

**MARION FERREIRA GOMES**

**AVALIAÇÃO DA EFICIÊNCIA DE "KITS" DESTINADOS À DETECÇÃO DE RESÍDUOS  
DE ANTIMICROBIANOS EM LEITE DE VACAS TRATADAS COM IVERMECTINA E  
ABAMECTINA**

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

Área: Tecnologia e Inspeção de Produtos de  
Origem Animal.

Orientador: Prof. Leorges Moraes da Fonseca

**Belo Horizonte - MG  
Escola de Veterinária - UFMG  
2005**

G633a Gomes, Marion Ferreira, 1944-

Avaliação da eficiência de "kits" destinados à detecção de resíduos de antimicrobianos em leite de vacas tratadas com Ivermectina e Abamectina / Marion Ferreira Gomes. – 2005.  
39p.: il.

Orientador: Leorges Moraes da Fonseca

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária

Inclui bibliografia

1. Leite – Análise – Teses. 2. Leite – Qualidade – Teses. 3. Resíduos de antibióticos – Análise – Teses. 4. Ivermectina – Teses. 5. Abamectina – Teses. I. Fonseca, Leorges Moraes da. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Escola de Veterinária. III. Título.

CDD – 637

Dissertação defendida em 08 de julho de 2005 pela Comissão Examinadora constituída por:

---

Orientador Prof. Leorges Moraes da Fonseca

---

Profa. Mônica Cerqueira Pinho

---

Prof. Reinaldo Travassos

---

Dra. Claudia Inez Pereira Lima

---

Profa. Edna Froeder Arcuri

PÁGINA EM BRANCO

---

## AGRADECIMENTOS

---

À Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais, pela oportunidade de realizar este curso.

Ao Colegiado de pós-graduação, secretaria e professores pela organização e ensinamentos.

Ao Serviço de Inspeção Federal – SIF ao qual dediquei minha vida profissional.

Ao Prof. Leorges Moraes da Fonseca, pela orientação segura e precisa, pelo coleguismo, pela amizade, pela paciência e pela dedicação em todos os momentos, tornando possível a conclusão deste trabalho.

À Dra. Claudia Inez Pereira Lima, pela compreensão, desprendimento, pela ajuda em todos os momentos e pela participação nesta banca.

À Pesquisadora Dra. Edna Froeder Arcuri pela sua presença nesta banca, pela amizade, e pelos trabalhos realizados conjuntamente na EPAMIG- CT- Instituto de Laticínios Cândido Tostes, quando fomos colegas docentes.

À Prof. Monica Maria O. Pinho Cerqueira, pela participação em todas as avaliações dos seminários, nesta banca e pelo seu trabalho incessante na melhoria da qualidade do leite.

Ao Prof. Renaldo Travassos Martins, pela competência com que sempre conduziu os seminários, pela sua compreensão, dedicação e como membro desta banca.

À Dra. Josefa Abucater Lima, do Laboratório do MAPA, em Pedro Leopoldo pela sua colaboração que muito engrandeceu este trabalho.

Ao Prof. Ronon Rodrigues, pela sua presença nas avaliações e pelo trabalho que desenvolve no Laboratório de Controle de Qualidade do Leite.

Aos colegas e funcionários do Serviço de Inspeção Federal de Juiz de Fora, pelo incentivo.

À EPAMIG – CT- Instituto de Laticínios Cândido Tostes, berço de minha formação laticinista, minhas homenagens.

À FIPLAC – Faculdades Integradas do Planalto Central, pela motivação.

À Prof. Regina Célia de Oliveira Procópio, pelo apoio.

À colega Cristiana Salaberga Procópio Fonseca, pelo apoio e ajuda constante durante todo o curso.

Ao meu filho Pedro Henrique Silva Gomes, pela colaboração proporcionada no decorrer do trabalho, sempre ao meu lado me impulsionando para continuar.

À minha irmã Marília Ferreira Gomes, pela colaboração.

À Pesquisadora Marlice Teixeira Ribeiro pela cooperação e incentivo.

À Deputada Federal Edna Macedo pela prestimosa ajuda.

Ao Dr. Rui Vargas, ex. Diretor do DIPOA, pelo seu alto espírito de compreensão.

Aos amigos do Departamento de Tecnologia e Inspeção de Produtos de Origem Animal, da Escola de Veterinária da UFMG, pelo apoio recebido em todos os momentos.

À amiga Andréia Leão Carneiro, pela colaboração.

Aos Laboratórios Madasa do Brasil, Christian Hansen, Hexis Científica e Global Food (DSM) pela doação dos “Kits analíticos”.

Ao Sr. Geraldo Guadalupe, pela cessão dos animais para o experimento.

Ao Sr. Sylas de Oliveira Kaizer, pela colaboração.

À Joana Ferez pela prestimosa ajuda na finalização desta dissertação

A todos que colaboraram para a realização deste trabalho.

Aos colegas do curso.

Carinhosamente e em especial homenagem: a minha mãe, Olga.

Aos meus filhos, Saulo Marion e Pedro Henrique.

Ao Sindicato dos Produtores Rurais de Mar de Espanha-MG.

A todos os profissionais que se dedicam a melhoria da qualidade do leite no Brasil.

**“Felizes os que sonham: Alimentarão a  
esperança de muitos e correrão o doce  
risco de ver, um dia, seus sonhos  
concretizados.”**

**D.Helder Câmara**

**“Comece fazendo o que é necessário e  
depois o que é possível, e de repente  
você estará fazendo o impossível”**

**São Francisco de Assis.**

---

## SUMÁRIO

---

<b>RESUMO</b> .....	<b>8</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>9</b>
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>10</b>
<b>2. REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	<b>11</b>
2.1. ANTIBIÓTICOS .....	11
E ANTIMICROBIANOS .....	11
2.1.1. <i>Resíduos em leite e derivados</i> .....	11
2.1.2. <i>“Kits” analíticos</i> .....	12
2.2. IVERMECTINA .....	17
E ABAMECTINA .....	17
2.3. CARACTERÍSTICAS DAS IVERMECTINAS, PERÍODO DE CARÊNCIA E EFEITOS À SAÚDE HUMANA .....	19
2.4. SAÚDE PÚBLICA .....	22
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>23</b>
3.1. AMOSTRAGEM E DELINEAMENTO EXPERIMENTAL .....	23
3.2. COMPOSIÇÃO CENTESIMAL .....	24
3.3. CONTAGEM DE CÉLULAS SOMÁTICAS .....	25
3.4. CONTAGEM BACTERIANA .....	25
3.5. ANÁLISE DE RESÍDUOS POR MEIO DOS “KITS” ANALÍTICOS .....	26
3.6. ANÁLISE QUANTITATIVA DE IVERMECTINA E ABAMECTINA .....	26
3.7. ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	26
<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>26</b>
4.1. COMPOSIÇÃO, CONTAGEM DE CÉLULAS SOMÁTICAS E CONTAGEM BACTERIANA .....	26
4.2. ANÁLISE DE RESÍDUOS INIBIDORES POR MEIO DE “KITS” ANALÍTICOS .....	30
4.3. DETERMINAÇÃO DE IVERMECTINA E ABAMECTINA .....	31
<b>5. CONCLUSÕES</b> .....	<b>32</b>
<b>6. CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	<b>33</b>
<b>7. ANEXO: Resultados dos testes para detecção de resíduos inibidores em leite</b> .....	<b>34</b>
<b>8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>36</b>

---

### LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Período de eliminação de alguns antibióticos pelo leite .....	12
Tabela 2. Aspectos dos métodos de diagnóstico para detecção de resíduos em leite .....	16
Tabela 3. Limites máximos de resíduos (Codex Alimentarius, Comunidade Econômica Européia) e tolerâncias (Estados Unidos) para drogas antimicrobianas no leite ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) .....	22
Tabela 4. Composição, contagem de células somáticas (CCS/mL) e contagem bacteriana (UFC/mL) de amostras de leite de vacas submetidas a diferentes tratamentos com ivermectina e abamectina .....	27

---

### LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Sítios de ligação da célula bacteriana para alguns antibióticos e quimioterápicos .....	13
Figura 2. Sistema integrado de detecção de resíduos de antimicrobianos em leite .....	14
Figura 3. Estruturas das avermectinas .....	18
Figura 4. Estrutura básica da abamectina .....	19
Figura 5. Fluxograma experimental .....	24
Figura 6. Variação da composição do leite de vacas tratadas com ivermectina e abamectina, durante o período de 38 dias .....	28
Figura 7. Variação da contagem de células somáticas do leite de vacas tratadas com ivermectina e abamectina, durante o período de 38 dias .....	29
Figura 8. Variação da contagem bacteriana do leite de vacas tratadas com ivermectina e abamectina, durante o período de 38 dias .....	29
Figura 9. Concentração de ivermectina e abamectina no leite de vacas durante o período de 38 dias após tratamento .....	32

## RESUMO

Os limites máximos de resíduos de medicamentos veterinários no leite e derivados têm importância fundamental por serem referência para o comércio internacional, assim como para o estabelecimento de limites seguros que não apresentem riscos ao consumidor. Portanto, para se obter uma matéria-prima isenta de resíduos, é necessário a utilização de métodos de diagnóstico seguros. Os objetivos deste trabalho foram avaliar a eficiência dos “Kits analíticos” para detecção de resíduos de antibióticos, SNAP<sup>®</sup> (Beta-lactam test kit), DELVOTEST SP<sup>®</sup>, CH ATK<sup>®</sup> (single test P&S), BETA STAR<sup>®</sup>, CHARM MRL<sup>®</sup> Test e CHARM SL<sup>®</sup> Test, frente a resíduos de ivermectina e abamectina excretados no leite de animais tratados com esses fármacos e verificar o tempo de carência desses medicamentos no leite. Três lotes de animais, com três animais cada foram avaliados, sendo um lote tratado com ivermectina, outro com abamectina e outro lote controle. Amostras de leite de cada animal foram submetidas a análises com os “kits analíticos”, tendo o controle positivo de um animal com administração de antibiótico (beta-lactâmico) para verificar a eficiência dos “kits”. As amostras foram coletadas antes da administração dos medicamentos, nos quatro primeiros dias após a aplicação e, semanalmente, até 38 dias após o início do tratamento. Cada amostra foi analisada para composição, contagem de células somáticas, contagem bacteriana, presença de resíduos de antimicrobianos. As alíquotas diárias das amostras de cada grupo experimental foram misturadas formando pool para a análise de avermectinas por HPLC (High Performance Liquid Chromatograph). Não houve ocorrência de reação cruzada nos “kits” avaliados. A curva metabólica de excreção das avermectinas foi determinada, com detecção até o 7<sup>o</sup> dia após a administração destes medicamentos.

Palavras-chave: ivermectina, abamectinas, resíduos, qualidade do leite.



## **ABSTRACT**

*The maximum residues limits of veterinary drugs in milk and dairy products are important parameters for international market and to assure safety levels of residues for the consumer. Therefore, to obtain safe milk, it is necessary the utilization of safe diagnostic methods. The objectives of this experiment were to evaluate the efficiency of some analytical kits (SNAP® - Beta-lactam test kit, DELVOTEST SP®, CH ATK® single test P&S, BETA STAR®, CHARM MRL® Test, and CHARM SL® Test) used to detect inhibitors residues in milk obtained from cows administered with ivermectin and abamectin, and to evaluate the curve of excretion of these drugs in the milk. Three groups of cows, with three cows each, were treated with, respectively, ivermectin, abamectin, and the third group was used as a control. Samples were obtained before treatment, in the four following days, and weekly until the 38<sup>th</sup> day. Each milk sample was analyzed for composition, somatic cell count, bacterial count, presence of inhibitor residues, and pools of samples for the different groups in the collect days were analyzed by HPLC to determine levels of ivermectin and abamectin. There was no cross-reaction in the results obtained with the kits for antibiotics. The metabolic excretion curve for avermectins shows that these drugs were eliminated in the milk until the 7<sup>th</sup> day after treatment.*

*Keywords: ivermectin, avermectin, residues, milk quality.*

## 1. INTRODUÇÃO

A produção de leite no Brasil vem crescendo nos últimos anos em aproximadamente 5,8% ao ano, devendo o país, em breve, atingir suas necessidades e, conseqüentemente, gerar mais divisas através da exportação de produtos para o comércio internacional. Para exportar, é necessário que o país seja competitivo no mercado internacional, sendo que isto somente acontecerá por meio da melhoria da qualidade dos produtos, o que, por sua vez, depende da fonte de produção, que precisará produzir uma matéria prima de qualidade. A ausência de resíduos de drogas veterinárias é um dos requisitos de qualidade.

Por sua vez, a indústria laticinista no Brasil vem passando por considerável evolução, tanto na melhoria das condições físicas, como também na instalação de equipamentos modernos capazes de garantir uma melhor higienização, eliminando a contaminação que poderia ocorrer em razão dessa deficiência.

Há também de se levar em conta o esforço do governo federal em adaptar, harmonizar e modernizar a legislação brasileira, tornando-a mais ágil para acompanhar a evolução das novas tecnologias. Isto ocorre pela edição e promulgação de vários Regulamentos Técnicos de Identidade e Qualidade de diversos produtos, e também, com os de equipamentos, que garantem a aquisição de maquinário adequado, condições ideais de processamento e segurança, além de boas condições de higienização.

Ressalta-se que a Instrução Normativa n° 51, de 18 de setembro de 2002, publicada no Diário Oficial da União em 20 de setembro, do mesmo ano, aprovou os Regulamentos Técnicos de Identidade e Qualidade dos Leites tipos “A”, “B”, “C”, leite pasteurizado, leite cru refrigerado, leite cru refrigerado na propriedade rural e seu transporte a granel, estabelecendo parâmetros novos para avaliação da qualidade (Brasil, 2002a). Dentro desses

novos parâmetros, deu-se ênfase à detecção de resíduos de inibidores no leite, com destaque para os antibióticos, devido aos riscos à saúde humana, e à própria indústria de laticínios do país.

Vários métodos rápidos de detecção de inibidores surgiram no mercado e, embora, sejam avaliados oficialmente, necessitam maiores estudos para constatar possíveis interferências de outras drogas na avaliação do seu uso, na indústria, evitando falsos positivos ou erros que possam levar à condenação da matéria prima.

