UNIVERSIDADE ESTADUAL DO MARANHÃO

CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS

MESTRADO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

UTILIZAÇÃO DO DELVOTEST® SP – NT, ECLIPSE 50 E TWINSENSOR – BT 20 NA DETECÇÃO DE RESÍDUOS DE ANTIMICROBIANOS EM AMOSTRAS DE LEITE "IN NATURA" PROVENIENTES DE QUATRO BACIAS LEITEIRAS DO ESTADO DO MARANHÃO

Selma Cristina Abib de Camargo

SÃO LUÍS – MA

2010

Livros Grátis

http://www.livrosgratis.com.br

Milhares de livros grátis para download.

SELMA CRISTINA ABIB DE CAMARGO

UTILIZAÇÃO DO DELVOTEST® SP – NT, ECLIPSE 50 E TWINSENSOR – BT 20 NA DETECÇÃO DE RESÍDUOS DE ANTIMICROBIANOS EM AMOSTRAS DE LEITE "IN NATURA" PROVENIENTES DE QUATRO BACIAS LEITEIRAS DO ESTADO DO MARANHÃO

Dissertação apresentada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciências Veterinárias.

Área: Sanidade Animal

Orientador: Profª. DsC. Francisca Neide Costa

SÃO LUÍS

2010

Camargo, Selma Cristina Abib de

Utilização do Delvotest® SP-NT, Eclipse 50 e Twinsensor – BT 20 na detecção de resíduos de antimicrobianos em amostras de leite "in natura provenientes de quatro bacias leiteiras do Estado do Maranhão / Selma Cristina Abib de Camargo.- São Luis, 2010.

116f

Dissertação (Mestrado) – Curso em Ciências Veterinárias, Universidade Estadual do Maranhão, 2010.

Orientadora: Profa. Drª Francisca Neide Costa

1.Resíduos de antimicrobianos 2.Leite "in natura" 3.*Bacillus stearothermophilus var. calidolactis* 4.*Geobacillus steathermophilus*. I.Título.

CDU: 637.131

Dissertação de Mestrado defendida e aprovada em ___/___/____ pela banca examinadora composta pelos seguintes membros:

_____

Prof. DsC. Oswaldo Durival Rossi Júnior
1º membro

_____

Profª. DsC.Lenka de Moraes Lacerda
2º membro

_____

Profª. DsC.Francisca Neide Costa
Orientador

Dedicatória

“Eles eram o meu norte, meu sul, meu leste, meu oeste.
Minha semana de trabalho e meu domingo.
Meu meio-dia, minha meia-noite.
Minha conversa, minha canção.”
(W. H. Auden)

Dedico este Trabalho:

Aos meus pais, José Roberto e Marilene, pelo amor, pela educação e dedicação em minha criação, pelo aprendizado da humildade, pelo exemplo de amor e fé, pela forma de encarar a vida: sempre de frente e sem esmaecer!

Agradecimentos

AGRADECIMENTOS

... Agradeço,

... a Deus, por me presentear com bênçãos e por estar presente em todos os momentos da minha vida, sejam eles bons ou complicados, me dando forças e sempre colocando pessoas maravilhosas em meu caminho.

... a Universidade Estadual do Maranhão - UEMA pela oportunidade, através do programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias, fazer parte do seu corpo discente e assim poder alcançar mais uma etapa.

... aos meus pais, pelo grande apoio prestado ..., até abrindo porteiras.

... as minhas irmãs, Cláudia Patricia e Silvia Helena, pela amizade e incentivo.

... aos meus sobrinhos, Luis Neto e Daniel, por me alegrarem nos momentos mais estressantes, com seus sorrisos e brincadeiras, principalmente, nas colheitas de amostras.

... a minha gatinha Bethy “gorducha”, pelo companheirismo durante as madrugadas de estudo e por me acordar todos os dias.

... aos amigos de turma e do grupo de pesquisa “Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Pública”, em especial, Fernando Almeida de Souza, pelos esclarecimentos, ajuda e compreensão nos momentos de tensão, incerteza e dificuldades. Agradeço, também, pelos momentos de diversão que juntos, desfrutamos no decorrer destes dois anos.

... a amiga Joyce Bitencourt, pelo companheirismo nas viagens realizadas para colheita de amostras e na busca por conhecimentos na Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia de São Paulo – FMVZ/USP, onde compartilhamos o “FRIO”, a família “ABIB”, e os caminhos perdidos.

... aos maravilhosos André Gonçalves, Fabíola e Alessandra Nicacio pela amizade, pelo companheirismo e abrigo em suas residências.

... a bolsista do CNPq e grande companheira de guerra Iara Oliveira, pela valiosa ajuda na realização deste trabalho.

... aos alunos de graduação, Gardel, Ermiton e Daniel, pela grande força prestada na busca das propriedades, no município de Imperatriz.

... a orientadora Profª. DSc. Francisca Neide Costa, pela oportunidade, orientação, paciência, compreensão, confiança e pelos ensinamentos de vida.

... aos órgãos fiscalizadores, Agência Estadual de Defesa Agropecuária do Maranhão – AGED e Agência Estadual de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural do Maranhão - AGERP/SEAGRO, pela disponibilização dos cadastros das propriedades e veículo. Em especial, a Médica Veterinária Sonizethe Silva e ao motorista Sr. Cosme da AGED, pela oportunidade de conhecimento das regiões estudadas antes da realização deste trabalho.

... aos produtores de leite pelo fornecimento das amostras, essenciais para a execução deste trabalho.

... aos motoristas da Universidade Estadual do Maranhão – UEMA, em especial, o Sr. Barata e o Sr. Jângulo pela ajuda nas colheitas das amostras.

... à coordenação de pós-graduação, Profª. DsC. Ana Lúcia Abreu Silva, Profª. DsC. Alana Lisleia de Sousa e a secretária Carol Romão, pelos esclarecimentos e compreensão durante o curso.

... ao convênio PROCAD/AMAZÔNIA pela oportunidade de realização do estágio junto a Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia de São Paulo – FMVZ/USP, para aprimorar os conhecimentos e adquirir novas experiências.

... as Profª. DsC. Simone de Carvalho Balian e Profª. DsC. Evelise Oliveira Telles da FMVZ/USP pelo apoio, carinho e oportunidade de desenvolvimento de outros trabalhos.

... aos técnicos do Laboratório de Higiene Alimentar da FMVZ/USP e aos alunos de pós-graduação, pelos novos conhecimentos e carinho.

