53, n. 2, p. 88-90, 1998.

SILVA, T.J.P.; SENA, M.C. Prevalência de antibióticos no leite pasteurizado tipo B e especial 3,2% de gordura consumidos em Belo Horizonte, 1982-1983. *Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes*, v.39, n.235, n.7-12, 1984.

SOUZA, N. G. *Ocorrência de resíduos de antibióticos no leite de consumo no estado de Santa Catarina*. 1998. 78 f. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) – Universidade Federal de Santa Catarina, Curitiba.

SUHREN, G. Possibilities and limitations of microbiological inhibitors tests. In: SYMPOSIUM ON RESIDUES OF ANTIMICROBIAL DRUGS AND OTHER INHIBITORS IN MILK, 1995. Brussels. *Proc...* Brussels: International Dairy Federation, 1995, p. 159-171.

SUHREN, G.; WALTE, H. G. First experiences with automatic flow cytometric determination of total bacterial count in raw

milk. *Bulletin of the International Dairy Federation (IDF)*, n. 358, p. 36-48, 2000.

VARNAM, A H.; SUTHERLAND, J. P. *Leche y productos lácteos: tecnología, química y microbiología*. Espanha: Editorial Acribia. 1994, p. 29-36.

VILELA, S. C.; SANTOS, E. C. Identificação rápida de resíduos de

antibiótico no leite. *Arquivo da Escola de Veterinária da UFMG*. v. 33, n. 3, p. 569-574, 1981.

ZENG, S. S.; HART, S.; ESCOBAR, E. N. et al. Validation of antibiotic residue tests for dairy goats. *Journal of Food Protection*. v. 61, n. 3, p. 344-349, 1998.