Para que um produto seja utilizado na indústria de laticínios, que funciona sob o regime de Inspeção Federal, é imprescindível que o mesmo esteja autorizado pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, por meio da Secretaria de Defesa Agropecuária, sendo o Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal – DIPOA, que emite a Autorização de Uso de Produto – AUP. Todos os métodos rápidos devem passar por esse processo. Somente após a análise do produto por um Comitê de Técnicos, conforme Resolução n° 02, de 12 de julho de 2002 é que se faz a emissão da AUP, tornando o produto com livre acesso nos estabelecimentos de produtos de origem animal (Brasil, 2002b).

Embora não haja citações na literatura, há preocupação, por parte do setor laticinista, sobre a possibilidade da interferência de outros medicamentos utilizados na área veterinária nos testes para a detecção de resíduos inibidores do crescimento microbiano. Assim, este trabalho visou avaliar a eficiência de “kits” destinados à detecção de resíduos inibidores em leite obtido de vacas tratadas com ivermectina e abamectina, e o tempo de carência dessas drogas no leite produzido.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1. ANTIBIÓTICOS E ANTIMICROBIANOS

#### 2.1.1. Resíduos em leite e derivados

A passagem de moléculas de antibióticos e ou antimicrobianos ao leite é variável, dependendo de sua disponibilidade no sangue, de sua lipossolubilidade e de seu estado de ionização, que é função do coeficiente de partição da substância e do pH do meio. Os antibióticos que são bases fracas, a exemplo das tetraciclina e dos aminoglicosídeos, são mais lipossolúveis e não ionizados no pH do leite (6,4-6,8), difundindo-se muito bem. Os  $\beta$ -lactâmicos são ácidos fracos que são absorvidos pelas membranas celulares em pH 6,0-6,5, sendo menos lipossolúveis e não ionizados no leite e, em geral, precisam ser administrados em formulações oleosas em infusões locais para maior eficiência do princípio ativo (Machado, 1998).

O Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, através da Resolução nº 02, de 12 de julho de 2002, criou o Comitê Técnico Consultivo, para proceder a avaliação dos “kits” analíticos destinados a detecção de microrganismos, resíduos de drogas, medicamentos ou outras substâncias, no processo de Autorização de Uso de Produto – AUP. Esta medida disciplina o uso de “kits” e, assim, garante que o seu funcionamento estará de acordo com o previsto na legislação.

O leite pode conter resíduos de substâncias administradas aos animais ou usadas no ambiente da fazenda, tais como, antimicrobianos, antiparasitários, desinfetantes e detergentes, herbicidas. Os resíduos de antimicrobianos podem ser detectados no leite após o animal ter sido tratado, por qualquer via usual de administração (intramamária, intramuscular, intra-uterina, intravenosa, oral ou

subcutânea). Na vaca leiteira, o emprego mais comum de antimicrobianos é no tratamento de mastites e metrites. Um fato agravante da presença dessas substâncias no leite é que a maior parte delas é resistente à pasteurização, das quais algumas não são inativadas, mesmo quando submetidas a temperaturas acima de 100° C (Hotta, 2003). A presença de resíduos de antimicrobianos no leite preocupa as autoridades sanitárias e a população, devido a ocorrência de reações alérgicas à penicilina, potencial carcinogênico de alguns antimicrobianos (nitrofuranos e sulfametazina), seleção de estirpes bacterianas resistentes e inibição de fermento láctico na indústria.

A Portaria Nº 56, (hoje Instrução Normativa 51/2002) (MAPA), incluiu nos testes obrigatórios do leite cru, a detecção de resíduos de antibióticos do grupo dos  $\beta$ -lactâmicos, que inclui as penicilinas (naturais, semi-sintéticas e de amplo espectro), e as cefalosporinas de primeira, segunda, terceira e quarta geração, estando ainda prevista a inclusão de testes para a detecção de gentamicina e tetraciclina. A efetivação de medidas que coíbam a presença de resíduos de antimicrobianos no leite é desejável e imprescindível, para a garantia da segurança do leite para o consumidor, e para evitar prejuízos à industrialização. Essas medidas devem seguir os padrões e métodos adotados internacionalmente e estarem de acordo com os limites impostos pelo Codex Alimentarius (Brito e Brito, 2001).

O leite com resíduos de antimicrobianos é considerado adulterado e impróprio para o consumo humano, representando riscos para a saúde pública e prejuízos para a indústria de laticínios, com conseqüentes danos econômicos para os setores envolvidos.

Na adoção de um sistema de criação mais intensivo, os animais ficam confinados por mais tempo, favorecendo a transmissão de microrganismos de um animal para o outro, e destes para o meio ambiente. Associando esta realidade ao manejo inadequado na

obtenção do leite, observa-se um conseqüente aumento do índice de mamite no rebanho e, inevitavelmente, medidas terapêuticas são tomadas para o tratamento desta enfermidade. Diferentes tipos de antimicrobianos, combinações, dosagens, vias de aplicação são utilizadas para tratamentos de problemas de saúde do gado leiteiro, como em casos de problemas reprodutivos, respiratórios, locomotores e, principalmente, nas infecções da glândula mamária. Na grande maioria das vezes, a dosagem recomendada, a frequência de tratamento e o período de carência, não são respeitados e o problema se agrava ainda mais pelo uso de medicamentos sem orientação do médico veterinário, e pela questionável origem de alguns medicamentos (Costa, 1996).

Muitas vezes, o produtor, desconhecendo ou ignorando os riscos para a saúde ou agindo de má fé, não querendo se desfazer do leite proveniente de vaca tratada, mistura o leite com resíduos no tanque de resfriamento, juntamente com o leite proveniente de vacas sadias. Este fato, ocorre decorrente da falsa expectativa do produtor, que um efeito de diluição resultará em concentrações não detectáveis (Fonseca, 2003).

O controle de resíduos na indústria laticinista está relacionado com o fato da presença destes resíduos no leite possibilitarem a inibição das culturas lácteas utilizadas no processamento de produtos fermentados, como, o iogurte, outros leites fermentados, manteiga e queijo, causando uma diminuição do rendimento industrial. Está relacionado ainda com o fator qualidade, que condiciona o pagamento de leite ao produtor, além da possibilidade de afetar negativamente a imagem do leite e gerar por parte do consumidor, a rejeição do mesmo e de seus derivados (Machado, 1998).

O período mínimo de eliminação de medicamentos no leite vai depender também do veículo utilizado na produção destes, pela indústria farmacêutica (Tabela 1). A

penicilina, por exemplo, é eliminada no mínimo por três dias em solução aquosa e seis dias na forma de pomada (Costa, 1996).

Tabela 1. Período de eliminação de alguns antibióticos pelo leite

<b>Antibióticos (Via intramamária)</b>	<b>Período mínimo de eliminação (dias)</b>
Penicilina (procaína)	2
Clortetraciclina	6
Oxitetraciclina	4
Cloranfenicol	3
Estreptomina	4

Fonte – Costa (1996)

### 2.1.2. “Kits” analíticos

Os antimicrobianos podem ser divididos em vários grupos, de acordo com o modo de ação sobre os microrganismos. Existem diferentes sítios de ligação entre a célula do microrganismo e os diferentes antibióticos e quimioterápicos. Tais sítios, podem estar localizados na superfície da célula, na própria membrana ou no interior da célula, como em ribossomos (Figura 1).

Desde 1941, quando ocorreram os primeiros relatos sobre os métodos de detecção de resíduos de antibióticos no leite e nos produtos derivados, um número considerável de testes quantitativos e qualitativos vem sendo desenvolvidos (Marshall, 1992). Atualmente, vários são os testes existentes para se detectar os resíduos de antimicrobianos no leite.

De acordo com o resultado, é submetida a verificação, (identificação e quantificação) por meio de testes específicos para cada grupo/substância, por meio de testes imunoenzimáticos, como por exemplo, Penzyme, Teste de Receptor e Imunoensaio ou por meio de análise físico-química, como os testes de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência e Cromatografia Gasosa (Monograph, 1997).

## Sítios de ligação

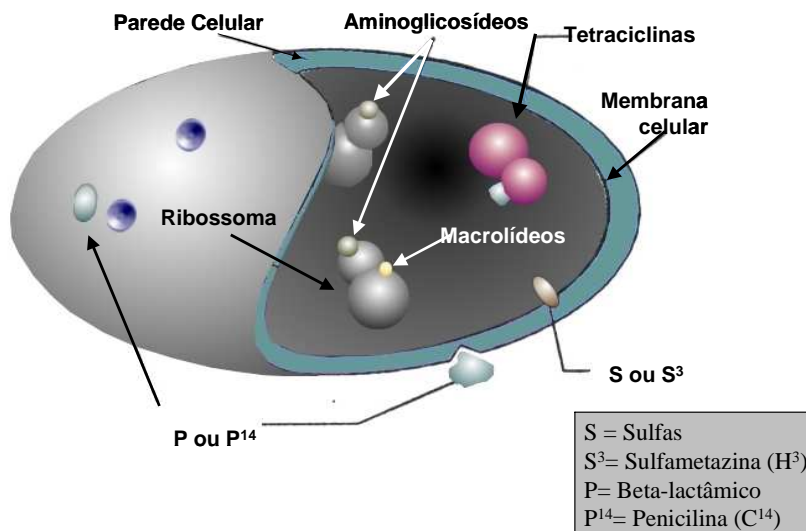


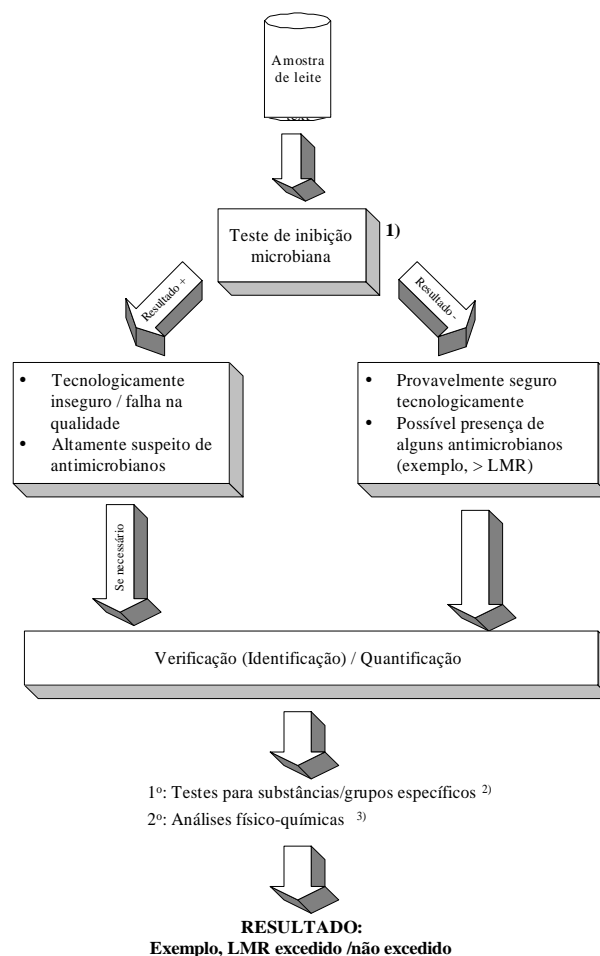
Figura 1. Sítios de ligação da célula bacteriana para alguns antibióticos e quimioterápicos.

Fonte – Charm & Zomer, 1995 (Adaptado por Fonseca, 2003)

Hotta (2003) comparou sete métodos de detecção de resíduos de antimicrobianos no leite (Snap para beta-lactâmicos, Snap para tetraciclina, Charm SL para beta-lactâmicos, Charm SL para tetraciclina, Delvotest SP, ATK P&S single e ATK P&S microplate). Os resultados variaram significativamente, sendo observado que o kit Snap para tetraciclina detectou maior porcentagem de amostras com resíduos (11,5%) ( $P < 0,001$ ), seguido do ATK P&S single (9,5%) e microplate (8,5%). Os métodos imunoenzimáticos (Snap para tetraciclina) e de receptores (Charm SL para tetraciclina) detectaram tetraciclina na concentração de 100 ppb (padrão do controle positivo) enquanto os métodos microbiológicos (Delvotest SP; ATK P&S single e microplate) não foram capazes de detecção. Os kits Delvotest SP, ATK P&S single e ATK P&S microplate detectaram resíduos de antimicrobianos de diversos grupos como beta-lactâmicos, tetraciclina e aminoglicosídeos.

Algumas empresas têm colocado no mercado “kits analíticos” que proporcionam às indústrias possibilidade de detecção de uso, nas propriedades rurais, de drogas veterinárias no leite. Esses “kits”, no entanto, embora sejam aprovados pelo órgão do serviço oficial de inspeção, sendo testados quanto à sensibilidade e especificidade, necessitam serem avaliados sobre possíveis interferentes que podem tornar o resultado falso positivo, trazendo prejuízos para o produtor e para a indústria que deixa de utilizar a matéria prima.

Alguns testes de seleção são baseados na inibição do crescimento microbiano frente a resíduos de substâncias inibidoras. Os testes tradicionais baseados neste princípio podem ser do tipo difusão em ágar, aumento da turbidez, ou ainda, mudança de coloração, utilizando um corante indicador).



- 1) Exemplo: *Bacillus stearothermophilus*, *B.cereus*  
 2) Exemplo: Penase, PABA, Penzima, Teste de Receptor, Imunoensaio  
 3) Exemplo: HPLC, GC, GC/MS

Figura 2. Sistema integrado de detecção de resíduos de antimicrobianos em leite.

Fonte – Pedersen & Suhren, 2000 Adaptado por Fonseca, L.M. 2003

No método baseado na difusão em ágar, o material a ser pesquisado se difunde através de um meio nutriente com base de ágar, que tenha sido uniformemente semeado com esporos de um microrganismo susceptível. Após incubação, por um tempo específico, uma zona de inibição do crescimento indica a presença de inibidores. No método turbidimétrico, o crescimento de um microrganismo indicador, em um meio de cultura líquido transparente, aumenta a turbidez do meio com o tempo. Em ambos métodos, o número de microrganismos viáveis usado é crítico, pois a densidade de crescimento, revelada pelo halo de inibição

ou pela turbidez do meio, é dependente do número inicial de microrganismos. A temperatura de incubação é outra variável a ser rigidamente controlada, pois a multiplicação microbiana é dependente deste fator. No método de difusão, destaca-se também, a importância da porosidade do meio, sendo que menores proporções de ágar resultam em maiores zonas de inibição. Outros fatores importantes incluem a profundidade da camada de ágar, a idade do inóculo, a técnica da adição da amostra, e a presença de outras substâncias na amostra original (Luitz et al., 1996, Romnee et al., 1999a, Yamani et al., 1999).

