

MARIA MARLI PEREIRA E ARAÚJO

**VALIDAÇÃO DE MÉTODOS IMUNOENZIMÁTICOS
PARA DETERMINAÇÃO DE RESÍDUOS DE
ANTIMICROBIANOS NO LEITE**

Dissertação apresentada à UFMG, como requisito parcial para
obtenção do grau de Mestre em Ciência Animal
Área de Concentração: Tecnologia e Inspeção de Produtos de
Origem Animal
Orientadora: Profa. Mônica Maria Oliveira Pinho Cerqueira

Belo Horizonte – MG
UFMG – Escola de Veterinária
2010

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho primeiramente a Deus, ao meu filho Danilo e ao meu amado esposo André. Vocês são o meu ponto de equilíbrio.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, minha fortaleza, Àquele que me guiou, fortaleceu e iluminou em toda trajetória.

Ao meu amado esposo André, pela força, carinho, paciência, atenção e ajuda. Você é meu porto seguro, seu amor e compreensão me impulsionaram até aqui.

Ao meu grande amor, meu filho Danilo. Você é a luz que dá sentido a minha vida, razão de querer chegar até o fim.

Aos meus pais Romeu e Maria Aparecida, meus sogros Otaviano e Augusta (*in memorian*) e toda minha família pelo apoio e incentivo.

À minha querida irmã Dalva, por me incentivar e acreditar na minha capacidade. Por ser compreensiva, amiga e sempre presente em todos momentos de minha vida.

Ao Sr. Antônio Couto, pela acolhida, incentivo e torcida. Valeu!

À Universidade Federal de Minas Gerais – Escola de Veterinária e ao Departamento de Tecnologia e Inspeção de Produtos de Origem Animal, por abrirem as portas para que eu pudesse realizar o Curso de Mestrado.

À Profa. Mônica Maria Oliveira Pinho Cerqueira pelos conhecimentos transmitidos, pela orientação, amizade, confiança, carinho, pelas longas horas dedicadas para realização deste trabalho e principalmente pelo profissionalismo digno de ser seguido.

A todos os professores e funcionários do Departamento de Tecnologia e Inspeção de Produtos de Origem Animal, principalmente aos funcionários do laboratório de Microbiologia de alimentos, em especial ao Marco Antônio, Maura e Tainara pela atenção e ajuda indispensável.

Ao Prof. Marcelo Resende pela acolhida, por permitir que eu me sentisse em casa e principalmente por me fazer acreditar que seria capaz.

Ao Danilo, Profas. Angela e Natascha, pelos ensinamentos e sugestões no tratamento estatístico.

À Itambé e as empresas (Madasa do Brasil e Hexis Científica) pelo apoio e todo o material necessário para que este trabalho fosse realizado.

Aos amigos, Vinícius, Guilherme, Rachel, Juliana, Andréa, Deise, Marcel, Arianna, Marco Antônio. Obrigada pelo apoio, pelas longas horas dedicadas para realização deste trabalho. Sem vocês seria difícil chegar ao fim. Vocês fazem parte desta conquista!!!

Ao meu irmão-amigo Adriano... Obrigada pelo companheirismo e solicitude. Você foi fundamental nesta fase da minha vida. Agradeço a Deus por ter colocado você em meu caminho. Você é uma pessoa muito especial!!!

À FASF/UNISA pelo apoio e incentivo.

Aos meus colegas e amigos do mestrado pelas diversas situações que passamos juntos, momentos estes que jamais sairão da memória.

Aos amigos Marli Baldelli, Garolfla e Reni pelas incansáveis caronas até a Escola de Veterinária.

Enfim, a todos que de forma direta ou indireta contribuíram para a realização deste trabalho. Àqueles que por ventura esqueci-me de mencionar. Muito obrigada!

"O que faz o barco não é a vela enfunada, mas o vento que não se vê"
Platão

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA	11
2	REVISÃO DE LITERATURA	11
2.1	Produção de leite no Brasil e em algumas regiões do mundo	11
2.2	Leite orgânico	12
2.3	Qualidade do leite e sua relação com antimicrobianos	12
2.4	Antimicrobianos	14
2.4.1	Grupos de antimicrobianos de uso comum em animais de produção	15
2.4.1.1	Sulfonamidas	15
2.4.1.2	Aminoglicosídeos	15
2.4.1.3	Tetraciclina	15
2.4.1.4	Beta-lactâmicos: Penicilinas e cefalosporinas	16
2.4.1.5	Macrolídeos	16
2.4.1.6	Anfenicóis	16
2.4.1.7	Quinolonas	17
2.5	Pesquisa de resíduos de antibióticos e outras drogas no leite	17
2.5.1	Controle de resíduos de antimicrobianos	18
2.5.2	Persistência de resíduos de antimicrobianos em leite	19
2.5.3	Período de carência dos principais medicamentos veterinários para uso em vacas leiteiras	22
2.5.4	Métodos rápidos de detecção de resíduos de antimicrobianos em leite	22
2.5.4.1	Métodos imunoenzimáticos	23
2.5.4.1.1	Método SNAP	23
2.5.4.1.2	Método CHARM	24
3	HIPÓTESES	24
4	OBJETIVO	24
5	MATERIAL E MÉTODOS	24
5.1	Procedimentos utilizados	27
5.1.1	Obtenção da amostra de leite orgânico	27
5.2	Preparo das soluções	27
5.3	Controles analíticos	27
5.4	Kit SNAP Beta-lactâmicos e SNAP Tetraciclina	27
5.5	Kit CHARM MRL BL/TET	28
6	ANÁLISE ESTATÍSTICA	28
7	RESULTADO E DISCUSSÃO	28
8	CONCLUSÕES	40
9	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	40
10	ANEXOS	46

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Estrutura Química do Ceftiofur.....	16
----------	-------------------------------------	----

LISTA DE QUADROS

Quadro 1	Plano de controle de Resíduos de antimicrobianos, estabelecido pelo Programa Nacional de Controle de Resíduos em Leite – PNCRL.....	19
Quadro 2	Duração mínima de eliminação no leite de alguns antimicrobianos muito usados na atividade leiteira.....	22
Quadro 3	Testes disponíveis para pesquisa de resíduos de antimicrobianos em leite e o princípio em que se baseiam.....	23
Quadro 4	Níveis de concentração dos antimicrobianos expressos em ppb avaliados pelo Kit SNAP Tetraciclinas em leite.....	26
Quadro 5	Níveis de concentração dos antimicrobianos expressos em ppb avaliados pelo Kit SNAP Beta-lactâmicos em leite.....	26
Quadro 6	Níveis de concentração dos antimicrobianos expressos em ppb avaliados pelo Kit CHARM MRL BL/TET em leite.....	29
Quadro 7	Valores médios de temperatura dos blocos e resultados da leitura de padrão e branco por kit empregado e dia analisado	29
Quadro 8	Detecção de tetraciclinas no leite pelo Kit SNAP Tetraciclinas e comparação da leitura visual com a leitora e do branco com cada nível de concentração testada	30
Quadro 9	Detecção de diferentes antimicrobianos no leite pelo Kit SNAP Tetraciclinas e comparação da leitura visual com a leitora e do branco com cada nível de concentração testada	30
Quadro 10	Detecção de diferentes antimicrobianos no leite pelo Kit SNAP Beta-lactâmicos e comparação da leitura visual com a leitora e do branco com cada nível de concentração testada	33
Quadro 11	Detecção de diferentes antimicrobianos no leite pelo Kit SNAP Beta-lactâmicos e comparação da leitura visual com a leitora e do branco com cada nível de concentração testada	34
Quadro 12	Detecção de diferentes beta-lactâmicos no leite pelo Kit Charm MRL BL/TET e comparação da leitura visual com a leitora e do branco com cada nível de concentração testada	35
Quadro 13	Detecção de diferentes tetraciclinas no leite pelo Kit Charm MRL BL/TET e comparação da leitura visual com a leitora e do branco com cada nível de concentração testada	35
Quadro 14	Detecção de diferentes antimicrobianos no leite pelo kit Charm MRL BL/TET e comparação da leitura visual com a leitora e do branco com cada nível de concentração testada.....	36
Quadro 15	Comparação entre os kits Snap Beta-lactâmicos e Charm MRL BL/TET na detecção de diferentes concentrações de antimicrobianos do grupo beta-lactâmicos em leite	37
Quadro 16	Comparação entre os kits Snap Beta-lactâmicos e Charm MRL BL/TET na detecção de diferentes concentrações de antimicrobianos dos grupos aminoglicosídeos, sulfonamidas, macrolídeos, tetraciclinas e outro em leite.....	38
Quadro 17	Comparação entre os kits Snap Tetraciclinas e Charm MRL BL/TET na detecção de diferentes concentrações de antimicrobianos dos grupos beta-lactâmicos, aminoglicosídeos, sulfonamidas, macrolídeos, e outro em leite.....	38
Quadro 18	Comparação entre os kits Snap Tetraciclinas e Charm MRL BL/TET na detecção de diferentes concentrações de antimicrobianos do grupo das tetraciclinas em leite	39
Quadro 19	Limites de detecção de antimicrobianos pelos kits Charm MRL/BL/Tet, Snap Tetraciclinas, Snap Beta-lactâmicos, limites legais estabelecidos pelo Brasil (IN:42), pelo <i>Codex Alimentarius</i> , Food and Drug Administration (FDA), União Europeia (EU) e Organização Mundial da Saúde (OMS).....	40

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Projeção de produção, consumo e exportação de leite do Brasil no período de 2008 a 2020.....	12
Tabela 2	Média dos resultados das análises da qualidade do leite orgânico obtido da Fazenda Salvaterra.....	28
Tabela 3	Valores médios de acidez titulável do leite utilizado no preparo da solução de trabalho.....	29
Tabela 4	Percentual de resultados de leitura visual em desacordo com leitura na leitora kit Charm MRL BL/TET em amostras de leite inoculado com diferentes concentrações de antimicrobianos	31
Tabela 5	Percentual de resultados de leitura visual em desacordo com leitura na leitora pelo kit Snap Tetraciclina em amostras de leite inoculado com diferentes concentrações de antimicrobianos	32
Tabela 6	Percentual de resultados de leitura visual em desacordo com leitura na leitora pelo kit Snap Beta-lactâmicos em amostras de leite inoculado com diferentes concentrações de antimicrobianos	32

LISTA DE SIGLAS E SÍMBOLOS

ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
βL	Beta-lactâmicos
CBT	Contagem Bacteriana Total
CCRVDF	Comitê do <i>Codex Alimentarius</i> sobre Resíduos de Drogas Veterinárias nos Alimentos
CCS	Contagem de Células Somáticas
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
FAO	Food and Agriculture Organization
FDA	Food and Drug Administration
Hab	Habitante
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IN	Intrusão Normativa
Kg	Quilograma
LMR	Limite Máximo de Resíduo
MAPA	Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento
mL	Mililitros
Nº	Número
N1	Nível 1
N2	Nível 2
N3	Nível 3
N4	Nível 4
OMC	Organização Mundial do Comércio
OMS	Organização Mundial da Saúde
ONU	Organização das Nações Unidas
PABA	Ácido Para-aminobenzoico
PNCRB	Plano Nacional de Controle de Resíduos Biológicos
PNCRL	Programa Nacional de Controle de Resíduos em Leite
PANVet	Programa de Análise de Resíduos de Medicamentos Veterinários
ppb	Parte por bilhão
RNA	Ácido Ribonucléico
SIF	Serviço de Inspeção Federal
SP1	Solução Padrão 1
SP2	Solução Padrão 2
Spp.	Espécies
TTC	Cloreto de Trifeniltetrazolium
UE	União Européia
UHT	Temperatura Ultra Alta (Ultra High Temperature)
μL	Microlitros
°C	Graus Celsius
°D	Graus Dornic
%	Por cento

RESUMO

Avaliou-se a eficiência dos kits Charm MRL BL/TET, SNAP beta-lactâmico e SNAP tetraciclina na detecção de resíduos de antimicrobianos inoculados experimentalmente em quatro concentrações distintas em leite isento de resíduos, considerando o limite de detecção declarado pelo fabricante e o limite máximo de resíduo (LMR) estabelecido pela legislação brasileira (Instrução Normativa nº42/1999/MAPA). Foram utilizadas 21 bases de antimicrobianos de seis classes diferentes, além de amostras controle positivas e negativas, com 30 repetições cada. Durante todo o experimento, controlou-se a temperatura dos blocos aquecedores, e foi avaliada a qualidade do leite utilizado (contagem bacteriana total e de células somáticas, determinação dos teores de gordura, proteína, lactose, extrato seco desengordurado e total, além da acidez titulável). A avaliação foi realizada por ensaios laboratoriais, no período de junho a setembro de 2009. As temperaturas variaram de 44 a 47 °C no bloco aquecedor para os Kits SNAP e de 55 a 57 °C para o kit Charm MRL BL/TET, estando, portanto, de acordo com valores estabelecidos pelas respectivas empresas de 45 ± 5 °C e 56 ± 2 °C. Os valores de acidez titulável do leite variaram de 14,35 a 16,56 °D. Discrepâncias não foram observadas quanto à recomendação do fabricante (N3). Ambos os kits detectaram a presença dos resíduos de antimicrobianos nas concentrações do LMR no nível 2 (legislação brasileira) e alguns em baixas concentrações (N1), que correspondem à metade do valor declarado pelo fabricante. No kit Snap Tetraciclina o percentual de detecção de tetraciclina, oxitetraciclina e clortetraciclina no nível 2 variou de 90 a 100%. Para os beta-lactâmicos, a sensibilidade no nível 2 variou de 93,3 a 100%, com destaque para o ceftiofur no nível 1 com 76,7 % de positividade. Beta-lactâmicos não declarados pelo fabricante foram detectados em 100% pelo kit SNAP beta-lactâmicos para cefazolina, 90% para dicloxacilina sódica e 66,7% para cloxacilina. No kit Charm MRL Beta/TET, o percentual de detecção no nível 2 (N2) foi de 100% para maioria dos antimicrobianos, exceto para cloxacilina (93,3%). O ceftiofur foi detectado em 100% das amostras testadas. Sobre a concentração declarada pelo fabricante (N3), o kit detectou a cefalexina em 23,3% e a cefapirina em 20,0%; cefazolina não foi detectada. O kit Snap Beta-lactâmico quando comparado com o kit Charm MRL BL/TET não detectou resíduos de tetraciclina e o Kit Snap Tetraciclina não detectou beta-lactâmicos. Embora não tenha sido observada diferença estatisticamente significativa em relação à leitura visual e na leitora, alguns resultados foram discordantes. Conclui-se que os kits são eficientes na detecção de resíduos de antimicrobianos, podendo ser usados como métodos de triagem no monitoramento destas substâncias no leite. O uso da leitora deve ser obrigatório para a triagem de resíduos de antimicrobianos no leite avaliados pelos kits testados.

Palavras-chave: leite, antimicrobianos, resíduos, detecção e métodos.

ABSTRACT

In order to evaluate the efficiency of Charm MRL BL/TET, SNAP beta-lactams and SNAP tetracyclins kits for detecting antimicrobials residues in milk, raw milk samples without antimicrobials were inoculated with 21 drugs in four different concentrations considering the Brazilian legal limit (MRL) and the detected level of the kits. The 21 antimicrobials from six different groups and positive and negative controls were tested with 30 repetitions/level. During all the experiment, the blocks temperature was measured and the milk quality was evaluated for total bacterial count, somatic cell count, determination of fat, protein, lactose, total and solids non fat content. The experiment was carried out from June to September, 2009. The temperatures varied from 44 to 47 °C in Kits SNAP's blocks and from 55 to 57 °C to Charm MRL BL/TET kit and were considered satisfactory. The titrable acidity of the milk samples varied from 14.35 to 16.56 °D. Considering all the limit level of antimicrobial detection (N3) defined by the kits manufacturer, discrepancies were not observed. All the kits detected the different antimicrobials in level 2 that correspond to MRL concentration (Brazilian legislation) and also some detect in level 1 (N1) that is the half of the N3 concentration. The Snap Tetracyclin kit detection of tetracyclin, oxitetracyclin and clortetracyclin in N2 level varied from 90 to 100%. For beta-lactams, the sensitivity in N2 level varied from 93.3 to 100% and ceftiofur (N1) was detected in 76.7 %. Beta-lactams such as cefazolina were detected in 100%; sodium dicloxacilin in 90.0% and cloxacillin in 66.7% by Snap beta-lactams kit. In Charm MRL Beta/TET kit, the detection for level 2 (N2) was 100% for the majority of the antimicrobials, exception for cloxacilin (93.3%). Ceftiofur was detected in 100% of all the milk samples tested. In relation to N3 level, the Charm MRL Beta/TET kit detected cefalexin in 23.3% and cefapirin in 20.0%; cefazolin was not detected. The Snap Beta-lactams kit did not detect tetracyclins and the Snap Tetracyclin kit did not detected beta-lactams. Although statistical difference ($P > 0.05$) was not noted when the results were evaluated visually compared with the kit's reader, some results were not similar. It can be concluded that all the tested kits are efficient for detecting antimicrobials in milk and they can be used as screening tests for monitoring these substances in milk. The kit's reader must be obligatory for screening antimicrobial residues in milk.