... a Profa. DsC. Elizabeth Nascimento de Souza da Faculdade de Ciências Farmacêuticas – USP, pelos valiosos esclarecimentos desta pesquisa.

... a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudo durante o mestrado.

Enfim, a todos agradeço...

Resumo

CAMARGO, S.C.A.; COSTA, F.N. **Utilização do Delvotest® SP–NT, Eclipse 50 e Twinsensor – BT 20 na detecção de resíduos de antimicrobianos em amostras de leite "in natura" provenientes de quatro bacias leiteiras do Estado do Maranhão**. [Use of Delvotest® SP-NT, Eclipse 50 and Twinsensor - BT 20 in the detection of antimicrobial residues in samples of raw milk from four milk basin in the state of Maranhão]. 2010. 116 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) – Universidade Estadual do Maranhão, São Luís, 2010.

RESUMO

O leite é um alimento de alto valor nutritivo, amplamente consumido pelo ser humano, sendo um dos principais alimentos da dieta das crianças. Um ponto fundamental na qualidade do leite é a ausência de contaminantes, como por exemplo, os resíduos de antimicrobianos. A incorporação acidental ou indiscriminada de antimicrobianos na pecuária leiteira pode levar a ocorrência de níveis de resíduos acima dos LMRs (Limite Máximo de Resíduos) permitidos pela legislação nacional, representando um problema tanto na área econômica quanto na saúde pública. O presente estudo teve como objetivos pesquisar resíduos de antimicrobianos em amostra de leite "in natura" nas bacias leiteiras dos municípios de Itapecuru Mirim, Bacabal, Imperatriz e Ilha de São Luís, MA, utilizando os "Kits" comerciais de triagem (Delvotest® SP–NT, Eclipse 50 e Twinsensor – BT 20), comparar a eficácia entre os testes e obter informações sobre as práticas de manejo adotadas nas propriedades. Foram analisadas 96 amostras de leite "in natura", colhidas diretamente do latão, no período de janeiro a novembro de 2009, provenientes de 96 propriedades rurais. Do total de 96 amostras analisadas, uma (1,04%) estava contaminada por β-lactâmicos, no teste Twinsensor – BT 20; três (3,12%) positivas para resíduos de antimicrobianos no Delvotest® SP-NT e Eclipse 50. Não foi evidenciada diferença estatística entre o tamanho das propriedades (produção leiteira) e a presença de resíduos antimicrobianos no leite. O uso de antimicrobianos para tratar enfermidades do rebanho e a presença de resíduos antimicrobianos no leite foi estatisticamente significante ($p = 0,0038$) no Delvotest® SP–NT e Eclipse 50, sendo a Gentamicina e Oxitetraciclina os princípios ativo utilizados com maior freqüência. Os resultados indicam que o leite produzido nas quatro bacias leiteiras do Maranhão pode representar risco para a saúde pública e que os métodos de triagem Delvotest® SP-NT e Eclipse 50 foram eficientes na detecção dos resíduos antimicrobianos.

Palavras-Chave: Resíduos de Antimicrobianos, Leite "in natura", *Bacillus stearothermophilus var. calidolactis*, *Geobacillus steathermophilus*

Use of Delvotest® SP-NT, Eclipse 50 and Twinsensor - BT 20 in the detection of antimicrobial residues in samples of raw milk from four milk basin in the state of Maranhão

CAMARGO, S.C.A.; COSTA, F.N. **Use of Delvotest® SP-NT, Eclipse 50 and Twinsensor - BT 20 in the detection of antimicrobial residues in samples of raw milk from four milk basin in the state of Maranhão.** [Utilização do Delvotest® SP–NT, Eclipse 50 e Twinsensor – BT 20 na detecção de resíduos de antimicrobianos em amostras de leite "in natura" provenientes de quatro bacias leiteiras do Estado do Maranhão]. 2010. 116 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) – Universidade Estadual do Maranhão, São Luís, 2010.

ABSTRACT

Milk is a high nutritional value food, widely consumed by humans and it's one of the main food in children's diet. A main point in the quality of milk is the absence of contaminants, such as antimicrobial residues. The accidental or indiscriminate use of antimicrobials in dairy products may lead to the occurrence of residue levels above the MRLs (Maximum Residue Limits) permitted by law, an issue both in the economic and public health. This study aimed to find residues of antibiotics in raw milk sample milk basin in the municipalities of Itapecuru Mirim, Bacabal, Imperatriz and the island of São Luís, using commercial kits for screening (Delvotest® SP-NT, Eclipse 50 and Twinsensor - BT 20), to compare the efficacy between the tests and to get information about the management practices adopted in the properties. We analyzed 96 samples of raw milk, taken directly from the brass, from January to November 2009, from 96 farms. From 96 samples analyzed, one (1.04%) was contaminated by β-lactam antibiotics, the testing Twinsensor - BT 20, three (3.12%) positive for residues of antimicrobials in Delvotest® SP-NT and Eclipse 50. There was no significant statistical difference between the size of the farms (dairy) and the presence of antibiotic residues in milk. The use of antimicrobials to treat diseases of livestock and the presence of antibiotic residues in milk was statistically significant ($p = 0.0038$) in Delvotest® SP-NT and Eclipse 50, and the gentamicin and oxytetracycline the active principles used frequently. The results indicate that the milk produced in four milk basin in Maranhão may pose a threat to public health and the sorting Delvotest® SP-NT and Eclipse 50 were efficient in detecting residues of antibiotics.

Keywords: Antimicrobials residues, Raw milk, *Bacillus stearothermophilus var. calidolactis*, *Geobacillus steathermophilus*

Sumário

SUMÁRIO

Pág.