No método baseado em mudança da coloração de um corante associado a um meio, contendo algum microrganismo indicador, os fatores acima citados são também importantes, exceto para a porosidade do ágar, pois o meio é liquefeito durante a incubação.

Nas últimas duas décadas, um número expressivo de kits para diagnóstico tem sido disponibilizado, incluindo aqueles baseados em técnicas imunológicas. Por exemplo, o teste Charm II é um kit rápido, baseado em técnica de radioisótopo, que pode detectar os seguintes grupos de antibióticos: beta-lactâmicos, tetraciclina, macrolídeos, aminoglicosídeos, novobiocina, sulfonamidas e cloranfenicol. O teste é baseado na competição entre a droga marcada e o resíduo da droga na amostra do leite, por um número limitado de sítios ligantes específicos nas superfícies de bactérias que são adicionadas à amostra. (Figura 1).

Na técnica imunológica por marcador radioisótopo, o procedimento envolve a adição ao leite dos antibióticos marcados por radioisótopos e os microrganismos para ligação, seguido de um curto período de incubação, centrifugação, remoção de gordura, resuspensão do precipitado microbiano em um fluido para cintilação e contagem. Quanto maior a concentração do resíduo de antibiótico, menor quantidade de marcador radioisótopos se ligará aos microrganismos. Dois grupos de antibióticos podem ser analisados em cada tubo por uma proporção específica dos antibióticos radiomarcados com  $C^{14}$  e  $H^3$  (Nielsen, 1994).

Outro teste imunológico projetado para a detecção de beta-lactâmicos em leite é baseado em fluorescência (Fluorophos BetaScreen), e possui alta sensibilidade a penicilina G, detectando aproximadamente duas vezes o número de amostras positivas em relação aos kits microbianos. Este método apresenta a vantagem do leitor ser configurado para outras análises rápidas, inclusive análise de fosfatase alcalina em leite (Sternesjo & Johnsson, 1998).

A seletividade dos testes utilizados atualmente é considerada boa. Entretanto, para alguns kits, a ocorrência de resultados falso positivos pode ser considerado um fator importante. Dentre os fatores que estão correlacionados com a ocorrência de resultados falso positivos, pode-se citar a contaminação microbiana, o número de partições e a quantidade de leite produzido (Andrew et al., 1997).

O efeito de diferentes concentrações de proteína e de gordura do leite nos resultados obtidos por meio de kits para a detecção de resíduos de inibidores foi relatado, sendo que, em rebanhos com diferentes níveis de produção, isto é, raça Jersey e raça Holandesa, os resultados de falso positivos foram correlacionados com maiores teores de proteínas e menor quantidade de células somáticas (Andrew, 2000).

Outro fator considerado relevante é o tipo de alimentação. Dados mostram que diferentes formas de suplementação com vitaminas e mineral também podem resultar em falso positivo no teste para detecção de resíduos com base em inibição microbiana (Romnee et al., 1999b).

Tabela 2. Aspectos dos métodos de diagnóstico para detecção de resíduos em leite

MÉTODO	VANTAGENS	DESVANTAGENS
Método do disco com <i>Bacillus stearothermophilus</i> var. <i>calidolactis</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Baixo custo</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Grande número de etapas</li> <li>• Emprego de técnicas adequadas</li> <li>• Pessoal qualificado</li> <li>• Necessário uso da penicilinase para determinar especificidade</li> <li>• Tempo de análise de 3 a 4 horas</li> <li>• Interferência de alta CCS e/ou alta contagem bacteriana</li> <li>• Não permite a utilização em análises instrumentais</li> <li>• Não é factível realização em campo (equipamento, instalações e pessoal adequado)</li> </ul>
Delvotest P e SP	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Baixo custo</li> <li>• Não necessita de locais especiais, nem de equipamentos sofisticados.</li> <li>• Operacionalmente como é um kit com todos os componentes já preparados pode ser executado pelo produtor ou em campo, pois não exige instalações e equipamentos sofisticados.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Por ser um método totalmente derivado do método do disco com <i>Bacillus stearothermophilus</i> var. <i>calidolactis</i>, apresenta todos os problemas e interferências já descritos para o método do qual originou-se (vide método do disco).</li> <li>• É necessário que se realize sempre um teste com leite isento de antibióticos (prova em branco) e outro com a quantidade padrão de sensibilidade (0,006 U.I. penicilina/ml de leite).</li> <li>• O tempo para a realização da análise inviabilizando a sua utilização</li> <li>• Não permite a utilização em análises instrumentais.</li> </ul>
Métodos imunoquímicos	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Rapidez</li> <li>• Grande sensibilidade</li> <li>• Permite identificação e quantificação dos resíduos de antibióticos</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Requer pessoal com treinamento específico e habilitado</li> <li>• Requer, <b>em alguns tipos</b>, instalações adequadas e equipamentos sofisticados</li> </ul>



## 2.2. IVERMECTINA E ABAMECTINA

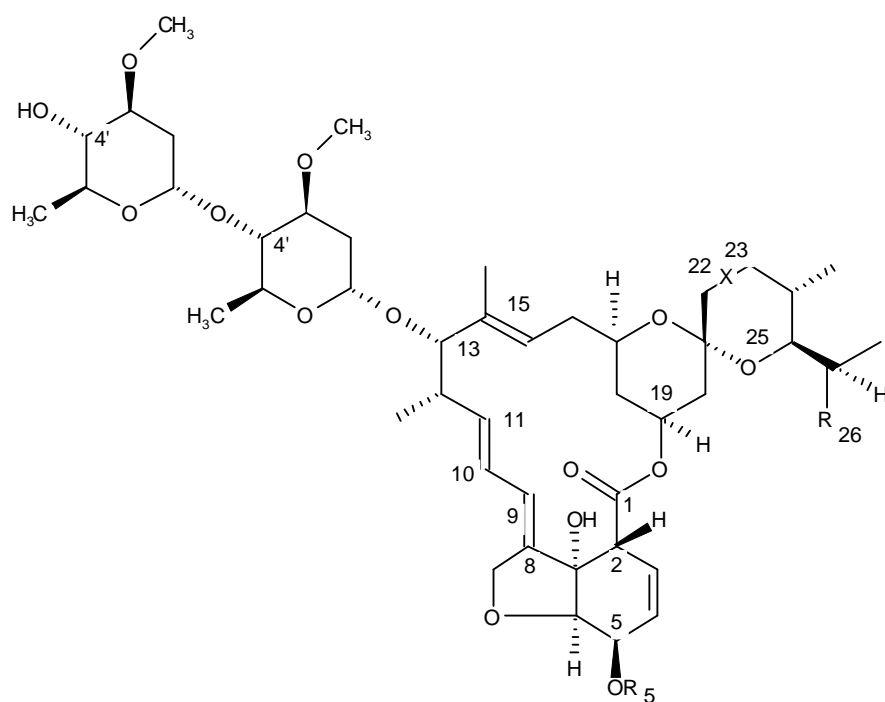
As doenças parasitárias estão entre os problemas mais comuns de rebanho, causando perdas econômicas decorrentes dos danos à saúde dos animais infectados. Por essa razão não se pode evitar programas antiparasitários. Em anos recentes, o desenvolvimento de drogas antiparasitárias tem sido rápido. As avermectinas representam um grande progresso na terapia antiparasitária desde 1981, quando a ivermectina foi introduzida na medicina veterinária, mostrando-se eficiente contra um largo espectro de endo e ecto parasitas. São muito solúveis em gorduras corporais e essa característica é a razão para sua eficácia prolongada. Por outro lado, a longa retenção dos resíduos dessa droga, em produtos de origem animal, é problemático devido ao seu longo tempo de excreção pelo organismo e a conseqüente contaminação de alimentos, incluindo o leite. A ivermectina consiste de dois componentes homólogos contendo não menos de 80% H<sub>2</sub>B<sub>1a</sub> e 20% H<sub>2</sub>B<sub>1b</sub> (Figura 3 e Figura 4).

Na Eslovênia, o uso de ivermectina nas ovelhas é proibido no período de 21 a 33 dias antes do parto e durante todo o período de lactação. Durante experimentos prévios com ovelhas tratadas com ivermectina, em inoculação subcutânea, em 23 dias ainda foi constatada a presença de resíduo no leite, o que é considerado um período longo de excreção (Cerkvenick et al, 2002). Este fato é relevante, tanto em aspecto de saúde, como econômico.

Os processamentos tecnológicos que ocorrem na indústria laticinista, podem afetar a estabilidade das avermectinas. Devido a sensibilidade da ivermectina a condições ácidas, é possível a sua degradação parcial durante a fermentação ácido láctica (Dowing, 1989). Na literatura há poucos relatos de quantificação de resíduos de ivermectina em queijo e outros

derivados, sendo que a retenção de ivermectina na matriz de queijos pode resultar na contaminação de produtos, após o uso inadequado de avermectinas em búfalas em lactação (Esposito et al, 2001). A termização do leite de ovelha durante a pasteurização (74°C/40 seg.), alta pasteurização (80°C/1minuto) e fervura (100°C/ 10 seg.) não altera a concentração de resíduos de ivermectina (Cerkvenick et al, 2001).

O destino dos resíduos de ivermectina foi estudado por meio do processamento da produção diária de leite de 30 ovelhas obtido durante 33 dias após a administração sub cutânea de 0,2 mg de ivermectina por quilo de peso vivo, nos seguintes produtos lácteos: iogurte elaborado com leite cru e pasteurizado, queijo depois de prensado, com 30 a 60 dias de maturação, soro de leite e proteínas do soro, obtidas após a fabricação de ricota. A concentração do componente de ivermectina H<sub>2</sub>B<sub>1a</sub> foi analisada nesses produtos lácteos usando um método com detecção de fluorescência HPLC. A sensibilidade desse método, dependendo do produto, foi de 87 a 100%. Limites de detecção da ordem de 0,1ng de H<sub>2</sub>B<sub>1a</sub> foram obtidas. Concentrações máximas de ivermectina foram detectadas principalmente no segundo dia de administração das drogas nas ovelhas. As mais altas concentrações de ivermectina foram encontradas no segundo dia de fabricação em queijos maturados por 60 dias (96 µg de H<sub>2</sub>B<sub>1a</sub> por quilo de queijo). O soro obtido após a fabricação de ricota foi a matriz com menor concentração de ivermectina (menor que 0,6 µg H<sub>2</sub>B<sub>1a</sub> /kg). Nas matrizes investigadas houve correlação linear entre a concentração de ivermectina e os teores de gordura no leite. Durante a produção de iogurte a estabilidade de fermentação termal da ivermectina foram observadas (Cerkvenick et al, 2004).



Avermectina	R <sub>5</sub>	R <sub>26</sub>	C <sub>22</sub> -X-C <sub>23</sub>
A <sub>1a</sub>	CH <sub>3</sub>	C <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	-CH=CH-
A <sub>1b</sub>	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	-CH=CH-
B <sub>1a</sub>	H	C <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	-CH=CH-
B <sub>1b</sub>	H	CH <sub>3</sub>	-CH=CH-
A <sub>2a</sub>	CH <sub>3</sub>	C <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	$\begin{array}{c} \text{OH} \\   \\ -\text{C}-\text{C}- \\   \quad   \\ \text{H}_2 \quad \text{H} \end{array}$
A <sub>2b</sub>	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	$\begin{array}{c} \text{OH} \\   \\ -\text{C}-\text{C}- \\   \quad   \\ \text{H}_2 \quad \text{H} \end{array}$
B <sub>2a</sub>	H	C <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	$\begin{array}{c} \text{OH} \\   \\ -\text{C}-\text{C}- \\   \quad   \\ \text{H}_2 \quad \text{H} \end{array}$
B <sub>2b</sub>	H	CH <sub>3</sub>	$\begin{array}{c} \text{OH} \\   \\ -\text{C}-\text{C}- \\   \quad   \\ \text{H}_2 \quad \text{H} \end{array}$
Ivermectina	H	>80% C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> <20% CH <sub>3</sub>	-CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -

Figura 3. Estruturas das avermectinas

Fonte: Campbell, 1989

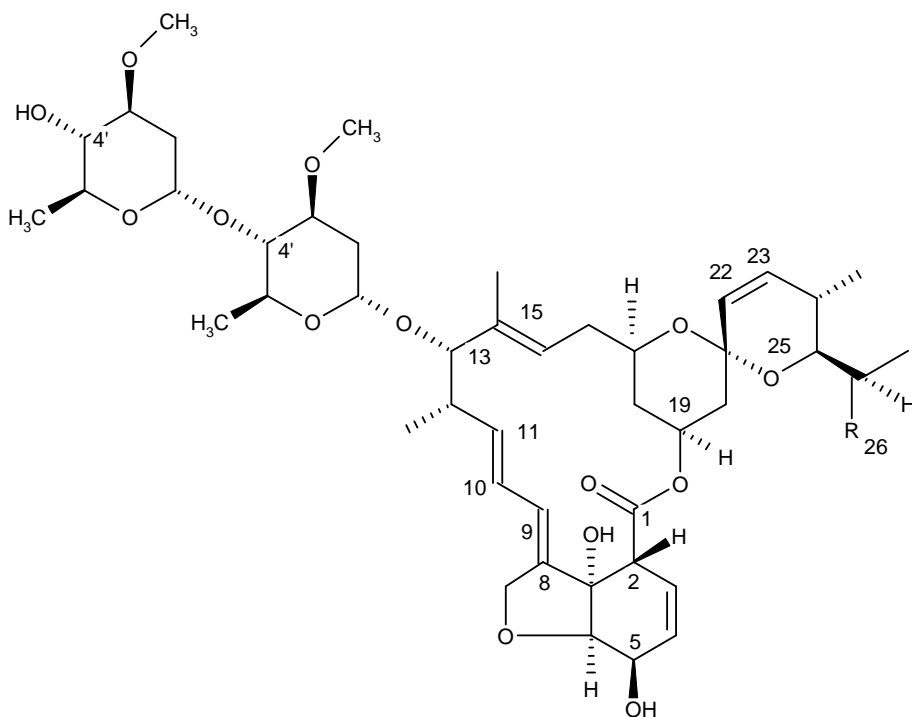


Figura 4. Estrutura básica da abamectina

### 2.3. CARACTERÍSTICAS DAS IVERMECTINAS, PERÍODO DE CARÊNCIA E EFEITOS À SAÚDE HUMANA

As propriedades farmacocinéticas da ivermectina são uma função da espécie na qual o composto é estudado. Comercialmente, a ivermectina, é mais largamente utilizada no tratamento dos bovinos. De acordo com estudo da farmacocinética de ivermectina em ovelhas em lactação concluiu-se que a exposição indireta a ivermectina em carneiros lactentes pelo leite foi desprezível (Cerkvenick et al, 2001).