Keywords: milk, antimicrobials, residues, detection and methods

1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

A globalização, com consequente crescimento industrial, tem exigido dos produtores rurais a aplicação de novas tecnologias visando à produção de leite no menor custo e com melhor qualidade. Atualmente, a questão da qualidade e segurança dos alimentos tem sido alvo da atenção de autoridades de saúde pública, indústria, produtores e consumidores de modo geral.

O Brasil é um dos principais produtores de leite no mundo, superando a marca de 25 bilhões de litros/ano, com a produção predominante em sistema a pasto. O aumento nos índices de produtividade do rebanho brasileiro tem direcionado a produção excedente para elaboração de derivados lácteos para o mercado externo. O cumprimento dos programas de sanidade/qualidade garante a excelência dos produtos lácteos na pauta de exportações do agronegócio brasileiro (Plano..., 2008).

O leite é considerado um alimento completo. Por ser rico em proteínas, vitaminas, gordura, carboidratos e sais minerais, torna-se fonte de nutrientes importantes para a saúde do homem. Porém, em situações específicas, pode veicular resíduos de medicamentos ou drogas de uso veterinário. No entanto, este leite contaminado por resíduos de antibióticos é considerado adulterado e impróprio para consumo, representando riscos para a saúde pública, riscos tecnológicos para a indústria de laticínios e riscos comerciais.

Para manter a saúde dos rebanhos leiteiros, é comum o emprego de antimicrobianos para a prevenção e combate a doenças,

principalmente a mastite, podendo levar ao aparecimento de resíduos no leite e derivados lácteos. Consequentemente, há uma preocupação dos consumidores e das autoridades ligadas à saúde pública, à indústria e ao comércio em relação à

pesquisa da presença de resíduos de antimicrobianos no leite e derivados. Daí, a necessidade de se pesquisar novas técnicas de identificação de quantidades mínimas destes resíduos no leite.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Produção de leite no Brasil e em algumas regiões do mundo

No Brasil, a heterogeneidade do processo produtivo de leite é marcante em todo território. Há produtores especializados que investem em tecnologia, usufruem das economias de escala e diferenciam seu produto, recebendo mais pelo volume produzido e pela qualidade alcançada, concentrados em bacias leiteiras tradicionais nos estados de Minas Gerais, Goiás, São Paulo e Paraná. Além destes, há também produtores distribuídos por todo o território nacional que vivem exclusivamente da renda gerada na atividade, vital para a agricultura familiar (Carvalho e Oliveira, 2006).

A região Sudeste é predominante na produção leiteira com 10,132 bilhões de litros em 2008. Minas Gerais ocupa um lugar de destaque com uma produção de 7,657 bilhões de litros neste mesmo período (Produção..., 2008). Em 1990, a produção de leite no Brasil era de 14,494 bilhões de litros e para 2009/2010, estima-se que a mesma seja de 31,12 bilhões de litros (Produção..., 2010).

De acordo com dados do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) no ano de 2009 (Tabela 1), estimou-se a produção de leite no Brasil em 31,12 bilhões de litros de leite, com uma taxa de crescimento anual de 1,95%. Isso corresponde a uma produção de 37,75 bilhões de litros de leite cru em 2019/2020 (Produção..., 2010). No cenário internacional, o Brasil destaca-se como o quinto país de maior produção de leite (Produção..., 2009).

Tabela 1. Projeção de produção, consumo e exportação de leite do Brasil, no período de 2008 a 2020

Ano	Leite em bilhões de litros (Projeção)		
	Produção	Consumo	Exportação
2008/2009	30,4	26,58	1,05
2009/2010	31,12	27,33	1,10
2010/2011	31,80	27,93	1,18
2011/2012	32,46	28,52	1,27
2012/2013	33,12	29,11	1,35
2013/2014	33,78	29,71	1,44
2014/2015	34,45	30,30	1,52
2015/2016	35,11	30,90	1,60
2016/2017	35,77	31,49	1,69
2017/2018	36,43	32,08	1,77
2018/2019	37,09	32,68	1,85
2019/2020	37,75	33,27	1,94

Fonte: Elaboração da AGE/MAPA com dados do LSPA/IBGE, USDA e Embrapa Gado de leite (2010)

Segundo os dados de estimativa de produção, consumo e exportação de leite pelo Brasil, nota-se grande potencial do país, com projeção de aumento de exportação de 1,10 bilhões de litros (2009-2010) para 1,94 bilhões de litros em 2019-2020 (Carvalho, 2007; Produção..., 2010).

No que diz respeito ao consumo de leite fluido *per capita*, o Brasil ocupa o sétimo lugar com 83,2 kg/hab./ano, ficando atrás da Rússia, Nova Zelândia, Canadá, Estados Unidos, Austrália e em primeiro lugar a Ucrânia (Consumo..., 2008). O consumo brasileiro deverá crescer a uma taxa de 1,98% ao ano nos próximos anos. Essa taxa é bem superior à observada para o crescimento da população brasileira, que de acordo com dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), foi de 1,05% em 2008 (Projeção..., 2008).

2.2 Leite orgânico

Nos últimos anos, aumentou a preocupação dos consumidores quanto à qualidade do leite e às condições de produção e bem estar dos animais. Simultaneamente, aumentou o interesse e o consumo de produtos e subprodutos de origem animal produzidos no sistema orgânico, com destaque para o leite e derivados (Ribeiro et al., 2009).

O leite orgânico é um produto oriundo da ordenha de vacas com manejo e tratamento diferenciados do sistema convencional, caracterizado pelo emprego de tecnologias que otimizam o uso de recursos naturais com o objetivo de ser auto sustentável (Produção..., [200-]).

Para usar a denominação “orgânico” é necessário que o produtor tenha certificação emitida por entidade reconhecida pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. No Brasil, a produção de alimentos orgânicos está regulamentada pela Lei nº 10.831 (Brasil, 2003) que visa a oferta de produtos saudáveis, com elevado valor nutricional, isentos de resíduos e contaminantes que venham afetar a saúde do consumidor, do agricultor e do meio ambiente. A legislação não estabelece padrões para a qualidade do leite produzido nesse sistema. Portanto, os parâmetros de qualidade do leite produzido e comercializado no país são definidos pela Instrução Normativa nº51 (IN51) (Brasil, 2002), servindo como indicativos para a produção orgânica.

2.3 Qualidade do leite e sua relação com antimicrobianos

Evidências de que o leite produzido e consumido no Brasil nem sempre apresenta

a qualidade desejada têm gerado discussão e desenvolvimento de novas políticas de incentivo à produção leiteira (Nero et al., 2005). A produção de leite de alta qualidade deve ser a prioridade para estabelecer um mercado forte para o leite e derivados, uma vez que a qualidade do leite cru determina a dos produtos lácteos (Santos e Bergmann, 2003).

A contaminação microbiana do leite *in natura* pode ocorrer por vias endógenas, decorrentes de infecções dos animais, incluindo os processos inflamatórios da glândula mamária, ou por vias exógenas, com destaque para superfície exterior do úbere e dos tetos, as mãos do ordenhador, os utensílios e equipamentos de ordenha e as condições de armazenamento do leite (Fonseca e Santos, 2000).

A qualidade do leite depende de vários fatores como: higiene do ordenhador, limpeza do local, utensílios e equipamentos que entram em contato com o produto, uma vez que as condições de produção, estocagem e transporte do leite, além dos cuidados na administração de medicamentos ou drogas veterinárias, podem influenciar diretamente a qualidade higiênica (Dürr, 2007).

Na atualidade, a questão da "qualidade e segurança" dos alimentos tem recebido maior atenção por parte das autoridades, indústria, profissionais envolvidos, produtores e consumidores de modo geral. O leite é considerado o alimento mais perfeito da natureza por apresentar uma composição rica em proteínas, vitaminas, gordura, carboidratos e sais minerais (principalmente cálcio), sendo fonte essencial à saúde do homem.

A composição média do leite consiste em 87,4% de água e 12,6% de sólidos totais, sendo 3,9% de gordura, 3,2% de proteína, 4,6% de lactose e 0,90% de minerais e outros sólidos (Walstra et al., 1987). Quanto maior for a concentração de sólidos no leite, maior será o rendimento dos derivados lácteos. Leite com alta contagem de células somáticas (CCS) afeta negativamente a produção de leite em pó, manteiga e leite UHT, reduzindo a vida de

prateleira, e produzindo sabores indesejáveis. Com relação à saúde pública, à medida que há aumento de CCS do rebanho, maior é a probabilidade de serem encontrados resíduos de antimicrobianos no leite (Souza et al., 2004). Produzido durante a lactação, a partir de elementos que passam do sangue para as células especializadas da glândula mamária, em situações específicas pode conter resíduos de medicamentos ou drogas de uso veterinário.

Medicamentos veterinários são utilizados para a profilaxia e tratamento do rebanho leiteiro e devem ser prescritos por profissionais competentes. A utilização indevida, sem respeitar as indicações do receituário e o período de carência, poderá ocasionar a presença de resíduos no leite (Costa, 2002).

Além dos antimicrobianos, o leite pode conter também, resíduo de substâncias como desinfetantes e pesticidas administrados aos animais ou usados no ambiente da fazenda. Antimicrobianos podem ser detectados no leite após serem administrados pelas vias intramamária, intramuscular, intrauterina, oral e subcutânea. Os antimicrobianos são comumente usados para tratar mastite e outras infecções das vacas leiteiras (Brito e Brito, [200-]).

O antimicrobiano usado para tratar mastite é uma preocupação importante para a indústria e para a saúde pública. A presença de resíduo de antimicrobiano no leite interfere no processamento de muitos produtos lácteos, como queijo e outros produtos fermentados. Sua presença, mesmo sendo em níveis baixos, pode causar problemas de saúde aos consumidores (Tozzetti et al., 2008).

Exigências pela qualidade e segurança alimentar têm aumentado nos últimos tempos em relação à contaminação química e microbiológica. O leite pode veicular resíduos de antimicrobianos como resultado do manejo incorreto das drogas. Isto pode levar à seleção de cepas bacterianas resistentes, desequilíbrio da microbiota intestinal, efeitos teratogênicos, reações de hipersensibilidade e inibição da

multiplicação bacteriana com redução da carga microbiana em análises laboratoriais. Na indústria, os resíduos de antimicrobianos podem causar diversos problemas tecnológicos; como, por exemplo, a inibição da atividade de cultura *starter* na produção de produtos lácteos (Nascimento et al., 2001; Nero et al., 2007).

2.4 Antimicrobianos

Os antimicrobianos são substâncias químicas usadas para combater os micro-organismos. Estes agentes podem ser inespecíficos, que são aqueles que atuam sobre os micro-organismos em geral, patogênicos ou não. Este grupo é composto pelos anti-sépticos e desinfetantes. Os agentes específicos são aqueles que atuam sobre os micro-organismos responsáveis pelas doenças infecciosas que acometem os animais; sendo representado pelos quimioterápicos e antibióticos. Os quimioterápicos são agentes químicos sintéticos, exibindo as mesmas atividades de um antibiótico (Spinosa, 2002a).

Os antibióticos são substâncias químicas produzidas pelo metabolismo de determinadas amostras de bactérias, fungos e actinomicetos. Podem, em soluções diluídas, impedir temporária ou definitivamente as funções vitais de outros micro-organismos, determinando efeitos bacteriostáticos e bactericidas (Brasil, 1999a).

Na prática da agricultura moderna, medicamentos veterinários estão sendo usados em larga escala e administrados como aditivos alimentares ou através da água potável, a fim de evitar o surto de doenças (Stolker e Brinkman, 2005). A utilização de antimicrobianos em animais sempre acompanhou o desenvolvimento da prática médica e veterinária. Na década de 50, descobriu-se seu uso como aditivo alimentar objetivando promover o crescimento dos animais com melhor eficiência produtiva. As classes de antimicrobianos mais comumente utilizados em animais de produção são os β -lactâmicos (penicilinas e cefalosporinas), as tetraciclinas (oxitetraciclina, tetraciclina e

clortetraciclina), os aminoglicosídeos (estreptomicina, neomicina e gentamicina) os macrolídeos (eritromicina) e as sulfonamidas (sulfametazina) (Mitchell et al., 1998).

O uso incorreto de antibióticos na medicina veterinária pode originar resíduos nos alimentos. Estes resíduos podem ter efeitos tóxicos diretos sobre os consumidores, como reações alérgicas em indivíduos hipersensíveis, ou podem ainda causar problemas indiretamente pela indução de cepas de bactérias resistentes (Stolker e Brinkman, 2005). Outra implicação importante relacionada à presença de resíduos refere-se à ocorrência de problemas tecnológicos nas indústrias de alimentos, especialmente naquelas que utilizam bactérias ácido-láticas. Segundo Brito e Lange (2005), o principal problema que normalmente ocorre é a inibição das culturas lácteas utilizadas na produção de iogurtes, queijos e outros produtos fermentados, dificultando a produção dos mesmos ou alterando sua qualidade. Outros problemas incluem a formação de odores desagradáveis na manteiga e no creme.

Rapini et al. (2004), ao avaliarem o perfil de sensibilidade antimicrobiana de 45 cepas de *Staphylococcus* spp. isoladas de dez amostras de queijo tipo coalho comercializado nas praias nordestinas, encontraram elevado percentual de resistência: 100% para penicilina; 91% para tetraciclina; 75,5% para vancomicina; 71,1% para gentamicina; 66,7% para oxacilina; 60% para eritromicina; 48,9% para cefalotina e 26,7% para sulfazotrin. Os autores destacaram a necessidade de medidas de controle no uso indiscriminado de antimicrobianos.

Shitandi e Sternesjo (2004) avaliaram a prevalência de *Staphylococcus aureus* multirresistente em leite de grandes e pequenos produtores no Quênia, pelo perfil de susceptibilidade à penicilina G, tetraciclina, eritromicina, trimetoprim / sulfametazina, e cloranfenicol em 402 isolados de leite de vacas com mastite subclínica. A resistência múltipla, definida como a falta de sensibilidade a pelo menos dois antimicrobianos de diferentes classes,

foi observada em 69 (34,3%) dos isolados nas pequenas propriedades em comparação com 36 (17,9%) dos isolados das grandes fazendas.

2.4.1 Grupos de antimicrobianos de uso comum em animais de produção

2.4.1.1 Sulfonamidas

As sulfonamidas são análogos estruturais e antagonistas competitivos do ácido para-aminobenzóico (PABA) que impedem sua utilização na síntese do ácido fólico (Mandell e Petri Jr., 1997). O ácido fólico na forma reduzida, o ácido tetraidrofolico é fundamental para síntese de DNA e RNA bacteriano. O trimetoprim exerce efeito sinérgico quando utilizado com sulfonamida, inibindo a diidrofolato-reductase microbiana, enzima que reduz o diidrofolato a tetraidrofolato, produzindo efeito antimicrobiano sinérgico. Esses antimicrobianos possuem amplo espectro (Gorniak, 2002).

As sulfonamidas são substâncias bacteriostáticas. A presença de seus resíduos nos alimentos preocupa em virtude do seu poder carcinogênico e pela possibilidade do desenvolvimento de resistência aos antibióticos nos seres humanos. Embora as sulfonamidas sejam utilizadas como medicamentos veterinários para fins profiláticos e efeitos terapêuticos, estes antimicrobianos também atuam como promotores de crescimento. Trimetoprim é um potencializador frequentemente administrado em conjunto com as sulfonamidas (Stolker e Brinkman, 2005).

2.4.1.2 Aminoglicosídeos

Os aminoglicosídeos são constituídos por um núcleo de hexose unido a aminoácidos por meio de ligações glicosídicas. Agem interferindo na síntese protéica bacteriana, promovendo a formação de proteínas defeituosas. Os aminoglicosídeos ligam-se a subunidade 30S do ribossoma, provocando a leitura incorreta do código genético com

consequente interrupção da síntese da proteína. A proteína defeituosa resultante é essencial para o metabolismo da bactéria, levando a morte celular. Portanto antimicrobianos dessa classe são considerados bactericidas. Eles têm espectro de ação relativamente curto, predominando sobre os micro-organismos Gram negativo (Chambers e Sande, 1997; Dowling, 2006a).

Os aminoglicosídeos mais conhecidos são a gentamicina, lincomicina, neomicina e estreptomicina. Embora possam causar efeitos colaterais de nefrotoxicidade e ototoxicidade, eles ainda são ocasionalmente utilizados para o tratamento de infecções graves (Stolker e Brinkman, 2005).

2.4.1.3 Tetraciclinas

As tetraciclinas são antibióticos produzidos por diversas espécies de *Streptomyces*, sendo algumas semi-sintéticas. Esta denominação é relacionada à sua estrutura química formada por quatro anéis. Elas agem inibindo a síntese protéica, ligando a subunidade 30S do ribossoma impedindo que o RNA transportador se fixe ao mesmo. As tetraciclinas são antibióticos de largo espectro. Atuam sobre bactérias Gram positivo e Gram negativo, clamídias, riquetsias e alguns protozoários como *Plasmodium falciparum*, *Trichomonas* spp., *Entamoeba coli*, *Giardia lamblia* e outros. Estes antibióticos podem ocasionalmente se ligar a subunidade 40S do ribossoma dos animais superiores, o que explica reações adversas como: náusea, vômito, diarreia, quando administrado via oral, e dor local, quando por via intramuscular (Kapusnik-Uner et al., 1997; Giguère, 2006b).

