

Ricardo de Miranda Henriques Leite

**IDENTIFICAÇÃO DE RESÍDUOS DE ISONIAZIDA NO
LEITE BOVINO PELA CROMATOGRÁFIA LÍQUIDA DE
ALTA EFICIÊNCIA**

**Dissertação apresentada à Universidade
Federal de Minas Gerais como requisito
parcial para a obtenção do grau de
Mestre em Medicina Veterinária.
Área: Medicina Veterinária Preventiva
Orientador: Prof. Andrey Pereira Lage**

**Belo Horizonte
UFMG – Escola de Veterinária
1999**

L533i Leite, Ricardo de Miranda Henriques, 1967-

Identificação de resíduos de isoniazida no leite bovino pela cromatografia líquida de alta eficiência / Ricardo de Miranda Henriques Leite. – Belo Horizonte: UFMG-Escola de Veterinária, 1999.

62p. : il.

Dissertação (mestrado)

1. Leite – Análise – Teses. 2. Leite – Contaminação – Teses. 3. Tuberculose em bovino – Teses. 4. Resíduo de drogas em veterinária – Teses. 5. Cromatografia líquida de alta eficiência – Teses.

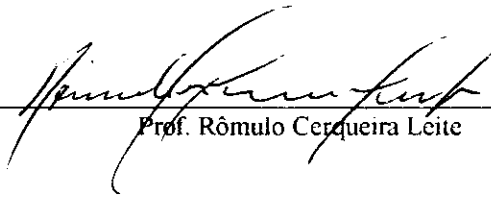
I. Título.

CDD - 637

Dissertação defendida e aprovada em 29 de janeiro de 1999, pela Comissão Examinadora constituída por:




Prof. Andrey Pereira Lage
Orientador



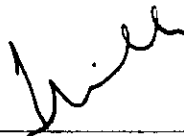
Prof. Rômulo Cerqueira Leite



Prof. Francisco Carlos Faria Lobato



Prof. Jenner Karlison Pimenta dos Reis



Prof. Jorge Luis Pesqueiro

A minha família, especialmente minha esposa e filha, por todo amor e compreensão, e por terem suportado com paciência os momentos de minha ausência, sem o qual não conseguiria alcançar meus objetivos.

Aos meus pais, por toda a formação que me ofereceram e pelos bons exemplos que foram e são por toda a minha vida, e ao grande profissional que é o meu pai, no qual tento me espelhar.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Andrey Perreira Lage, pela orientação, apoio e amizade sem a qual não seria possível a realização deste trabalho.

Aos professores Rômulo Cerqueira Leite e Francisco C. F. Lobato, pela orientação, amizade e disponibilidade em ajudar sempre.

A Escola de Veterinária da UFMG, a seus professores e funcionários, por todo o apoio e amizade, me fazendo sentir em casa.

A EMEPA-PB, empresa na qual trabalho, por todo apoio e por acreditar em meu trabalho, liberando-me para a realização do mestrado.

Aos técnicos do LARA (M.A.Ab), Dr. Pedro Moacyr Pinto Coelho Mota e Dra. Josefa Abucater Lima, por toda ajuda durante a realização deste projeto.

Aos professores Jenner Karlisson Pimenta dos Reis e Jorge Luiz Pesquero pelas contribuições à dissertação.

Ao Professor Iran Borges, por todo o auxílio na estatística.

Ao CNPq, pela concessão de bolsa de mestrado.

À FAPEMIG e à Pró-Reitoria de Pesquisa da UFMG pelo financiamento concedido.

Aos colegas do Laboratório de Bacteriologia Aplicada, Aisca, Ana Paula, Cid, Val, Paulinho, Raul, Marcelo, Márcio, Josely e Luciana.

A turma da Pós-Graduação: Márcio, Rizaldo, Alice, Cristiano, Salete, Heleno, Cecília, Valeska e Nuncio,

A turma do estudo: Jefferson (Pássaro), Alessandro (Carioca), André (Baiano), Júnior (Bochecha), Márcio (De Bua), Andresinho, Rodrigo (Poço), Fernando (Pochete), Fernando, Ivon e outros.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	14
LISTA DE FIGURAS	15
RESUMO	16
1 INTRODUÇÃO	17
2 OBJETIVOS	22
3 BIBLIOGRAFIA CONSULTADA	23
4 MATERIAL E MÉTODOS	31
4.1 Animais Experimentais	31
4.2 Administração da Isoniazida	32
4.3 Coleta de Amostras de Leite	32
4.4 Pasteurização	33
4.5 Preparo das Amostras de Leite	33
4.6 Identificação de Isoniazida pela Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC)	34

4.7	Avaliação da Utilização da HPLC na Rotina de Identificação de Resíduos de Isoniazida no Leite	37
4.8	Análises Estatísticas	37
5	RESULTADOS	38
6	DISCUSSÃO	47
7	CONCLUSÕES	53
8	SUMMARY	54
9	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	55

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Peso, dose de isoniazida e tempo após o parto dos animais Europeu/Zebu utilizados no experimento.	31
Tabela 2 - Concentração média de resíduos de isoniazida no leite de animais tratados.	40
Tabela 3 - Relação entre o peso, a produção de leite e a excreção de isoniazida no leite de animais tratados com uma dose de 25 mg/kg/dia de isoniazida.	43
Tabela 4 - Comparação entre a concentração de resíduos de isoniazida no leite antes e após a pasteurização.	46

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Curva Padrão construída a partir de amostras contendo 0, 150, 300 e 600 $\mu\text{g/l}$ de isoniazida. 35
- Figura 2 - Cromatogramas das amostras de leite utilizadas como padrão, adicionadas respectivamente de 0 (A), 150 (B), 300 (C) e 600 (D) $\mu\text{g/l}$ de uma solução padrão de isoniazida. 36
- Figura 3 - Cromatograma da pesquisa de isoniazida no leite do animal 01 no dia -3 antes da administração da droga - concentração 0,0 $\mu\text{g/l}$ - (A) e cromatograma da pesquisa de isoniazida no leite do animal 01 no dia 1 após a administração de 25 mg/kg/dia de isoniazida - 767,3 $\mu\text{g/l}$ - (B). 39
- Figura 4 - Resíduos de isoniazida no leite de animais tratados com 25 mg/kg/dia. As setas indicam os dias onde houve administração da droga. 42
- Figura 5 - Comparação entre a concentração de isoniazida no leite antes e após a pasteurização. 45
-

RESUMO

A Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC) foi utilizada na identificação de isoniazida (hidrazida do ácido isonicotínico) no leite de bovinos tratados com a dose de 25 mg/kg/dia, em dias alternados, foi também verificado o efeito da pasteurização sobre a concentração residual de isoniazida no leite destes animais. A liberação da droga no leite dos animais apresentou uma variação cíclica com picos no primeiro dia após a administração da droga, com média de 1104,48 µg/l, e queda dois dias após, com média de 104,12 µg/l. Quatro dias após a última administração da droga não foi mais possível, pela técnica utilizada, a identificação de resíduos de isoniazida no leite. Verificou-se que existe a influência do peso e produção de leite do animal em relação a quantidade da droga excretada e que a pasteurização diminuiu, em média 47,07%, a concentração de resíduo de isoniazida no leite.

Palavras Chave: Tuberculose bovina, Isoniazida, HPLC.

1 INTRODUÇÃO

A Tuberculose é a principal causa de morte devido a um único agente infeccioso entre adultos em todo o mundo. É estimado que a incidência e mortalidade de Tuberculose humana entre 1990 e 1999 será de 88 milhões e 30 milhões respectivamente, com a maioria dos casos em países em desenvolvimento. *Mycobacterium tuberculosis* é a causa mais comum de Tuberculose humana, mas uma proporção de casos se deve ao *Mycobacterium bovis*. Em países industrializados, programas de controle e eliminação da Tuberculose animal, junto com a pasteurização de leite, diminuíram drasticamente a incidência da doença causada por *M. bovis* tanto em bovinos quanto no homem. Entretanto, em países em desenvolvimento, a Tuberculose animal está amplamente difundida, as medidas de controle não são aplicadas ou são aplicadas esporadicamente e a pasteurização é raramente praticada. A correlação direta entre infecção por *M. bovis* em bovinos e a doença na população humana foi bem documentada em países industrializados. Entretanto, pouca informação é encontrada nos países em desenvolvimento, onde os fatores de risco para a infecção pelo *M. bovis* tanto em animais quanto no homem estão presentes (Cosivi et al,1998).