Para avaliar o potencial tóxico da concentração tissular residual da ivermectina e seus metabólitos, estudos do metabolismo têm sido realizados em espécies alvo (bovinos, ovelhas e suínos) usando a droga marcada por radioisótopo. A ivermectina é

rapidamente absorvida por via subcutânea, intra-ruminal ou oral. A excreção fecal é a principal via de eliminação da droga em todas as espécies estudadas. Somente cerca de 2% da droga é excretada pela urina. Concentrações tissulares residuais foram detectadas no fígado e nos tecidos adiposos, enquanto níveis mais baixos foram observados no cérebro. O metabolismo da ivermectina marcada no fígado e na gordura de bovinos, ovelhas e ratos é similar. Algumas diferenças são notadas nos suínos. A droga parenteral é o principal resíduo hepático em todas as quatro espécies. O maior metabólito hepático em bovinos e ovinos é 24-hidroximetil H<sub>2</sub>B<sub>1a</sub>, o qual é conjugado para ácidos graxos, como ésteres e depositado em tecido hepático.

Resíduos de Ivermectina (fração H<sub>2</sub>B<sub>1a</sub>) foram encontrados no leite depois da administração dessa droga em vacas leiteiras, (de 22 a 51 dias antes do parto), na dose recomendada pelo fabricante (200

$\mu\text{g}/\text{kg}$ ). As concentrações de resíduos no leite podem exceder  $2 \text{ ng}/\text{mL}$ , depois de 28 dias do tempo de afastamento antes do parto. A utilização da Ivermectina nos planos de profilaxia de parasitose é feito geralmente baseado em uma posologia qualificada de “microdoses”,  $0,1 \text{ mL}$  de uma formulação comercial de Ivermectina (Ivomec® – solução bovina). Ela corresponde a uma dose de  $1,2$  a  $2,0 \mu\text{g}/\text{kg}$  para bovinos de  $500$  a  $800 \text{ kg}$  e, neste caso, a dose recomendada pela L’Autorisation de Mise sur le Marché (L’A .M. M.) é de  $200 \text{ m}\mu/\text{kg}$ .

Alvinerie et al. (1997) avaliaram os teores residuais de ivermectina no leite de vacas leiteiras tratadas para hipodermose de acordo com a dosagem recomendada pela L’A. M. M., isto é,  $200 \mu\text{g}/\text{kg}$ , 28 dias ou menos antes da data do parto. Os resultados indicaram que a utilização da dose recomendada pela L’A. M. M ( $200 \mu\text{g}/\text{kg}$ ) leva a presença de resíduos no leite em concentrações superiores àquelas resultantes da administração da ivermectina em uma microdose. Dessa forma não parece desejável a utilização da dose recomendada pela L’A. M. M. para realizar uma profilaxia coletiva de hipodermose, (ou de qualquer outro tratamento coletivo), na vaca 28 dias antes do parto. Diante disto são duas as possibilidades: tratar as vacas leiteiras ao menos 50 dias antes do período de risco com a dose recomendada pela L’A. M. M. ou utilizar a microdose em um estágio qualquer do ciclo de reprodução. Esta última solução é a mais atrativa do ponto de vista econômico, porque todas as vacas de um mesmo rebanho podem ser tratadas num mesmo dia e a saúde pública na França considera que esse resíduo excretado no leite é aceitável.

Devido a alta lipofilicidade da ivermectina, ela é prontamente excretada no leite. Na União Européia e Estados Unidos não é permitido nenhum resíduo desta droga no leite e no Brasil o nível residual máximo para a droga no leite é de  $2,5 \text{ ppb}$ . Um nível residual máximo para fígado de bovinos foi

estabelecido em  $100 \text{ ng}/\text{g}$  para países da União Européia. Determinados métodos analíticos cromatográficos [cromatografia líquida (LC), cromatografia líquida de alta performance (HPLC)] para determinação de resíduos da droga em caprinos, bovinos e leite humano têm sido publicados. Em geral, muitos dos métodos usam extração solvente-solvente de ivermectina como modelo. A persistência prolongada de resíduos da droga em tecidos e fluidos de animais tratados evidencia a importância de se ter um método simples e rápido para avaliações de rotina. Samsonova et al. (2002) desenvolveram um método imunológico simples e rápido para a determinação da ivermectina no leite bovino, com aplicação potencial em análises de rotina. Foi obtida uma detecção de  $16,2 \text{ ng}/\text{mL}$  com esse método. Os valores médios para as amostras de leite com concentrações de  $100$  e  $50 \text{ ng}/\text{mL}$  foi de  $102,6$  e  $51,5 \text{ ng}/\text{mL}$ , respectivamente. A pesquisa mostra que a ivermectina pode ser detectada com bom desempenho, especificidade e repetitividade.

Merck & Co (1987) mostraram em trabalho realizado, que níveis residuais de ivermectina são geralmente mais altos seguindo a aplicação oral, quando comparados com a aplicação tópica. Tempos de concentração de pico foram mais longos seguindo a aplicação tópica. A principal via de excreção foram as fezes. As concentrações em fezes no entanto foram mais altas em fêmeas comparadas com machos; concentração na urina foram mais baixa em fêmeas do que em machos. Isto foi consistentemente observado em todo o tempo de estudo, utilizando ivermectina marcada pelo radio. No uso oral  $57,4\%$  (machos) e  $58,4\%$  (fêmeas) da droga administrada foi eliminada um dia depois da administração. Esses índices aumentaram para  $83\%$  (machos) e  $91,7\%$  (fêmeas), cinco dias após a administração. Na administração oral os mais altos níveis nos tecidos corporais foram observados na gordura, seguidos pelo fígado, rins e músculos. A proporção para os níveis residuais nesses

tecidos foram 100: 55: 40: 15 e foram similares para ambos os sexos. Para a administração tópica a situação ficou menos esclarecida, em virtude da demora do aparecimento dos resíduos nos tecidos. No terceiro dia após a administração quando níveis máximos de resíduos foram observados as concentrações nos tecidos alvo estavam na mesma ordem, isto é, gordura, fígado, rins e músculos.

Casos de intoxicação acidental em humanos foram observados. Um jovem de 15 anos acidentou-se com uma agulha que perfurou o seu dedo tendo sido injetada quantidade desconhecida de Ivomec®. Seu braço mais tarde ficou paralisado provavelmente devido a uma coincidente polineurite virotica, a qual possivelmente não foi relacionada a ivermectina. Uma mulher adulta injetou acidentalmente uma quantidade de Ivomec® estimada em 200 mcg/kg de peso corpóreo. Doze horas mais tarde apresentou cólicas abdominais, com náuseas que desapareceram nas doze horas que se seguiram. Uma criança de 16 meses, pesando aproximadamente 15 kg ingeriu acidentalmente, aproximadamente 10 a 13 mL de Ivomec® a 1%. Midríase foi observada em uma pupila, vômitos, palidez, temperatura corpórea de 35° C, taquicardia, sonolência e oscilações da pressão arterial. Na manhã seguinte ocorreu urticária. Ele ficou normal após três dias. A terapia hospitalar incluiu gluconato de cálcio, caféina e um anti-histamínico. Uma mulher com oito meses de gravidez usou inadvertidamente “spray” de Eqvalan em seu olho. O olho foi lavado. O único efeito colateral descrito foi ardor (Merk & Co., 1988).

A ivermectina foi primeiramente administrada em humanos em 1981 para tratar pacientes com oncocercose. Desde a primeira experiência clínica numerosos estudos multiclínicos têm sido conduzidos em áreas endêmicas de oncocercose em diferentes países, sendo que na França ela foi aprovada para o tratamento dessa doença. Adicionalmente, ela tem sido usada com

sucesso no tratamento de filariose (Kumaraswami et al. 1988; Richard-Lenoble et al., 1988; Naquira et al., 1989).

A tolerância de ivermectina foi avaliada em um estudo clínico envolvendo 54 indivíduos saudáveis que receberam uma dose oral única de Mectizan™. Os sintomas adversos apresentados foram cefaléia em três pessoas que receberam 6 mg/dose. Decréscimo na contagem de glóbulos brancos ocorreu em um indivíduo depois de dose oral única de 12 mg. Esses efeitos foram avaliados como sendo devido a droga (Merck & Co., 1988b).

A tolerância em pacientes também foi avaliada no tratamento de oncocercose com ivermectina em dose oral única de 0,15 a 0,2/kg de peso corporal a cada 12 meses. Os efeitos colaterais observados em alguns pacientes foram, em sua maioria, brandos e transitórios. Estes efeitos colaterais foram provavelmente, atribuídos a reações de hipersensibilidade resultantes da eliminação de microfilárias. Os sintomas mais freqüentemente relatados incluíram pruridos, artralgia, vertigens, mialgia, febre, edema, linfadenites, náuseas, vômitos, diarreias, hipotensão postural, taquicardia, fraqueza, rash e cefaléia (Merk & Co., 1988 b).

Em estudo clínico em mulheres durante o período de lactação, tratadas com dosagem única de ivermectina, concentração máxima de 23 µg da droga foi encontrada no leite um dia após o tratamento. Este nível foi reduzido para abaixo de 0,1 µg/L, aproximadamente após uma semana do tratamento. No entanto, níveis plasmáticos não foram relatados para este estudo em particular e os dados determinados de outros estudos não foram diretamente comparados. Parece que as concentrações no leite humano são similares ou levemente menores que as do plasma (Merk & Co., 1988).

## 2.4. SAÚDE PÚBLICA

Os consumidores, através de uma maior conscientização, vêm exigindo qualidade nos produtos colocados no mercado e, com isto, forçando as indústrias a elaborarem derivados com matéria-prima de melhor qualidade.

O tratamento dos animais com antibióticos e antiparasitários internos e externos implica no estabelecimento do tempo de carência para o consumo dos produtos obtidos do mesmo, isto é, leite e carne, para que a droga administrada seja totalmente eliminada (Tabela 3).

Tabela 3. Limites máximos de resíduos (Codex Alimentarius, Comunidade Econômica Européia) e tolerâncias (Estados Unidos) para drogas antimicrobianas no leite ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ ).

Substâncias	Codex	CEE	Estados Unidos
Beta Lactâmicos			
Penicilina	4	4	5
Ampicilina	-	4	10
Amoxicilina	-	4	10
Cloxacilina	-	30	10
Dicloxaciclina	-	30	-
Oxacilina	-	30	50
Cefacetil	-	125	-
Ceftiofur	100	100	50
Cefazolina	-	50	-
Tetraciclina	-	-	-

Fonte: Pedersen & Suhren, 2000.

Outro aspecto que assume grande importância na saúde pública é o fato de pessoas serem alérgicas a determinadas drogas, cujo consumo de leite e derivados com resíduos das mesmas podem ocasionar problemas a esses consumidores. Este fato está associado à maior preocupação dos profissionais ligados à inspeção de leite e derivados, que deve ser, primariamente, em relação à saúde pública, ou seja, o leite deve ser de boa qualidade para garantir um produto inócuo. Para o público infantil, o leite e seus derivados, representam uma importante porção da ingestão diária de alimentos (Monograph, 1997). Estes indivíduos juntamente com os idosos, são mais vulneráveis e mais sensíveis a uma menor concentração de resíduos ingerida. A

criança pode não apresentar sintomas imediatos, mas podem ocorrer conseqüências futuras (Costa, 1996 citado por Fonseca, 2003).

O Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, por meio da Secretaria de Defesa Agropecuária, editou a Instrução Normativa nº 42, de 20 de dezembro de 1999, que alterou o Plano Nacional de Controle de Resíduos em Produtos de Origem Animal –PNCR e os Programas de Controle de Resíduos em Carnes – PCRC, Mel – PCRM, Leite – PCRL e Pescado – PCR.P., em que afirma que “Resíduo de uma droga veterinária é fração da droga, seus metabólitos, produtos de conversão ou reação e impurezas que permanecem no alimento originário de animais tratados. – Codex Alimentarius FAO/WHO.”

(CODEX, 1993). Nessa Instrução Normativa também são relacionados o Plano de Amostragem, os Limites Máximos de Resíduos, Metodologia Analítica, as considerações sobre as drogas objeto do PNCR, citando outras drogas como a Abamectina, Ivermectina, Doramectina, Nitrofurazona, Furazolidona e Nicarbazina.

A ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária, através da Portaria nº 685, de 27 de agosto de 1998, aprovou o Regulamento Técnico de Princípios Gerais para o Estabelecimento de Níveis Máximos de Contaminantes Químicos em Alimentos.

Essa Portaria estabelece níveis máximos de contaminantes (micotoxinas, contaminantes inorgânicos, resíduos de pesticidas, medicamentos de uso veterinário e de migrantes de embalagens e equipamentos em contato com alimentos), em alimentos que constituam riscos à saúde humana.

O controle é uma exigência dos órgãos federais, como o U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service, Food and Drug Administration, e dos consumidores, que exigem a ausência de resíduos de antibióticos no leite e em seus derivados. Esses produtos constituem-se na base da alimentação infantil e a ingestão crônica de antibióticos afeta o sistema imunológico, diminui a população de bactérias da microbiota intestinal, que é sensível aos antibióticos, bem como, propicia a criação de cepas de bactérias cada vez mais resistentes aos antibióticos, além de causar reações alérgicas nas pessoas sensíveis a tais tipos de substâncias químicas (Oliveira, 1998).

No Brasil, desde 1952, a legislação já se preocupava com os resíduos de drogas veterinárias que chegam ao consumidor, através do leite. Assim, o Regulamento de Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal – RIISPOA, em seu artigo 514, enfatiza que o emprego de produtos químicos para a conservação do leite é proibido, admitindo única e

exclusivamente a utilização da refrigeração do leite na propriedade rural como forma de conservação do mesmo. Também preconiza que devem ser afastadas da produção leiteira as fêmeas que estejam em tratamento, ou que sejam portadoras de doenças infecto-contagiosas, que estejam febris, com corrimento vaginal ou qualquer outro sintoma patológico (Brasil, 1952).