Estes antibióticos podem ocasionar reações alérgicas em humanos, comprometer o desenvolvimento ósseo de crianças, interferir na reabsorção de cálcio pelos ossos além de provocar alterações na dentição. São ainda pouco absorvidas no trato gastrointestinal, onde permanecem em altas concentrações interferindo na microbiota intestinal (Produção..., 2009).

2.4.1.4 Beta-lactâmicos: penicilinas e cefalosporinas

Penicilinas e cefalosporinas são polipeptídeos que apresentam um anel beta-lactâmico. As penicilinas derivam do ácido 6-amino-penicilinâmico e as cefalosporinas do ácido 7-amino-cefalosporinâmico. Ambos atuam impedindo a formação da parede celular, interferindo na síntese de peptídeoglicano do microrganismo em fase de crescimento logarítmico, sendo, portanto, bactericida. Estes agem inibindo a transpeptidase, enzima que participa da última etapa da síntese da parede celular (Spinosa, 2002b; Prescott, 2006).

A penicilina foi descoberta por Alexander Fleming em 1928 como um co-produto do *Penicillium notatum*, ao qual deu origem ao nome do medicamento. As penicilinas possuem um anel beta-lactâmico fundido a um anel sulfúrico com cinco membros contendo tiazolidina. Uma modificação na posição seis da cadeia lateral do anel beta-lactâmico resulta em drogas com diferentes

propriedades antibacterianas e farmacológicas (Programa..., 2009).

A primeira cefalosporina foi descoberta em 1945 por Giuseppe Botzu, a partir de *Cephalosporium acremonium*. As cefalosporinas possuem um anel beta-lactâmico ligado a um anel de dihidrotiazina de seis membros contendo enxofre. O núcleo das cefalosporinas é mais resistente à ação de muitas enzimas bacterianas, propriedade que explica seu amplo espectro de ação (Programa..., 2009).

O ceftiofur, uma cefalosporina de terceira geração, é um dos fármacos comumente usado em fazendas leiteiras principalmente no tratamento de infecções respiratórias e mastites, tanto em vaca seca como em lactação. O fármaco é comercializado com várias denominações com apelo de descarte zero em leite. Porém, pode degradar, resultando em metabólitos conforme a Figura 1 (Ceftiofur..., 2009).

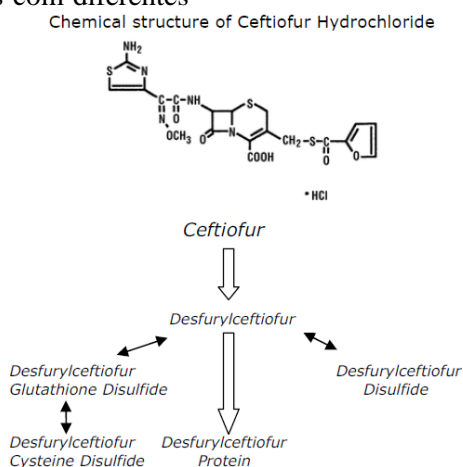


Figura 1. Estrutura química do Ceftiofur.
Fonte: Ceftiofur, 2009

2.4.1.5 Macrolídeos

Os macrolídeos possuem um anel lactônico macrocíclico ao qual se ligam açúcares. Agem impedindo a translocação do RNAt na subunidade 50S do ribossoma, inibindo a enzima peptidiltransferase, impossibilitando a síntese protéica bacteriana, sendo então, bacteriostáticos. Eles são ativos contra bactérias Gram positivo e *Mycoplasma*,

com boa atividade contra bactérias anaeróbias (Giguère, 2006a).

2.4.1.6 Anfenicóis

Anfenicóis compõem uma classe de antibióticos bacteriostáticos que inibem a síntese dos polipeptídeos bacterianos. Pertencem a este grupo, o cloranfenicol, o tianfenicol e o florfenicol. O cloranfenicol,

inicialmente produzido pelo *Streptomyces venezuelae*, também, pode na atualidade ser obtido por síntese laboratorial. Estes antimicrobianos apresentam largo espectro de ação atuando sobre bactérias, riquetsias, espiroquetas e *Mycoplasma*. Eles agem inibindo a síntese protéica dos microorganismos sensíveis, ligando a subunidade 50S, o que interfere na formação do peptídeo pelo bloqueio da enzima peptidiltransferase, e são bacteriostáticos. Estes antimicrobianos inibem também a síntese protéica mitocondrial das células da medula óssea dos mamíferos, sendo um de seus efeitos mais graves a anemia aplástica (Spinosa, 2002c; Dowling, 2006b).

O uso de cloranfenicol em animais produtores de alimentos está proibido no Brasil, nos Estados Unidos, na União Européia e em outros países. O tianfenicol e o florfenicol são antibióticos com estruturas similares à do cloranfenicol; não estão associados ao aparecimento de anemia aplástica; são administrados via oral para controle de infecções em seres humanos; e prescritos ainda para tratamento de doenças infecciosas de bovinos, suínos e aves (Produção..., 2009).

2.4.1.7 Quinolonas

A base estrutural das quinolonas é o anel 4-quinolona que tem sido modificado na tentativa de obter um aumento no espectro da droga que age inibindo as topoisomerasas bacterianas do tipo II (DNA girase), impedindo o enrolamento da hélice de DNA. A introdução de quinolona fluorada representa um progresso terapêutico, pois estas drogas são dotadas de amplo espectro de ação (Mandell e Petri Jr., 1997).

2.5 Pesquisa de resíduos de antimicrobianos e outras drogas no leite

As principais razões que justificam a preocupação com a presença de resíduos de antimicrobianos no leite são: 1) alguns consumidores apresentam reação alérgica à penicilina, mesmo em pequenas quantidades; 2) alguns nitrofuranos e

sulfametazina desenvolvem tumores malignos em animais de laboratório, havendo o potencial para causar o mesmo efeito no homem. O cloranfenicol pode afetar a medula óssea e causar anemia aplástica em indivíduos susceptíveis; 3) os resíduos de antibióticos poderiam selecionar amostras resistentes de bactérias do ambiente e/ou presentes nos animais, prejudicando futuros tratamentos; 4) pequenas concentrações de antimicrobianos podem inibir as espécies de bactérias usadas nos produtos lácteos fermentados. A atividade dos antimicrobianos não é, geralmente, afetada pela pasteurização. Portanto, é importante que alguns cuidados sejam tomados quando são administrados antibióticos às vacas em lactação para que o leite com resíduos não seja comercializado (Brito e Brito, [200-]).

Devido aos riscos relacionados à saúde pública, associados à presença de resíduos no leite, recomenda-se o monitoramento freqüente de resíduos de medicamentos e de seus derivados metabólicos no leite, adotando-se, como referência, os limites estabelecidos pelas agências internacionais. Historicamente, a principal referência mundial para esse assunto é o *Codex Alimentarius* (FAO/OMS) que fornece subsídios técnicos e serve de referência para vários países do mundo. De acordo com o mesmo, o limite máximo de resíduo de antibiótico para o leite é um décimo daquele encontrado em produtos cárneos, pois o leite é alimento essencial para crianças e recém-nascidos (Fonseca, 2005).

No intuito de avaliar e prevenir esses riscos, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) implantou no Brasil, em 2003, o Programa de Análise de Resíduos de Medicamentos Veterinários em alimentos de origem animal (PAMvet), que visa, controlar resíduos de medicamentos veterinários nos alimentos. O leite foi o primeiro alimento a ser pesquisado, por ser muito consumido pela população. Definiram-se, também, os seguintes princípios ativos a serem pesquisados: tetraciclina, beta-lactâmicos, sulfas, abamectina, doramectina e ivermectina (Programa..., 2005).

Após a observação dos efeitos adversos ocasionados pelo problema de resíduos de antimicrobianos no leite, foram desenvolvidos testes para sua detecção. Um grupo de testes disponíveis comercialmente baseia-se na inibição do crescimento bacteriano. As bactérias empregadas apresentam alta sensibilidade à penicilina G e sensibilidade para outros antimicrobianos. Entretanto, o período para obtenção do resultado pode variar de duas a 24 horas, dependendo do teste e da espécie de microrganismo empregada. Como alternativa, existem outros testes rápidos que apresentam alta sensibilidade e especificidade; contudo, são designados para grupos específicos de substâncias. No caso do Brasil, existe um problema adicional, pois como existem diversas bases liberadas para tratamento de doenças de bovinos leiteiros, principalmente mastite, isto implica em aumentar o número de testes a ser empregado pelas indústrias, o que contribui com aumento do custo, principalmente quando se considera a necessidade de uso de rotina (Brito, [200-]).

2.5.1 Controle de resíduos de antimicrobianos

A presença de resíduos de antimicrobianos no leite pode resultar em prejuízos econômicos e danos à saúde. Por isto, é de fundamental importância monitorar a qualidade desse produto bem como implantar programas de fiscalização da qualidade do leite recebido, quanto à presença de resíduos de antimicrobianos nas indústrias de laticínios para evitar perdas econômicas (Denobile e Nascimento, 2004).

Não é permitido o envio de leite para posto de refrigeração ou estabelecimento industrial quando oriundo de animais que estejam sendo submetidos a tratamento com

drogas e medicamentos de uso veterinário em geral, passíveis de eliminação pelo leite. Por isto, estes animais 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 (Brasil, 1952; 2002).

No Brasil, a Instrução Normativa nº 42, publicada em 1999 pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), estabelece os padrões legais para cada grupo de antimicrobiano. O Plano Nacional de Controle de Resíduos Biológicos em Produtos de Origem Animal (PNCRB), instituído pelo MAPA, objetiva sistematizar os meios de controle da contaminação desses produtos por resíduos de compostos usados na agropecuária, bem como de poluentes ambientais. Os limites legais (Quadro 1) estabelecidos referem-se aos valores internacionais que garantem a segurança do leite para o consumidor (Brasil, 1999b; Plano..., 2008).

Os métodos analíticos utilizados no PNCRB são adotados em função da disponibilidade de métodos validados, principalmente, aqueles recomendados pelo Comitê do *Codex Alimentarius* sobre Resíduos de Drogas Veterinárias nos Alimentos (CCRVDF). Inicialmente são incluídos métodos de triagem, os quais não devem exigir investimentos em instrumentos laboratoriais complexos, nem em reagentes ou na capacitação de pessoal a elevados custos. Devem ser eficazes e economicamente viáveis. Estes métodos de triagem podem ser definidos como métodos de análises qualitativos, de um remanescente residual de uma substância em concentração igual ou inferior ao LMR. Um resultado suspeito indica que pode ter sido superado o LMR e deverá ser analisada novamente através de métodos confirmatórios, fornecendo fundamento para ação regulatória (Brasil, 1999b).

Quadro 1. Plano de controle de resíduos de antimicrobianos estabelecido pelo Programa Nacional de Controle de Resíduos em Leite – PNCRL

<i>Antimicrobianos</i>	<i>Técnica</i>	<i>LQ/MIC</i> ($\mu\text{g}/\text{kg}$ ou $\mu\text{g}/\text{L}$)	<i>LMR/NA*</i> ($\mu\text{g}/\text{kg}$ ou $\mu\text{g}/\text{L}$)	<i>Amostra</i>
Clortetracilina ^a	CLAE-UV	50	100	120
Oxitetraciclina ^a		10		
Tetraciclina ^a		20		
Sulfatiazol ^b	CLAE – UV	25	100	60
Sulfametazina ^b		25		
Sulfadimetoxina ^b		25		
Cloranfenicol	CL – EM/EM	0,1	0,3	60

Fonte: Adaptado de Plano... (2008)

(*) NA - Nível de ação; LQ - Limite de Quantificação; MIC - Concentração Mínima Inibitória; LMR – Limite Máximo de Resíduos; ^a Somatório de todas as Tetraciclinas; ^b Somatório de todas as Sulfonamidas

MÉTODOS DE ANÁLISE

CLAE - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

UV - Detector Ultra Violeta

EM – Espectrometria de massa

O Plano Nacional de Controle de Resíduos em Produtos de Origem Animal - PNCRA, foi instituído pela Portaria Ministerial n.º51, de 06 de maio de 1986 e adequado pela Portaria Ministerial n.º 527, de 15 de agosto de 1995, com o objetivo de se integrar ao esforço destinado à melhoria da produtividade e da qualidade dos alimentos de origem animal. Secundariamente, objetiva proporcionar condições de o país se adequar do ponto-de-vista sanitário às regras do comércio internacional de alimentos preconizadas pela Organização Mundial do Comércio (OMC) e pelos órgãos auxiliares (FAO, OIE e WHO). No Brasil, estabelecer limites máximos de resíduos (LMR's) é competência do Ministério da Saúde. No caso de não estarem estabelecidos por aquele Ministério, utilizam-se os internalizados no MERCOSUL, os recomendados pelo *Codex Alimentarius*, os constantes nas Diretivas da União Européia e os utilizados pelo FDA/USA (Brasil 1999b).

O plano nacional monitora a presença de resíduos de medicamentos veterinários e contaminantes em produtos de origem animal. As análises levam em consideração recomendações do *Codex Alimentarius* (fórum internacional de regularização de alimentos), estabelecidas pela Organização das Nações Unidas (ONU) e pela Organização Mundial de Saúde (OMS). Todos os estabelecimentos registrados no Serviço de Inspeção Federal (SIF) participam de sorteios semanais para coleta

de amostras que são examinadas no âmbito do Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes (PNCRC), inclusive aqueles habilitados para emitir certificado sanitário internacional (Produção..., 2009).

Para garantir a qualidade da matéria prima, a pesquisa de resíduos de antibióticos deve ser realizada pelo menos uma vez ao mês em unidade operacional da Rede Brasileira de Laboratórios para Controle da Qualidade do Leite, independente da frequência de realização de análise estipulada pelo controle de qualidade interno da granja leiteira (Brasil, 2002).

2.5.2 Persistência de resíduos de antimicrobianos em leite

Com o objetivo de garantir maior segurança para o leite e seus derivados, o MAPA instituiu em 1999 a IN 42 que estabelece o Limite Máximo de Resíduos (LMR). Portanto, inúmeros trabalhos têm sido realizados para obter dados sobre a presença de resíduos de antimicrobianos em leite, a frequência, os níveis, e a distribuição no território nacional. Diversos testes disponíveis no mercado têm sido usados com o intuito de evitar que leite contaminado seja processado e comercializado.

Borges et al. (2000) ao avaliaram a ocorrência de resíduos de antimicrobianos em leite pasteurizado integral e padronizado

produzido e comercializado no estado de Goiás, no período de junho de 1997 a agosto de 1998. Utilizou-se o método de difusão de resíduos de antimicrobianos em ágar e *Bacillus subtilis* e *Bacillus stearothermophilus* como micro-organismos reveladores. Os autores observaram 9,95 % de amostras positivas para resíduos de antimicrobianos.

Ao realizarem pesquisa de resíduos de antimicrobianos pelo Kit Delvotest P e pelo β L SNAP test, em 300 amostras de leite pasteurizado tipo C (130) e Integral fazenda (170) coletadas aleatoriamente em estabelecimentos comerciais na região norte do Rio de Janeiro, no período de abril de 1996 a abril de 1997, Folly e Machado (2001), observaram 4,33% de amostras positivas para resíduos de antimicrobianos.

Barros et al. (2001), ao avaliarem 26 amostras de leite pasteurizado tipo C de uma única marca em Salvador (BA), no período de outubro de 1998 a março de 1999, observaram 38,5% de amostras positivas para resíduos de antimicrobianos utilizando o método de difusão em ágar.

A ocorrência de resíduos de antimicrobianos foi avaliada por Nascimento et al. (2001) em 96 amostras de leite pasteurizado de seis diferentes marcas (duas tipo B, duas tipo C, uma 1 tipo A e uma integral - longa vida) de estabelecimentos comerciais de Piracicaba – SP. Os autores utilizaram disco de papel filtro impregnado com leite sobre superfície do meio de cultura TSB (caldo tripton de soja) previamente inoculado com cultura teste de *Bacillus stearothermophilus*. Observaram-se que 48 (50%) das amostras apresentaram resíduos de antimicrobianos, sendo que destes, 33 (34,8%) eram beta-lactâmicos e dentre estes 27 amostras apresentaram resíduos de penicilina. Diferença estatística não foi observada entre as amostras analisadas para os antibióticos em geral. Porém quando avaliado a presença de penicilina, 22 delas (81,5%) continham índices superiores aos recomendados.

A frequência de resíduos de antimicrobianos no leite de 200

propriedades rurais em Minas Gerais, comparando-se diferentes métodos rápidos de detecção foi avaliada por Hotta (2003). Resíduos de antimicrobianos foram detectados em 21% das amostras analisadas.

Na região do Triângulo Mineiro, Tetzner et al. (2005) pesquisaram a presença de resíduos de antimicrobianos no leite de 21 propriedades pelo Delvotest e observaram 33,3% de amostras positivas para resíduos.

Em investigação da ocorrência de cloranfenicol em 151 amostras de leite pasteurizado tipo B e C de diferentes marcas comercializadas no estado do Paraná, por ensaio imunoenzimático (ELISA), Oliveira et al. (2007) encontraram 2,5 % de amostras positivas, sendo duas de leite tipo B e duas do tipo C.