Tuberculose é a principal infecção oportunística em pessoas infectadas com HIV (Síndrome da imunodeficiência Adquirida). A grande maioria das pessoas portadoras desta dupla infecção moram em países em desenvolvimento, mas tanto infecções por HIV como por *M. bovis* foram reportadas em países industrializados. A epidemia da infecção por HIV em países desenvolvidos, particularmente em países em que infecção por *M. bovis* esta presente nos animais e em que as condições favorecem as transmissões zoonóticas, podem fazer da Tuberculose bovina uma séria ameaça a saúde pública para pessoas de grupos de risco (Cosivi et al, 1998)

Trabalhando com dados parciais, o Departamento de Defesa Animal do Ministério da Agricultura e Abastecimento (M.A.Ab.) apontou, no ano de 1996, a presença de Tuberculose em 551 rebanhos bovinos no país computando 2.307 animais positivos. Considerados elevados, estes dados não refletem, porém, a realidade, já que nem todos os animais são testados ou tem a existência da doença comunicada, apesar desta ser uma enfermidade de notificação obrigatória (Pitombo,1997).

No Brasil não existe um programa de controle ou erradicação da Tuberculose bovina. Esta atividade está inserida em um programa

genérico denominado Programa de Controle das Doenças Animais, desenvolvido pelo Ministério da Agricultura e do Abastecimento, Secretarias Estaduais de Agricultura e entidades afins (Ferreira Neto & Bernardi, 1997). A legislação sanitária animal brasileira é bem adequada ao tratar de enfermidades contagiosas, ao obrigar o sacrifício de animais positivos à tuberculinização e prevendo a indenização dos pecuaristas em um quarto do valor do animal sacrificado (Brasil, 1934, 1943). Mas, se fosse cumprida à risca em todas as propriedades, não haveria recursos para o pagamento das indenizações. Entretanto, apesar da luta destes órgãos, o esforço para o controle da Tuberculose bovina não surtiu efeito, em decorrência a uma série de razões, tais como as crises econômicas.

Dentre os fatores que dificultariam o controle da Tuberculose bovina no País poderiam ser citados: a dimensão do rebanho brasileiro - estimado em 151 milhões de cabeças em 1994, maior rebanho comercial do mundo (FAO-WHO-OIE, 1994), a extensão territorial, a existência de fronteiras com outros dez países, as diferenças regionais quanto a infra-estrutura e condições sócio-econômicas, a heterogeneidade das criações quanto ao modo de produção e situação sanitária e a insuficiência dos recursos financeiros destinadas aos órgãos oficiais que se ocupam da saúde animal (Ferreira Neto & Bernardi, 1997).

Devido a estes fatores, um programa de controle da Tuberculose bovina específico para o Brasil deve ser montado com medidas indicadas “para regiões nas quais seria inviável a realização da erradicação como medida inicial, por ser a doença endêmica e altamente disseminada” (Ferreira Neto & Bernardi, 1997).

Embora a maioria dos países desenvolvidos continue utilizando métodos de comprovada eficiência como o sacrifício dos animais reagentes à tuberculinização, a Tuberculose bovina ainda assim não foi erradicada de alguns países do primeiro mundo como, por exemplo, os Estados Unidos (Mota & Nakajima, 1992). Uma alternativa aos programas clássicos de controle de Tuberculose bovina que se baseiam no sacrifício dos animais seria a utilização do tratamento dos animais infectados.

No Brasil, estudos realizados com esquemas de tratamentos intermitentes com isoniazida (hidrazida do ácido isonicotínico) demonstraram uma eficiência de até 100% no controle da Tuberculose bovina em rebanhos infectados (Langenegger et al., 1991a e b). Devido a estes estudos, houve uma difusão na utilização do tratamento com isoniazida no controle da Tuberculose bovina em nosso meio, sem o necessário acompanhamento e responsabilidade.

Além disto, a legislação sanitária animal brasileira não prevê a utilização do tratamento no controle da Tuberculose bovina (Brasil, 1934).

2 OBJETIVOS

O presente trabalho teve por objetivos:

- Avaliar a aplicabilidade da técnica de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC) na identificação de isoniazida no leite de bovinos tratados;
- Pesquisar a concentração de resíduo liberado no leite de animais, recebendo a dosagem padrão de isoniazida empregada no tratamento da Tuberculose bovina no Brasil (25 mg/kg/dia de peso vivo em dias alternados);
- Verificar o efeito da pasteurização sobre a concentração da isoniazida no leite.

3 BIBLIOGRAFIA CONSULTADA

A isoniazida continua sendo considerada a droga de primeira linha para o tratamento da Tuberculose. Esta é bacteriostática para o *Mycobacterium sp* em “repouso”, enquanto possui ação bactericida para microrganismos em rápida divisão. O seu mecanismo de ação embora desconhecido sugere várias hipóteses, incluindo efeitos sobre lipídios, biossíntese de ácidos nucleicos e glicólise. Takayama et al. (1975) sugeriram uma ação primária da isoniazida inibindo a biossíntese de ácidos micólicos, que são importantes constituintes da parede celular das micobactérias. Como os ácidos micólicos são peculiares das micobactérias, esta ação poderia explicar o elevado grau de seletividade da atividade antimicrobiana da isoniazida. A exposição a isoniazida provoca perda da álcool-ácido resistência e diminuição na quantidade de lipídeos extraídos por metanol dos microrganismos. A isoniazida é rapidamente absorvida quando administrada por via oral ou parenteral sofrendo rápida difusão em todos os líquidos e células do organismo (Mandell & Petri Jr., 1996).

A toxicidade da isoniazida para o homem com a dose máxima de 300 mg/dia por dois meses (10-20 mg/kg/dia em crianças), refere-se ao sistema nervoso central e periférico sendo isto devido a uma carência de piridoxina, que provavelmente se deve a competição da isoniazida com essa (Leschiera et al., 1993). Só estão descritos os fenômenos de neurite periférica, insônia, agitação e tremor muscular, retenção urinária, convulsão e fenômenos psicóticos. Quase todas estas alterações podem ser prevenidas pela aplicação simultânea de piridoxina e isoniazida. Em alguns pacientes nota-se a presença de reação de hipersensibilidade, caracterizada pela presença de erupção cutânea, febre, linfadenopatia, vasculite e raramente a síndrome tipo *lupus eritematoso*, em outros casos observa-se toxicidade sangüínea com anemia aplástica, hemolítica e sideroblástica, agranulocitose, trombocitopenia e eosinofilia. Estes efeitos colaterais devem-se não só a dose e a duração da administração, mas também a inativação lenta deste fármaco (Leschiera et al., 1993)

Camurri (1953), realizando tratamento de Tuberculose, administrou isoniazida na dose de 3,2 mg/kg/dia e observou que a droga estava presente no leite de mães em lactação em poucas horas. As concentrações foram a metade ou um quarto mais baixo do que o valor encontrado no sangue das mães naquele momento. Lass e

Bunger (1953) reportaram a eliminação, de isoniazida no leite humano após administração de 200 mg da droga por via oral. Na amostra coletada duas horas após administração da droga foram encontrados em média 2000 µg/l e em amostras colhidas sete horas após a administração 500 µg/l de isoniazida no leite, que corresponde a 40 e 60 % dos níveis séricos da droga. Estes pediatras concluíram que um montante de 2000 µg/l de isoniazida no leite não era suficiente para causar algum efeito nos bebês. Bromberg et al. (1954), administrando 200 mg de isoniazida oralmente para cinco mães em lactação, determinou uma média de 3800 µg/l de isoniazida no leite durante um período de uma a três horas após a administração.

Vários autores na Itália e na África do Sul utilizaram a isoniazida no tratamento da Tuberculose bovina, obtendo resultados variáveis. Na Itália, Morreti & Pedini (1952), administraram isoniazida na dosagem de 4mg/kg/dia, por via intra-muscular, por períodos de 30 a 60 dias consecutivos. Os resultados revelaram apenas melhora clínica dos animais. Observações semelhantes foram feitas nos anos seguintes por Mucci (1953) e Sandro (1954).