1 INTRODUÇÃO..... 21

2 REVISÃO DE LITERATURA..... 26

2.1 Características do Leite..... 26

2.2 Qualidade do Leite e a Legislação Brasileira..... 27

2.3 O Uso de Antimicrobianos na Agropecuária..... 29

2.3.1 Eliminação de Antimicrobianos pelo Leite..... 30

2.4 Principais doenças infecciosas do gado leiteiro..... 33

2.4.1 Mastite..... 33

2.4.1.1 Metrite..... 36

2.4.2 Prejuízos Econômicos decorrentes do uso de Antimicrobianos..... 37

2.4.3 Saúde Pública e o Uso de Antimicrobianos..... 40

2.5 Limite Máximo de Resíduos de Antimicrobianos..... 42

2.6 Controle de Resíduos de Antimicrobianos no Leite..... 44

2.7 Métodos de Detecção de Resíduos de Antimicrobianos no Leite..... 46

3 MATERIAL E MÉTODOS..... 51

3.1 Seleção das Propriedades Leiteiras e Caracterização da Área de Estudo..... 51

3.2 Colheita das Amostras..... 53

3.3 Procedimentos Laboratoriais..... 53

3.3.1 Delvotest® SP–NT..... 53

3.3.2 Eclipse 50..... 56

3.3.3 Twinsensor – BT 20..... 57

3.4. Inquérito Epidemiológico..... 59

3.5. Análise Estatística..... 59

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO..... 61

5 CONCLUSÕES..... 87

6 CONSIDERAÇÃO FINAL..... 90

REFERÊNCIAS..... 92

APÊNDICE..... 106

ANEXOS..... 110

LISTA DE TABELAS

Página

Tabela 1:	Antimicrobianos utilizados pelos produtores de leite dos municípios de Itapecuru Mirim e Bacabal, MA, 2009.....	64
Tabela 2:	Antimicrobianos utilizados pelos produtores de leite dos municípios de Imperatriz e ilha de São Luís, MA, 2009...	66
Tabela 3:	Freqüência de amostras de leite “in natura” com resíduos de antimicrobianos frente aos testes Delvotest® SP–NT, Eclipse 50 e Twinsensor – BT 20, provenientes das bacias leiteiras de Itapecuru Mirim, Bacabal, Imperatriz e Ilha de São Luís, MA, 2009.....	72
Tabela 4:	Freqüência de amostras de leite “in natura” com resíduos de antimicrobianos frente aos testes Delvotest® SP-NT, Eclipse 50 e Twinsensor – BT 20 em relação à produção de leite das propriedades, do município de Itapecuru Mirim, MA, 2009.....	74
Tabela 5:	Freqüência de amostras de leite “in natura” com resíduos de antimicrobianos frente aos testes Delvotest® SP-NT, Eclipse 50 e Twinsensor – BT 20 em relação à produção de leite das propriedades, do município de Bacabal, MA, 2009.....	76
Tabela 6:	Freqüência de amostras de leite “in natura” com resíduos de antimicrobianos frente aos testes Delvotest® SP-NT, Eclipse 50 e Twinsensor – BT 20 em relação à produção de leite das propriedades, do município de Imperatriz, MA, 2009.....	78
Tabela 7:	Freqüência de amostras de leite “in natura” com resíduos de antimicrobianos frente aos testes Delvotest® SP-NT, Eclipse 50 e Twinsensor – BT 20 em relação à produção de leite das propriedades, da Ilha de São Luís, MA, 2009.....	80

Tabela 8: Número e percentual de amostras de leite, colhidas de rebanho submetidos a tratamentos com antimicrobianos no período da colheita, e positivas, suspeitas ou negativas ao Delvotest® SP-NT, Eclipse 50 e Twinsensor – BT 20, 2009..... 82

Tabela 9: Número de amostras de leite suspeitas de conter resíduos de antimicrobianos no teste Eclipse 50, obtidas de vacas com mastite e em final de lactação, provenientes das bacias leiteiras de Itapecuru Mirim, Bacabal, Imperatriz e Ilha de São Luís, MA, 2009..... 85

LISTA DE FIGURAS

Página

Figura 1:	Distribuição geográfica dos municípios que compõem as bacias leiteiras de Itapecuru Mirim, Bacabal, Imperatriz e Ilha de São Luís, MA.....	52
Figura 2:	Componentes do Kit comercial Delvotest® SP-NT.....	54
Figura 3:	Resultado Positivo: presença de resíduos antimicrobianos.....	55
Figura 4:	Resultado Negativo: ausência de resíduo de antimicrobiano no leite.....	55
Figura 5:	Componentes do Kit comercial Eclipse 50.....	56
Figura 6:	1- Reação positiva: presença de resíduos de antimicrobianos no leite; 2– Reação negativa: ausência de resíduo de antimicrobiano no leite.....	57
Figura 7 (a; b):	Componentes do Kit Twinsensor – BT 20.....	58
Figura 8:	Controles positivo e negativo no Twinsensor – BT 20.	58

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

ANVISA:	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AOAC:	*Association of Official Analytical Chemistis*
APHA:	*Americam Public Health Association*
CCS:	Contagem de Células Somáticas
CMT:	*Califormia Mastitis Test*
ELISA:	*Ensyme linked immunoadsorbant assay*
FDA:	*Food Drugs Administration*
IBGE:	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IDA:	ingestão diária aceitável
LMRs:	Limite Máximo de Resíduos
MAPA:	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
mg/mL:	miligramas por mililitro
µg/mL:	microgramas por mililitro = miligramas por litro = ppm
NOEL:	nível de efeito não observado (*no observable effect*)
PNCR:	Plano Nacional de Controle de Resíduos em Produtos de Origem Animal
OMS:	Organização Mundial de Saúde
PNCRL:	Programa de Controle de Resíduos em Leite
ppb:	partes por bilhão
ppm:	partes por milhão
RIISPOA:	Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal
UI:	unidades Internacionais
WHO:	World Health Organization
WMT:	*Wisconsin Mastitis Test*

Introdução

1 INTRODUÇÃO

O sistema agroindustrial do leite tem grande importância no agronegócio brasileiro, sendo esta atividade praticada em mais de um milhão de propriedades rurais, com aproximadamente 4,8 milhões de estabelecimentos rurais, dos quais 85% são considerados de produção familiar, tendo a pecuária de leite como fonte de renda (MARTINS, 2003; ZOCCAL, 2004). Em virtude disso, a produção de leite no país vem se destacando no comércio interno e externo, com dados bastante consistentes, possuindo uma posição privilegiada no cenário mundial, apesar da produtividade do rebanho leiteiro ser relativamente baixa.

A baixa produtividade do rebanho brasileiro é determinada por vários fatores que implicam em conseqüências econômicas e sociais, entre eles, potencial genético, manejo inadequado, mão-de-obra qualificada, baixa tecnologia, política econômica ineficiente e problemas sanitários. Então, para atingir real eficiência na produção leiteira de um país é importante monitorar a saúde do rebanho, uma vez que a saúde do animal influi diretamente no rendimento da produção e na qualidade do leite (COSTA, 2001).