Nero et al. (2007), ao investigarem resíduos de antimicrobianos pelo Kit Charm-test em 210 amostras de leite cru coletadas em quatro regiões leiteiras no Brasil (47-Viçosa, MG; 50-Pelotas, RS; 63-Londrina, PR; 4-Botucatu, SP), encontraram resíduos de antimicrobianos em 24 amostras analisadas (11,4%). Destas, 13 foram observadas em amostras de Londrina, quatro em Botucatu, quatro em Viçosa e três em Pelotas.

Ao avaliar 136 amostras de leite cru provenientes da região metropolitana de Belo Horizonte (MG) pelo método de inibição microbiana COPAN ATR & Single Microplate, Tenório (2009) observou 24,26% de amostras positivas para resíduos de antimicrobianos.

Morais et al. (2009) avaliaram 57 amostras de leite pasteurizado (16 de leite tipo B e 41 de leite tipo C) provenientes do Rio de Janeiro (49), de Minas Gerais (sete) e do Espírito Santo (uma) utilizando os kits SNAP BL[®], SNAP TET[®] e o kit RIDASCREEN[®]. Os autores observaram que das 57 amostras analisadas de leite pasteurizado dos tipos B e C, 25 apresentavam resíduos de tetraciclinas (44%), dois de beta-lactâmicos (3,5%), quatro de estreptomicina/diidroestreptomicina (7%) e seis de tetraciclinas e beta-lactâmicos

(10,5%). Com relação à procedência do leite pasteurizado analisado, a presença dos três grupos de drogas veterinárias avaliados foi detectada em cinco amostras provenientes do estado de Minas Gerais (71%) e em 32 provenientes do Rio de Janeiro (65%). Na única amostra procedente do estado do Espírito Santo, nenhuma das substâncias estudadas foi detectada.

Ao avaliarem 100 amostras de leite UAT de dez marcas provenientes de diferentes unidades industriais nos estados de Minas Gerais, Rio de Janeiro, Goiás, São Paulo, Rio Grande do Sul, Fonseca et al. (2009), observaram 4% de resultados positivos para resíduos de antimicrobianos.

O efeito de altos teores de proteína e gordura do leite sobre a especificidade dos vários testes de triagem de resíduos de antimicrobianos (kits Delvotest SP, Penzyme, CITE Snap, Cowside) foi avaliado por Andrew (2000). Utilizou-se leite de 60 vacas da raça Jersey e 30 da raça Holandesa de cinco rebanhos não tratados por pelo menos 30 dias da Universidade de Connecticut e de quatro rebanhos comerciais em Connecticut. Os teores de gordura e de proteína variaram segundo a raça, sendo maiores para vacas da raça Jersey. A CCS média foi de 148.000 céls./mL e não diferiu no leite das diferentes raças. A taxa de especificidade foi maior do que 90,0% para três dos quatro testes de triagem. Entre raças, houve maior probabilidade de resultado falso-positivo para o teste Penzyme, com aumento de proteína do leite e diminuição da CCS. O maior teor de gordura do leite foi associado com uma maior probabilidade de resultados falso-positivos para o Snap CITE. Não houve associação ($P > 0,10$) entre mastite clínica e resultado dos testes para todos os antimicrobianos analisados. No entanto, considerando-se todos os testes avaliados, a especificidade foi menor quando o leite de vacas Jersey. Isto sugere que o leite com altos teores de proteína e gordura podem apresentar maior taxa de resultados falso-positivos em determinados testes para detecção de resíduos de antimicrobianos.

Na região de Castilla-La Mancha (Espanha), Yamaki et al. (2004) avaliaram 2686 amostras de leite de cabras de 490 propriedades pelo Kit Delvotest e observaram 1,7% de amostras positivas e 2,1% de amostras suspeitas. Nas amostras positivas ou suspeitas, realizou-se tratamento térmico do leite a 82 °C para eliminar inibidores naturais do leite. Após este tratamento, 1,3% e 0,4% das amostras iniciais permaneceram positivas e suspeitas, respectivamente.

Sierra et al. (2009) testaram os kits BRT AIM, Delvotest, Eclipse 100 e Copan utilizando leite isento de resíduos de 30 cabras e 20 bases de antimicrobianos dos grupos aminoglicosídeos, macrolídeos, tetraciclina, sulfonamidas e quinolonas. Testaram-se oito concentrações com 18 repetições/concentração. O coeficiente de concordância foi superior a 98% para maioria dos antimicrobianos, exceto para sulfanilamida (66,7% para BRT AIM), quinolonas (75 a 100% para todos os testes), algumas tetraciclina (8 a 10% de concordância utilizando o kit Delvotest e BRT AIM). Nenhum dos quatro kits atendeu os critérios estabelecidos como ideais para testes de triagem por International Dairy Federation. O Delvotest, no entanto, apresentou os melhores resultados. Somente os kits Copan e Delvotest foram capazes de detectar três antimicrobianos (neomicina, tilosina e sulfadimetoxina) abaixo do limite de detecção.

Tan et al. (2009) realizaram estudo para investigar a persistência de gentamicina em leite após tratamento intramamário em 34 vacas holandesas com mastite de terceira ou quarta lactação de um rebanho da China. Os animais foram tratados com sulfato de gentamicina e as amostras de leite submetidas à detecção de resíduos pelo teste de inibição microbiana que utiliza o cloreto de trifeniltetrazolium (TTC). Os resultados encontrados variaram de acordo com a dose (0,3 a 0,8 g/dose) e número de infusão (duas a seis) e mostraram que a persistência de resíduos tende a aumentar quando o tratamento com a mesma dosagem é prolongado.

2.5.3 Período de carência dos principais medicamentos veterinários para uso em vacas leiteiras

Em circunstâncias normais, as vacas tratadas devem ser ordenhadas separadamente por período determinado. Normalmente, esse período de isolamento é de quatro a cinco dias, podendo variar de

acordo com o tipo e dosagem do antimicrobiano usado no tratamento (Quadro 2). Se esse período não for respeitado, os produtores correm alto risco de os resíduos dos antimicrobianos contaminarem o leite. As punições são graves para resultados positivos de contaminação do leite por antimicrobianos (Fernandes, 2008).

Quadro2. Duração mínima de eliminação no leite de alguns antimicrobianos muito usados na atividade leiteira

Antimicrobiano (via intramamária)	Período mínimo de eliminação (dias)
Penicilina (Procaína)	2
Clortetraciclina	6
Oxitetraciclina	4
Estreptomicina	4

Fonte: Spinosa (2002)

2.5.4 Métodos rápidos de detecção de resíduos de antimicrobianos em leite

Grande parte dos testes disponíveis comercialmente no mercado é qualitativo, sendo, portanto, classificados como testes de triagem. Os testes de triagem podem ser classificados como aqueles que permitem com precisão, indicar se uma substância está ou não em concentrações acima do limite de segurança (Santos, 2003).

Existem diversos métodos de detecção desses resíduos de antimicrobianos disponíveis (Quadro 3) para serem utilizados pelas indústrias de laticínios, pois a legislação determina que essa pesquisa seja feita no leite antes de o mesmo ser beneficiado. Dentre esses métodos, os de inibição microbiana são amplamente utilizados por sua praticidade e facilidade de manipulação. No entanto, os mesmos não devem ser utilizados como pesquisa rápida, pois demandam cerca de duas a quatro horas para que seu resultado possa ser observado (Tenório, 2009).

Quadro 3. Testes disponíveis para pesquisa de resíduos de antimicrobianos em leite e o princípio em que se baseiam

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 ⁷ , Copan ATK P & S Single ⁷ Valio T101 test
Receptor	Charm Cowside Test ² Charm I Test, Charm II Test ² Charm MRL BL/TET ²
Ligação à proteína	CITE Probe (β-lactâmico)
ELISA	CITE Probe (Tetraciclina) ⁴ CITE Probe® Gentamicina ⁴ CITE CITE® Sulfa-trio (sulfametazina, sulfatiazol, sulfametazina) ⁴ EZ-Screen Lactek (Beta-lactâmicos); Lactek (sulfametazina); Lactek (Gentamicina) ⁵ Signal (gentamicina); Signal (sulfametazina); Signal (neomicina) ⁵
Enzima	Penzyme ® ⁶ Snap™ (Beta-lactâmicos) ⁸ Snap™ (Tetraciclina) ⁸ Método de bioluminescência (ATP) ⁹
Aglutinação em látex	“Spot” test

Fonte: Adaptado de Cullor (1992), Tenório (2005)

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

⁴CITE Probe® - IDEXX Laboratories Inc., Portland, Maine, USA

⁵Lactek – Idetek, Inc.; Sunnyvale, California, USA

⁶Penzyme® - UCB-Bioproducts S. A., Chemin du Foriest, Belgium

⁷Copan ATK P e S Microplate e Single - Copan Itália

⁸Snap - IDEXX Laboratories, Inc., Portland, Maine, USA

⁹ Método de bioluminescência (ATP) - Biosys S.A., Compiègne, France.

O PAMVet adotou como estratégia a realização de testes de triagem. Nos casos de detecção de presença de resíduos de antimicrobianos (beta-lactâmicos, tetraciclina, cloranfenicol, estreptomicina, diidroestreptomicina e neomicina) pelos testes Snap beta-lactâmicos e Snap tetraciclina, as amostras eram submetidas a testes de quantificação (ELISA e CLAE/RF/UV) em 2009. A utilização de testes de triagem, embora exija confirmação por outros métodos em caso de resultado positivo, é uma alternativa eficiente, pois reduz significativamente o custo e agiliza as análises (Programa..., 2009).

Para detectar a presença de resíduos de antimicrobianos, muitos métodos têm sido usados, como os de inibição microbiológica, os imunológicos, os imunoenzimáticos, a cromatografia gasosa, a cromatografia em camada delgada e a cromatografia líquida de alta pressão (Kang; Kondo, 2001). Entre os diferentes métodos disponíveis comercialmente, destacam-se os imunoenzimáticos.

2.5.4.1 Métodos Imunoenzimáticos

2.5.4.1.1 Método SNAP

Os testes qualitativos (SNAP Beta-lactâmicos e SNAP Tetraciclina) detectam substâncias inibitórias no leite por reação imunoenzimática, com alteração na intensidade da cor no círculo de ativação da amostra e do controle, de azul escuro em ambos os orifícios (Teste negativo) a azul claro ou ausência de coloração no círculo teste (teste positivo). A detecção destes resíduos de antimicrobianos no leite é rápida e tem como objetivo, atender aos requisitos do FDA - USA, LMR-Codex Alimentarius, Ministério da Saúde e Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (BR) (Rugged..., 2009).

No teste imunoenzimático Snap, o antimicrobiano é capturado por uma proteína conjugada com receptor específico em um suporte sólido absorvente localizado em uma unidade plástica moldada que permite detectar no leite resíduos de tetraciclina, clortetraciclina, oxitetraciclina e penicilina G, amoxicilina, ampicilina, ceftiofur, cefapirina. A presença de resíduos

na amostra resulta em um *spot* colorido que é comparado com *spot-controle* de concentração conhecida. O teste apresenta resultado em um tempo total de dez minutos por amostra, o resultado pode ser fornecido visualmente, pela comparação da cor no *spot* ou utilizar leitora. (New..., 2009; SNAP..., 2009).

2.5.4.1.2 Método CHARM

De acordo com o manual do fabricante, o Kit Charm utiliza um receptor específico com afinidade às drogas beta-lactâmicas/tetraciclinas que são covalentemente ligados a partículas de ouro visíveis. Eles são pulverizados sobre um suporte sólido (membrana do dispositivo de teste) e tornam-se móveis quando são reidratados com a amostra de leite. O complexo formado (leite + receptor) escorre pela membrana lateralmente e na presença de resíduo de antimicrobianos na amostra, este se liga ao receptor. Ao passar por uma cavidade fixa contendo um conjugado, a quantidade de receptor disponível será menor, formando uma linha vermelha de menor intensidade de cor (linha Teste BL e/ou TE). Se a quantidade de resíduo for muito elevada, poderá não haver aparecimento da cor vermelha da(s) linha(s) BL e/ou TE. O receptor que ainda não reagiu continua a escorrer pelo dispositivo e passa pela última cavidade fixa, contendo anticorpos anti-receptores formando sempre uma linha vermelha visível (linha Controle C). Se a(s) linha(s) BL e/ou TE formadas for (em) mais clara do que a linha C, a amostra é considerada positiva, pois parte do receptor reagiu com o antibiótico anteriormente. Se a linha T formada for mais escura do que a(s) linha(s) BL e/ou TE, ou da mesma intensidade de cor, a amostra é considerada negativa, pois não houve reação do receptor com o resíduo

3 HIPÓTESES

Os kits imunoenzimáticos SNAP Beta-lactâmicos, SNAP Tetraciclinas e CHARM MRL BL/TET detectam diferentes antimicrobianos em concentrações abaixo

dos limites legais estabelecidos pela legislação brasileira (IN 42);

Os kits imunoenzimáticos SNAP Beta-lactâmicos, SNAP Tetraciclinas e CHARM MRL BL/TET detectam diferentes antimicrobianos no leite de forma similar;

A leitura visual de resíduos de antimicrobianos no leite difere da realizada pela leitora quando se utilizam os kits imunoenzimáticos SNAP Beta-lactâmicos, SNAP Tetraciclinas e CHARM MRL BL/TET.

4 OBJETIVOS

Avaliar a eficiência, a especificidade e a sensibilidade dos kits SNAP Beta-lactâmicos, SNAP Tetraciclinas e CHARM MRL BL/TET na detecção de resíduos de antimicrobianos em leite inoculado experimentalmente com diferentes concentrações de seis grupos de antimicrobianos;

Verificar possíveis interferentes que poderiam originar resultados falso-positivos de resíduos de antimicrobianos no leite utilizando-se os kits SNAP Beta-lactâmicos, SNAP Tetraciclinas e CHARM MRL BL/TET;

5 MATERIAL E MÉTODOS

Os procedimentos de avaliação dos Kits **SNAP¹** Tetraciclinas, SNAP Beta-lactâmicos e CHARM MRL BL/TET² foram realizados de acordo com as recomendações prescritas na Guia para validação de métodos EURACHEM (1998).

As análises, realizadas no período de julho a setembro de 2009, seguiram criteriosamente as recomendações e cuidados do fabricante, descritos no manual de instruções dos respectivos Kits.

Todos os procedimentos foram realizados em capela de fluxo laminar sob condições assépticas, utilizando material esterilizado, no Laboratório de Microbiologia de alimentos do Departamento de Tecnologia e

Inspeção de Produtos de Origem Animal da Escola de Veterinária da UFMG em Belo Horizonte - MG.

Utilizaram-se soluções-padrão preparadas com os 21 antimicrobianos (beta-lactâmicos: penicilina G, ampicilina, dicloxacilina, amoxicilina, cloxacilina, oxacilina, cefazolina, cefapirina, cefalexina, cefquinona, ceftiofur; tetraciclina: clortetraciclina, oxitetraciclina e tetraciclina; sulfonamidas: sulfadiazina; macrolídeos: eritromicina e tilosina; aminoglicosídeos: gentamicina, neomicina e sulfato de estreptomicina; outro: trimetoprim) que foram adicionadas em amostra de leite isento de resíduos de antimicrobianos, em diferentes concentrações. As soluções-padrão (SP2) utilizadas na adição das amostras foram preparadas em solvente compatível com o kit, seguindo recomendações descritas internacionalmente (Guidance..., 1999).

O preparo das amostras (solução de trabalho) consistiu na inoculação de soluções-padrão dos analitos pesquisados em uma amostra branca da matriz (amostra de leite isento de resíduos de antimicrobianos). 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 (Instrução Normativa nº42/1999/MAPA), conforme Brasil (1999b) ou por órgãos internacionais como a OMS, UE e o *Codex Alimentarius* quando a legislação brasileira

não estabelece os limites para determinada droga.

Os testes foram analisados em quatro níveis de concentração diferentes nos antimicrobianos dos grupos: beta-lactâmicos, tetraciclina, sulfonamidas, macrolídeos, aminoglicosídeos e outro (Quadros 4, 5 e 6), com 30 repetições de cada nível, sendo:

- O primeiro nível de adição equivalente à metade do limite de detecção declarado pelo fabricante (N1);
- O segundo nível de adição equivalente ao limite máximo de resíduos estabelecido pela legislação brasileira (N2);
- O terceiro nível de adição equivalente ao limite de detecção declarado pelo fabricante (N3);
- O quarto nível de adição equivalente ao dobro do limite de detecção declarado pelo fabricante (N4).

A realização do teste foi feita seguindo recomendações do fabricante. Para aqueles antimicrobianos que não possuíam limites de detecção declarado pelo fabricante foram realizados somente o nível 2 (limite de detecção declarado pela legislação brasileira ou equivalente).