O uso de doses maiores, cerca de 10mg/kg/dia, e durante períodos mais longos de aplicação da isoniazida (até 18 meses) proporcionaram melhores resultados, sendo observados, além da melhora clínica, gradual dessensibilização alérgica, em até 80,7% dos animais tratados. Entretanto, alguns dos animais aparentemente curados voltaram a ser reagentes à tuberculinização (Nai e Crespi, 1958; Kleeberg, 1959; Nai e Perini, 1960; Cerruti et al., 1961, 1962).

Estudos realizados na África do Sul, onde os animais foram tratados com doses de isoniazida de 20 mg/kg/dia, mostraram que o tratamento era eficiente na cura dos animais infectados podendo ser utilizado para o controle da Tuberculose bovina em áreas de alta prevalência (Kleeberg e Weyland, 1961; Kleeberg e Worthington, 1963; Kleeberg et al., 1966).

No Brasil, estudos realizados com esquemas de tratamentos diferentes, onde se utilizavam doses de 25 mg/kg/dia de isoniazida e tratamento intermitente, ou seja em dias alternados, mostraram uma eficiência de até 100% no controle da Tuberculose em rebanhos bovinos infectados pelo *M. bovis* (Langenegger et al., 1991a e b).

O tratamento de vacas com isoniazida não tem influência direta na produção de leite ou no seu gosto. Rebanhos com mais de 100 vacas em lactação receberam isoniazida na dosagem de 10 mg/kg/dia por períodos de oito a nove meses e o leite foi entregue para os consumidores tanto pasteurizado quanto fresco, não havendo reclamação desses consumidores (Kleeberg et al, 1961).

A absorção de isoniazida, sua distribuição pelo corpo e sua eliminação pela urina foram estudadas intensivamente no homem e animais de laboratório. A droga pode ser detectada no sangue e pode ser encontrada nos fluidos pleural e cerebrospinal três horas após sua administração. No mesmo período, a isoniazida já está amplamente distribuída pelos tecidos (Kleeberg et al, 1961).

Foi estabelecido que os níveis de isoniazida no leite de bovinos, em função do tempo após uma dose oral, varia significativamente entre os animais. Pode-se assumir que as diferenças nas concentrações lácteas são resultado de variações pela acetilação da isoniazida pelo fígado e da produção de leite dos animais (Kleeberg et al, 1961).

Verificou-se ainda que a administração diária de isoniazida nas dosagens de 10 mg/kg/dia e 20 mg/kg/dia determinam uma eliminação no leite de 240 µg/l e de 400 µg/l, respectivamente.

Considerando-se que uma criança consome meio litro de leite por dia, deverá ingerir 0,1 a 0,2 mg de isoniazida por dia. Este estudo foi realizado com uma técnica espectrofotométrica de detecção de isoniazida no leite, sendo 107,0 µg/l a menor quantidade detectada durante o experimento, 17 horas após a administração (Kleeberg et al., 1961).

Na Itália, a isoniazida foi extensivamente empregada na Medicina Veterinária para o tratamento de Tuberculose bovina até 1968 quando seu uso foi declarado ilegal pelo fato de causar a negatização dos animais positivos a tuberculinização. Por não se detectar os focos de Tuberculose bovina devido a ausência de diferença entre animais positivos e animais tratados com esta droga. Isto poderia levar ao insucesso na erradicação da Tuberculose bovina. Além disto, poderia trazer problemas de saúde pública como a interação da isoniazida com outras drogas, de desordens hepáticas e de aumento potencial de cepas de *Mycobacterium tuberculosis* resistentes à isoniazida (Defilippi et al, 1995).

Estas conseqüências podem ocorrer pela rápida difusão da isoniazida no leite (Leschiera et al., 1993; Defilippi et al., 1995). Pela administração de 10mg/kg/dia de isoniazida em três vacas foi demonstrado que sua difusão no leite se compara com aquela no

sangue: o nível máximo de isoniazida aparece 5-7 horas após administração, com concentração da droga de 1600-2000 e 1400-1700 µg/l, respectivamente no sangue e no leite, e que a droga ainda pode ser detectada, na concentração de 10 µg/l em ambos os líquidos quatro a cinco dias após sua administração. Verificou-se também que a concentração de isoniazida no leite de bovinos congelado a -20°C por seis meses, apresenta uma variação desta de -13,3 a 11,3% e diminui cerca de 40% aos doze meses após congelamento (Leschiera et al., 1993).

Apesar da isoniazida ser uma droga altamente hidrofílica, sua presença foi recentemente confirmada em queijos produzidos a partir de leite contaminado com a droga (Defilippi et al., 1994), demonstrando que a isoniazida também pode estar presente em produtos lácteos.

Uma série de métodos analíticos, incluindo espectrofotometria, espectrofluorometria, cromatografia gasosa e cromatografia líquida foram descritos na literatura para a identificação de isoniazida e alguns de seus metabólitos em fluidos biológicos de pacientes submetidos a tratamento contra Tuberculose. Entretanto poucas são as informações existentes sobre a identificação específica de isoniazida no leite (Defilippi et al, 1994).

Apenas três procedimentos estão em uso atualmente para a determinação quantitativa de isoniazida no leite. Os dois primeiros desenvolvidos por Ruffo (1965), são baseados em medidas espectrofotométricas e biológicas, que possuem baixa sensibilidade: 100 e 50 $\mu\text{g/l}$, respectivamente. O terceiro é baseado na Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC) e foi desenvolvido e amplamente empregado na Itália (Defilippi et al, 1994). Esta técnica provou ser de confiança, com alta sensibilidade (0,1 $\mu\text{g/l}$) e ser de rápida realização. Entretanto, possuía duas limitações práticas: (1) o uso de uma coluna de cromatografia rara e (2) o uso de uma amostra para definir o volume de injeção de 100 μl ("loop") adaptada no sistema HPLC. Posteriormente estas limitações foram resolvidas, sem haver mudanças no seu modelo de derivação com cinamaldéido, que tem a função de tornar a amostra de leite mais visível ou seja sensível aos raios ultra violeta (UV), mas explorando uma variedade de condições cromatográficas e diferentes técnicas de pré-concentração (Defilippi et al, 1995).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Animais Experimentais

Foram utilizadas seis fêmeas bovinas mestiças Europeu/Zebu, no terço médio do período de lactação (Tabela 1). Os animais foram submetidos a uma ordenha diária.

Tabela 1 - Peso, dose de isoniazida e tempo após o parto dos animais Europeu/Zebu utilizados no experimento.

Animal	Peso (kg)	Dose de Isoniazida (g) ¹	Tempo Pós-Parto (meses)
1	375	9,37	3
2	330	8,25	5
3	335	8,37	2
4	435	10,87	5
5	400	10,00	6
6	420	10,50	5

¹ - Dose de isoniazida fornecida aos animais durante o experimento, equivalendo a 25mg/kg/dia de peso vivo (Langenegger et al,1991b).

4.2 Administração da Isoniazida

A isoniazida (Interchange, China) foi administrada por via oral na dose de 25 mg/kg/dia, às segundas, quartas e sextas-feiras, durante duas semanas, perfazendo um total de seis aplicações. A administração da droga foi sempre feita na parte da manhã logo após a ordenha do dia, sendo que a primeira dose foi administrada no dia 0 do experimento. Preparou-se uma suspensão da dose de isoniazida em 50 ml de água que foi administrada por via oral aos animais com seringa dosificadora. Este intervalo de administração da droga é o que vem sendo empregado no tratamento de bovinos tuberculosos, em oitenta doses, com uma duração do tratamento de cerca de seis meses (Langenegger et al, 1991b).

4.3 Coleta de Amostras de Leite

Cinco mililitros de leite de cada animal tratado, da mistura do leite de todos os animais e da mistura do leite dos animais tratados após a pasteurização foram coletadas durante todo o período de administração da droga e até o sexto dia após a última administração, no dia 17 do experimento. Todas as amostras foram coletadas no mesmo horário, ou seja, mantendo um intervalo de tempo entre as coletas de 24 horas. As amostras coletadas nos dias

5, 6, 12 e 13 do experimento foram congeladas a -20°C até a realização do teste, dois dias após a coleta.