A elevada produção leiteira no Brasil é justificada pelo tamanho do rebanho, fazendo com que o país ocupe o quinto lugar na produção mundial de leite, com uma produção superior a 26 bilhões de litros de leite por ano (OCB, 2008). A maior parte da produção de leite do Brasil concentra-se nas regiões Sudeste (50%) e Sul (23%). Entre os estados, Minas Gerais lidera a produção nacional, com 30%, ficando em segundo lugar, São Paulo com 14% da produção.

O Estado do Maranhão, segundo o IBGE (2008), possui o segundo maior rebanho da região Nordeste com aproximadamente 6.816.338 cabeças, perdendo apenas para o estado da Bahia. A produção leiteira do estado do Maranhão é de 365.564 mil litros de leite, representando 11% da produção na região, com 16.537 estabelecimentos produtores, gerando uma receita de aproximadamente 149 mil reais para o estado.

Desde a década de 80, a cadeia produtiva de lácteos tem se empenhado para alcançar e sustentar padrões excelentes de qualidade e inocuidade dos produtos desde a obtenção da matéria-prima até o consumidor final. Fatos estes exigidos tanto pela legislação normatizadora do setor, quanto pelo mercado consumidor, já que, os produtos lácteos exercem um papel de extrema importância na nutrição do ser humano, onde a ingestão de um litro de leite por dia é capaz de suprir todas as necessidades de proteína em crianças (até 6 anos), mais de 60% das necessidades protéicas dos adolescentes e 50% das necessidades protéicas dos adultos. Quanto ao cálcio, a mesma quantidade de leite ingerida diariamente, supre 100% das necessidades (RAIA JUNIOR, 2001; LEME, 2005; RIBEIRO, 2009)

No Brasil, infelizmente, existem dois tipos de mercados lácteos, conhecidos como formal e informal, ambos de grande expressão econômica, diferenciados pela presença, ou não da inspeção sanitária e higiênica pelo governo. No critério qualidade, a ausência de contaminantes, como por exemplo, os resíduos antimicrobianos, segundo o Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal (RIISPOA) é o principal ponto crítico de controle de contaminação química do leite, devendo os resíduos de antimicrobianos ser monitorados nas indústrias de laticínios (BRASIL, 1981; CULLOR, 1993; FOLLY & MACHADO, 2001), visto que vários relatos confirmam sua resistência aos métodos de conservação: calor e congelamento, constituindo um potencial risco à saúde e rejeição da empresa pelo consumidor.

Desde o final da década de 60, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) prevê na legislação brasileira o uso de medicamentos veterinários para o tratamento das enfermidades em vacas de leite, havendo, portanto, para algumas categorias de animais, o uso restritivo, como por exemplo, o uso em vacas no período de lactação. Além disso, vale ressaltar a existência de legislação específica que determina a fiscalização do uso dos produtos veterinários em todo território nacional, na qual esta fiscalização se estende desde a manipulação, acondicionamento e utilização ou venda dos produtos (ANVISA, 2001).

Desta maneira, é fundamental o monitoramento freqüente de resíduos de medicamentos e seus derivados metabólitos no leite, adotando-se, como referência os limites estabelecidos pelas agências internacionais. De acordo com a *Association of Official Analytical Chemistis* (AOAC, 1995) e *Americam Public Health Association* (APHA, 1984) várias metodologias são recomendadas para a detecção de resíduos de antimicrobianos no leite, estando algumas disponíveis comercialmente. Estas envolvem desde técnicas microbiológicas simples como técnicas mais complexas, por exemplo, cromatografia, imunoensaio, espectrometria de massa, ressonância e eletroforese em gel de agarose (NASCIMENTO et al., 2001; MEDEIROS, 2004; NASCIMENTO et al., 2008).

No Brasil, segundo a Instrução Normativa Nº 51 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) a pesquisa de resíduos de antibióticos no leite é periódica e a concentração de antibióticos no leite não deve ser superior aos Limites Máximos de Resíduos (LMRs), previsto para cada grupo químico específico (BRASIL, 2002). Vale ressaltar, que vários Kits analíticos de detecção de resíduos de antibióticos foram aprovados e autorizados pelo MAPA para o controle da presença dessas substâncias no leite, utilizando diferentes princípios de ação e detecção (BRASIL, 2004).

Para uma maior segurança no consumo de leite de boa qualidade, tanto no que diz respeito à manutenção de sua composição química natural, quanto da ausência de substâncias que possam levar efeitos danosos à saúde, é necessário o estabelecimento de políticas públicas efetivas de fiscalização dos alimentos (NASCIMENTO et al., 2001). Mas, para o sucesso dos programas de controle, segundo Brito et al. (1997) é necessário mudanças de atitude e de manejo, onde o produtor e os funcionários desempenham um papel primordial.

Baseando-se no que há na literatura e ressaltando-se a importância de estudos sobre resíduos de antimicrobianos no leite, tanto na área econômica como na saúde pública, a elevada prevalência de mastites entre outras enfermidades, que necessitam da utilização do uso de antimicrobianos

para tratamento, assim como a inexistência de um diagnóstico de situação sobre este tema no Estado do Maranhão, realizou-se esta pesquisa com os seguintes objetivos: detectar resíduos de antimicrobianos em amostra de leite “in natura” provenientes de quatro bacias leiteiras do Estado do Maranhão, utilizando os Kits comerciais de triagem (Delvotest® SP–NT, Eclipse 50 e Twinsensor – BT 20), comparar a eficácia entre os testes Delvotest® SP–NT, Eclipse 50 e Twinsensor – BT 20 e obter informações sobre as práticas de manejo adotadas nas propriedades.

Revisão de Literatura

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Características do Leite

O leite é a secreção láctea, obtida pela ordenha completa, ininterrupta, a partir de elementos que passam do sangue para as células especializadas da glândula de vacas sadias e em condições de higiene, constituído por uma mistura complexa e heterogênea de substâncias orgânicas e inorgânicas (BRASIL, 2002; BRITO & LANGE, 2005).

A função biológica do leite é o fornecimento de nutrientes e proteção imunológica para o recém-nascido, uma vez que estão presentes em sua composição todos os nutrientes requeridos para a manutenção e o crescimento (energia, aminoácidos, sais minerais e vitaminas), sendo caracterizado como alimento completo de alto valor nutritivo para o ser humano, particularmente crianças e idosos (SANTOS & FONSECA, 2007; VILLA & PINTO, 2008).