Quadro 4. Níveis de concentração dos antimicrobianos expressos em ppb avaliados pelo Kit SNAP Tetraciclina em leite

Nível de concentração	Concentração do antimicrobiano (ppb)																				
	Penicilina	S.estreptomomicina	Sulfadiazina	Eritromicina	Neomicina	Gentamicina	Tilosina	Trimetoprim	Tetraciclina	Oxitetraciclina	Clortetraciclina	Cefalexina	Cefazolina	Cefquinona	Amoxicilina	Ampicilina	Oxacilina	Dicloxacilina sódica	Cloxacilina	Ceftiofur	Cefapirina
Nível 1	-	-	-	-	-	-	-	-	25	25	50	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Nível 2	4	200	10	40	500	200	50	50	100	100	100	100	50	20	4	4	30	30	30	100	20
Nível 3	-	-	-	-	-	-	-	-	50	50	100	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Nível 4	-	-	-	-	-	-	-	-	100	100	200	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Quadro 5. Níveis de concentração dos antimicrobianos expressos em ppb avaliados pelo Kit SNAP Beta-lactâmicos em leite

Nível de concentração	Concentração do antimicrobiano (ppb)																				
	Penicilina	S.estreptomomicina	Sulfadiazina	Eritromicina	Neomicina	Gentamicina	Tilosina	Trimetoprim	Tetraciclina	Oxitetraciclina	Clortetraciclina	Cefalexina	Cefazolina	Cefquinona	Amoxicilina	Ampicilina	Oxacilina	Dicloxacilina sódica	Cloxacilina	Ceftiofur	Cefapirina
Nível 1	1,5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3,65	2,9	-	-	-	6	5,85
Nível 2	4	200	10	40	500	200	50	50	100	100	100	100	50	20	4	4	30	30	30	100	20
Nível 3	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	7,3	5,8	-	-	-	12	11,7
Nível 4	6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	14,6	11,6	-	-	-	24	23,4

Quadro 6. Níveis de concentração dos antimicrobianos expressos em ppb avaliados pelo Kit CHARM MRL BL/TET em leite

Nível de concentração	Concentração do antimicrobiano (ppb)																				
	Penicilina	S.estreptomomicina	Sulfadiazina	Eritromicina	Neomicina	Gentamicina	Tilosina	Trimetoprim	Tetraciclina	Oxitetraciclina	Clortetraciclina	Cefalexina	Cefazolina	Cefquinona	Amoxicilina	Ampicilina	Oxacilina	Dicloxacilina sódica	Cloxacilina	Ceftiofur	Cefapirina
Nível 1	1	-	-	-	-	-	-	-	10	25	25	7,5	4	7,5	1,25	1,25	-	10	12,5	10	2
Nível 2	4	200	10	40	500	200	50	50	100	100	100	100	50	20	4	4	30	30	30	100	20
Nível 3	2	-	-	-	-	-	-	-	20	50	50	15	8	15	2,5	2,5	-	20	25	20	4
Nível 4	4	-	-	-	-	-	-	-	40	100	100	30	16	30	5	5	-	40	50	40	8

5.1 Procedimentos utilizados

5.1.1 Obtenção da amostra de leite orgânico

A amostra de leite foi coletada na Fazenda Salvaterra Ltda., situada em Juiz de Fora – MG. O rebanho possui 36 (trinta e seis) vacas em lactação, sendo o grau de sangue predominante: $\frac{1}{2}$ e $\frac{3}{4}$ de sangue Holandês x Zebu. A produção média diária era de 230 litros.

A amostra foi refrigerada e posteriormente acondicionada em caixa isotérmica para o transportada até o Laboratório de Microbiologia de Alimentos do Departamento de Tecnologia e Inspeção de Produtos de Origem Animal da Escola de Veterinária da UFMG em Belo Horizonte – MG, onde foram retiradas alíquotas e enviadas ao Laboratório de Qualidade do Leite - UFMG, para realização das análises de CBT, utilizando-se Citometria de Fluxo pelo Equipamento Bactocount IBC 150 Bently Instruments, também CCS e composição por Absorção do comprimento de Onda no Infravermelho usando o equipamento Bently Combisystem 2300. Outra alíquota foi devidamente preparada e enviada para Charm Sciences Inc. Lawrence, MA, USA para pesquisa quantitativa de resíduos utilizando o método Charm II[®] Quantitative Test. Os frascos contendo o leite foram acondicionados sob refrigeração para posterior uso.

5.2 Preparo das soluções

As soluções-padrão e solução de trabalho foram preparadas utilizando os analitos a serem pesquisados e solventes compatíveis, mantendo o mesmo padrão de homogeneização para todos os antimicrobianos. As amostras de leite foram homogeneizadas por inversão, 25 vezes antes de retirada a alíquota (APHA, 1992). As soluções padrão 1 (SP1) foram transferidas para tubos de ensaio estéreis, previamente identificados e homogeneizados por movimentos de inversão, dez vezes e posteriormente agitados em agitador PHOENIX AP56 por 30 segundos. As soluções padrão 2 (SP2)

foram agitadas por 30 segundos em agitador e as soluções de trabalho foram invertidas no tubo, 25 vezes antes da transferência para os kits. As soluções de trabalho eram agitadas imediatamente antes da realização de cada teste.

5.3 Controles analíticos

No decorrer de todo experimento foram realizados controles periódicos da temperatura dos blocos aquecedores, leitura do padrão que acompanha o kit, análise de amostras de leite isento de resíduos de antimicrobianos (branco) e determinação da acidez titulável (°D) do leite utilizado (Brasil, 1981), além da análise quantitativa de resíduos de antimicrobianos pelo Kit Charm II[®] quantitative test.

5.4 Kits SNAP Beta-lactâmicos e SNAP Tetraciclina

Aproximadamente 15 minutos antes da realização do teste, o bloco aquecedor que acompanha o Kit, foi ligado e mantido a $45 \pm 5^\circ\text{C}$. Depois de identificadas, preparadas e homogeneizadas as concentrações, 440 μL de cada diluição contendo as diferentes concentrações de antimicrobianos foram transferidos, com auxílio da pipeta que acompanha o teste, para um tubo contendo reagente, homogeneizado e aquecidos por 5 ± 1 min., juntamente com o dispositivo de análise, até o aparecimento da coloração azul escuro no círculo. Decorrido este tempo, as amostras foram vertidas e mantidas no orifício do dispositivo até que chegassem ao círculo de ativação, o que deveria ocorrer em até um minuto. Posteriormente foi acionado o ponto de ativação e a amostra foi incubada por quatro minutos. Decorrido este tempo, a leitura foi feita visualmente observando-se a presença ou não de alteração na coloração (azul claro – positivo ou azul escuro - negativo) e na leitora. No decorrer do experimento foram realizados também leitura do padrão que acompanha o kit e testes controle, com amostras de leite isento de resíduos.

5.5 Kit CHARM MRL BL/TET

Antes de iniciar o teste, foi ligada a chapa aquecedora de bancada e regulada a temperatura do bloco de ferro em $56 \pm 2^\circ\text{C}$. Após preparada e identificada, a solução foi bem homogeneizada. Abriu-se o *strip test* levantando o adesivo plástico até a linha indicada pela seta. Foram pipetados 300 μl da solução com a micropipeta que acompanha o kit e transferidos para o teste, lentamente e nas laterais da cavidade e nunca sobre a fita branca. Fechou-se o adesivo, colocando a tampa e apertando o botão “P” da chapa, ativando o tempo de oito minutos. Após soar o alarme, retirou-se *strip test* da chapa e foi avaliada visualmente a formação de três linhas de tons vermelhos: C (linha Controle); BL (linha teste beta-lactâmicos) e; TE (linha teste tetraciclinas).

Após esta avaliação foi ligado o leitor, inserido o teste no dispositivo de leitura até o final, e após aproximadamente cinco segundos, o resultado foi fornecido. No

decorrer do experimento foram realizados também leitura do padrão que acompanha o kit e testes controle, com amostras de leite isento de resíduos.

6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As respostas obtidas neste experimento foram submetidas à análise estatística descritiva (Sampaio, 2002) e não paramétrica, utilizando-se o teste de MacNemar (Siegel, 1975).

7 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A tabela 2 mostra os resultados médios das análises de contagem de células somáticas (CCS), contagem bacteriana total (CBT) e composição do leite realizadas no Laboratório de Análise da Qualidade do Leite da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais (LabUFMG).

Tabela 2. Média dos resultados das análises da qualidade do leite orgânico obtido da Fazenda Salvaterra

Coleta	CBT (UFC/mL)	CCS Cels./mL	Gordura	Proteína	Sólidos	Lactose
23/06/2009	41.000	377.000	3,48	3,08	12,08	4,57
30/06/2009	702.000	514.000	3,54	3,19	12,20	4,55
23/09/2009	177.000	1.293.000	2,4	3,22	10,71	4,50

A qualidade do leite utilizado nas diferentes datas variou, mas resíduos de antimicrobianos não foram detectados pelo Charm II[®] quantitative test (Anexo 1) realizado no laboratório da Charm Sciences Inc. Lawrence, MA.USA.

Ressalta-se que é importante avaliar a composição do leite. Pois, uma amostra com elevado percentual de gordura pode interferir de forma negativa na realização do teste com demora do “carreamento” da amostra até o ponto de ativação do teste.

Os valores da temperatura variaram de 44 a 47 °C no bloco aquecedor para o Kit SNAP e de 55 a 57 °C para o kit CHARM, estando, portanto, de acordo com valores estabelecidos pelas respectivas empresas de $45 \pm 5^\circ\text{C}$ e $56 \pm 2^\circ\text{C}$. As leituras do padrão (controle negativo que acompanha o kit) e dos brancos (amostra de leite sem resíduo) apresentaram resultados negativos em todos os dias analisados (Quadro 7). Nas amostras de leite, os valores de acidez (°D) variaram de 14,35 a 16,56 (Tabela 3), não extrapolando os valores estabelecidos pela Instrução nº 51, segundo Brasil (2002).

Quadro 7. Valores médios de temperatura dos blocos e resultados da leitura de padrão e branco por kit empregado e dia analisado

Temperatura média dos blocos e resultados do padrão e branco												
Dia	SNAP							CHARM				
	Temperatura (°C)					Controles		Temperatura (°C)			Controles	
	B1	B2	B3	B4	B5	Padrão	Branco	B1	B2	B3	Padrão	Branco
24/06	46	45	46	-	-	Negativo	Negativo	55	56	55	Negativo	Negativo
25/06	45	45	45	47	-	Negativo	Negativo	55	55	55	Negativo	Negativo
26/06	45	45	45	45	-	Negativo	Negativo	55	55	55	Negativo	Negativo
30/06	45	45	44	45	46	Negativo	Negativo	55	55,5	56	Negativo	Negativo
01/07	44	45	45	46	45	Negativo	Negativo	56	55	55	Negativo	Negativo
02/07	45	46	45	45	45	Negativo	Negativo	56	55	55	Negativo	Negativo
03/07	45	45	45	45	45	Negativo	Negativo	55	55	55	Negativo	Negativo
23/09	46	46	44	45	44	Negativo	Negativo	56	55,5	56	Negativo	Negativo
24/09	46	46	44	45	44,5	Negativo	Negativo	55	55	56	Negativo	Negativo
25/09	46	45	45	-	-	Negativo	Negativo	-	-	-	-	-
30/09	44	45	45	-	-	Negativo	Negativo	56	57	-	Negativo	Negativo

B = bloco

Tabela 3. Valores médios de acidez titulável do leite utilizado no preparo da solução de trabalho

Período	Acidez titulável média (°D)	
	Inicial	Final
24/06 a 26/06	14,51	16,47
30/06 a 03/07	14,35	16,37
23/09 a 30/09	15,45	16,56

De modo geral, os kits utilizados não apresentaram problemas durante a realização dos testes e as amostras padrão e a temperatura do bloco aquecedor mantiveram-se conformes de acordo com a recomendação do fabricante. Da mesma forma, os resultados observados para o leite sem resíduos de antimicrobianos (branco) e acidez titulável apresentaram resultados coerentes. Ressalta-se que isto é importante e deve ser monitorado pelas empresas durante todos os ensaios analíticos para detecção de resíduos.

Das 21 bases de antimicrobianos dos diferentes grupos (**beta-lactâmicos**: penicilina G, oxacilina, dicloxacilina, amoxicilina, ampicilina, cloxacilina, cefazolina, cefapirina, cefalexina, cefquinona, ceftiofur; **tetraciclina**: tetraciclina, clortetraciclina e oxitetraciclina; **sulfonamidas**: sulfadiazina; **macrolídeos**: eritromicina e tilosina; **aminoglicosídeos**: neomicina, gentamicina e sulfato de estreptomicina; **outro**: trimetoprim), avaliadas pelos Kits SNAP Beta-lactâmicos, SNAP Tetraciclina e CHARM MRL BL/TET, levando-se em consideração os níveis de concentração, discrepâncias não foram observadas quanto à recomendação do fabricante (N3). Ambos

os kits detectaram também a presença dos resíduos de antimicrobianos nas concentrações do LMR (N2) e alguns em baixas concentrações (N1), que corresponde à metade do valor declarado pelo fabricante (Quadros 8 a 14).

O kit Snap Tetraciclina detectou, com elevado percentual, amostras contendo resíduos de drogas do grupo de tetraciclina (Quadro 8). O percentual de detecção de tetraciclina, oxitetraciclina e clortetraciclina no nível 2 (equivalente ao LMR) variou de 90 a 100%, o que indica a capacidade do kit de detectar resíduos deste grupo no limite que é estabelecido pela legislação brasileira. Os outros antimicrobianos avaliados não foram detectados, demonstrando elevada especificidade do método (Quadro 9).

De acordo com Tolrá e Reig (2006), a técnica imunoenzimática é amplamente utilizada e entre suas principais vantagens, destacam-se: a facilidade de execução, alta sensibilidade e especificidade, disponibilidade de kits compreendendo um bom número de compostos específicos, realização de várias análises em curto período de tempo. Porém, as desvantagens são o curto período de validade do kit e possibilidade de resultados falso-positivos.

Quadro 8. Detecção de tetraciclinas no leite pelo Kit SNAP Tetraciclinas e comparação da leitura visual com a leitora e do branco com cada nível de concentração testada

ANTIMICROBIANO*	NÍVEL	ppb	POSITIVO		NEGATIVO		RESULTADO (Branco** x nível)	RESULTADO (Leitora x visual)
			Nº	%	Nº	%		
Tetraciclinas								
Tetraciclina	N1	25	2	6,7	28	93,3	P > 0,05	P > 0,05
	N2	100	30	100	0	0	P < 0,05	P > 0,05
	N3	50	29	96,6	1	3,4	P < 0,05	P > 0,05
	N4	100	30	100	0	0	P < 0,05	P > 0,05
Oxitetraciclina	N1	25	10	33,3	20	66,7	P > 0,05	P > 0,05
	N2	100	30	100	0	0	P < 0,05	P > 0,05
	N3	50	30	100	0	0	P < 0,05	P > 0,05
	N4	100	30	100	0	0	P < 0,05	P > 0,05
Clortetraciclina	N1	50	0	0	30	100	P > 0,05	P > 0,05
	N2	100	27	90	3	10	P < 0,05	P > 0,05
	N3	100	27	90	3	10	P < 0,05	P > 0,05
	N4	200	30	100	0	0	P < 0,05	P > 0,05

*Declarado pelo fabricante do Kit SNAP Tetraciclinas

**Leite isento de antimicrobianos

Quadro 9. Detecção de diferentes antimicrobianos no leite pelo Kit SNAP Tetraciclinas e comparação da leitura visual com a leitora e do branco com cada nível de concentração testada

ANTIMICROBIANO*	NÍVEL	ppb	POSITIVO		NEGATIVO		RESULTADO (Branco** x nível)	RESULTADO (Leitora x visual)
			Nº	%	Nº	%		
Beta-lactâmicos								
Penicilina G	N2	4	0	0	30	100	P > 0,05	P > 0,05
Oxacilina	N2	30	0	0	30	100	P > 0,05	P > 0,05
Dicloxacilina sódica	N2	30	0	0	30	100	P > 0,05	P > 0,05
Amoxicilina	N2	4	0	0	30	100	P > 0,05	P > 0,05
Ampicilina	N2	4	0	0	30	100	P > 0,05	P > 0,05
Cloxacilina	N2	30	0	0	30	100	P > 0,05	P > 0,05
Cefazolina	N2	50	0	0	30	100	P > 0,05	P > 0,05
Cefapirina	N2	20	0	0	30	100	P > 0,05	P > 0,05
Cefalexina	N2	100	0	0	30	100	P > 0,05	P > 0,05
Cefiquinona	N2	20	0	0	30	100	P > 0,05	P > 0,05
Ceftiofur	N2	100	0	0	30	100	P > 0,05	P > 0,05
Aminoglicosídeos								
Neomicina	N2	500	0	0	30	100	P > 0,05	P > 0,05
Gentamicina	N2	200	0	0	30	100	P > 0,05	P > 0,05
Sulf. de estreptomicina	N2	200	0	0	30	100	P > 0,05	P > 0,05
Macrolídeos								
Eritromicina	N2	40	0	0	30	100	P > 0,05	P > 0,05
Tilosina	N2	50	0	0	30	100	P > 0,05	P > 0,05
Sulfonamidas								
Sulfadiazina	N2	10	0	0	30	100	P > 0,05	P > 0,05
Outro								
Trimetoprim	N2	50	0	0	30	100	P > 0,05	P > 0,05

*Não declarado pelo fabricante do Kit SNAP Tetraciclinas

**Leite isento de antimicrobianos

Quando se compararam os resultados pela leitura visual com os da leitora, diferenças estatísticas não foram observadas ($P > 0,05$), tanto para o kit Snap Tetraciclinas quanto para o kit Snap Beta-lactâmicos e Charm MRL BL/TET. No entanto, o uso da leitora é recomendado em virtude da sutileza na intensidade de coloração nos testes e do percentual de resultados em desacordo conforme Tabelas 5, 6 e 7.