Amostras coletadas nos dias -3, -2, -1 e 0 foram utilizadas como controles negativos para identificação da isoniazida.

4.4 Pasteurização

Após a coleta da amostra para a identificação da quantidade de isoniazida na mistura do leite de todos os animais tratados, este leite foi submetido à pasteurização rápida à $72-75^{\circ}\text{C}$ por 16 segundos em um pasteurizador de placas (Mec-Brasil, Pompéia, São Paulo), segundo Kessler (1981).

Para o controle da pasteurização foram empregados as provas de fosfatase alcalina e peroxidase, sendo considerados como aprovadas as amostras que apresentaram reação negativa à prova de fosfatase alcalina e reação positiva à prova de peroxidase (Brasil, 1981).

4.5 Preparo das Amostras de Leite

As amostras de leite com 2 ml foram desproteinizadas com uma solução de ácido tricloroacético a 20% por 10 minutos à temperatura ambiente e então centrifugadas a 4000 rpm por 15

minutos. O sobrenadante (600 µl) foi filtrado em membrana de nitrocelulose de 0,45 µm e, então, derivado utilizando-se uma solução de cinamaldeído a 1% em metanol, agitado em um agitador de tubos por alguns segundos e deixado a temperatura ambiente por 5 minutos até ser injetado (Defilippi et al, 1994).

4.6 Identificação de Isoniazida pela Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC)

A identificação de resíduos de isoniazida no leite foi realizada em um cromatógrafo TSP (Thermo Separation Products Inc., California, USA), utilizando-se coluna Lichorsphere 100 RP18 (250 mm X 4 mm ID) (Merck, Alemanha), fluxo da fase móvel de 1ml/min, detector UV a 330 nm e volume de injeção de 100 µl, segundo metodologia descrita por Defilippi et al. (1995). Injetou-se o branco e os padrões de isoniazida preparados junto com as amostras a serem estudadas, para ser construída uma curva padrão (Figura 1). Para se preparar esta curva padrão, três tubos contendo 2 ml de leite proveniente de animal não tratado foram adicionados, respectivamente, de 600, 300 e 150 µl de uma solução padrão de isoniazida contendo de 1 µg/l e um quarto tubo sem adição de isoniazida serviu de branco (Figura 2: A, B, C e D).

ISONIAZIDA

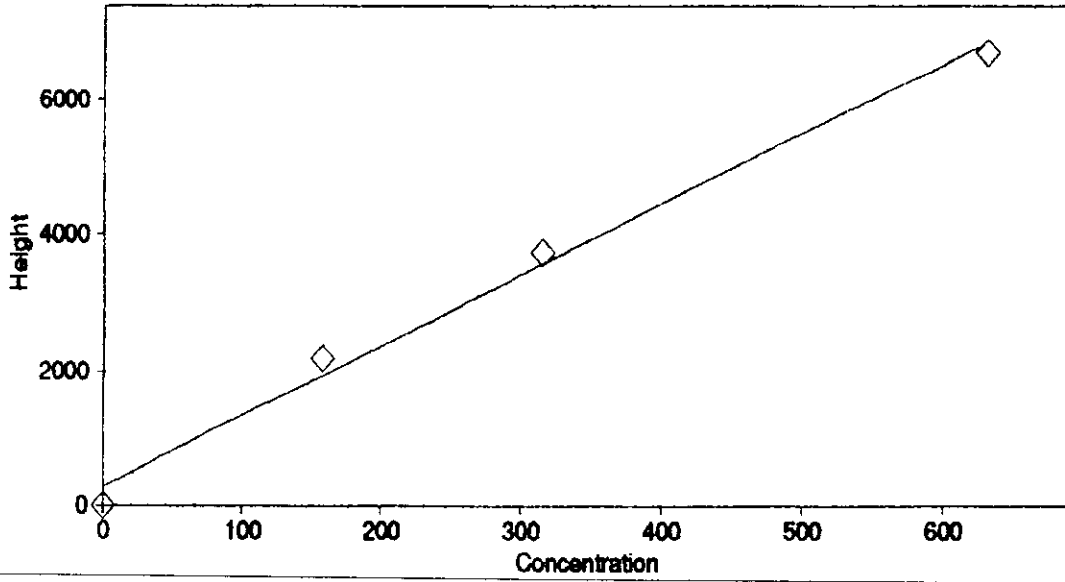


Figura 1 - Curva Padrão construída a partir de amostras contendo 0, 150, 300 e 600 µg/l de isoniazida.

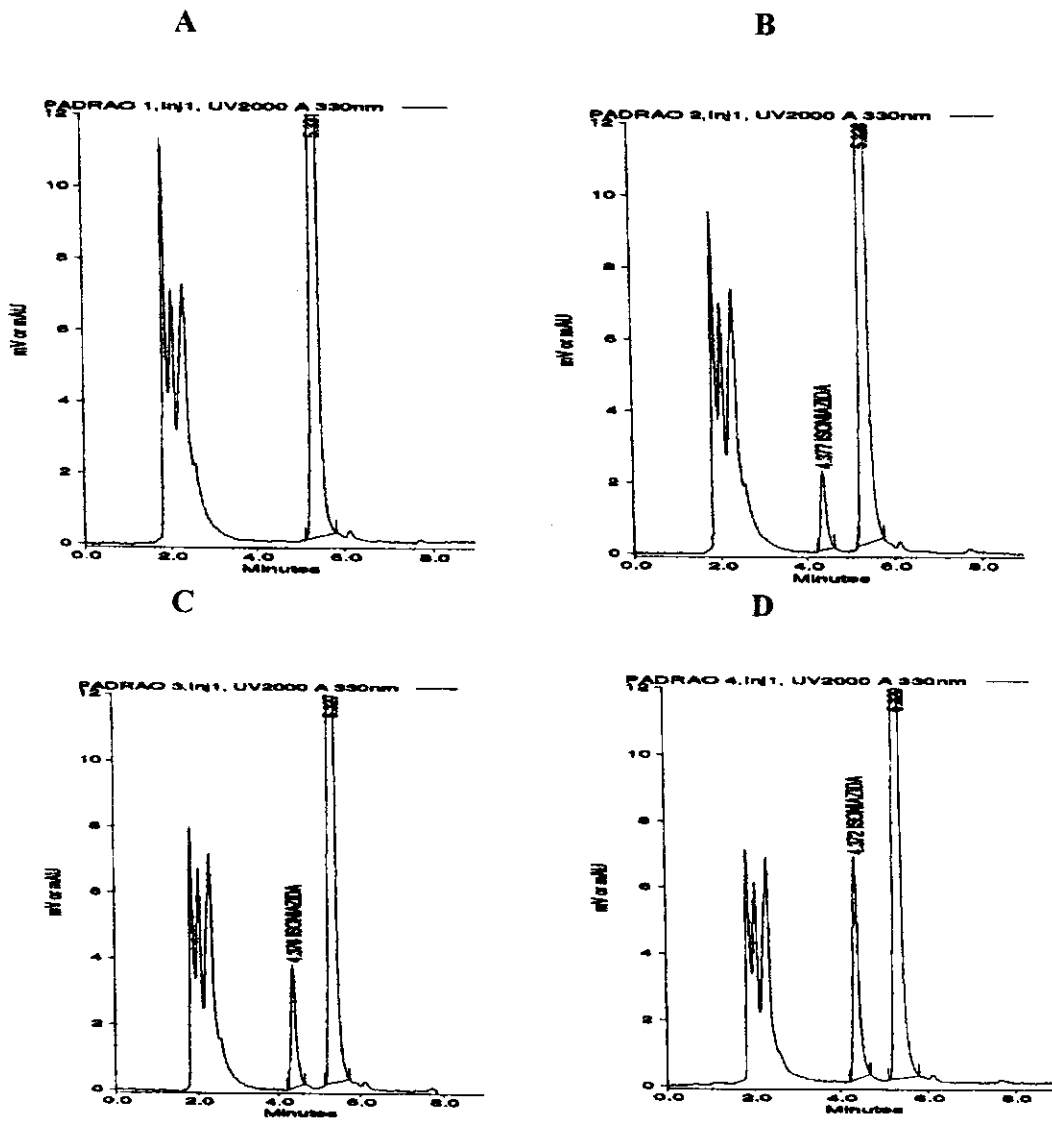


Figura 2 - Cromatogramas das amostras de leite utilizadas como padrão, adicionadas respectivamente de 0 (A), 150 (B), 300 (C) e 600 (D) $\mu\text{g/l}$ de uma solução padrão de isoniazida.