Entretanto, alguns autores verificaram que, mesmo observando-se tal período de carência, muitas vezes é constatada a presença desses inibidores, os quais causam grandes prejuízos aos consumidores e às indústrias de produtos lácteos (Gallina, 1997, citado por Hotta, 2003).

### **3. MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1. Amostragem e Delineamento Experimental**

Dez animais da raça Girolanda, foram utilizados neste experimento, compreendendo quatro tratamentos: três grupos experimentais contendo três vacas no terço médio de lactação, distribuídas aleatoriamente em cada grupo e um animal que recebeu uma aplicação de antibiótico Beta-lactâmico - Multibiotico® (para controle de resultado positivo). Os tratamentos utilizados em dois grupos foram ivermectina, abamectina (10 mg/ 50 kg de peso; Jofadel®), além de um terceiro grupo utilizado como controle negativo (Figura 5). As primeiras coletas (dia zero) de amostras foram realizadas antes da administração do medicamento, depois, diariamente nos quatro primeiros dias, e então semanalmente, até 38 dias após o início do experimento (isto é, dia 0, antes da administração do medicamento, dias 1, 2, 3, 4, 10, 17, 20, 24, 31 e 38). Durante o período de carência dos antiparasitários os animais não receberam nenhum tratamento com antibióticos. O leite produzido pelos animais foi descartado. A produção média dos animais foi de aproximadamente 8 litros de leite/dia.

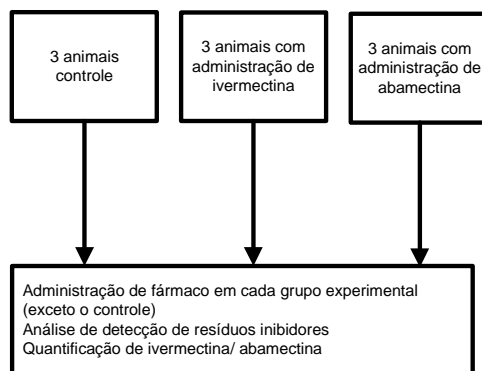


Figura 5. Fluxograma experimental.

Para verificação do funcionamento dos “kits analíticos”, um animal em lactação recebeu por via parenteral o produto a base de penicilina 1.200.000 UI. O leite do mesmo foi coletado antes da administração e nos 4 dias seguintes. Este animal não fazia parte dos lotes acima e a finalidade foi exclusivamente, testar os “kits”, sem nenhuma preocupação com a concentração do antibiótico no leite.

Cada amostra foi dividida em três alíquotas, e enviadas, em caixa isotérmica contendo gelo, para o DTIPOA/Escola de Veterinária da UFMG em veículo exclusivamente destinado a essa finalidade. Uma alíquota foi adicionada de bronopol<sup>1</sup> (8 mg/40 mL, isto é 1 comprimido/40 mL) para análise de composição (teores de gordura, proteína, lactose e sólidos totais) e contagem de células somáticas.

Outra alíquota foi adicionada de Azidiol<sup>2</sup> e analisada para contagem bacteriana total. A terceira alíquota, sem conservante, foi utilizada para pesquisa de atividade inibitória por meio dos “kits” analíticos para resíduos inibidores, e então, congelada a –

<sup>1</sup> 2-bromo-2-nitropropano-1,3-diol e natamicina

<sup>2</sup>Cloranfenicol (0,15g/100mL), azida sódica (3,6g/100mL), citrato de sódio (4,5g/100g) e álcool etílico (1 mL/100mL), azul de bromofenol (35 mg/100mL). Completando volume com água destilada esterilizada.

20° C até o momento da análise para quantificação de avermectinas.

Foram determinadas a composição centesimal e a contagem de células somáticas das amostras de leite, utilizando-se o equipamento Bentley<sup>®</sup>2300, calibrado com amostra padrão de origem canadense e a contagem bacteriana pelo equipamento IBC Bactocount da Bentley<sup>®</sup>.

### 3.2. COMPOSIÇÃO CENTESIMAL

A análise composicional e contagem de células somáticas foram realizadas no equipamento Bentley<sup>®</sup> Combi System 2300, composto por uma unidade do equipamento Bentley 2000 trabalhando conjuntamente com uma unidade do equipamento Somacount 300, com capacidade de até 300 amostras por hora.

O equipamento Bentley 2000 (B2000) realiza análise por meio da mensuração da absorção da energia, utilizando quatro comprimentos de onda selecionados por quatro filtros, os quais passam por um feixe de raio laser durante cada ciclo de análise. Três destes comprimentos de onda correspondem a comprimentos de onda específicos para alguns macro-componentes (5,73 mm para gordura, 6,46 mm para proteína e 9,53 mm lactose) e o quarto trata-



se de um comprimento de referência (Bentley..., 1998; IDF, 2000).

A amostra de leite, aquecida a 40°C, é agitada, aspirada e finalmente homogeneizada, a fim de reduzir o diâmetro dos glóbulos de gordura, e recebe irradiação pelo feixe de luz infravermelha em uma cubeta. A diferença de energia absorvida entre a amostra a ser analisada e a amostra de referência é captada por um detector de infravermelho e é quantificada e transformada automaticamente em teores de componentes, tendo como referência a curva de calibração (Bentley..., 1998).

As calibrações do equipamento Bentley Combi System 2300 são realizadas mensalmente no laboratório LabUFMG com checagem quinzenal, usando amostras padrão elaboradas no Canadá. Um laudo contendo os resultados das análises de referência dos teores de gordura, proteína, lactose e sólidos totais e das contagens de células somáticas era enviado juntamente com as amostras padrão. No LabUFMG, as amostras padrão foram analisadas nos equipamentos eletrônicos. Os valores discrepantes foram excluídos de forma a manter o desvio padrão recomendado pelo fabricante e, com a manutenção de pelo menos nove amostras, foram feitas as calibrações automaticamente.

### **3.3. CONTAGEM DE CÉLULAS SOMÁTICAS**

O equipamento Bentley Combi System 2300 é automatizado para enumeração de células somáticas do leite que tem como princípio básico a citometria de fluxo. Uma alíquota da amostra, pré-aquecida a 40°C, é sugada para dentro do equipamento e levada a uma seringa contendo o corante tampão. O instrumento requer o uso do corante fluorescente brometo de etídio (pastilhas de Glocount – Somacount..., 1997), para corar o DNA das células. Em seguida, 5 mL da amostra são conduzidos por um fluido

carreador para o citômetro de fluxo, onde recebem incidência de um feixe de raio laser. A luz emitida passa por uma série de filtros ópticos e lentes focalizadas em comprimentos de onda apropriados e é captada como pulso elétrico. Este pulso é ampliado, filtrado e convertido em contagem de células somáticas (Bentley..., 1997).

O Laboratório de Análise da Qualidade do Leite, LabUFMG, possui um sistema combinado dos dois equipamentos conhecido como Bentley Combi System 2300. Os dois equipamentos encontram-se conectados e o trabalho é realizado em apenas uma operação, desta forma a contagem de células somáticas por citometria de fluxo e a análise da composição do leite por infravermelho podem ser feitas em até 300 amostras por hora.

### **3.4. CONTAGEM BACTERIANA**

A análise de contagem bacteriana total foi realizada no equipamento Bactocount 150, capaz de analisar até 150 amostras/hora. Para a análise, a amostra de leite contendo conservante é aspirada para uma cavidade de um carrossel circular em rotação, onde é aquecida a 50°C. Durante este período o material de análise entra em contato com uma solução de incubação constituída por substância tamponante, enzimas proteolíticas e brometo de etídio como marcador fluorescente de DNA (Bactocount..., 2002). Esta solução tem como objetivo lisar células somáticas, solubilizar glóbulos de gordura e proteínas, permeabilizar bactérias e corar o DNA. Durante a incubação, a mistura é então sonicada por meio de duas sondas ultrassônicas para auxiliar a quebra de partículas interferentes, romper colônias bacterianas remanescentes para melhorar a detecção de bactérias individuais e reduzir a fluorescência de fundo.

Após o período de incubação, uma porção da mistura é transferida para o citômetro de

fluxo, onde as bactérias são alinhadas dentro de um tubo capilar e expostas a um raio laser quando ocorre a emissão de fluorescência a partir da molécula de brometo de etídio. O sinal fluorescente é coletado pelos receptores ópticos, filtrado e captado por um foto-multiplicador. A intensidade e a amplitude dos pulsos de fluorescência são registradas e usadas como parâmetros para os resultados. Os pulsos captados são então traduzidos em contagem individual de bactérias e, finalmente, em UFC/mL após transformação estatística automática baseada em uma curva de calibração previamente elaborada. O equipamento foi automaticamente limpo, após cada análise, por retro-lavagem com solução tampão de detergente concentrado (RBS-35) (Bactocount..., 2002; Broutin, 2004).

### **3.5. ANÁLISE DE RESÍDUOS POR MEIO DOS “KITS” ANALÍTICOS**

Os kits para detecção de inibidores testados foram: SNAP<sup>®</sup> (Beta-lactam test kit), DELVOTEST SP<sup>®</sup>, CH ATK<sup>®</sup> (single test P&S), BETA STAR<sup>®</sup>, CHARM MRL<sup>®</sup> Test e CHARM SL<sup>®</sup> Test, seguindo instruções de uso do fabricante.

### **3.6. ANÁLISE QUANTITATIVA DE IVERMECTINA E ABAMECTINA**

A amostra de leite foi descongelada em geladeira e a seguir processada para análise de acordo com Souza et al. (2005) por cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por fluorescência.

### **3.7. ANÁLISE ESTATÍSTICA**

Os dados analíticos obtidos foram avaliados por meio de estatística descritiva e correlações, levando-se em conta os fatores

data de coleta, grupo de tratamento e unidades animais. Para se verificar diferenças entre os fatores, após transformações, foi realizada análise de variância dos resultados. O modelo utilizado foi linear multifatorial, com os fatores fixos dia e grupos de tratamento. A diferença mínima significativa entre os fatores avaliados foi obtida por meio do teste Student-Newman-Keuls (SNK). A análise estatística foi feita utilizando-se os pacotes estatísticos Minitab<sup>®</sup> 10.0 e SPSS<sup>®</sup> 9.0, ambos para Windows<sup>®</sup> (Sampaio, 2002).

## **4. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **4.1. COMPOSIÇÃO, CONTAGEM DE CÉLULAS SOMÁTICAS E CONTAGEM BACTERIANA**

Os resultados de composição, contagem de células somáticas e contagem bacteriana das amostras coletadas no presente experimento são apresentados na Tabela 4 e nas Figuras 6, 7 e 8.

Os valores de composição encontrados indicam diferença significativa entre os diferentes tratamentos, principalmente com relação aos teores de gordura, proteína e sólidos totais, sendo que para o tratamento com abamectina, a média destes componentes foi reduzida em relação ao grupo tratado com ivermectina e ao grupo controle. Ressalta-se que os animais do lote 2, tratados com abamectina, apresentaram redução significativa de gordura e proteína nos primeiros dias após a administração do antiparasitário. Não foi encontrada citação na literatura pesquisada sobre influência das ivermectinas sobre a composição do leite. Possivelmente se deve ao fato de que as ivermectinas disponíveis no mercado até o momento são vedadas para o uso de vacas em lactação. Embora o valor de proteína tenha sido significativamente menor para os

animais tratados com abamectina durante todo o período do experimento, ressalta-se que mesmo na amostra do dia zero, isto é, antes da administração do medicamento, o teor de proteína já encontrava-se abaixo dos teores de proteínas do leite das vacas dos outros tratamentos. Entretanto, observa-se o

número de animais, que não foi projetado para verificar este tipo de interferência. Este dado evidencia a necessidade de maiores estudos, com um número maior de animais, para avaliação significativa do efeito destes medicamentos sobre a composição do leite.

Tabela 4. Composição, contagem de células somáticas (CCS/mL) e contagem bacteriana (UFC/mL) de amostras de leite de vacas submetidas a diferentes tratamentos com ivermectina e abamectina

Tratamento	Dia da coleta	Gordura (g/100g)	Proteína (g/100g)	Lactose (g/100g)	Sólidos totais (g/100g)	CCS/mL (Log)	CBT/mL (Log)
Ivermectina	0*	2,99	3,44	4,27	11,89	4,98	4,45
	1	4,55	3,08	4,29	12,75	5,13	4,29
	2	3,68	3,20	4,33	12,23	4,94	4,91
	3	4,02	3,24	4,32	12,55	4,90	4,31
	4	3,52	3,20	4,30	12,07	4,91	4,27
	10	3,65	3,33	4,27	12,31	-	3,98
	17	3,90	3,48	4,47	12,91	4,47	4,44
	24	4,90	3,75	4,22	13,81	4,89	4,80
	31	4,51	3,43	4,58	13,51	4,49	4,65
	38	5,68	3,67	4,25	14,43	4,45	4,52
	<b>Média</b>	<b>4,14<sup>a</sup></b>	<b>3,38<sup>a</sup></b>	<b>4,33<sup>a</sup></b>	<b>12,84<sup>a</sup></b>	<b>4,80<sup>a</sup></b>	<b>4,46<sup>a</sup></b>
Abamectina	0*	4,71	3,00	4,48	12,94	5,16	3,92
	1	2,29	2,86	4,47	10,83	4,23	3,10
	2	2,66	2,87	4,49	11,19	4,41	3,16
	3	2,34	2,92	4,46	10,95	4,45	3,55
	4	2,15	2,93	4,44	10,78	4,46	3,59
	10	2,61	3,07	4,50	11,39	-	3,33
	17	4,50	3,31	4,38	13,10	5,05	4,27
	24	3,47	3,46	4,41	12,46	4,50	4,21
	31	3,10	2,98	4,65	11,87	4,20	4,87
	38	4,43	3,37	4,40	13,18	4,51	3,68
	<b>Média</b>	<b>3,23<sup>b</sup></b>	<b>3,04<sup>b</sup></b>	<b>4,47<sup>b</sup></b>	<b>11,87<sup>b</sup></b>	<b>4,55<sup>a</sup></b>	<b>3,77<sup>a</sup></b>
Controle	0*	4,14	3,44	4,43	13,02	4,90	3,72
	1	4,54	3,31	4,37	13,12	4,67	3,52
	2	4,75	3,36	4,42	13,42	4,68	3,79
	3	4,69	3,39	4,45	13,43	4,59	3,78
	4	4,25	3,34	4,44	13,00	4,57	3,66
	10	4,52	3,47	4,44	13,47	-	4,26
	17	4,04	3,30	4,40	12,73	4,86	4,28
	24	5,48	3,64	4,37	14,35	4,57	4,69
	31	5,38	3,29	4,65	14,19	4,60	4,66
	38	4,02	3,54	4,33	12,92	4,45	3,86
	<b>Média</b>	<b>4,58<sup>c</sup></b>	<b>3,41<sup>a</sup></b>	<b>4,43<sup>b</sup></b>	<b>13,37<sup>c</sup></b>	<b>4,66<sup>a</sup></b>	<b>4,02<sup>a</sup></b>
	<b>Média Geral</b>	<b>3,98</b>	<b>3,28</b>	<b>4,41</b>	<b>12,69</b>	<b>4,67</b>	<b>4,08</b>