Embora não tenham ocorrido diferenças estatísticas, é recomendado o uso da leitora, pelo fato de uma amostra com percentual de resíduos próximo ao limite de detecção, poder gerar dúvidas pela intensidade de coloração, gerando resultados equivocados, o que pode levar a perdas econômicas para o produtor e/ou indústria. Uma única amostra em desacordo pode gerar problemas por falhas na leitura do resultado e comprometer a qualidade do leite por

risco de veiculação de resíduos ou por originar resultado falso positivo.

Com relação à maior discrepância observada no percentual de resultados em desacordo entre leitura visual e leitura na leitora para o kit Charm MRL BL/TET, ou seja, quando o resultado foi positivo visualmente e negativo na leitora, a variação chegou a 20% para tetraciclina e 23,3% para cefalexina no nível 3. Já o percentual negativo visualmente enquanto na leitora foi positivo chegou a 10% para cefapirina e cefalexina no nível 3 (Tabela 4). Ressalta-se mais uma vez a necessidade de uso da leitora na realização dos testes.

Para o kit Snap Tetraciclina, o percentual de positividade chegou a 10% para clortetraciclina nos níveis 2 e 3 (Tabela 5) e no kit Snap Beta-lactâmicos, 40% para ampicilina no nível 1 e 13,3% para cloxacilina no nível 2. Neste mesmo kit, a cefapirina apresentou 16,6% de resultados suspeitos (Tabela 6). Estes resultados confirmam a necessidade do uso da leitora, uma vez que não somente o produtor como também as indústrias podem ser oneradas pelo não pagamento, pelo descarte indevido do leite ou ainda pelo fato de a presença de resíduo de antimicrobiano interferir de forma negativa o equilíbrio entre os microorganismos, retardando o tempo de fermentação do leite.

Tabela 4. Percentual de resultados de leitura visual em desacordo com leitura na leitora kit Charm MRL BL/TET em amostras de leite inoculado com diferentes concentrações de antimicrobianos

Antimicrobiano	Nível 1			Nível 2			Nível 3			Nível 4		
	%			%			%			%		
	S	P	N	S	P	N	S	P	N	S	P	N
Penicilina G	-	20	23,3	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Oxacilina	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Dicloxacilina	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Amoxicilina	-	-	-	-	-	-	-	6,7	-	-	-	-
Ampicilina	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Cloxacilina	-	-	-	-	3,3	-	-	-	-	-	3,3	-
Cefazolina	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Cefapirina	-	-	16,6	-	-	-	-	16,6	10	-	-	-
Cefalexina	-	-	-	-	-	-	-	23,3	10	-	-	-
Cefquinona	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	13,3	-
Ceftiofur	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Neomicina	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Gentamicina	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Sulfato de estreptomicina	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Tetraciclina	-	-	-	-	-	-	-	20	-	-	-	-
Clortetraciclina	-	-	-	-	-	-	-	-	6,7	-	-	-
Oxitetraciclina	-	16,6	10	-	-	-	-	-	-	-	3,3	3,3
Eritromicina	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Tilosina	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Sulfadiazina	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Trimetoprim	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

S = suspeito, P = Positivo, N = Negativo

Tabela 5. Percentual de resultados de leitura visual em desacordo com leitura na leitora pelo kit Snap Tetraciclina em amostras de leite inoculado com diferentes concentrações de antimicrobianos

Antimicrobiano	Nível 1			Nível 2			Nível 3			Nível 4		
	%			%			%			%		
	S	P	N	S	P	N	S	P	N	S	P	N
Penicilina G	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Oxacilina	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Dicloxacilina	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Amoxicilina	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ampicilina	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Cloxacilina	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Cefazolina	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Cefapirina	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Cefalexina	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Cefquinona	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ceftiofur	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Neomicina	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Gentamicina	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Sulfato de estreptomicina	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Tetraciclina	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Clortetraciclina	-	-	-	-	10	-	-	10	-	-	-	-
Oxitetraciclina	-	6,6	3,3	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Eritromicina	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Tilosina	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Sulfadiazina	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Trimetoprim	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

S = suspeito, P = Positivo, N = Negativo

Tabela 6. Percentual de resultados de leitura visual em desacordo com leitura na leitora pelo kit Snap Beta-lactâmicos em amostras de leite inoculado com diferentes concentrações de antimicrobianos

Antimicrobiano	Nível 1			Nível 2			Nível 3			Nível 4		
	%			%			%			%		
	S	P	N	S	P	N	S	P	N	S	P	N
Penicilina G	3,3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Oxacilina	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Dicloxacilina	-	-	-	3,3	6,7	-	-	-	-	-	-	-
Amoxicilina	-	13,3	-	-	6,7	-	-	-	-	-	-	-
Ampicilina	-	40,0	-	-	3,3	-	-	-	-	-	-	-
Cloxacilina	-	-	-	6,7	13,3	-	-	-	-	-	-	-
Cefazolina	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Cefapirina	-	-	-	-	-	-	16,6	3,3	-	-	-	-
Cefalexina	-	-	-	3,3	-	-	-	-	-	-	-	-
Cefquinona	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ceftiofur	6,7	10,0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Neomicina	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Gentamicina	-	-	-	3,3	-	-	-	-	-	-	-	-
Sulfato de estreptomicina	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Tetraciclina	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Clortetraciclina	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Oxitetraciclina	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Eritromicina	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Tilosina	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Sulfadiazina	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Trimetoprim	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

S = suspeito, P = Positivo, N = Negativo

Avaliando-se os resultados de detecção de resíduos pelo kit Snap beta-lactâmicos, verificou-se também alta sensibilidade e especificidade do método (Quadros 10 e 11). Para os beta-lactâmicos, a sensibilidade variou de 93,3 a 100%. Deve-se destacar que para alguns antimicrobianos, concentrações equivalentes à metade (N1)

do que o fabricante declara (N3) foram detectadas em até 76,7% (ceftiofur).

O ceftiofur, segundo Programa... (2009), é um antimicrobiano de terceira geração de amplo espectro de ação incluindo as cepas produtoras de β -lactamase. É amplamente utilizado como medicamento veterinário em vacas no tratamento de doenças

respiratórias e mastite. O ceftiofur foi desenvolvido para uso exclusivo em medicina veterinária. Ele é rapidamente metabolizado formando vários metabólitos, sendo o principal deles o desfuroilceftiofur.

Isto preocupa, pois este antibiótico comercializado no Brasil tem apelo de descarte “zero”. Tal fato pode gerar problemas no campo, uma vez que a metade da concentração declarada pelo fabricante está sendo detectada em percentual elevado. Ressalta-se que a ocorrência de resultados falso-positivos indica a presença de altos níveis de antibióticos no leite de vacas não tratadas, ou que contém resíduos em concentrações abaixo dos níveis de tolerância. As conseqüências deste problema recaem principalmente sobre o produtor, acarretando perdas econômicas consideráveis devido ao descarte indevido de leite.

A cefapirina, no entanto, não foi detectada no nível 3 (nível declarado pelo fabricante), em percentual muito elevado (Quadro 10), o que pode representar um problema, por ser um antimicrobiano de uso comum nas propriedades leiteiras para tratamento da mastite clínica, conforme relatam Pol e Ruegg (2007) em trabalho desenvolvido para avaliar práticas de tratamento e quantificação de antimicrobianos e drogas ilícitas, de uso, em 20 propriedades leiteiras convencionais e 20 que produzem leite orgânico em Wisconsin (EUA). Neste trabalho os produtores convencionais relataram que a penicilina foi o composto de uso frequente em 18 (90%) das propriedades, para a terapia da vaca seca e cefapirina foi mais comumente utilizado para o tratamento da mastite clínica, também em dezoito estabelecimentos (90%).

Quadro 10. Detecção de diferentes antimicrobianos no leite pelo Kit SNAP Beta-lactâmicos e comparação da leitura visual com a leitora e do branco com cada nível de concentração testada

ANTIMICROBIANO*	NÍVEL	ppb	POSITIVO		NEGATIVO		RESULTADO (Branco** x nível)	RESULTADO (Leitora x visual)
			Nº	%	Nº	%		
Beta-lactâmicos								
Penicilina G	N1	1,5	3	10	27	90	P > 0,05	P > 0,05
	N2	4	30	100	0	0	P < 0,05	P > 0,05
	N3	3	30	100	0	0	P < 0,05	P > 0,05
	N4	6	30	100	0	0	P < 0,05	P > 0,05
Amoxicilina	N1	3,65	21	70,0	9	30	P < 0,05	P > 0,05
	N2	4	28	93,3	2	6,7	P < 0,05	P > 0,05
	N3	7,3	30	100	0	0	P < 0,05	P > 0,05
	N4	14,6	30	100	0	0	P < 0,05	P > 0,05
Ampicilina	N1	2,9	18	60	12	40	P < 0,05	P > 0,05
	N2	4	29	96,7	1	3,3	P < 0,05	P > 0,05
	N3	5,8	30	100	0	0	P < 0,05	P > 0,05
	N4	11,6	30	100	0	0	P < 0,05	P > 0,05
Ceftiofur	N1	6	23	76,7	7	23,3	P < 0,05	P > 0,05
	N2	100	30	100	0	0	P < 0,05	P > 0,05
	N3	12	30	100	0	0	P < 0,05	P > 0,05
	N4	24	30	100	0	0	P < 0,05	P > 0,05
Cefapirina	N1	5,85	0	0	30	100	P > 0,05	P > 0,05
	N2	20	30	100	0	0	P < 0,05	P > 0,05
	N3	11,7	17	56,7	13	43,3	P < 0,05	P > 0,05
	N4	23,4	30	100	0	0	P < 0,05	P > 0,05

*Antimicrobianos declarados pelo fabricante do Kit SNAP Beta-lactâmicos

**Leite isento de antimicrobianos

O kit apresentou eficiência também no nível 2, equivalente ao LMR (legislação brasileira), na pesquisa de antimicrobianos do grupo dos beta-lactâmicos no qual

apresentou 100% de positividade para cefazolina, 90% para dicloxacilina sódica e 66,7% para cloxacilina. No entanto, estes antimicrobianos não são declarados pelo fabricante (Quadro 11).

Quadro 11. Detecção de diferentes antimicrobianos no leite pelo Kit SNAP Beta-lactâmicos e comparação da leitura visual com a leitora e do branco com cada nível de concentração testada

ANTIMICROBIANO*	NÍVEL	ppb	POSITIVO		NEGATIVO		RESULTADO (Branco** x nível)	RESULTADO (Leitora x visual)
			Nº	%	Nº	%		
Beta-lactâmicos								
Cefazolina	N2	50	30	100	0	0	P < 0,05	P > 0,05
Cefalexina	N2	100	0	0	30	100	P > 0,05	P > 0,05
Cefiquinona	N2	20	7	23,3	23	76,7	P > 0,05	P > 0,05
Oxacilina	N2	30	0	0	30	100	P > 0,05	P > 0,05
Dicloxacilina sódica	N2	30	27	90	3	10	P < 0,05	P > 0,05
Cloxacilina	N2	30	20	66,7	10	33,3	P < 0,05	P > 0,05
Aminoglicosídeos								
Neomicina	N2	500	0	0	30	100	P > 0,05	P > 0,05
Gentamicina	N2	200	0	0	30	100	P > 0,05	P > 0,05
Sulfato de estreptomicina	N2	200	0	0	30	100	P > 0,05	P > 0,05
Tetraciclina								
Tetraciclina	N2	100	0	0	30	100	P > 0,05	P > 0,05
Oxitetraciclina	N2	100	0	0	30	100	P > 0,05	P > 0,05
Clortetraciclina	N2	100	0	0	30	100	P > 0,05	P > 0,05
Macrolídeos								
Eritromicina	N2	40	0	0	30	100	P > 0,05	P > 0,05
Tilosina	N2	50	0	0	30	100	P > 0,05	P > 0,05
Sulfonamidas								
Sulfadiazina	N2	10	0	0	30	100	P > 0,05	P > 0,05
Outro								
Trimetoprim	N2	50	0	0	30	100	P > 0,05	P > 0,05

*Não declarado pelo fabricante do Kit SNAP Tetraciclina

**Leite isento de antimicrobianos

Segundo relatos de Programa... (2009), a presença de resíduos de antibióticos beta-lactâmicos no leite é resultado da sua administração em rebanhos leiteiros para prevenção ou tratamento de enfermidades, geralmente para infecções da glândula mamária e doenças do trato reprodutivo. Os riscos à saúde do consumidor são representados por reações alérgicas e podem desencadear choque anafilático em indivíduos sensíveis a estas substâncias.

O kit duplo Charm MRL BL/TET, que tem um maior espectro de detecção, apresentou também elevada sensibilidade e especificidade. O percentual de detecção do nível 2 (N2), equivalente ao LMR (legislação brasileira), foi de 100% para

quase todos os antimicrobianos, exceto para cloxacilina (93,3%) (Quadros 12 e 13). Embora a oxacilina seja um beta-lactâmico, este antimicrobiano não foi detectado, confirmando as informações do fabricante (Quadro 14). Quanto ao ceftiofur, o kit detectou este antimicrobiano em 100% das amostras testadas, inclusive no nível N1, equivalente à metade da concentração declarada pelo fabricante. Isto mais uma vez é um problema, por ser este antibiótico, muito usado atualmente pelo apelo de descarte “zero”. Sobre a concentração declarada pelo fabricante (N3), o kit detectou a cefalexina em 23,3% e a cefapirina em 20,0%. Cefazolina não foi detectada no nível 3 (concentração declarada pelo fabricante) conforme o (Quadro12).

Quadro12. Detecção de diferentes beta-lactâmicos no leite pelo Kit Charm MRL BL/TET e comparação da leitura visual com a leitora e do branco com cada nível de concentração testada

ANTIMICROBIANO*	NÍVEL	ppb	POSITIVO		NEGATIVO		RESULTADO (Branco** x nível)	RESULTADO (Leitora x visual)
			Nº	%	Nº	%		
Beta-lactâmicos								
Penicilina G	N1	1	15	50	15	50	P < 0,05	P > 0,05
	N2	4	30	100	0	0	P < 0,05	P > 0,05
	N3	2	30	100	0	0	P < 0,05	P > 0,05
	N4	4	30	100	0	0	P < 0,05	P > 0,05
Dicloxacilina sódica	N1	10	0	0	30	100	P > 0,05	P > 0,05
	N2	30	30	100	0	0	P < 0,05	P > 0,05
	N3	20	28	93,3	2	6,7	P < 0,05	P > 0,05
	N4	40	30	100	0	0	P < 0,05	P > 0,05
Amoxicilina	N1	1,5	0	0	30	100	P > 0,05	P > 0,05
	N2	4	30	100	0	0	P < 0,05	P > 0,05
	N3	2,5	27	90	3	10	P < 0,05	P > 0,05
	N4	5	30	100	0	0	P < 0,05	P > 0,05
Ampicilina	N1	1,25	14	46,7	16	53,3	P < 0,05	P > 0,05
	N2	4	30	100	0	0	P < 0,05	P > 0,05
	N3	2,5	30	100	0	0	P < 0,05	P > 0,05
	N4	5	30	100	0	0	P < 0,05	P > 0,05
Cloxacilina	N1	12,5	0	0	30	100	P > 0,05	P > 0,05
	N2	30	28	93,3	2	6,7	P < 0,05	P > 0,05
	N3	25	1	3,4	29	96,6	P > 0,05	P > 0,05
	N4	50	28	93,3	2	6,7	P < 0,05	P > 0,05
Cefalexina	N1	7,5	0	0	30	100	P > 0,05	P > 0,05
	N2	100	30	100	0	0	P < 0,05	P > 0,05
	N3	15	7	23,3	23	76,7	P > 0,05	P > 0,05
	N4	30	30	100	0	0	P < 0,05	P > 0,05
Cefazolina	N1	4	0	0	30	100	P > 0,05	P > 0,05
	N2	50	30	100	0	0	P < 0,05	P > 0,05
	N3	8	0	0	30	100	P > 0,05	P > 0,05
	N4	16	26	86,7	4	13,3	P < 0,05	P > 0,05
Cefiquinona	N1	7,5	0	0	30	100	P > 0,05	P > 0,05
	N2	20	30	100	0	0	P < 0,05	P > 0,05
	N3	15	0	0	30	100	P > 0,05	P > 0,05
	N4	30	30	100	0	0	P < 0,05	P > 0,05
Ceftiofur	N1	10	30	100	0	0	P < 0,05	P > 0,05
	N2	100	30	100	0	0	P < 0,05	P > 0,05
	N3	20	30	100	0	0	P < 0,05	P > 0,05
	N4	40	30	100	0	0	P < 0,05	P > 0,05
Cefapirina	N1	2	8	26,7	22	73,3	P > 0,05	P ≤ 0,05
	N2	20	30	100	0	0	P < 0,05	P > 0,05
	N3	4	6	20	24	80	P > 0,05	P > 0,05
	N4	8	30	100	0	0	P < 0,05	P > 0,05

*Declarado pelo fabricante do Kit SNAP Tetracilinas

**Leite isento de antimicrobianos

Quadro 13. Detecção de diferentes tetracilinas no leite pelo Kit Charm MRL BL/TET e comparação da leitura visual com a leitora e do branco com cada nível de concentração testada