4.7 Avaliação da Utilização da HPLC na Rotina de Identificação de Resíduos de Isoniazida no Leite

A utilização da HPLC na rotina de detecção de resíduos de isoniazida no leite foi avaliada pela sua praticidade (facilidade de realização da técnica), rapidez (número de amostras possíveis de serem testadas por dia) e sensibilidade (quantidade mínima detectável).

4.8 Análises Estatísticas

A comparação das médias das concentrações de resíduos de isoniazida no leite, da relação entre o peso e produção de leite dos animais e concentração de resíduo de isoniazida excretada e do efeito da pasteurização sobre as concentrações de resíduos deste fármaco no leite de animais tratados foram realizados pelos testes de t de Student, de Student-Newman-Keuls (SNK) e de Tukey utilizando $p < 0,05$ como significativo (Snedecor & Cochran, 1980). Também foi realizado uma análise de regressão das concentrações de resíduos de isoniazida após pasteurização (Snedecor & Cochran, 1980).

5 RESULTADOS

As Figuras 3 A e B mostram cromatogramas de amostras de leite do animal 01, respectivamente antes da administração da droga no dia -3 do experimento, e após um dia (± 24 h) da primeira administração de isoniazida, no dia 1 do experimento. Pode-se observar a presença do pico, de isoniazida em 4.429 minutos de retenção, entre os picos do ácido tricloroacético e do cinamaldeído, 24 horas após a administração da droga (Figura 3 B), e a ausência da droga no leite do animal 01 antes da droga ser administrada (Figura 3 A).

Perfis semelhantes ao demonstrado para o animal 01 no dia -3 do experimento, foram encontrados para todos os animais nos dias -3, -2, -1 e 0, quando não houve presença de isoniazida no leite destes antes de se iniciar as administrações da droga (Figura 3 A, Tabela 2).

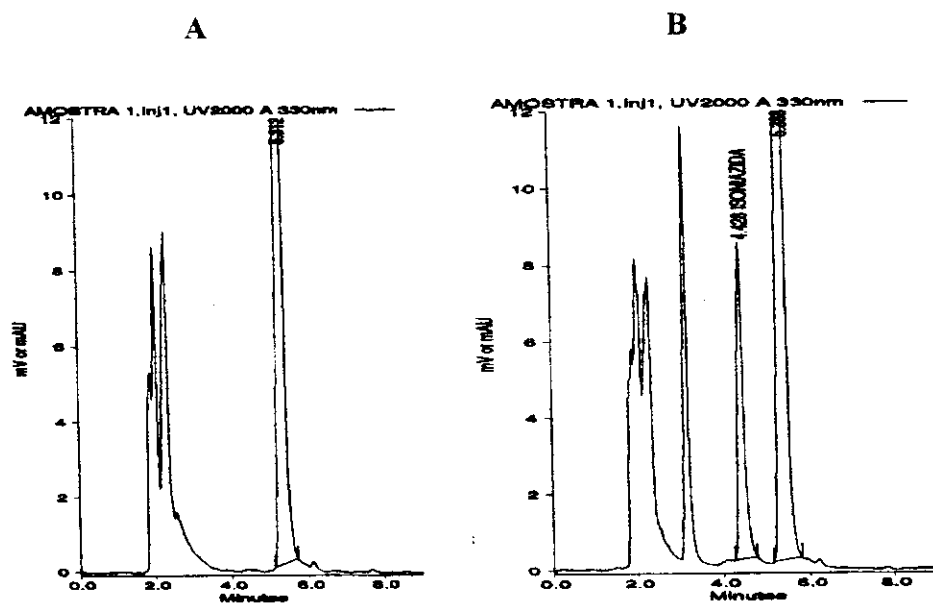


Figura 3 - Cromatograma da pesquisa de isoniazida no leite do animal 01 no dia -3 antes da administração da droga - concentração $0,0 \mu\text{g/l}$ - (A) e cromatograma da pesquisa de isoniazida no leite do animal 01 no dia 1 após a administração de 25 mg/kg/dia de isoniazida - $767,3 \mu\text{g/l}$ - (B).

As concentrações médias diárias de resíduos de isoniazida amostras de leite, coletadas dos animais durante o experimento, assim como a comparação entre elas, encontram-se na Tabela 2.

Tabela 2 - Concentração média de resíduos de isoniazida no leite de animais tratados.

Dia	Tratamento ¹	Concentração média de isoniazida no leite ($\mu\text{g/l}$) ²	Comparações entre as médias ³
-3		0	-
-2		0	-
-1		0	-
0	T	0	E
1		1111.36	B C
2	T	53.46	E
3		908.53	C D
4	T	82.02	E
5		1595.30	A
6		170.01	E
7	T	41.65	E
8		928.14	C D
9	T	70.82	E
10		759.60	D
11	T	95.43	E
12		1323.98	B
13		152.98	E
14		40.32	E
15		0	-
16		0	-
17		0	-

1-T-Aplicação de isoniazida na dosagem de 25 mg/kg/dia de peso vivo. (Langenegger et al, 1991b)

2-Concentração média de isoniazida no leite dos animais experimentais por dia do experimento (média)

3-Teste de médias, SNK e Tukey, com erro de 5%, onde letras diferentes significam diferença estatística entre as médias.

Há uma flutuação nos resíduos de isoniazida no leite dos animais em função do tempo após a administração da droga. Um dia (± 24 h) após a administração da isoniazida houve um aumento significativo, nas concentrações da droga no leite dos animais tratados apresentando uma média de 1104,48 $\mu\text{g/l}$, decrescendo significativamente para uma média de 104,12 $\mu\text{g/l}$, dois dias (± 48 h) após a administração (Tabela 2).

Nas condições de tratamento utilizadas, o período de eliminação de isoniazida no leite após o término do período de administração da droga, assim como as variações de eliminação da droga durante o tratamento, apresentam um mesmo padrão para todos os animais do experimento (Figura 4) apesar das variações individuais apresentadas. A partir do dia 15 do experimento, quarto dia após a última administração da droga, realizada no dia 11 do experimento, não foram identificados resíduos de isoniazida no leite dos animais tratados (Tabela 2).