\*(antes do tratamento)

Letras diferentes na mesma coluna indicam valores estatisticamente diferentes ( $p \leq 0,05$ )

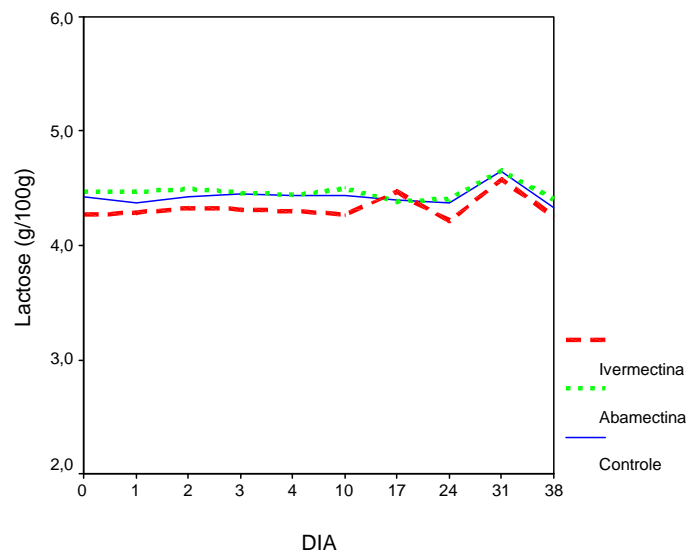
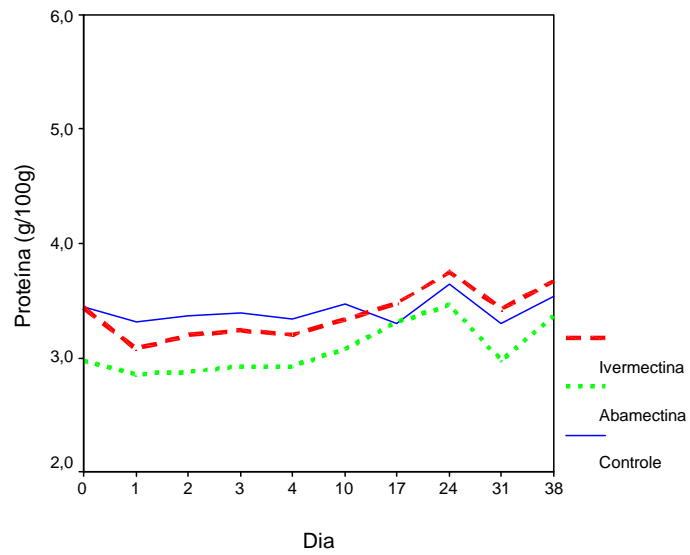
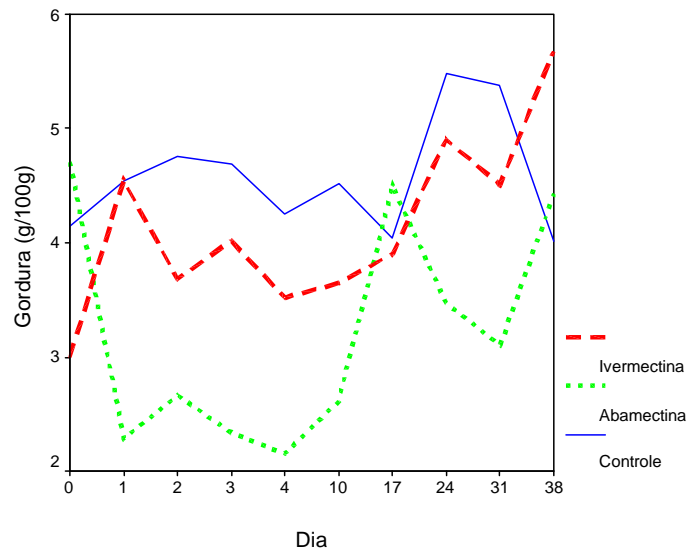


Figura 6. Variação da composição do leite de vacas tratadas com ivermectina e abamectina, durante o período de 38 dias.

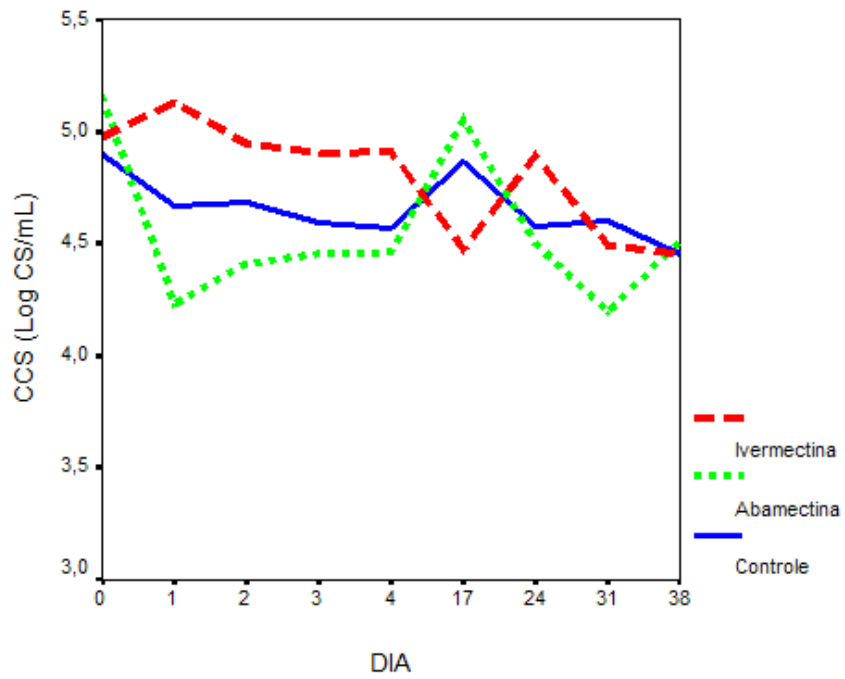


Figura 7. Variação da contagem de células somáticas do leite de vacas tratadas com ivermectina e abamectina, durante o período de 38 dias

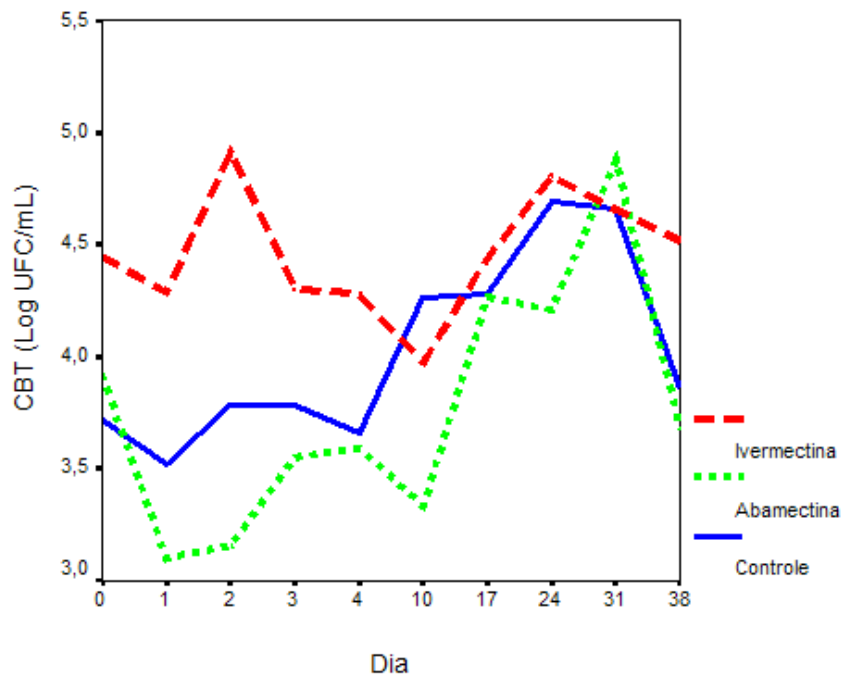


Figura 8. Variação da contagem bacteriana do leite de vacas tratadas com ivermectina e abamectina, durante o período de 38 dias

Os teores de gordura apresentaram valores com variação mais pronunciada durante o período avaliado, fato similar à contagem de células somáticas e à contagem bacteriana. A oscilação dos resultados foi mais marcante em relação à contagem bacteriana, pois este parâmetro é diretamente relacionado à higiene de ordenha, o que pode resultar em mudanças bruscas a partir de pequenas mudanças no manejo da ordenha (Fonseca, 2005)

A maior oscilação dos teores de gordura em relação aos componentes proteíca e lactose já foi verificada por outros autores, entretanto, a dispersão dos resultados segue uma distribuição normal, o que permite a sua avaliação estatística sem transformação (Covarrubias & Haverbeck, 1978; Ferreira et al., 1980; Santos et al., 1981; Homan & Wattiaux, 1995; Auld et al., 1998; Cerqueira et al., 1999; Hamann, 2002; Brito et al., 2003; Dürr, 2003; Lindmark-Mansson et al., 2003; Machado et al., 2003; Bueno, 2004). Entretanto, os dados de CCS e contagem bacteriana, são altamente variáveis, não seguindo uma dispersão de distribuição normal. Portanto, foi necessário a transformação dos mesmos para uma interpretação mais correta dos dados, diminuindo o afastamento dos pontos extremos e para a realização da análise estatística de variância. A transformação logarítmica foi a mais adequada nestes casos (Shook, 1982, Fonseca, 2005).

De acordo com a Instrução Normativa 51/2002, compulsória a partir de março de 2005 para estabelecimentos exportadores sob inspeção federal e a partir de julho/2005 para os outros estabelecimentos na região Sudeste, Sul e Centro-Oeste, todas as amostras de leite de conjunto do grupo controle estiveram dentro dos parâmetros de composição, CCS e contagem bacteriana. Entretanto, há de se destacar a proibição destes medicamentos para o uso em vacas em lactação, fato pelo qual o leite oriundo destes lotes foi considerado impróprio e, portanto, descartado.

Outro fator observado é que, segundo a Instrução Normativa 51, os padrões de CCS e de contagem microbiana admitidas são no máximo de um milhão/mL de leite em ambos os casos. A ordenha e armazenamento do leite do presente experimento foram realizados sob condições normais de obtenção do leite nas propriedades rurais em questão, ou seja, a ordenha transcorreu conforme realizada diariamente, não se restringindo ou exigindo nenhuma modificação higiênica daquela habitual do dia a dia, que os produtores utilizavam. Assim, nenhuma amostra ultrapassou o limite estabelecido pela legislação com resultados obtidos conforme a realidade da fonte de produção. Ressalta-se que a refrigeração do leite após a ordenha é fator primordial para garantir a sua qualidade, inibindo o crescimento bacteriano.

#### **4.2. ANÁLISE DE RESÍDUOS INIBIDORES POR MEIO DE “KITS” ANALÍTICOS**

Os resultados obtidos nas amostras individuais dos animais do experimento demonstraram que o uso de ivermectina e abamectina em vacas no período de lactação, não interferiram na eficiência dos “kits analíticos” comercializados no Brasil, uma vez que, todos apresentaram resultados negativos durante os testes, mesmo no leite produzido nas primeiras 24 horas após administração do antiparasitário, e este resultado continuou durante os 38 dias em que o experimento foi executado.

Verifica-se que, dependendo do “kit” utilizado, a amostra deverá estar dentro dos parâmetros normais de acidez, pois o leite ácido pode interferir, ocasionando falso positivo.

Barker & Kappel (1997) avaliaram a possibilidade do efeito de resíduos de fenbendazol nos testes para antibióticos Charm II, Delvo P e método de disco com

base no *Bacillus stearothermophilus*. Entretanto, nenhum efeito de reação cruzada foi encontrado. Os autores concluem que o fenbendazol, administrado por três formas, não interferem na detecção de antibióticos por meio dos métodos testados.

Outro potencial interferente na detecção de resíduos de antibióticos é a elevada contagem de células somáticas. Coates (2003) e Huth et al. (2002) verificaram que em contagens de até 1.000.000 de células por mL, não ocorreram reação cruzada ou interferência nos resultados analíticos para a determinação de antibióticos. O método testado foi o Parallax. Entretanto, no presente experimento, as contagens de células somáticas das amostras de leite obtidas encontraram-se dentro dos valores normais.

### 4.3. DETERMINAÇÃO DE IVERMECTINA E ABAMECTINA

A eficácia de agentes antiparasitários é relacionada à manutenção de concentrações elevadas de ingredientes ativos no local de ação pelo maior período possível. Este conceito contrasta com a necessidade da obtenção de baixos níveis (ou ausência) de resíduos nos tecidos e secreções animais. A rota de administração dos medicamentos influencia as concentrações nos diversos tecidos e fluidos. Entretanto, a persistência é dependente da meia-vida dos resíduos ( $t_{1/2}$ ). Geralmente os resíduos totais têm meia-vida, mais longa quando comparados à forma original do medicamento. A longa meia-vida dos resíduos totais na gordura pode, parcialmente, ser explicada pela deposição de acil ésteres lipofílicos de metabólitos. Por exemplo, como citado no experimento de Downing, Tait e Wood (1984), a meia-vida do  $H_2B_{1b}$  é mais curta do

que a do  $H_2B_{1a}$ , possivelmente por um metabolismo mais rápido de  $H_2B_{1b}$ .

No presente experimento, os resíduos de ivermectina e abamectina foram detectados até o décimo sétimo dia após a aplicação do medicamento. Os níveis máximos encontrados foram alcançados no segundo dia após administração para a ivermectina (32,38  $\mu\text{g/L}$  de leite) e no terceiro dia após administração para abamectina (9,53  $\mu\text{g/L}$  de leite). Os resultados evidenciam os riscos de resíduos violativos quando da administração destes medicamentos em vacas em lactação, principalmente, levando-se em consideração o limite de detecção que é de 2,5  $\mu\text{g/L}$  de leite.