Por ser considerado um alimento completo de nutrientes facilmente assimiláveis, o leite é um excelente meio de cultivo para a maioria dos microrganismos. Mas, devido a essas qualidades intrínsecas, é um produto extremante perecível que pode sofrer alterações nas suas qualidades físico-químicas e microbiológicas, tornando-se inadequado para o consumo (NETTO et al., 2005).

Conforme Oliveira et al. (1999) e Nascimento et al. (2001) o leite sofre alterações em sua composição química devido a uma série de fatores, tais como, raça, idade e alimentação do animal, estágio de lactação, variações climáticas, infecções do úbere (glândulas mamárias) ou ainda pela presença de resíduos antimicrobianos.

Dentre os fatores mencionados, as infecções no úbere, mesmo que subclínicas, segundo Nascimento et al. (2001) influenciam fortemente em sua composição, tendo como principal efeito a redução no teor de lactose, caseína, gordura, cálcio e fósforo, além do aumento de imunoglobulinas, cloretos, sódio e lipase.

2.2 Qualidade do Leite e a Legislação Brasileira

A qualidade e a segurança dos alimentos têm recebido maior atenção por parte das autoridades, produtores, indústrias, profissionais responsáveis pela qualidade dos alimentos e por parte dos consumidores, especialmente em relação aos perigos microbiológicos e químicos presentes nos alimentos (MEDEIROS et al., 2004; NERO et al., 2007). Apesar de microrganismos patogênicos serem os agentes relacionados com maior freqüência causando enfermidades veiculadas por alimentos, a presença de substâncias químicas é bastante comum, visto que no Brasil e demais países do mundo, os antimicrobianos são resíduos químicos detectados com grande freqüência no leite.

O setor de produtos lácteos é, em especial, a atividade produtiva de maior exigência por parte dos consumidores, principalmente com o intuito de oferecer produtos de excelência, respeitando os quesitos ligados à inocuidade dos alimentos. Sendo assim, o grande desafio é alcançar e sustentar os padrões de identidade e qualidade em toda a cadeia produtiva, de forma competitiva, ou seja, racionalizando a produção de forma a atingir o máximo rendimento industrial (BRITO, 1998; LEME, 2005).

A Instrução Normativa Nº 7, de 17 de maio de 1999, foi sancionada pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), com o intuito de regulamentar a produção de leite orgânico no Brasil, assegurar a qualidade do produto, garantir competitividade de mercado para os produtos de origem animal e vegetal, bem como nortear as exigências para o credenciamento das propriedades e Instituições certificadoras (BRASIL, 1999), sendo revogado pela Instrução Normativa Nº 64, de 18 de dezembro de 2008 (MAPA), que aprova o regulamento técnico para os sistemas orgânicos de produção animal e vegetal (BRASIL, 2008). No mesmo contexto, a Instrução Normativa Nº 51, de 20 de setembro de 2002, regulamentada pelo MAPA, que veio substituir a legislação de 1952 (RIISPOA) promoveu várias modificações quanto às exigências da produção de leite em animais domésticos, com vistas a melhorar e assegurar as condições nutricionais e de inocuidade do produto e seus derivados,

procurando adequar gradativamente à produção nacional, com base na qualidade e demandas de mercado. Dentre as principais modificações e/ou aumento no rigor da fiscalização, destaca-se as exigências quanto aos valores de células somáticas, contagem bacteriana total, ausência de resíduos de antimicrobianos, bem como a colheita a granel nos tanques de expansão. O objetivo desta norma, portanto, é harmonizar, em termos legais, as condições higiênico-sanitárias do leite na sua cadeia produtiva (BRASIL, 2002; RIBEIRO et al., 2009).

Os contaminantes físico-químicos potencialmente presentes no leite, possuem instruções normativas bem definidas referentes ao que pode estar ou não presente no leite, e em especial, o Limite Máximo de Resíduos (LMRs) permitidos. Nesse contexto, os LMRs de antimicrobianos em alimentos são estabelecidos nos países a partir da realização prévia de vários testes e análises, realizados segundo protocolos e exigências oficiais que se fundamentam nas recomendações e diretrizes emanadas do *Codex Alimentarius* da Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação – FAO e da Organização Mundial de Saúde – OMS (FAO/OMS, 2002; WHO, 2002), ou na ausência destes, a partir de valores constantes das diretivas da União Européia e/ou da *Food Drugs Administration* – FDA dos Estados Unidos da América (BRASIL, 1999). Porém, em virtude de situações como, por exemplo, ocorrência de alterações hematológicas (discrasia sangüínea) pelo uso do cloranfenicol, potencial mutagênico (nitrofuranos) e a resistência microbiana causada pela avoparcina, os países restringem ou mesmo vetam a utilização do antimicrobiano que venha causar risco a saúde do consumidor nos produtos de origem animal, a exemplo do Brasil através da Portaria Ministerial n.448, de 10/09/1998 (BRASIL, 1998; PALERMO NETO, 2001).

2.3 O Uso de Antimicrobianos na Agropecuária

Os antimicrobianos representam um grupo importante de substâncias utilizadas para inibir ou tornar inativos os microrganismos, sendo amplamente utilizados, desde 1950, na cadeia produtiva dos alimentos de origem animal. Das substâncias antimicrobianas, as mais usadas são os antibióticos (BRITO & LANGE, 2005).

Os antibióticos são agentes antibacterianos específicos, produzidos por organismos vivos, bem como análogos estruturais obtidos por síntese completa ou parcial, inibindo processos vitais de uma ou mais espécies de microrganismos, a partir da inibição da síntese protéica, danos à membrana citoplasmática ou ainda interferindo em suas reações metabólicas, podendo agir, mesmo em baixas concentrações (NASCIMENTO et al., 2008).

Com a disseminação dos sistemas intensivos de produção de leite, o uso de antimicrobianos é essencial para a manutenção da saúde animal, produtividade, conforto e bem-estar dos animais. Os antimicrobianos disponíveis no mercado são utilizados sob a forma de diversos princípios ativos, isoladamente ou em associação, administrado por diferentes vias, em dosagem e veículos distintos e, em períodos diferentes da vida do animal, seco ou em lactação (LEME, 2005).

Os principais grupos de antimicrobianos utilizados na produção animal incluem os β-lactâmicos (penicilinas e cefalosporinas), as tetraciclinas (oxitetraciclinas e clortetraciclina), polipeptídeos (bacitracina), os aminoglicosídeos (estreptomicina, neomicina e gentamicina), os macrolídeos (eritromicina), rifamicinas (rifampicina) e as sulfonamidas (sulfametazina) (MITCHEL et al., 1998; COM, 2001). Dos antimicrobianos existentes, a classe dos β-lactâmicos é o mais utilizado no tratamento de doenças em rebanhos leiteiros, sendo assim, os mais freqüentemente detectados no leite (NERO et al., 2007).