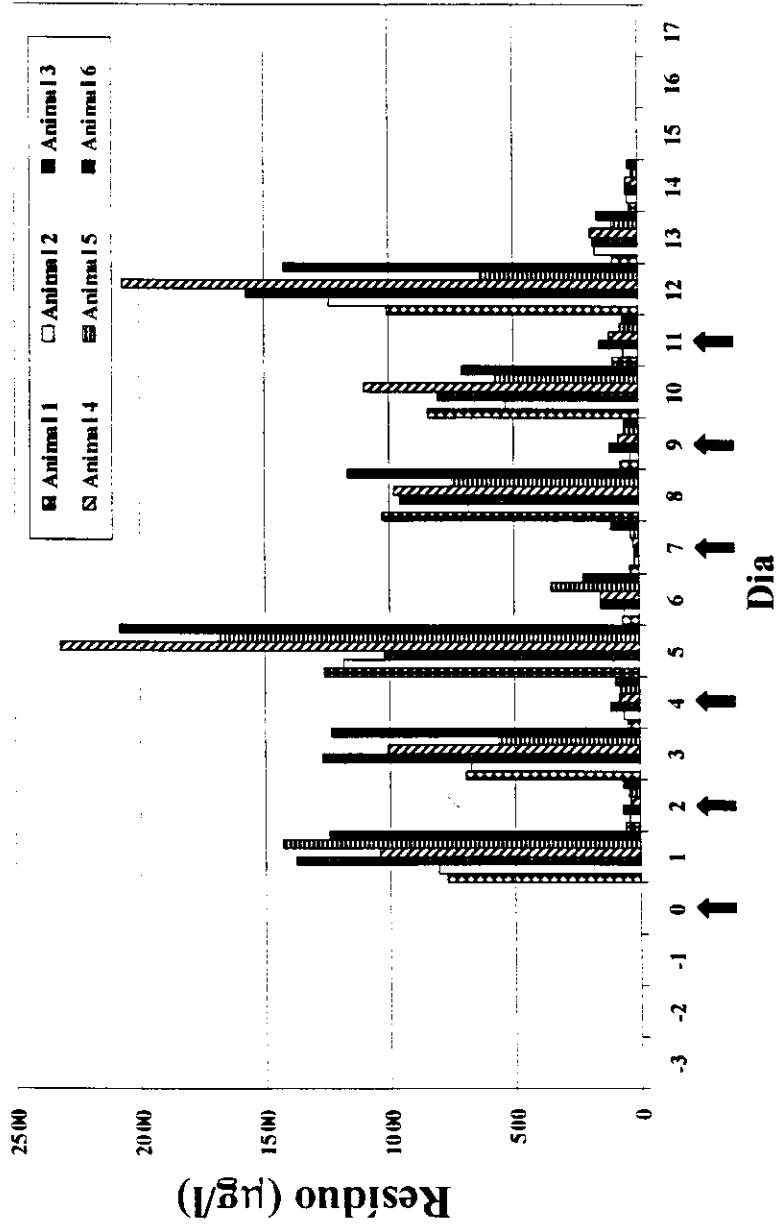


Figura 4 - Resíduos de isoniazida no leite de animais tratados com 25 mg/kg/dia. As setas indicam os dias onde houve administração da droga.

A Tabela 3 apresenta o peso dos animais experimentais à época do experimento, a sua produção total de leite durante o período do experimento, ou seja, do dia zero ao dia quinze do experimento, o cálculo da produção de leite dos animais por quilo de peso vivo, que é realizado pela produção total de leite de cada animal dividida pelo seu peso. Foi então calculada uma relação entre o resíduo acumulado, que é a concentração de isoniazida no leite, dada em $\mu\text{g/l}$, vezes as suas produções de leite diárias, que resulta no total de isoniazida eliminada no leite de cada animal por dia, isto multiplicado pela produção de leite por quilo de peso vivo. Isto nos apresenta uma relação entre o peso, a produção de leite e a quantidade da droga eliminada no leite dos animais. Foi então realizada uma comparação entre estas, onde diferentes letras representam diferença significativa.

Tabela 3 - Relação entre o peso, a produção de leite e a excreção de isoniazida no leite de animais tratados com uma dose de 25 mg/kg/dia de isoniazida.

Animal	Peso (kg) ¹	Prod. Leite (kg) ²	Prod. Leite por kg de peso ³	Relação resíduo acumulado X produção de leite ⁴	Comparações entre os resíduos ⁵
4	435	94,8	0,21	252350.8	A
6	420	104,5	0,24	227932.8	B
3	335	101,2	0,30	164793.2	C
5	400	120,5	0,30	160251.4	C
1	375	105,3	0,28	143927.8	D
2	330	107,9	0,32	115915.6	E

1-Peso dos animais experimentais a época do experimento.

2-Produção total de leite dos animais experimentais durante o período do experimento (dia 0 a dia 15).

3-Cálculo da produção de leite dos animais por quilo de peso vivo (produção total de leite dividida pelo peso dos animais).

4-Relação entre o resíduo acumulado (concentração de isoniazida no leite X produção de leite) e sua produção de leite por quilo de peso vivo.

5-Comparações da (relação entre o resíduo acumulado e a produção de leite por quilo de peso vivo) entre os animais, onde diferentes letras representam diferenças significativas entre as relações.

A média de produção diária de leite do conjunto dos animais do experimento, durante os 21 dias de duração do experimento, foi de 39,42 kg de leite/dia. Esta mistura do leite de todos os animais tratados, após a coleta das amostras de leite in natura, foi submetida à pasteurização rápida, durante 09 dias do experimento. A concentração de isoniazida na mistura de leite antes e após a pasteurização pode ser verificada na Tabela 4 e Figura 5.

Todas as amostras de leite após pasteurização apresentaram reação negativa a prova de fosfatase alcalina e positiva à prova de peroxidase, evidenciando que as amostras foram adequadamente pasteurizadas (Brasil, 1981).

As concentrações de isoniazida no leite após a pasteurização sofreram uma redução significativa em relação ao leite "in natura" ($t= 2,25$, $p= 0,01$ e $gl= 8$), apresentando uma redução média de 47,07% com intervalo de 10,8 a 100% (Tabela 4 e Figura 5). A análise de regressão da redução da concentração da isoniazida após a pasteurização do leite resulta na equação $Y= 26,20 + 0,49 * X$, com $r^2= 0,76$ e $p= 0,001$.

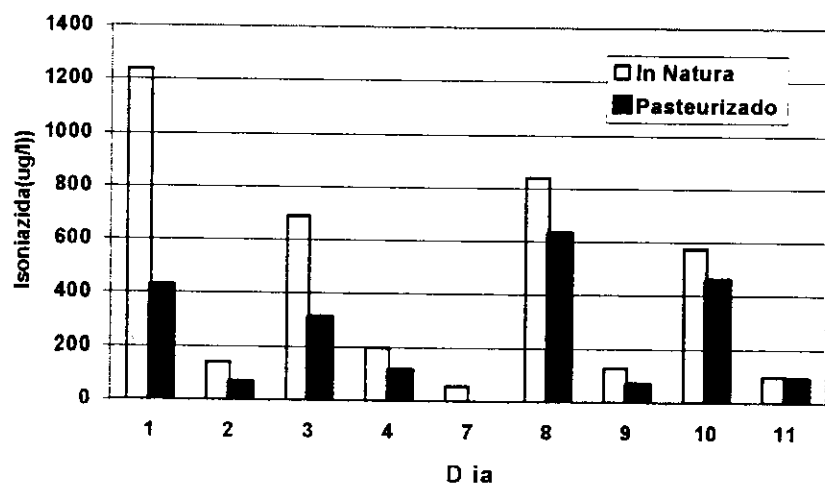


Figura 5 - Comparação entre a concentração de isoniazida no leite antes e após a pasteurização.

Tabela 4 - Comparação entre a concentração de resíduos de isoniazida no leite antes e após a pasteurização.

Dia	Concentração de isoniazida no leite ($\mu\text{g/l}$)			Porcentagem de Redução
	in natura	Pasteurizado	Redução	
1	1236,9	423,88	813,02	65,73 %
2	139,3	62,522	76,778	55,11 %
3	687,51	307,21	380,3	55,31 %
4	196,48	113,57	82,91	42,19 %
7	52,067	0	52,067	100,00 %
8	839,17	629,51	209,66	24,98 %
9	127	65,078	61,922	48,75 %
10	574,47	455,13	119,34	20,77 %
11	96,245	85,848	10,397	10,80 %
Média	-	-	-	47,07 %

A utilização da Cromatografia Líquida de Alta Eficiência na rotina de identificação de resíduos de isoniazida no leite foi considerada de fácil realização, sendo uma técnica rápida, eficiente e com uma boa sensibilidade, sendo a quantidade mínima detectada nas amostras deste experimento de 19,85 $\mu\text{g/l}$.

6 DISCUSSÃO

A rápida eliminação da isoniazida no leite de bovinos tratados foi observada no presente estudo, onde as concentrações máximas de isoniazida foram evidenciadas um dia (± 24 h) após a administração da droga. Além disto, foi observado no presente trabalho que após quatro dias da última administração a concentração de isoniazida estava abaixo da sensibilidade analítica do método de detecção empregado ($0,1 \mu\text{g/l}$) (Defilippi et al., 1995). Apesar das diferenças nas dosagens e modo de administração utilizados, esses resultados podem ser comparados com os de Leschiera et al.(1993) e os de Defilippi et al.(1995), segundo os quais a isoniazida pode ser eliminada rapidamente no leite e no sangue dos bovinos, apresentando níveis máximos cinco a sete horas após sua administração e que esta ainda pode ser identificada quatro a cinco dias após a última administração da droga.