Downing, Tait and Wood (1984) avaliaram os resíduos de ivermectina no leite bovino de três animais injetados com ivermectina. Os resultados evidenciam que níveis detectáveis de  $H_2B_{1a}$  e  $H_2B_{1b}$  são encontrados até respectivamente, 21 e 10 dias após dose (em valores médios). A sensibilidade do método usado foi de 2 ppb para  $H_2B_{1a}$  e 3 ppb para  $H_2B_{1b}$ .

O'Neill (1997) avaliou os resíduos de ivermectina em vacas Holandesas em lactação após a administração de dose única de 580  $\mu\text{g/kg}$  de peso vivo. Baseado na porcentagem de recuperação analítica, os resultados foram corrigidos. As concentrações de ivermectina  $B_{1a}$  no leite alcançaram valores máximos na terceira e quarta ordenha (rebanho com duas ordenhas diárias) após a aplicação do medicamento. Entretanto, uma das vacas apresentou a maior concentração de ivermectina no leite na décima ordenha (quinto dia) após a aplicação. Os teores máximos de ivermectina no leite chegaram aos valores médios de 5 a 10  $\mu\text{g/kg}$  de leite.

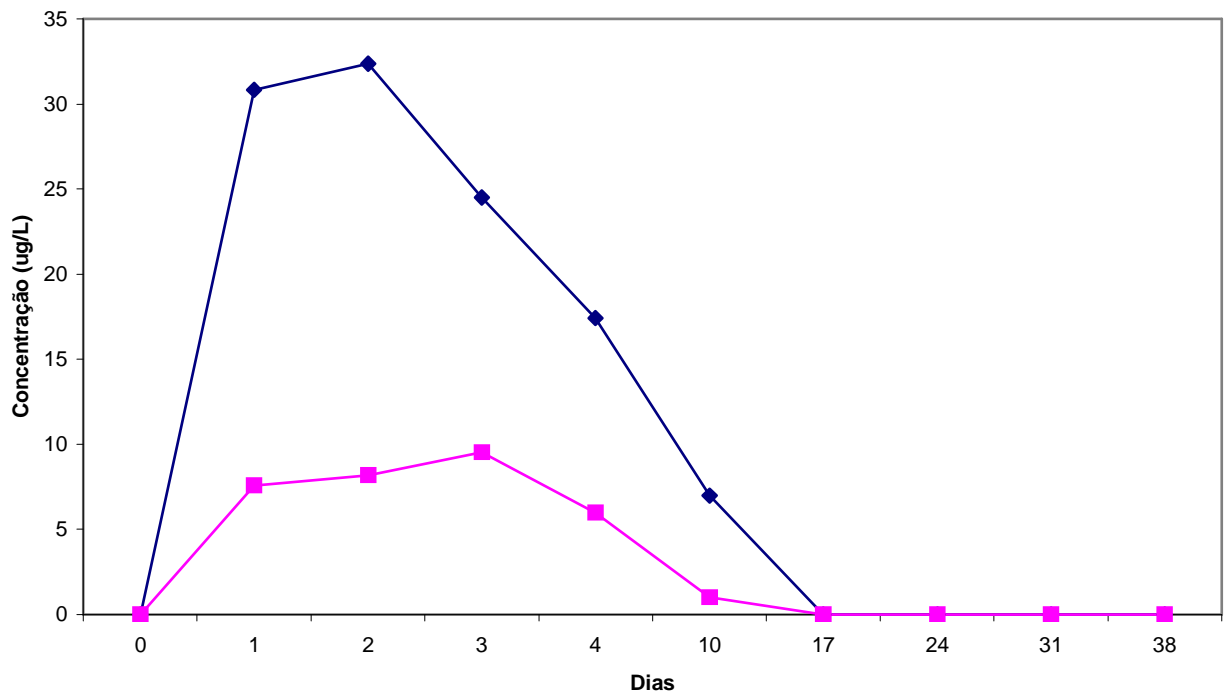


Figura 9. Concentração de ivermectina e abamectina no leite de vacas durante o período de 38 dias após tratamento.

Em outro experimento, O'Neil (1998) utilizou vacas Jersey que foram medicadas com ivermectina na forma "pour-on". A cinética de eliminação foi similar à de vacas holandesas, Entretanto, as concentrações máximas alcançadas variaram de 10 a 18 µg/kg de leite, enquanto que as de vacas holandesas foi de 5 a 10 µg/kg de leite. Para os animais da raça holandesa, os níveis médios de ivermectina no leite após 150 horas de administração apresentaram valores médios abaixo de 4 µg/kg, enquanto para os animais da raça Jersey os níveis, após 150 horas, ainda apresentavam-se com valores médios acima de 6µg/kg de leite.

## 5. CONCLUSÕES

Do exposto neste trabalho pode se concluir que:

1. Os resíduos de antiparasitários ivermectina e abamectina no leite não interferem na capacidade de detecção dos "Kits Analíticos" para antibióticos.
2. A amostra de leite deverá ser coletada e refrigerada devendo a mesma chegar ao laboratório, em condições normais de acidez, pois a acidificação das mesmas interfere nos resultados dos resíduos de antibiótico, podendo ocasionar falsos positivos, em alguns "kits".
3. Os resíduos de antibióticos beta-lactâmicos foram detectados por todos os "kits analíticos" avaliados no presente experimento.
4. Os resíduos dos antiparasitários ivermectina e abamectina foram excretados no leite até 17<sup>o</sup> dia após administração,



tendo alcançado valores máximos, respectivamente, no segundo e terceiro dias, não sendo recomendada, como já preconizado pela legislação, a utilização destes medicamentos em animais em lactação.

## **6. CONSIDERAÇÕES FINAIS**

Maiores estudos deverão ser realizados para verificar a interferência dos resíduos de avermectinas na composição do leite, especialmente nos primeiros dias.

Existe uma deficiência de laboratórios no país, em condições de realizar análises de resíduos de antiparasitários, o que dificulta a constatação de sua presença no leite.

Os resíduos de ivermectina e abamectina são termoestáveis e podem ser encontrados em maiores concentrações nos produtos derivados do leite, sendo necessário maiores estudos nesta área.

Há necessidade de maiores investimentos em pesquisa para a obtenção de “kits” para a detecção rápida de antiparasitários no leite, a exemplo dos “kits” para inibidores microbianos.

## 7. ANEXO: Resultados dos testes para detecção de resíduos inibidores em leite

Tratamento	Lote	Animal	Dia	Beta Star	Charm MRL	Charm SL	CHR Hansen	Snap	Delvotest
Antibiótico	-	10	0	(-)		-1781	(-)	(-)	(-)
Antibiótico	-	10	1	(++)		2690	(+)	(+)	(+)
Antibiótico	-	10	2	(+)		292	(+)	(-)	(-)
Antibiótico	-	10	3	(-)		-1081	(-)	(-)	(-)
Antibiótico	-	10	4	(-)			(+)	(-)	(-)
Ivermectina	1	1	0	(-)	-1081	-1822	(-)	(-)	(-)
Ivermectina	1	1	1	(-)	-1358	-1818	(-)	(-)	(-)
Ivermectina	1	1	2	(-)	-626	-1883	(-)	(-)	(-)
Ivermectina	1	1	3	(-)	-921	-1969	(-)	(-)	(-)
Ivermectina	1	1	4	(-)	-566	2162	(-)	(-)	(-)
Ivermectina	1	1	10	(-)	-1057	-1160	(-)	(-)	(-)
Ivermectina	1	1	17	(-)	-535	-1779	(-)	(-)	(-)
Ivermectina	1	1	24	(-)	-827	-1328	(-)	(-)	(-)
Ivermectina	1	1	31	(-)	-449	-1952	(-)	(-)	(-)
Ivermectina	1	1	38	(-)	-250	-1506	(-)	(-)	(-)
Ivermectina	1	2	0	(-)	-1111	-1302	(-)	(-)	(-)
Ivermectina	1	2	1	(-)	-1448	-1848	(-)	(-)	(-)
Ivermectina	1	2	2	(-)	-501	-1697	(-)	(-)	(-)
Ivermectina	1	2	3	(-)	-925	-1885	(-)	(-)	(-)
Ivermectina	1	2	4	(-)	-1798	-1910	(-)	(-)	(-)
Ivermectina	1	2	10	(-)	-909	855	(-)	(-)	(-)
Ivermectina	1	2	17	(-)	-330	-1336	(-)	(-)	(-)
Ivermectina	1	2	24	(-)	-520	-1183	(-)	(-)	(-)
Ivermectina	1	2	31	(-)	-584	-854	(-)	(-)	(-)
Ivermectina	1	2	38	(-)	-835	-1619	(-)	SR	(-)
Ivermectina	1	3	0	(-)	-1493	-1354	(-)	(-)	(-)
Ivermectina	1	3	1	(-)					
Ivermectina	1	3	2	(-)	-1158	-1401	(-)	(-)	(-)
Ivermectina	1	3	3	(-)	-667	-1641	(-)	(-)	(-)
Ivermectina	1	3	4	(-)	-688	-972	(-)	(-)	(-)
Ivermectina	1	3	10	(-)	-441	-1391	(-)	(-)	(-)
Ivermectina	1	3	17	(-)	-233	-1594	(-)	(-)	(-)
Ivermectina	1	3	24	(-)	-6	-2029	(-)	(-)	(-)
Ivermectina	1	3	31	(-)	-1575	-1650	(-)	(-)	(-)
Ivermectina	1	3	38	(-)	-508	-1449	(-)	SR	(-)
Abamectina	2	4	0	(-)	-887	-2378	(-)	(-)	(-)
Abamectina	2	4	1	(-)	AC	-1232	(-)	AC	(-)
Abamectina	2	4	2	(-)	-972	-1404	(-)	(-)	(-)
Abamectina	2	4	3	(-)	-652	-2087	(-)	(-)	(-)
Abamectina	2	4	4	(-)	-948	-1535	(-)	(-)	(-)
Abamectina	2	4	10	(-)	-649	-1282	(-)	(-)	(-)
Abamectina	2	4	17	(-)	-729	-1457	(-)	(-)	(-)
Abamectina	2	4	24	(-)	-331	-1149	(-)	(-)	(-)
Abamectina	2	4	31	(-)	-482	-576	(-)	(-)	(-)
Abamectina	2	4	38	(-)	-498	-1521	(-)	(-)	(-)
Abamectina	2	5	0	(-)	-881	-1396	(-)	(-)	(+) AC
Abamectina	2	5	1	(-)	-828	-1598	(-)	(-)	(-)
Abamectina	2	5	2	(-)	-968	-1940	(-)	(-)	(-)
Abamectina	2	5	3	(-)	-736	-228	(-)	(-)	(-)
Abamectina	2	5	4	(-)	-1115	-1618	(-)	(-)	(-)
Abamectina	2	5	10	(-)	-719	-73	(-)	(-)	(-)
Abamectina	2	5	17	(-)	-258	-1569	(-)	(-)	(-)
Abamectina	2	5	24	(-)	-166	-1103	(-)	(-)	(-)

Tratamento	Lote	Animal	Dia	Beta Star	Charm MRL	Charm SL	CHR Hansen	Snap	Delvotest
Abamectina	2	5	31	(-)	-371	-1319	(-)	(-)	(-)
Abamectina	2	5	38	(-)	-1058	-1767	(-)	(-)	(-)
Abamectina	2	6	0	(-)	-156	-499	(-)	(-)	(-)
Abamectina	2	6	1	(-)	AC	-1965	(-)	AC	(-)
Abamectina	2	6	2	(-)	-1347	-2009	(-)	AC	(-)
Abamectina	2	6	3	(-)	-967	-1870	(-)	(-)	(-)
Abamectina	2	6	4	(-)	1005	-814	(+)AC	(-)	(-)
Abamectina	2	6	10	(-)	-1079	-762	(-)	(-)	(-)
Abamectina	2	6	17	(-)	-753	-1594	(-)	(-)	(-)
Abamectina	2	6	24	(-)	-292	-1628	(-)	(-)	(-)
Abamectina	2	6	31	(-)	-570	-1237	(-)	(-)	(-)
Abamectina	2	6	38	(-)	-838	-1259	(-)	(-)	(-)
Controle	3	7	0	(-)	-2181	-2143	(-)	(-)	(-)
Controle	3	7	1	(-)	-1157	-2394	(-)	(-)	(-)
Controle	3	7	2	(-)	-756	-2001	(-)	(-)	(-)
Controle	3	7	3	(-)	-1452	-2285	(-)	(-)	(-)
Controle	3	7	4	(-)	-551	-1554	(-)	(-)	(-)
Controle	3	7	10	(-)	-817	-1209	(-)	(-)	(-)
Controle	3	7	17	(-)	-1236	-1662	(-)	(-)	(-)
Controle	3	7	24	(-)	-626	-1845	(-)	(-)	(-)
Controle	3	7	31	(-)	-415	-1972	(-)	(-)	(-)
Controle	3	7	38	(-)	-876	-1862	(-)	(-)	(-)
Controle	3	8	0	(-)	-2181	-2143	(-)	(-)	(-)
Controle	3	8	1	(-)	-1157	-2394	(-)	(-)	(-)
Controle	3	8	2	(-)	-756	-2001	(-)	(-)	(-)
Controle	3	8	3	(-)	-1452	-2285	(-)	(-)	(-)
Controle	3	8	4	(-)	-551	-1554	(-)	(-)	(-)
Controle	3	8	10	(-)	-1553	-343	(-)	(-)	(-)
Controle	3	8	17	(-)	-2117	-2080	(-)	(-)	(-)
Controle	3	8	24	(-)	-965	-1731	(-)	(-)	(-)
Controle	3	8	31	(-)	-1787	-2153	(-)	(-)	(-)
Controle	3	8	38	(-)	-865	-1900	(-)	(-)	(-)
Controle	3	9	0	(-)	-2181	-2143	(-)	(-)	(-)
Controle	3	9	1	(-)	-1157	-2394	(-)	(-)	(-)
Controle	3	9	2	(-)	-756	-2001	(-)	(-)	(-)
Controle	3	9	3	(-)	-1452	-2285	(-)	(-)	(-)
Controle	3	9	4	(-)	-551	-1554	(-)	(-)	(-)
Controle	3	9	10	(-)	-1413	-1490	(-)	(-)	(-)
Controle	3	9	17	(-)	-548	-2010	(-)	(-)	(-)
Controle	3	9	24	(-)	-137	-1574	(-)	(-)	(-)
Controle	3	9	31	(-)	-751	-1368	(-)	(-)	(-)
Controle	3	9	38	(-)	-763	-1769	(-)	(-)	(-)

OBS: SR = Sem Reação

AC = Ácido

OBS2: O Lote controle foi feito um POOL do dia 0 ao dia 4

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVINERIE, M., et al; Résidus d'Ivermectine dans le lait chez la vache laitière traitée pendant la période de tarissement avec la posologie recommandée par l'Autorisation de Mise sur le Marche. **Revue Médecine Vétérinaire**, v. 148, p. 115-116, 1997.