A incorporação de antimicrobianos na pecuária leiteira pode ocorrer de forma acidental com uso de medicamentos para fins terapêuticos ou profiláticos, principalmente, em infecções da glândula mamária (mastite) e

infecções do trato reprodutivo (metrite); ou de maneira indiscriminada, adicionados à alimentação animal como suplemento dietético (VEISSEYRE, 1988; FAGUNDES & MOLIN, 1988; FOLLY & MACHADO, 2001), promovendo o crescimento ou o aumento da produção, através da melhora da conversão alimentar (PALERMO NETO, 2001).

Outras condições podem ser citadas, quanto à presença de resíduos de antimicrobianos no leite, como a higienização de equipamentos e utensílios da indústria e/ou introdução voluntária fraudulenta de drogas para mascarar a deficiência na qualidade higiênica do leite e prolongar a durabilidade do produto (BORGES et al., 2000). Tais procedimentos conduzem à presença de níveis de resíduos de antimicrobianos acima do LMRs no leite, permitidos pela legislação nacional, representando um risco ao consumidor e sendo, portanto, um sério problema na área econômica e na saúde pública.

2.3.1 Eliminação de Antimicrobianos pelo Leite

A glândula mamária ainda não possui sua origem conhecida, mas acredita-se que tenha evoluído a partir de glândulas modificadas da pele, uma vez que a sua origem embrionária é a ectoderme. Para desempenhar sua função de síntese e armazenamento de grandes volumes de leite, a glândula mamária é formada por uma estrutura ramificada, composta e túbero-alveolar (FONSECA & SANTOS, 2007). Na síntese, as células epiteliais secretoras utilizam nutrientes absorvidos no trato gastrointestinal ou oriundo de reservas corporais, os quais são captados a partir da corrente sanguínea.

O epitélio secretor da glândula mamária apresenta características de uma membrana lipídica, que permite a passagem, por difusão, de substâncias apolares cuja concentração seja similar no plasma e leite, além de separar o sangue do leite, facilitando assim a excreção de medicamentos de caráter básico pelo leite. A diferença de pH do plasma e do leite (pH do leite é mais ácido), permite que as bases fracas venham a se concentrar mais no leite que no plasma, desta forma as tetraciclinas, penetamato de penicilina, eritromicina e lincomicina apresentam concentrações maiores no soro do leite. Por outro

lado, ácidos fracos tendem a se concentrar mais no plasma sanguíneo que no soro do leite, por isso, penicilina, benzilpenicilina, sulfonamidas e novobiocina apresentam maior concentração no plasma sanguíneo. Para as substâncias neutras, como o cloranfenicol, há um equilíbrio não influenciado pela diferença de pH do sangue e do leite (MIDIO & MARTINS, 2000; BALLARINI, 2001).

Pesquisadores relatam que a produção leiteira e o estado fisiológico da glândula mamária podem exercer influência sobre a eliminação de resíduos de antimicrobianos no leite (COSTA, 1999; RAIA JUNIOR, 2001). Logo, as alterações fisiopatológicas pela qual passa a glândula mamária, podem interferir com a farmacocinética dos antimicrobianos, favorecendo sua eliminação através do leite, pois existe uma maior difusão do composto do sistema circulatório para o parênquima da glândula (COSTA et al., 2000). Para Raia et al. (1999) o tempo de eliminação dos antimicrobianos nos quartos mamários com mastite pode ser maior do que em quartos saudáveis (COELHO, 2002; FAGUNDES, 2003).

A transferência de antimicrobianos por difusão direta ou passiva para o leite, independente do princípio ativo e da via de administração, ocorre entre todos os quartos mamários adjacentes, paralelos, diagonais e colaterais (BRITO, 2004). Isto se deve à absorção do antibiótico, que passa para a corrente sanguínea, chegando ao outros quarto mamários, contaminando todo o leite. Em virtude disso, Coelho & Costa (2002) citam que todo leite deve ser descartado, isto é, de todos os quartos da glândula mamária de animais com mastite, durante o período de tratamento e o período de carência exigido pelo fabricante para cada princípio ativo administrado, pois corroboram para o aparecimento de resíduos de antimicrobianos, acima dos LMRs estabelecido, ou até mesmo para o período de carência estipulado.

O período seco inicia-se após o término de um ciclo de lactação, cujo tempo mínimo para uma nova lactação é de 60 dias. Em tratamentos de mastite no período seco, o medicamento é aplicado na glândula mamária com veículo oleoso tendo, sua ação prolongada.

Fagundes (2003) constatou a presença de resíduos de antibióticos 60 dias após a administração do produto para tratamento de mastite, em período de secagem, onde 29,1% dos animais de 65 vacas em tratamento apresentaram resíduos de antibióticos no leite; 19,4% dos animais continuavam eliminando tais resíduos, no período entre 60 e 70 dias após administração; e, 7,1% dos animais, após 70 dias da administração. Estes resultados mostram que o cumprimento do período de carência (60 dias), para tratamentos realizados no período seco pode não ser suficiente para tornar o leite isento de resíduos. Neste sentido, o autor afirma que é possível que os resíduos encontrados após 60 dias da aplicação, estejam abaixo dos LMRs fixados pelo *Codex Alimentarius* e/ou pelo MAPA. Vale ressaltar também que, o período seco é de fundamental importância para se evitar a ocorrência de resíduos de antimicrobianos no leite.

A porta de entrada dos resíduos antimicrobianos e outras substâncias químicas no leite é a produção primária. Por isso, é fundamental que os produtores compreendam os fatores de riscos que levam a presença de resíduos no leite e como preveni-los (BRITO & LANGE, 2005).

Para Souza (2006), os fatores de riscos que corroboram para o aparecimento de resíduos antimicrobianos no leite são: 1) tratamentos aleatórios; 2) não identificação dos animais tratados; 3) não separação de vacas em tratamento no momento da ordenha; 4) uso de dosagem acima da recomendada, tanto em relação ao período de aplicação quanto à quantidade de aplicações por dose; 5) falhas na observação e não cumprimento dos períodos de carência dos antimicrobianos administrados; 6) excreção prolongada dos antimicrobianos; 9) descarte do leite apenas dos quartos tratados; 10) mistura acidental de leite normal com leite contaminado de antibióticos; 11) contaminação dos equipamentos de ordenha; 12) vacas que tiveram seu período seco reduzido ou parto precoce; 13) uso incorreto de medicamentos destinado a vacas no período seco em vacas no período de lactação.