Comparando-se a concentração média da droga no leite obtida um dia após a administração de uma suspensão aquosa da isoniazida, $1111,36 \mu\text{g/l}$, na dose de 25 mg/kg/dia , com os dados de Leschiera et al. (1993) que obtiveram um dia após a administração de isoniazida misturada na ração uma concentração média da droga de $575 \mu\text{g/l}$ no leite dos animais, na dose de 10 mg/kg/dia , pode-se

considerar as concentrações de resíduos de isoniazida identificadas no leite, no presente estudo equivalentes aos encontrados por Leschiera et al, 1993, não havendo diferença quanto as vias de administração da droga na concentração de resíduos no leite.

A eliminação da isoniazida no leite obedece um padrão de flutuação, com níveis máximos um dia após a administração e redução dois dias pós-aplicação, não havendo diferença significativa entre os dias seguintes à administração e entre os segundos dias após a administração de isoniazida, com exceção dos dias 5 e 12 do experimento (Tabela 2). Entretanto, vale ressaltar que as amostras dos dias 5 e 12 do experimento tiveram que ser congeladas a -20°C e ser analisadas dois dias depois, devido a problemas técnicos durante os fins de semana. Pode-se observar em Lischiera et al. (1993), que a comparação entre a concentração de isoniazida em leite de bovinos tratados, "in natura" e congelado a -20°C por seis meses, que as amostras tiveram, após seis meses de congelamento, variações em suas concentrações de resíduo de $-13,3\%$ a $+11,3\%$.

Segundo Kleeberg et al. (1961), quanto maior a produção de leite das vacas menor seria a concentração de isoniazida residual no leite destas, possivelmente por apresentar uma maior diluição. Como pode ser observado na Tabela 3, calculando-se uma relação entre o

peso dos animais, suas produções de leite e o resíduo de isoniazida acumulado, nota-se que o peso dos animais, em função do qual a dose de isoniazida foi calculada, junto com suas respectivas produções de leite, têm influência na quantidade de resíduo de isoniazida eliminado no leite de bovinos. O animal número 4 que apresentou a menor produção de leite total durante o experimento, 94,8 kg de leite, e o maior peso, 435 kg de peso vivo, consequentemente recebeu a maior dose de isoniazida dentre os animais experimentais. Isto levou a uma maior concentração da droga no leite, traduzida por uma maior quantidade de resíduo de isoniazida eliminado. Pode-se observar uma relação inversa no animal número 2, que apresentou o menor peso, 330 kg, e a maior produção de leite, 107,9 kg de leite, recebendo a menor dose de isoniazida dentre os animais experimentais, levando a uma menor concentração da droga no leite.

Submetendo as amostras da mistura do leite de todos os animais a pasteurização houve uma diminuição na concentração residual da isoniazida, mas não o seu total desaparecimento, como relatado por Kleeberg et al (1961). Estes autores sugerem que a maioria dos diferentes procedimentos por ele utilizados como pasteurização, aquecimentos e armazenagens, resultaram no desaparecimento total da isoniazida do leite. Entretanto todas as determinações foram

realizadas com uma técnica espectrofotométrica de identificação de isoniazida no leite, sendo 107,0 $\mu\text{g/l}$ a menor quantidade identificada durante o experimento, isto 17 horas após a sua administração (Kleeberg et al, 1961). Já a técnica de HPLC empregada no presente trabalho apresenta uma sensibilidade bem mais alta (0,1 $\mu\text{g/l}$) segundo Defilippi et al. (1994), sendo a menor concentração de isoniazida no leite de bovinos tratados identificada durante o experimento de 19,85 $\mu\text{g/l}$.

Lass e Bunger (1953), reportaram uma eliminação de isoniazida em leite humano após a administração por via oral de 200 mg da droga (para uma pessoa de 60 kg a dose seria de 3,6 mg/kg/dia) foram encontrados em média 2000 $\mu\text{g/l}$ de resíduo de isoniazida em amostras coletadas duas horas após a administração e 5000 $\mu\text{g/l}$ sete horas após esta. Estes pediatras concluíram que o montante de 2000 $\mu\text{g/l}$ de isoniazida no leite não seria suficiente para causar algum efeito maléfico em bebês.

Kleeberg et al., 1961 verificou que a administração diária de isoniazida em bovinos nas dosagens de 10 mg/kg/dia e 20 mg/kg/dia determinam uma eliminação no leite de 240 $\mu\text{g/l}$ e de 400 $\mu\text{g/l}$, respectivamente. Considerando-se que uma criança consome meio

litro de leite por dia, deverá ingerir 0,1 a 0,2 mg de isoniazida por dia (Kleeberg et al., 1961).

No presente estudo a média da concentração residual de isoniazida no leite dos animais tratados, com uma dose de 25mg/kg/dia, considerando-se apenas os dias em que houve presença de resíduo no leite, foi de 523,82 µg/l com uma variação de 1595,30 a 40,32 µg/l (Tabela 2).

Considerando-se que apenas o leite de animais tratados está sendo analisado, se considerarmos que nem todos os animais de uma fazenda estariam sendo submetidos ao tratamento, a concentração de isoniazida no leite total da fazenda tenderia a diminuir por causa do fator diluição, isto é quando se unir o leite dos animais sendo submetidos a tratamento e os que não estão. Após isto, haveria a pasteurização que diminuiria ainda mais esta concentração residual, sendo que o seu montante poderia não ter significância na saúde humana ou para qualquer medida no que diz respeito a erradicação da Tuberculose bovina. Apesar disto, deve ser enfatizado que a legislação brasileira “não permite a utilização de leite para consumo humano que apresente elementos estranhos a sua composição normal (Art. 542) ou ao qual for adicionado de substâncias

conservadoras ou de qualquer elementos estranhos a sua composição (Art.543)” (RIISPOA, 1997).

Estas sub-doses de isoniazida ingeridas na alimentação, como de qualquer outro agente antimicrobiano, podem levar ao aparecimento de amostras de *Mycobacteria* resistentes a isoniazida. Casos de pacientes infectados com o vírus HIV e com *M. bovis* resistente a isoniazida já foram descritos (Blázquez et al, 1997). Este fenômeno de aumento de resistência às drogas é uma consequência de programas de controle de Tuberculose mal executados e enfocados de forma inapropriada, tendo se amplificado e acelerado devido a epidemia de HIV. As cepas resistentes a drogas são tão contagiosas quanto os bastonetes normais e os índices de cura de pelo menos 95%, que podem ser conseguidos na infecção por bastonetes sensíveis, caem para 70% ou menos quando ocorre resistência a isoniazida e rifampicina (Snider et al, 1994). Por isto, cuidados devem ser tomados para se evitar o uso indiscriminado e sem acompanhamento técnico do tratamento da Tuberculose bovina com isoniazida.

7 CONCLUSÕES

- A identificação de resíduo de isoniazida no leite de bovinos pela Cromatografia Líquida de Alta Eficiência apresentou-se como uma técnica prática, rápida e sensível, adequando-se a rotina laboratorial da detecção desta droga;
- O resíduo de isoniazida no leite de bovinos tratados com a dose de 25mg/kg/dia em dias alternados apresenta uma variação cíclica com picos no primeiro dia após administração da droga e queda dois dias após;
- Quatro dias após a última administração da droga não foi mais possível, pela técnica utilizada, a identificação de resíduos de isoniazida no leite;
- A quantidade total diária de resíduo de isoniazida no leite é influenciada pelo peso e produção de leite dos animais;
- A pasteurização leva a uma diminuição das concentrações de isoniazida no leite identificadas pela HPLC.

8 SUMMARY

High Performance Liquid Chromatography (HPLC) was used in the identification of Isoniazid (Hydrazid Isonicotinic Acid) in milk of cattle treated with 25 mg/kg/day every other day. The effect of pasteurization was also verified on the residual concentration of the drug in the milk of these animals. Excretion of the drug on the milk showed a cyclical variation, with an average increase of 1104,48 µg/l one day after application of the drug, and an average decrease after two days of application for 104,12 µg/l. The technique used did not identify any residue of isoniazid in the milk four days after the last application of the drug. It was observed that the weight and the milk production of the animals studied influenced the amount of drug excreted. Pasteurization decreased, the residue of isoniazid in the milk by an average of 47,07%.

Key Words: Bovine Tuberculosis, Isoniazid, HPLC.