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

ANDREW, SM. Effect of fat and protein content of milk from individual cows on the specificity rates of antibiotic residue screening tests. **Journal of Dairy Science**, v.83, n. 12, p. 2992-2997, 2000.

AULDIST, M.J.; WALSH, B.J.; THOMSON, N.A. Seasonal and lactational influences on bovine milk composition in New Zealand. **Journal of Dairy Research**, v.65, n.3, p.401-411, 1998.

BARKER, S.A.; KAPPEL, L.C. Drug residues in milk from cows administered fenbendazole as a paste, drench, or feed top-dressing. **Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics**, v.20, n.2, p.160-162, 1997.

**SOMACOUNT 300 OPERATOR'S MANUAL**. Chaska: Bentley Instruments Inc., 1997. 116 p.

**BENTLEY 2000 OPERATOR'S MANUAL**. Chaska: Bentley Instruments Inc., 1998. 79 p.

**BACTOCOUNT 150 OPERATOR'S MANUAL**. Chaska: Bentley Instruments Inc., 2002. 49 p.

BRASIL. Ministério da Agricultura. Instrução Normativa nº 42, de 20 de

dezembro de 1999. Programa Nacional de Controle de Resíduos em Produtos de Origem Animal. **Diário oficial da União**.

Brasília, DF: Secretaria de Inspeção de Produto Animal, 1999, 53p.

BRASIL. Ministério da Agricultura. Instrução Normativa nº 51, de 18 de Setembro de 2002. Regulamentos Técnicos de Produção, Identidade, Qualidade, Coleta e Transporte de Leite. **Diário Oficial da União**. Brasília, DF: Ministério da Agricultura, Secretaria de Inspeção de Produto Animal, 2002, 39p.

BRASIL. Ministério da Agricultura. **Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leite E Produtos Lácteos**. Brasília, DF: Secretaria Nacional de Defesa Agropecuária, 1997. 77p.

BRASIL. Ministério da Agricultura. Resolução DIPOA nº 02, de 12 de julho de 2002. Cria o Comitê Técnico Consultivo para proceder a avaliação dos "kits" analíticos, destinados a detecção de microrganismos, resíduos de drogas, medicamentos e outras substâncias no processo de Autorização de Uso de Produto – AUP, nos estabelecimentos registrados no Serviço de Inspeção Federal. **Diário Oficial da União**. Brasília, DF: Secretaria de Inspeção de Produto Animal, 2002, 77p.

BRASIL. Ministério da Agricultura. Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal. **Regulamento de Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal**. Brasília: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 1997. 241p.

BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria nº 685, de 27 de agosto de 1998. Regulamento Técnico de Princípios Gerais para o Estabelecimento de Níveis Máximos de Contaminantes Químicos em Alimentos. **Diário Oficial da União** Brasília, DF: Ministério da Saúde, Agência Nacional de

Vigilância Sanitária, 1998, de 24/09/98, nº 165-E, Seção 1, págs 28 e 29.

BRITO, J.R.F.; BRITO, M.A.V.P. **Sustentabilidade da Pecuária de Leite no Brasil: qualidade e segurança alimentar.** Juiz de Fora: EMBRAPA, 2001. 184p.

BRITO, J.R.F.; SOUZA G.N.; BRITO M.A.V.P.; RUBIALE L.; SILVA M.R. Panorama da qualidade do leite na Região Sudeste: Espírito Santo, Minas Gerais e Rio de Janeiro. In: **CONGRESSO BRASILEIRO DE QUALIDADE DO LEITE**, 2003, Juiz de Fora. **Anais...** Juiz de Fora: CBQL, 2003. p.47-61.

BROUTIN, P. Contagem individual de bactérias no leite no manejo da qualidade. In: **CONGRESSO BRASILEIRO DE QUALIDADE DO LEITE**, 2004, Passo Fundo. **Anais...** Passo Fundo: UPF, 2004. p.316-331.

BUENO, V.F. **Contagem celular somática e bacteriana total do leite refrigerado em tanques de expansão de uso individual no Estado de Goiás.** 2004. 52f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Escola de Veterinária, Universidade Federal de Goiás, Goiânia.

CAMPBELL, W.C. **Ivermectin and abamectin.** New York: Springer-Verlag. 1989. 363 p.

CERQUEIRA, M.M.O.P. et al. Avaliação da qualidade do leite estocado em tanque de imersão e expansão por 48 horas. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v.54, n.309, p.251-254, 1999.

CERKVENICK, V.; et al. Fate of ivermectin residues in ewes' milk and derived products. **Journal of Dairy Research**, v. 71, n.1, p. 39-45, 2004.

CERKVENICK, V.; et al. Ivermectin pharmacokinetics in lactating sheep. **Veterinary Parasitology**. v.104, p. 175-185, 2002. Disponível em:

<<http://www.elsevier.com/locate/vetpar>> Acesso em 05/01/2005.

CERKVENICK, V.; et al. Thermal and long-term freezing stability of ivermectin residues in sheep milk. **European Food Research Technology**, p.73-76, 2001.

CHARM, S.E.; ZOMER, E. The evolution and direction of rapid detection/identification of antimicrobial drugs residues. **Symposium on Residues of Antimicrobial Drugs and other inhibitors in milk.** Brussels: IDF Proceedings, p. 224 – 233, 1995.

COATES, S. Validation of analytical methods. **Bulletin of the International Dairy Federation**, n.380, p.26-32, 2003.

CODEX Alimentarius Commission: list of Codex MRLs for vet drugs. In: **Residues of vet drugs in foods.** Rome: FAO/WHO, 1993. v. 3, seção 1.

COSTA, E. O. Resíduos de antibióticos no leite: um risco à saúde do consumidor. **Revista Higiene Alimentar**, v.10, n.44, p.15-17, 1996.

COVARRUBIAS, M.P.; HAVERBECK, J. Variações na qualidade do leite cru fase estábulo-indústria leiteira. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v.33, n.195, p.3-12, 1978.

DOWNING, G.V.; TAIT, W.E.; WOOD, J.S. **Ivermectin in Milk:** unpublished report, Submitted New Jersey: Merck & Co. Inc, 1984.

DOWNING, G.V. The determinative method for assaying ivermectin residues in tissue and plasma. In : CAMPBELL, W.C. **Ivermectin and abamectin.** New York: Springer-Verlag. 1989. P.324-335.

DÜRR, J.W. Panorama da qualidade do leite na Região Sul (RS). In: **CONGRESSO BRASILEIRO DE QUALIDADE DO LEITE**, 2003, Juiz de Fora. **Anais...** Juiz de Fora: CBQL, 2003. p.2-17.

- ESPOSITO, M.; ANASTASIO, A.; IMPARATO, E.; FENIZIA, D.; SARNACCHIARO, T.; SERPE, L. Pharmacokinetic parameters of Ivermectin in buffalo milk and evaluation of its residues in Mozzarella cheese. **Scienza e Tecnica Lattiero Casearia**, v. 52, n. 5, p. 351-357, 2001.
- FERREIRO, L.; SOUZA, H.M.; HEINECK, L.A. Influência da mastite bovina subclínica na composição físico-química do leite do gado mestiço. **Revista do Instituto de Laticínios Candido Tostes**, v.35, n.208, p.19-24, 1980.
- FONSECA, C.S.P. **Qualidade do leite cru de tanques refrigeradores de Minas Gerais**. Belo Horizonte: Escola de Veterinária, 2005. 67 p. (Mestrado em Medicina Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais).
- FONSECA, C.S.P. **Mecanismos de ação de antimicrobianos e métodos de detecção de seus resíduos em leite**. Belo Horizonte: Escola de Veterinária, 2003. 17 p. (Seminário apresentado na Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais).
- HAMANN, J. Relationships between somatic cell count and milk composition. **Bulletin of the International Dairy Federation (IDF)**, n.372, p.56-59, 2002.
- HOMAN, E.J.; WATTIAUX, M.A. **Dairy technical guide: lactation and milking**. Madison: University of Wisconsin-Madison, 1995. 94 p.
- HOTTA, J. M. **Monitoramento de resíduos de antimicrobianos no leite em diferentes pontos da cadeia produtiva do leite, comparando diferentes métodos de detecção**. 2003. 50 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.
- HUTH, S.P.; WARHOLIC, P.S.; DEVOU, J.M.; CHANEY, L.K.; CLARK, G.H. Parallax™ beta-lactam: a capillary-based fluorescent immunoassay for the determination of penicillin-G, ampicillin, amoxicillin, cloxacillin, cephalosporin, and ceftiofur in bovine milk. **Journal of AOAC International**, v.85, n.2, p.355-364, 2002.
- LINDMARK-MANSSON, H.; FONDÉN, R.; PETTERSSON, H.E. Composition of Swedish dairy milk. **International Dairy Journal**, v.13, p.409-425, 2003.
- LUITZ, M.; SUHREN, G.; HEESCHEN, W. Interactions of antimicrobials in milk- consequences for the detection by a microbial inhibitor test. **Milchwissenschaft**, v.51, n. 7, p. 390-392, 1996.
- MACHADO, S.C.A. **Utilização de métodos rápidos de análise para determinação da incidência da contaminação por resíduos de antibióticos no leite pasteurizado comercializado na região norte-noroeste do Estado do Rio de Janeiro**. Rio de Janeiro: Universidade Estadual do Norte Fluminense, 1998. 67 p. (Mestrado em Ciências e Tecnologias Agropecuárias).
- MACHADO, P.F.; CASSOLI L.D.; COLDEBELLA A.; COELHO K.O. Panorama da qualidade do leite na região Sudeste-São Paulo. In: **CONGRESSO BRASILEIRO DE QUALIDADE DO LEITE**, 2003, Juiz de Fora. **Anais...** Juiz de Fora: CBQL, 2003. p.39-45.
- MARSHALL, R.T. (ed.). **Standard methods for the examination of dairy products**, 16 ed. Washington, D.C.: American Public Health Association, 1992. 547p.
- MERCK & CO, Inc. **The metabolism, distribution, and excretion of 22,23-<sup>3</sup>H-MKO933 in rats dosed orally and percutaneously (Expt. ADM-66)**. Unpublished study; submitted to WHO by Merck & Co., Inc., 1987.

MERCK & CO., Inc. **Ivermectin: Poison Control Monograph**. Submitted to WHO by Merck & Co., Inc., 1988.

MERCK & CO., INC. **MECTIZANTM (IVERMECTIN, MSD). Product Monograph 7-89 MCT 88-R-1152M**. Submitted to WHO by Merck & Co., Inc., 1988b

MONOGRAPH on residues and contaminants in milk and milk products. **International Dairy Federation**, n. 9701, 1997.

NIELSEN, S. S. **Introduction to chemical analysis of foods**. London: Jones and Bartlett Publishers, 1994.529 p.

OLIVEIRA, A. F. Métodos rápidos para análise de resíduos de antibióticos no leite. **Revista Indústria de Laticínios**, p. 74 – 79, mar/abril 1998.

O'NEILL, P. **A research report dealing ivermectin residue levels in whole milk following treatment of lactating dairy cattle with a 5.0 g/L ivermectin pour-on formulation for cattle**. Schering-Plough Animal Health Limited, 1997 (Doc.n. 97/0633).

O'NEILL,P. **A research report dealing ivermectin residue levels in whole milk following treatment of lactating Channel Island breed dairy cattle with 5.0 g/L ivermectin pour-on formulation for cattle**. Schering-Plough Animal Health Limited, 1998 (Doc. N. 98/0540).

PEDERSEN, M.; SUHREN, G. Chemical-physical confirmation tests (“higher” validation level) for the Detection of Residues of Antimicrobials in Milk. **International Dairy Federation**. Bulletin. N. 358, p.29-35, 2000.

ROMNEE,J.M.; RASKIN,P.; ISTASSE, L.; GUYOT, A. Incidence of feed-related factors on false-positive results when using

Delvotest SP R for detection of antibiotics in milk. **Lait**, v. 79, n. 3, p.341-346, 1999.

SANTOS, E.C.; HAJDENWURCEL, J.R.; VILELA, M.A.P. Influência sazonal na composição de alguns constituintes do leite da bacia leiteira de Juiz de Fora. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v.36, n.219, p.3-9, 1981.

SAMPAIO, I.B.M. **Estatística aplicada à experimentação animal**. Belo Horizonte: Fundação de Ensino e Pesquisa em Medicina Veterinária e Zootecnia, 2002. 221p.

SHOOK, G.E. Approaches to summarizing somatic cell count which improve interpretability. In: NATIONAL MASTITIS COUNCIL ANNUAL MEETING, n.21. 1982. Madison. **Proceedings...** Madison: National Mastitis Council, 1982. p.150-166.

SOUZA, S.V.C; LIMA, J.A.; TEODORO,J.C.; JUNQUEIRA, R.G. In-house validation of a multi-residue method for analysis of avermectins in milk by high performance liquid chromatography with fluorescence detection. In: ENCONTRO NACIONAL DE ANALISTAS DE ALIMENTOS. N.14. 2005. Goiânia, **Anais...** Goiânia: Sociedade Brasileira de Analistas de Alimentos, 2005. p.121.

STERNESJO, A.; JOHNSON, G. A novel rapid enzyme immunoassay (Fluorophos BetaScreen) for detection of beta lactam residues in ex-farm raw milk. **Journal of Food Protection**, v. 61, n.7, p.808-811, 1998.

YAMANI, M.I.; AL KURDI, L.M.A.; HADDADIN, M.S.Y.; ROBINSON,R.K. A simple test for the detection of antibiotics and other chemical residues in ex-farm milk. **Food Control**, v. 10, n. 1, p.35-39, 1999.