Diante das implicações decorrentes deste tema, na literatura, há necessidade de adoção e manutenção de boas práticas de manejo e de produção leiteira, onde a pesquisa de resíduos de antimicrobianos no produto final é de grande valia para detectar a eficácia dos sistemas de controle de qualidade higiênico-sanitária do produto, em especial dos produtos químicos.

2.4 Principais doenças infecciosas do gado leiteiro

2.4.1 Mastite

A mastite é uma enfermidade multifatorial, definida como reação inflamatória da glândula mamária que, além de mudanças físico-químicas e microbiológicas, é caracterizada por um aumento do número de células somáticas (CCS) no leite e modificações no tecido mamário, que dependendo da sua forma de manifestação, pode ser classificada em clínica e subclínica (FAGUNDES & OLIVEIRA, 2004).

A mastite clínica caracteriza-se por alterações visíveis na glândula mamária e/ou leite. Pode ser aguda apresentando sintomatologia evidente de processo inflamatório (dor, calor, rubor e edema), ou crônica caracterizada por fibrosamento do tecido mamário e alterações no leite (formação de grumos e coágulos), independentemente da contagem de células somáticas (CCS) do leite. O avanço do processo inflamatório leva à perda de função da glândula mamária (RAIA JUNIOR, 2001; SILVA et al., 2008).

A mastite subclínica é caracterizada pela ausência de sinais inflamatórios ou fibrosamento, contudo, ocorre redução na produção de leite, possibilitando isolamento de um agente patogênico e mudanças na composição do leite, sendo necessária a utilização de testes auxiliares para seu diagnóstico, como *California Mastitis Test* (CMT), *Wisconsin Mastitis Test* (WMT), condutividade elétrica e CCS (RAIA JUNIOR, 2001; DELLA LIBERA et al., 2001; SILVA et al., 2008).

Por ser uma enfermidade multifatorial, as mastites são causadas por microrganismos patogênicos, que podem estar presentes à microbiota natural

dos animais e do ambiente; pode-se citar: *Actinomyces pyogenes*, alguns representantes da família *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Streptococcus* spp, microrganismos ubiquitários como os fungos, especialmente as leveduras e algas aclorofiladas (*Prototheca* sp.). O *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae* e *Streptococcus dysgalactiae* são os microrganismos mais freqüentemente isolados do leite de vacas com mastites (BRITO, 2001; FONSECA & SANTOS, 2007; SILVA et al., 2008).

A contagem de células somáticas (CCS) é o principal indicador da qualidade do leite utilizado pelas indústrias, produtores e entidades governamentais, pois detecta anormalidades que indicam alterações nas qualidades microbiológicas, físico-química e nutricional do produto (SOUZA, 2006).

Para características físico-químicas, a alta CCS está correlacionada com a viscosidade, valores de pH, ponto de congelamento e capacidade tamponante. O tempo de coagulação na fabricação do queijo é retardado, levando diferenças essenciais na fase primária de coagulação. Mudança no teor de proteína, rendimento do queijo e conteúdos sólidos também são observados, não sendo, portanto, corrigido nem mesmo pela pasteurização ou centrifugação. Além disso, há diferenças nas propriedades organolépticas, pois o teor de cloretos é aumentado e o teor de lactose é reduzido, proporcionando ao leite uma vida de prateleira mais curta e sabor rançoso, pela presença de ácidos graxos livres (TETZNER et al., 2005).

A ocorrência de mastite em rebanhos leiteiros e o aumento no número de células somáticas estão associados a fatores fisiológicos e ambientais. Fatores estes, identificados como de risco que inclui o número de parições, estádio da lactação (início e final), alta produção e escape de leite no momento da ordenha, tamanho do rebanho, tipo de ordenha (manual ou mecânica), qualidade da ordenha (não desinfecção dos tetos antes e após a ordenha), funcionamento inadequado do equipamento e não treinamento e motivação dos ordenhadores (SOUZA et al., 2005).

A partir de 2008, a Instrução Normativa Nº 51/2002 (Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento - MAPA) estabelece o requisito de no máximo 7,5 x 10^5 células somáticas (CS/mL) para as regiões Sul, Sudeste e Centro-Oeste do leite para consumo. Para as regiões Norte e Nordeste o limite é de 1,0 x 10^6 células somáticas (CS/mL), entretanto, em julho de 2010, entrarão em vigor o limite de 7,5 x 10^5 células somáticas (CS/mL) (BRASIL, 2002).

Segundo Santos (2002), rebanhos com elevados números de células somáticas no leite possuem maior risco de ocorrência de resíduos de antimicrobianos, uma vez que, o tratamento com antimicrobianos é uma das medidas utilizadas para a redução dos casos de mastites. Esta probabilidade é cerca de cinco vezes maior, nos rebanhos com CCS maior que 750.000 células/mL, em relação aos rebanhos com baixa CCS.

Fagundes (1981) analisando 24 vacas da raça holandesa em lactação, sendo oito com mastite e 16 saudáveis, constatou que após a aplicação de penicilina G e de clortetraciclina, em ambos os grupos, as vacas com mastite eliminaram resíduos, entre 126 e 141 horas, respectivamente após a aplicação do medicamento; enquanto que as vacas sadias eliminaram penicilina G somente nas primeiras 72 horas, após a aplicação do medicamento e clortetraciclina, nas primeiras 96 horas. Este trabalho evidencia que o período de carência necessário para a ausência de resíduos de fármacos no leite deve ser definido levando-se em consideração a farmacocinética e a farmacodinâmica da droga na glândula mamária, assim como o estado fisiológico da mesma.

A presença de resíduos de antimicrobiano no leite está estreitamente associada ao tratamento de mastite, e o aumento de células somáticas no leite reflete a ocorrência de mastite. Diante do exposto, o controle da mastite é primordial, visto que, a contaminação por antimicrobianos no leite se deve, principalmente, às conseqüências do tratamento de vacas em lactação, ou do controle da mastite durante o período seco (BIACCHI et al., 2004; BRITO & LANGE, 2005).

Para Souza et al. (2005), o controle da mastite baseia-se na adoção de estratégias de prevenção, entre as quais incluem a higienização na prática da ordenha, o uso correto da ordenhadeira, disponibilidade de alojamentos limpos e secos, administração de programas de nutrição saudável, identificação e tratamento de vacas com mastite clínica e subclínica.