9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BLAZQUEZ, J., MONTEROS, L.E.E., SAMPER, S., MARTIN, C., GUERRERO, A, COBO, J., EBDEN, J.V., BAQUERO, F., MAMPASO, E.G. Genetic characterization of multidrug-resistant *Mycobacterium bovis* strains from a hospital outbreak involving human immunodeficiency virus-positive patients. **J. Clin. Microbiol.** v.35, nº 6, p.1390-1393. 1997.
- BRASIL. Decreto Nº 24.548 - de 03 de Julho de 1934. Regulamento do serviço de defesa sanitária animal. cap. VI, art. 63, p. 9.
- BRASIL. Lei Nº 569, de 21 de Dezembro de 1943. art. 3, p. 27.
- BRASIL. Ministério da Agricultura. **Métodos analíticos oficiais para controle de produtos de origem animal e seus ingredientes II.** Métodos físicos e químicos. Brasília: LANARA, 1981. P. irreg.
- BROMBERG, Y.M., SALZBERGER, M., BRUDERMAN, J. The excretion of INH in human milk. **Tubercle.** v.25, n.10, p.263, 1954.
- CAMURRI, M. Sul passaggio della idrazide dell'acido isonicotinici nel latte. **Boll. Soc. Ital. Sper.** v.28, n.11, p.1738, 1953.
-

- CERRUTI, C.G., QUESADA, A., CORCIONE, B. Sull "attività dell" idrazide dell'acido isonicotinico (INI) nella infezione tubercolare bovina. **Atti Soc. Ital. Sci. Vet.** v. 15, p. 775-786.1961.
- CERRUTI, C.G., QUESADA, A., CORCIONE, B., Ulteriore indagini sull'attività dell'idrazide dell'acido isonicotinico(INI) nella infezione tubercolare bovina in campo pratico. **Atti Soc. Ital. Vet.** v.16, p. 513-522. 1962.
- COSIVI, °, GRANGE, J.M., DABORN, C.J., RAVIGLIONE, M.C., FUJIKURA, J., COUSINS, D., ROBINSON, R.A., HUCHZERMEYER, I.T.F.A.K., KANTOR, I., MESCLIN, F.-X. Zoonotic tuberculosis due to *Mycobacterium bovis* in developing countries. **Emerg. Infect. Dis.**, v.4, p. 59-70, 1998.
- DEFILIPPI, A., PIANCONE, G., LAIA, R.C., TIBALDI, G.P. An HPLC screening method for the detection of isonicotinic acid hydrazide in cattle milk. **Cromatgr.** v.40, n.3/4, p.170-174, 1995.
- DEFILIPPI, A., PIANCONE, G., TARTAGLINO, L., VIRETTO, A., TIBALDI, G.P. High-performance liquid chromatography with UV detection and diode-array UV confirmation of isonicotinic acid hydrazide in cattle. **Jour. Chromato.**, B 656, p. 466-471, 1994.

- FERREIRA NETO & J.S., BERNARDI, F. O controle da tuberculose bovina. **Higiene Alimentar**. v. 11, n° 47, p. 9-13, 1997.
- FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. In: **Animal Health Year Book: Roma/FAO-WHO-OIE**. 1994.
- KELLY, J.M., POER, R.B. The estimation of isonicotinic acid hydrazide (Nydrazide) in biological fluids. **Amer. Rev. Tuberc.** v.65, p.484, 1952.
- KESSLER, H.G. Food engineering and dairy technology. Germany: Verlag A. Kessler, 1981, 654p.
- KLEEBERG, H.H. The Treatment of Tuberculosis in man and animals with isoniazid. **J.S. Afr. Vet. Med. Ass.** v. 30, p. 69-73. 1959.
- KLEEBERG, H.H., GERICKE, J.J., WEYLAND, H. The excretion and stability of isoniazid in cow's milk. **J.S. Afr. Vet. Med. Ass.** v.32, p. 77-83. 1961.
- KLEEBERG, H.H., WEYLAND, H. Isoniazid administration and blood level in cattle. **J.S. Afr. Vet. Med.** 1961.
- KLEEBERG, H.H. & WORTHINGTON, R.W. A modern approach to the control of bovine tuberculosis. **J.S. Afr. Med. Vet. Ass.** v. 34, p. 383-391. 1963.
-

- KLEEBERG, H.H. Chemotherapy and chemoprophylaxis of tuberculosis in cattle. **Adv. Tuberc. Res.** v.15, p. 189-196. 1966.
- LANGENEGGER, J., CAVALCANTE, M.I., LIRA, A.D. Tratamento massal da Tuberculose Bovina com Isoniazida. **Pesq. Vet. Bras.**, v. 11, nº 3/4, p.21-23, 1991a.
- LANGENEGGER, J., LEITE, G.O., OLIVEIRA, Jr, J. Tratamento Intermitente da Tuberculose Bovina com Isoniazida. **Pesq. Vet. Bras.**, v. 11, nº 3/4, p.55-59, 1991b.
- LASS, A., BUNGER, P. Untersuchungen über die diffusion von isoniazid in den fetalen kreislauf, das fruchtwasser und die muttermilch. **Klin. Wschr.** v.31, p.606, 1953.
- LESCHIERA, M., DEFILIPPI, A., LAIA, R.C., TIBALDI, G.P. Pesquisa de hidrazida do ácido isonicotínico no leite de bovinos tratados ilegalmente. **Sel. Vet.** v.34, p.679-687, 1993.
- MANDELL, G.L., PETRI JR., W.A. Fármacos utilizados na quimioterapia da tuberculose, da doença pelo complexo *Mycobacterium avium* e da lepra In: HARDMAN, J.G., LIMBIRD, L.E. (ed), **As Bases Farmacológicas da Terapêutica**. ED 9, Nashville, Tennessee, 1996, 850-863p.

- MOTA, P.M.P.C., NAKAJIMA, M. Tuberculose bovina In: CHARLES, T.P.; FURLONG, J. eds. **Doenças dos bovinos de leite adultos**. Coronel Pacheco, EMBRAPA- CNPGL, 1992. p 96 - 122.
- MORRETI, B., PEDINI, B. Primi rilievi sul trattamento, com idrazide dell'acido isonicotinico, de forme acute de tuberculosi bovini, **Nuova. Vet.** v.28, p. 345-351. 1952.
- MUCI, G. Considerazione i relivi clinici sull'applicazione dell'idrazide nella tubercolosi bovina. **Zoot. Vet.** v.8, p. 278-283. 1953.
- NAI, D.D., CRESPI, A. Sulla negativizzazione della reazone tubercolinica nei bovini trattati con isoniazide. **Atti. Soc. Ital. Sci. Vet.** v. 12, p. 640-643. 1958.
- NAI, D.D., PERINI, G. Ulteriori osservazioni sulla negativizzazione allergica dei bovini tubercolino-positivi trattati com isoniazide. **Atti Soc. Ital. Sci. Vet.** v. 14, p. 612-616. 1960.
- PITOMBO, L. Problemas escondem perigo da Tuberculose. **DBO Rural.** nº 4, p. 38-42, 1997.
- QUATTROCCHI, O.A., ANDRIZZI, S.A., LABA, R.F. Introducción a la HPLC aplicacion y práctica. Buenos Aires, 1992, 407p.

- REGULAMENTO DA INSPEÇÃO INDUSTRIAL E SANITÁRIA
DE PRODUTOS DE ORIGEM ANIMAL. Brasília/DF, p. 131.
1997.
- RUFFO, G. Ricerche sul passaggio dell'isoniazide nel latte. **Arch. Vet. It.** V.16, p.245-254, 1965.
- SANDRO, C.; La cura dei bovini tubercolotici com la idrazide dell'acido isonicotinico unita a sali di calcio e di magnesio. **Cli. Vet. Milano**, v. 77, p. 79-89. 1954.
- SNEDECOR, G.W., COCHRAN, W.G. Statistical methods, Iowa, Ed. The Iowa State University Press, 1980. 507p.
- SNIDER, D.E., RAVIGLIONE, M., KOCHI, A. Global Burden of Tuberculosis. Tuberculosis: pathogenesis, Protection, and Control. New York, Ed. Barry r. Bloom, 1994, p. 3-11.