ANTIMICROBIANO*	NÍVEL	ppb	POSITIVO		NEGATIVO		RESULTADO (Branco** x nível)	RESULTADO (Leitora x visual)
			Nº	%	Nº	%		
Tetracilinas								
Tetracilina	N1	10	0	0	30	100	P > 0,05	P > 0,05
	N2	100	30	100	0	0	P < 0,05	P > 0,05
	N3	20	23	76,7	7	23,3	P < 0,05	P ≤ 0,05
	N4	40	30	100	0	0	P < 0,05	P > 0,05
Oxitetracilina	N1	25	1	93,3	29	6,7	P > 0,05	P > 0,05
	N2	100	30	100	0	0	P < 0,05	P > 0,05
	N3	50	30	100	0	0	P < 0,05	P > 0,05
	N4	100	30	100	0	0	P < 0,05	P > 0,05
Clortetracilina	N1	25	0	0	30	100	P > 0,05	P > 0,05
	N2	100	30	100	0	0	P < 0,05	P > 0,05
	N3	50	21	70	9	30	P < 0,05	P > 0,05
	N4	100	30	100	0	0	P < 0,05	P > 0,05

*Declarado pelo fabricante do Kit SNAP Tetracilinas

**Leite isento de antimicrobianos

Quadro 14. Detecção de diferentes antimicrobianos no leite pelo kit Charm MRL BL/TET e comparação da leitura visual com a leitora e do branco com cada nível de concentração testada

ANTIMICROBIANO*	NÍVEL	ppb	POSITIVO		NEGATIVO		RESULTADO (Branco** x nível)	RESULTADO (Leitora x visual)
			Nº	%	Nº	%		
Beta-lactâmicos								
Oxacilina	N2	30	0	0	30	100	P > 0,05	P > 0,05
Aminoglicosídeos								
Neomicina	N2	500	0	0	30	100	P > 0,05	P > 0,05
Gentamicina	N2	200	0	0	30	100	P > 0,05	P > 0,05
Sulfato de estreptomicina	N2	200	0	0	30	100	P > 0,05	P > 0,05
Macrolídeos								
Eritromicina	N2	40	0	0	30	100	P > 0,05	P > 0,05
Tilosina	N2	50	0	0	30	100	P > 0,05	P > 0,05
Sulfonamidas								
Sulfadiazina	N2	10	0	0	30	100	P > 0,05	P > 0,05
Outro								
Trimetoprim	N2	50	0	0	30	100	P > 0,05	P > 0,05

*Não declarado pelo fabricante do Kit SNAP Tetraciclinas

**Leite isento de antimicrobianos

Neste trabalho, procurou-se avaliar também se os kits detectavam resíduos de antimicrobianos não declarados pelos fabricantes. Os resultados observados, tanto para os kits Snap (versões beta-lactâmicos e tetraciclinas) e Charm duplo foram coerentes. Desta forma, o kit Snap Beta-lactâmico quando comparado com o kit Charm MRL BL/TET não detectou resíduos de tetraciclinas (Quadros 15 e 16). O mesmo ocorreu quando o Kit Snap Tetraciclinas foi usado para detectar beta-lactâmicos (Quadros 17 e 18). Isto é importante e demonstra que os testes têm elevada especificidade e são indicados para detecção destes resíduos.

De acordo com Brasil (1999b), é importante ressaltar que toda e qualquer metodologia analítica deve ser avaliada, seguindo os critérios relativos à especificidade, exatidão, precisão, limite de detecção, limite de quantificação, praticabilidade e aplicabilidade em condições normais de práticas laboratoriais.

Destaca-se a necessidade de desenvolvimentos de novos kits para pesquisa de outras classes de antimicrobianos, pois segundo Programa... (2009), alguns antimicrobianos usados na atividade leiteira como, por exemplo, os aminoglicosídeos podem ser ototóxicos e nefrotóxicos em humanos e outros mamíferos. A exposição excessiva à neomicina pode causar insuficiência renal e danos irreversíveis ao aparelho auditivo. Em relação à estreptomicina, bem como em

seu produto de redução, a diidroestreptomicina, o efeito tóxico ocorre principalmente no labirinto, podendo ainda levar à surdez. A eritromicina é um antibiótico pertencente ao grupo dos macrolídeos e além da resistência bacteriana provocada pela exposição contínua, a eritromicina está associada a problemas gastrintestinais graves e problemas auditivos. A maioria das sulfas apresenta meia-vida relativamente longa e representa problemas para a saúde humana, dentre os quais reações alérgicas ou tóxicas.

Ribeiro et al. (2009) avaliaram o perfil de sensibilidade microbiana, contagem de células somáticas e resíduos de antimicrobianos em leite bovino produzido em sistema de produção orgânico em quatro pequenas propriedades no interior de São Paulo (SP). Os antimicrobianos que apresentaram as maiores taxas de resistência frente aos isolados foram: penicilina (53,5%), ampicilina (41,6%) e neomicina (38,6%), sendo que a resistência a três ou mais fármacos foi encontrada em 39,6% dos isolados.

Outro ponto importante a ser considerado refere-se à detecção de resíduos no nível 2, ou seja, em concentração prevista na legislação brasileira (Instrução Normativa número 42). Verificou-se que apenas para alguns antimicrobianos (cefalexina, cefquinona e cloxacilina) houve diferença estatisticamente significativa. Quando foram considerados também o tipo de kit e a declaração do fabricante (N3),

comparando o kit Snap beta-lactâmico com Charm MRL BL/TET, houve diferença

estatisticamente significativa ($P < 0,05$) para a cefapirina (Quadro 15).

Quadro 15. Comparação entre os kits Snap Beta-lactâmicos e Charm MRL BL/TET na detecção de diferentes concentrações de antimicrobianos do grupo beta-lactâmicos em leite

Antimicrobiano/grupo	Nível	Kit Snap Beta-lactâmicos		Kit Charm MRL BL/TET		Resultados
		Positivo	Negativo	Positivo	Negativo	
Beta-lactâmicos: Penicilinas						
Penicilina G	N1	3	27	15	15	$P < 0,05$
Penicilina G	N2	30	0	30	0	$P > 0,05$
Penicilina G	N3	30	0	30	0	$P > 0,05$
Penicilina G	N4	30	0	30	0	$P > 0,05$
Oxacilina	N2	0	30	0	30	$P > 0,05$
Dicloxacilina sódica	N2	27	3	30	0	$P > 0,05$
Cloxacilina	N2	20	10	28	2	$P < 0,05$
Amoxicilina	N1	21	9	0	30	$P < 0,05$
Amoxicilina	N2	28	2	30	0	$P > 0,05$
Amoxicilina	N3	30	0	27	3	$P > 0,05$
Amoxicilina	N4	30	0	30	0	$P > 0,05$
Ampicilina	N1	18	12	14	16	$P > 0,05$
Ampicilina	N2	29	1	30	0	$P > 0,05$
Ampicilina	N3	30	0	30	0	$P > 0,05$
Ampicilina	N4	30	0	30	0	$P > 0,05$
Beta-lactâmicos: Cefalosporinas						
Cefalexina	N2	0	30	30	0	$P < 0,05$
Cefazolina	N2	30	0	30	0	$P > 0,05$
Cefquinona	N2	7	23	30	0	$P < 0,05$
Ceftiofur	N1	23	7	30	0	$P > 0,05$
Ceftiofur	N2	30	0	30	0	$P > 0,05$
Ceftiofur	N3	30	0	30	0	$P > 0,05$
Ceftiofur	N4	30	0	30	0	$P > 0,05$
Cefapirina	N1	0	30	8	22	$P > 0,05$
Cefapirina	N2	30	0	30	0	$P > 0,05$
Cefapirina	N3	17	13	6	24	$P < 0,05$
Cefapirina	N4	30	0	30	0	$P > 0,05$

Os resultados observados para os aminoglicosídeos, sulfonamidas, macrolídeos, tetraciclina e trimetoprim foram negativos para os kits SNAP beta-lactâmicos e Charm MRL BL/TET

(exceção para tetraciclina) (Quadro 16). Estes resultados confirmam as informações declaradas pelos fabricantes dos kits e descartam a possibilidade de tais antimicrobianos serem interferentes.

Quadro 16. Comparação entre os kits Snap Beta-lactâmicos e Charm MRL BL/TET na detecção de diferentes concentrações de antimicrobianos dos grupos aminoglicosídeos, sulfonamidas, macrolídeos, tetraciclina e outro em leite

Antimicrobiano/grupo	Nível	Kit Snap Beta-lactâmicos		Kit Charm MRL BL/TET		Resultados
		Positivo	Negativo	Positivo	Negativo	
Aminoglicosídeos						
Neomicina	N2	0	30	0	30	P > 0,05
Gentamicina	N2	0	30	0	30	P > 0,05
Sulfato de estreptomicina	N2	0	30	0	30	P > 0,05
Sulfonamidas						
Sulfadiazina	N2	0	30	0	30	P > 0,05
Macrolídeos						
Eritromicina	N2	0	30	0	30	P > 0,05
Tilosina	N2	0	30	0	30	P > 0,05
Tetraciclina						
Tetraciclina	N2	0	30	30	0	P < 0,05
Oxitetraciclina	N2	0	30	30	0	P < 0,05
Clortetraciclina	N2	0	30	30	0	P < 0,05
Outro						
Trimetoprim	N2	0	30	0	30	P > 0,05

Comparando-se o kit Snap Tetraciclina com o Kit Charm MRL BL/TET observou-se diferença significativa para oxacilina ao nível 2 (legislação brasileira). No entanto,

mais uma vez ressalta-se que este é um antimicrobiano não declarado pelo fabricante (Quadro 17).

Quadro 17. Comparação entre os kits Snap Tetraciclina e Charm MRL BL/TET na detecção de diferentes concentrações de antimicrobianos dos grupos beta-lactâmicos, aminoglicosídeos, sulfonamidas, macrolídeos, e outro em leite

Antimicrobiano/grupo	Nível	Kit Snap Tetraciclina		Kit Charm MRL BL/TET		Resultado
		Positivo	Negativo	Positivo	Negativo	
Beta-lactâmicos: Penicilinas						
Penicilina G	N2	0	30	30	0	P < 0,05
Oxacilina	N2	0	30	0	30	P > 0,05
Amoxicilina	N2	0	30	30	0	P < 0,05
Ampicilina	N2	0	30	30	0	P < 0,05
Dicloxacilina sódica	N2	0	30	30	0	P < 0,05
Cloxacilina	N2	0	30	28	2	P < 0,05
Beta-lactâmicos: Cefalosporinas						
Cefalexina	N2	0	30	30	0	P < 0,05
Cefazolina	N2	0	30	30	0	P < 0,05
Cefiquinona	N2	0	30	30	0	P < 0,05
Ceftiofur	N2	0	30	30	0	P < 0,05
Cefapirina	N2	0	30	30	0	P < 0,05
Aminoglicosídeos						
Sulfato de estreptomicina	N2	0	30	0	30	P > 0,05
Neomicina	N2	0	30	0	30	P > 0,05
Gentamicina	N2	0	30	0	30	P > 0,05
Macrolídeos						
Eritromicina	N2	0	30	0	30	P > 0,05
Tilosina	N2	0	30	0	30	P > 0,05
Sulfonamidas						
Sulfadiazina	N2	0	30	0	30	P > 0,05
Outro						
Trimetoprim	N2	0	30	0	30	P > 0,05

Quadro 18. Comparação entre os kits Snap Tetraciclina e Charm MRL BL/TET na detecção de diferentes concentrações de antimicrobianos do grupo das tetraciclina em leite

Antimicrobiano/grupo	Nível	Kit Snap Tetraciclina		Kit Charm MRL BL/TET		Resultado
		Positivo	Negativo	Positivo	Negativo	
Tetraciclina						
Tetraciclina	N1	2	28	0	30	P < 0,05
Tetraciclina	N2	30	0	30	0	P > 0,05
Tetraciclina	N3	29	1	23	7	P > 0,05
Tetraciclina	N4	30	0	30	0	P > 0,05
Oxitetraciclina	N1	20	10	2	28	P < 0,05
Oxitetraciclina	N2	30	0	30	0	P > 0,05
Oxitetraciclina	N3	30	0	30	0	P > 0,05
Oxitetraciclina	N4	30	0	30	0	P > 0,05
Clotetraciclina	N1	0	30	0	30	P > 0,05
Clotetraciclina	N2	27	3	30	0	P > 0,05
Clotetraciclina	N3	27	3	21	9	P > 0,05
Clotetraciclina	N4	30	0	30	0	P > 0,05

O Quadro 19 relaciona os diferentes limites de detecção dos kits utilizados e os limites legais estabelecidos no Brasil, nos EUA, na União Européia e pela OMS e pelo *Codex Alimentarius*. Percebe-se que os limites são variáveis e que nem todos os kits detectam os mesmos antimicrobianos nas mesmas concentrações. Um aspecto importante refere-se ao ceftiofur. O limite máximo de resíduo (LMR) é de 100 ppb e os kits Charm MRL BL/Tet e Snap Beta-lactâmicos detectam 20 e 12 ppb, respectivamente. Além da baixa concentração detectada, destaca-se que esta droga pode originar três metabólitos que

podem ser detectados por estes kits em concentrações muito menores. Tal fato é um dado preocupante, pois, pode levar a resultados falso-violativos e o produtor possivelmente será penalizado.

Por outro lado, o kit Snap Beta-lactâmicos detecta limites acima do valor estabelecido pela legislação brasileira para ampicilina e amoxicilina, o que pode gerar resultado falso negativo. Fato que pode gerar perdas para indústria, uma vez que esta irá usar este leite supostamente isento de resíduos, quando na realidade não está.

Quadro 19. Limites de detecção de antimicrobianos pelos kits Charm MRL/BL/Tet, Snap Tetraciclina, Snap Beta-lactâmicos, limites legais estabelecidos pelo Brasil (IN:42), pelo *Codex Alimentarius*, Food and Drug Administration (FDA), União Europeia (EU) e Organização Mundial da Saúde (OMS)

Antimicrobianos	LMR/ (µg/kg) IN 42	LMR <i>Codex</i> (µg/kg)	Safe Level FDA (µg/kg)	LMR UE (µg/kg)	LMR OMS (µg/k)	Limite de detecção Charm MRL/BL/ Tet (µg/kg)	Limite de detecção SNAP Tetra (µg/kg)	Limite de detecção SNAP Beta (µg/kg)
Penicilina G	4	-	-	-	-	2	-	3
Cefapirina	-	-	20	20	-	4	-	11,7
Ceftiofur	100	-	-	-	-	20	-	12
Cloxacilina sódica	-	-	10	30	30	25	-	-
Dicloxacilina sódica	-	-	-	30	-	20	-	-
Oxacilina	-	-	-	30	30	-	-	-
Ampicilina	4	-	-	-	-	2,5	-	5,8
Amoxicilina	4	-	-	-	-	2,5	-	7,3
Cefquinome	-	-	-	20	-	15	-	-
Cefazolin	-	50	-	-	-	8	-	-
Cefalexina	-	100	-	-	-	15	-	-
Clortetraciclina	100	-	-	-	-	50	100	-
Oxitetraciclina	100	-	-	-	-	50	50	-
Tetraciclina	100	-	-	-	-	20	50	-
Trimetoprim	-	-	-	50	50	-	-	-
Tilosina	-	-	50	50	-	-	-	-
Gentamicina	-	200	30	100	-	-	-	-
Neomicina	500	-	-	-	-	-	-	-
Eritromicina	40	-	-	-	-	-	-	-
Sulfadiazina	-	-	10	-	-	-	-	-
Estreptomicina	200	-	-	-	-	-	-	-

8 CONCLUSÕES

- Os kits avaliados apresentaram elevada sensibilidade e especificidade na detecção de diferentes resíduos de antimicrobianos no leite;

- Algumas drogas, como por exemplo, o ceftiofur, foi detectado em elevada concentração pelos kits testados, mesmo em concentração muito baixa (metade do limite declarado pelo fabricante);

- Os kits são facilmente utilizados, mas requerem controles como uso de amostra negativa (branco) e positiva (controle positivo), além do controle da temperatura no bloco aquecedor para garantia dos resultados analíticos;

- A maioria dos antimicrobianos testados foi detectada pelos kits utilizados no LMR (limite máximo de resíduos) estabelecido pela Instrução Normativa nº42 (Brasil, 1999);

- Os dois kits estão aptos para serem usados no monitoramento de resíduos de antimicrobianos no leite, devendo-se ter cuidado, no entanto, para o monitoramento de ceftiofur.

- O uso da leitora é indicado para ambos os kits, pelo fato de apresentar resultado visual em divergência quando comparado com a leitora.

9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDREW, M. S. Effect of fat and protein Content of milk from individual cows on the specificity rates of antibiotic residue screening tests. *J. Dairy Sci.* v. 83, n. 12, 2000.

APHA (American Public Health Association). *Standard methods for the examination of dairy products*. 16.ed. Washington: APHA, 1992. 546p.

BARROS, G. M. S.; JESUS, N. M. de; SILVA, M. H. Pesquisa de resíduos de antibióticos em leite pasteurizado tipo c, comercializado na cidade de Salvador. *Rev. Bras. Saúde Prod. Anim.*, v. 2, n. 3 p. 69-73, 2001.

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. *Ci. Anim. Bras.*, v. 1, n.1, 2000.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento – MAPA – Lei 10.831, de 23 de dezembro de 2003. *Dispõe sobre a agricultura orgânica e dá outras providências*. Disponível em: <<http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis-consulta/consultarLegislacao>>. Acesso em 07/2010.

BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento – MAPA – Instrução Normativa nº3, de 22 de Janeiro de 1999. Reedita o Plano Nacional de Controle de Resíduos Biológicos em Produtos de Origem Animal – PNCRB. *Diário Oficial da União*: Brasília, Distrito Federal, em 17 de fevereiro de 1999a. Seção 1, página 15. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br>. Acesso em: 20 de fevereiro 2009.

BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento – MAPA – Instrução Normativa nº 42, de 20 de dezembro de 1999, que altera o Plano Nacional de Controle de Resíduos em Produtos de Origem Animal – PNCR. *Diário Oficial da União*: Brasília, Distrito Federal, em 22 de dezembro de 1999b. Seção 1, página 13. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br>. Acesso em: 19 de fevereiro de 2009.

BRASIL. Lei nº 30.691, de 29 de março de 1952. Aprova o Regulamento de Inspeção Industrial e Sanitária dos Produtos de Origem Animal (RIISPOA). *Diário Oficial da União*, Brasília, DF, 07 set. 1952. Seção 1, p. 10785. Disponível em: <<http://www.scribd.com/doc/3194328/RIISPOA>> Acesso em: 20 maio 2010.

BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento – MAPA- Portaria nº 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. *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: 20 setembro 2005.

BRITO, M. A. V. P.; BRITO, J. R. F. Qualidade do leite, [200-]. Disponível em: http://www.fernandomadalenacom/site_arquivos/903.pdf. Acesso 20 de fevereiro de 2009

BRITO, M. A. V. P. Resíduos de antibióticos no leite: um problema que tem solução. [200-]. Disponível em: <http://www.centraldapecuaria.com.br/artigos/visualiza.asp?artigo=17>. Acesso em: 20 fevereiro 2009.

BRITO, M. A. V. P.; LANGE, C.C. Resíduos de antibióticos no leite. Juiz de Fora: Embrapa, 2005. 4p. (Comunicado Técnico 44).

CARVALHO, G.R. Leite: Por que olhar para o Brasil?. 2007. Disponível em: <http://www.milkpoint.com.br/?noticiaID=41633&actA=7&areaID=50&secaoID=128>. Acesso em: 03 abril de 2010.

CARVALHO, G.R.; OLIVEIRA, A. F. de. O setor lácteo em perspectiva. Boletim de conjuntura agropecuária. Disponível em: <http://www.cnpm.embrapa.br/conjuntura/0609_Leitederivados.pdf>. Acesso em: 06 abril de 2010.

CEFTIOFUR detection in raw milk. Technical Note. Informational Release. Charm Sciences Inc. January, 12, 2009.

CHAMBERS, H. F.; SANDE, M. A. Fármacos antimicrobianos: os

- aminoglicosídeos. In: GILMAN, A.G. *As bases farmacológicas da terapêutica*. 9 ed. McGraw-Hill Companies. 1997. p. 812-826.
- CONSUMO per capita mundial de leite fluido 2000-2008, 2008. Disponível em: <http://www.cnpqgl.embrapa.br/nova/informacoes/estatisticas/consumo/tabela0703.php>. Acesso em: 02 abril 2010.
- COSTA, E. O. Uso de antimicrobianos na mastite. In: SPINOSA, H. S.; GÓRNIK, S. L.; BERNARDI, M. M. *Farmacologia aplicada à medicina veterinária*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002, p. 442-455.
- CULLOR, J. S. Tests for identifying antibiotic residues in milk: How well do they work? *Veterinary Medicine*, v.87, n.12, p.1235-1241, 1992.
- DENOBILO, M; NASCIMENTO, E. S. Validação de método para determinação de resíduos dos antibióticos oxitetraciclina, tetraciclina, clortetraciclina e doxiciclina, em leite, por cromatografia líquida de alta eficiência. *Braz. J. Pharm. Sci.* v. 40, n. 2, p.209-218, 2004.
- DOWLING, P.M. Aminoglycosides. In: GIGUÈRE, S. et al. *Antimicrobial Therapy in Veterinary Medicine*. 4. ed. Ames: Ed.Blackwell publishing, 2006a. p. 207-230.
- DOWLING, P.M. Chloramphenicol, Thiamphenicol, and Florfenicol. In: GIGUÈRE, S. et al. *Antimicrobial Therapy in Veterinary Medicine*. 4. ed. Ames: Ed.Blackwell publishing, 2006b. p. 241-248.
- DÜRR, J. W. *Como produzir leite de qualidade*. Brasília:SENAR, 2007. 36 p.
- EURACHEM Guide: The Fitness for Purpose of Analytical Methods. United Kingdom: LGC. 1998. 61 p.
- FERNANDES, R. M. M. Christian Hansen comercializa novo teste para detectar resíduos de antibióticos no leite. 2008. Disponível em: http://www.chr-hansen.com/press/news/show_news/chr-hansen-markets-new-test-for-detection-of-antibiotic-residues-in-milk.html?L=6&cHash=610a1da3ff. Acesso em: 06 março 2009.
- FOLLY, M. M.; MACHADO, S. C. A. Determinação de resíduos de antibióticos, utilizando-se métodos de inibição microbiana, enzimático e imunoensaios no leite pasteurizado comercializado na região norte do estado do Rio de Janeiro, Brasil. *Ciê. Rural* v.31, n.1, p.95-98, 2001.
- FONSECA, G. P.; CRUZ, A.G.; FARIA, J. A. F. et al. Antibiotic residues in Brazilian UHT milk: a screening study. *Ciê. Tecnol. Aliment.*, v. 29, n. 2, p. 451-453, 2009.
- FONSECA, L.F.L. *A questão dos resíduos de antibióticos*. 2005. Disponível em: <http://www.milkpoint.com.br/conjuntura/printpage.asp> Acesso em: 21 dez. 2005.
- FONSECA, L. F. L.; SANTOS, M. V. *Qualidade do leite e controle de mastite*, São Paulo: Lemos, 2000. 175p.
- GIGUÈRE, S. Macrolides, Azalides, and Ketolides. In: ____ et al. *Antimicrobial Therapy in Veterinary Medicine*. 4. ed. Ames: Ed.Blackwell publishing, 2006a. p. 191-205.
- GIGUÈRE, S. Tetracyclines and glycylicylines. In: ____ *Antimicrobial Therapy in Veterinary Medicine*. 4. ed. Ames: Ed.Blackwell publishing, 2006b. p. 231-240.
- GÓRNIK, S. L. Quimioterápicos. In: SPINOSA. H. S.; GÓRNIK, S. L.; BERNARDI, M. M. *Farmacologia Aplicada à Medicina Veterinária*. 3 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002. p.398-408.
- GUIDANCE for the standardized evaluation of microbial inhibitor tests. International DairyFederation – Standard 183: 1999. Disponível em: <http://www.fil-idf.org>. Acesso em: 05/09/2006.
- HOTTA, J. M. *Monitoramento de resíduos de antimicrobianos em diferentes pontos da*

- cadeia produtiva do leite, comparando diferentes métodos de detecção*. 2003. 90f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG.
- KANG, J. H.; KONDO, F. Occurrence of false-positive results of inhibitor on milk samples using the Delvotest SP assay. *J. Food Prot.*, v.64, n.8, p.1-5, 2001.
- KAPUSNIK-UNER, J.E.; SANDE, M. A.; CHAMBERS, H. F.; Fármacos antimicrobianos: Tetraciclina, cloranfenicol, eritromicina e outros fármacos antibacterianos. In: GILMAN, A. G. *As bases farmacológicas da terapêutica*. 9 ed. McGraw-Hill Companies. 1997. p. 826-849.
- MANDEL, G. L.; PETRI JR, W. A. Farmacos Antimicrobianos: Sulfonamidas, trimetropina-sulfametoxazol, quinolonas e agentes para infecção das vias urinárias. In: GILMAN, A. G. *As bases farmacológicas da terapêutica*. 9 ed. McGraw-Hill Companies. 1997. p. 775-789.
- MITCHELL, J.M.; GRIFFITHS, M.W.; MCEWEN, S.A. et al. Antimicrobial drug residues in milk and meat: causes, concerns, prevalence, regulations, tests, and test performance. *J. Food Prot.* v.61, n.6, p.742-756, 1998.
- MORAIS, C. M. Q. J.; DURÃES, T. S.; NÓBREGA, A. W. et al. Presença de resíduos de antibióticos em leite bovino pasteurizado. *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, dez.2009.
- NASCIMENTO, G. G. F.; MAESTRO, V.; CAMPOS, M. S. P. Ocorrência de resíduos de antibióticos no leite comercializado em Piracicaba, SP. *Rev. Nutr.* v.14, n.2, p.119-124, 2001.
- NERO, L. A.; MATTOS, M. R.; BELOTI, V. et al. Leite cru de quatro regiões leiteiras brasileiras: Perspectivas de atendimento dos requisitos microbiológicos estabelecidos pela Instrução Normativa 51. *Ciênc. Tecnol. Aliment.* v.25, n.1, p.191-195, 2005.
- NERO, L. A.; MATTOS, M. R.; BELOTI, V. et al. Resíduos de antibióticos em leite cru de quatro regiões leiteiras no Brasil. *Ciênc. Tecn. Aliment.* v.27, n.2, p.391-393, 2007.
- NEW SNAP Beta –Lactam Test Kit. 2009. IDEXX Laboratories Inc, Westbrook, Maine. Disponível em: <http://www.idexx.com/search/index.jsp>. Acesso em: 19 de março 2009.
- OLIVEIRA, R. C.; BANDO, E.; MACHINSKI JUNIOR, M. Ocorrência de cloranfenicol em leite pasteurizado comercializado no Estado do Paraná, Brasil. *Acta Scientiarum Health Science*, v. 29, n. 1, p. 59-62, 2007.
- PLANO Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes - PNCRC, Brasília: Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2008. 20p.
- POL, M.; RUEGG, P. L. Treatment Practices and Quantification of Antimicrobial Drug Usage in Conventional and Organic Dairy Farms in Wisconsin. *J. Dairy Sci.* v. 90, n. 1, p. 249–261, 2007.
- PRESCOTT, J. F. Beta-lactam Antibiotics: penam penicilins. In: GIGUÈRE, S. et al. *Antimicrobial Therapy in Veterinary Medicine*. 4. ed. Ames: Ed.Blackwell publishing. 2006. p.159-170.
- PRODUÇÃO brasileira de leite em milhões de litros por unidade da federação, 2008. Disponível em: http://www.milkpoint.com.br/estatisticas/Producao_Estado.htm Acesso em : 04 abril 2010
- PRODUÇÃO, consumo e exportação de leite. Projeções do agronegócio, Brasil 2009/10 a 2019/20 - Assessoria de Gestão Estratégica. Ministério da Agricultura pecuária e Abastecimento, 2010. 48p. Disponível em: http://www.agricultura.gov.br/images/MAPA/arquivos_portal/Projecoes_Agronegocio.pdf. Acesso em: 31 março 2010.
- PRODUÇÃO de leite fluido em mil toneladas, Dados baseados em: USDA

(United States Department of Agriculture) - Dairy: World Markets and Trade/ December 200, 2009. Disponível em: http://www.milkpoint.com.br/estatisticas/Producao_Estado.htm Acesso em: 07 abril 2010

PRODUÇÃO Orgânica de Leite - Qualidade e Segurança Alimentar.[200-] Disponível em: <http://www.cnpab.embrapa.br/publicacoes/artigos/leite-seguro.html>. Acesso em: agosto, 2010.

PROGRAMA de análise de resíduos de medicamentos veterinários em alimentos de origem animal – PAMVet. Agência Nacional de Vigilância Sanitária, – relatório 2002/2003.46 p. Monitoramento de resíduos em leite exposto ao consumo (1º e 2º anos de atividade), 2005.

PROGRAMA de análise de resíduos de medicamentos veterinários em alimentos de origem animal – PAMVet. Agência Nacional de Vigilância Sanitária, relatório 2006/2007. 73 p. Monitoramento de resíduos em leite exposto ao consumo (4º e 5º anos de atividade), 2009.

PROJEÇÃO da População do Brasil. Comunicação Social 27 de novembro de 2008. Disponível em: http://www.ibge.gov.br/home/presidencia/noticias/noticia_impresao.php?id_noticia=1272 Acesso em: 05 abril 2010.

RAPINI, L. S; TEIXEIRA, J. P.; MARTINS, N. E. et al. Perfil de resistência antimicrobiana de cepas de *Staphylococcus* sp. isoladas de queijo tipo coalho. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* v.56, n.1, p.130-133, 2004.

RIBEIRO, M. G.; GERALDO, J.S.; LANGONI, H.; et.al. Microrganismos patogênicos, celularidade e resíduos de antimicrobianos no leite bovino produzido no sistema orgânico. *Pesq. Vet. Bras.* v. 29, n.1,p.52-58, 2009.

RUGGED results in a snap. 2009. IDEXX Laboratories Inc, Westbrook, Maine . Disponível em:

<http://www.idexx.com/dairy/snap/index.jsp>. Acesso em: 29 março 2009.

SANTOS, M.V. Antibióticos: como não deixar resíduos no leite. *Rev. Balde Branco.* n.460, p.54-57, 2003.

SANTOS, D.; BERGMANN, G. P. Influência da temperatura durante o transporte sobre a qualidade microbiológica do leite cru. Parte II – Coliformes totais. *Rev. Hig. Alimen.* v.17, n.110, p.80 – 84, 2003.

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

SHITANDI, A.; STERNESJO, A. Prevalence of Multidrug Resistant *Staphylococcus aureus* in Milk from Large- and Small-Scale Producers in Kenya. *J. Dairy Sci.* v.87, n.12, p.4145-4149, 2004.

SIERRA, D.; CONTRERAS, A.; SÁNCHEZ, A. et al. Short communication: Detection limits of non- β -lactam antibiotics in goat's milk by microbiological residues screening tests. *J. Dairy Sci.* v. 92, n.9, p.4200-4206, 2009.

SNAP* Tetracycline Test Kit(tetracycline, chlortetracycline, oxytetracycline). 2009. IDEXX Laboratories Inc, Westbrook, Maine . Disponível em: <http://www.idexx.com/search/index.jsp>. Acesso em: 19 de março 2009.

SOUZA, M.R.; PENNA, C.F.A.M.; LEITE, M.O. et al. Determinação dos teores de gordura, extrato seco total e extrato seco desengordurado do leite: Tecnologia de leite e produtos derivados – Tei 601. Belo Horizonte: UFMG, 2004.

SPINOSA, H. S. Considerações gerais sobre os antimicrobianos. In: SPINOSA, H. S.; GÓRNIK, S. L.; BERNARDI, M. M. *Farmacologia Aplicada à Medicina Veterinária.* Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002a, p.379-385.

- SPINOSA, H. S. Antibióticos: Beta-lactâmicos: penicilinas e cefalosporinas. In: SPINOSA, H. S.; GÓRNIAC, S. L.; BERNARDI, M. M. *Farmacologia Aplicada à Medicina Veterinária*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002b, p.409-415.
- SPINOSA, H. S. Antibióticos: Tetraciclina, cloranfenicol e análogos. In: _____. *Farmacologia Aplicada à Medicina Veterinária*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002c, p.420-424.
- STOLKER, A.A.M.; BRINKMAN, U.A.Th. Analytical strategies for residue analysis of veterinary drugs and growth-promoting agents in food-producing animals—a review *J.Chromatogr. A*. v.1067, p. 15–53, 2005.
- TAN, X; JIANG, Y.; HUANG, Y. *et al* . Persistence of gentamicin residues in milk after the intramammary treatment of lactating cows for mastitis. *J Zhejiang Univ Sci B*. v.10, n.4. p. 280-284, 2009.
- TENÓRIO, C. G. M. S. C. *Eficiência dos testes COPAN (Microplate e Single) na detecção de resíduos de antimicrobianos no leite*. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.61, n.2, p.504-510, 2009.
- TETZNER, T.A.D.; BENEDETTI, E.; GUIMARÃES, E.C. et al. Prevalência de resíduos de antibióticos em amostras de leite cru na região do Triângulo Mineiro, MG. *Rev. Hig. Alimen.* v.19, n.130, p. 69-72, 2005.
- TOLDRÁ, F.; REIG, M. Methods for rapid detection of chemical and veterinary drug residues in animal food. *Trends Food Sci.Technol*, v.7, n.9, p.482-489, 2006.
- TOZZETTI, D. S.; BATAIER, M.B.; ALMEIDA,L.R. et al. Prevenção, controle e tratamento das mastites bovinas – Revisão de literatura. *Rev. Cient. Eletr. Med. Vet.* v.6, n.10, 2008.
- YAMAKI, M.; BERRUGA, M. I. ALTHAUS, R. L. et al. Occurrence of antibiotic residues in milk from manchega ewe dairy farms. *J. Dairy Sci.* v. 87, n.10, p. 3132–3137, 2004.
- WALSTRA, P.; JENNESS, R.; BADINGS, H. T. *Química y física lactologica*. Zaragoza: Acribia, 1987. 423p.

ANEXOS