2.4.1.1 Metrite

A metrite é uma infecção bacteriana aguda e ascendente do útero, sendo geralmente, um distúrbio pós-parto, particularmente de vacas de leite. É provocada, normalmente por bactérias Gram positivas, principalmente por *Escherichia coli* (MOREIRA NETO, 2000). Os sintomas e sinais clínicos são típicos de uma infecção bacteriana: febre, desidratação, depressão, anorexia e taquicardia. Além disso, é observado corrimento vaginal fétido, com ou sem retenção das membranas fetais, dilatação do útero com consistência flutuante, queda na produção de leite e falta de apetite (SOUZA, 2006).

Para Wattiaux (1994), a metrite pode ser identificada através de acúmulo de pus no útero da fêmea. A ocorrência da metrite advém de abortos, partos prematuros, retenção de membranas fetais, partos gemelares, distocia, lesão de útero e de cérvix, além de falta de higiene, manobras obstétricas mal conduzidas, retenção de secundinas, atonia uterina, deficiência nutricional ou sanitária ou, ainda, sêmen contaminado.

Diversos tratamentos podem ser utilizados em casos de metrite, mas o tipo de tratamento a ser utilizado depende do grau de severidade da doença. Nos casos severos, os fluidos uterinos são evacuados por palpação retal associado com infusões intra-uterinas a base de anti-sépticos e antibióticos e/ou a utilização de tratamentos sistêmicos com a utilização de antibióticos injetáveis. Além disso, pode optar-se pela indução do cio com o uso do hormônio prostaglandina no tratamento da metrite, pois durante o cio, as contrações uterinas ajudam a drenar a infecção minimizando o uso de antibióticos, e conseqüentemente a presença de resíduos de antibióticos no leite (BRESSAM et al., 2008).

2.4.2 Prejuízos Econômicos decorrentes do uso de Antimicrobianos

O leite pode ser transformado numa enorme variedade de produtos lácteos, desde os queijos aos leites fermentados, para os quais são utilizados diferentes “starter”, isto é, culturas de arranque, que iniciam a produção de ácido láctico e conseqüente coagulação do leite (ANIL, 2002).

Vários fatores podem interferir na atividade das culturas de arranque, incluindo as variações do próprio leite (fatores sazonais, mastites), processo de fabrico, entre outros. Entretanto, os resíduos de antimicrobianos e os bacteriófagos são os inibidores mais significantes na indústria de lacticínios, resultando em grandes perdas de partidas de leite (ANIL, 2002).

Nesse contexto, para a indústria, o principal problema quanto à presença de resíduos antimicrobianos no leite é a inibição de culturas lácteas sensíveis utilizadas na fabricação de queijos, iogurtes e outros produtos fermentados, dificultando sua obtenção ou alterando sua qualidade, através da modificação dos resultados de análises laboratoriais ou sabores na produção, principalmente na manteiga e no creme. Além disso, a presença de resíduos de antimicrobianos no leite favorece a multiplicação de microrganismos indesejáveis (coliformes, leveduras e bactérias putrefativas), dificultando seu pleno aproveitamento industrial (FOLLY & MACHADO, 2001; BRITO & LANGE, 2005; MARTINS et al., 2006).

Para Sbampato (2000), os principais problemas que ocorrem em queijos oriundos de leites contendo resíduos de antimicrobianos são a má dessoragem da coalhada, fermentação indesejável com produção de gás e a maturação irregular, devido à interferência dos antimicrobianos sobre os fermentos utilizados para fabricação de queijos, os quais são inibidos.

Mol (1976) afirma que 10 UI/mL de penicilina no leite retardam a consideravelmente a acidificação; 100 UI/mL aumentam a acidificação; 150 UI/mL ocasionam a produção de um queijo anormal e 500 UI/mL inibem totalmente os fermentados. Para Jacquet (1953), a concentração entre 0,5 – 1,0 UI/mL de penicilina no leite, é capaz de impregnar, o queijo Camembert de gás, durante sua fabricação. A tetraciclina no leite, em pequenas

concentrações estabelece uma interação entre a caseína, o antibiótico e o cálcio, não ocorrendo a coagulação da proteína, durante a produção do queijo Cottage. Maupoumé (1953) observou a putrefação de queijos por coliformes resistentes à ação de antibióticos, fazendo com que não ocorresse a fermentação pelas cepas selecionadas, acarretando modificações nas características do produto.

O iogurte, produto obtido da fermentação láctea, é outro derivado que tem sua fabricação afetada pela presença de resíduos antimicrobianos, retardando o processo de acidificação, com conseqüente desequilíbrio no desenvolvimento das bactérias componentes do “fermento láctico”. O iogurte produzido nestas condições apresentará sabor de peptona e aspecto anormal, devido à exsudação abundante de soro que se acumula na superfície do produto.

Para Fagundes & Molin (1988) os resíduos de antimicrobianos interferem sobre as principais culturas bacterianas *Streptococcus thermophilus* e *Lactobacillus bulgaricus*, utilizadas na fabricação dos iogurtes. Kosikowski & Mocquot (1958) afirmam que, concentrações de 0,01 a 0,05 UI/mL de penicilina no leite inibem *Streptococcus thermophilus*, enquanto que *Lactobacillus bulgaricus* é mais resistente, necessitando de concentração de 0,30 a 0,60 UI/mL. Para Jacquet (1953) a concentração de 0,02 UI/mL de penicilina no leite retarda a acidificação láctica do iogurte.

Outro fator a ser considerado sob o ponto de vista tecnológico é a influência dos testes da qualidade bacteriológica sob a presença de resíduos de antimicrobianos, pois os testes de qualidade bacteriológica (redutase, fosfatase e peroxidase) são baseados direta ou indiretamente no desenvolvimento da microbiota bacteriana, o que leva o suprimento ou inibição da flora na presença destas drogas, melhorando assim a qualidade do produto (FAGUNDES & MOLIN, 1998).

Aurvalle (1981) afirma que, há alteração nos resultados do teste para Fosfatase alcalina em leite pasteurizado, contendo tetraciclina ou penicilina, uma vez que se verificou o aparecimento da cor que indica uma

pasteurização deficiente, induzida pelos antibióticos. Para a Redutase, ocorre uma redução na quantidade, não havendo, portanto, uma descoloração do azul de metileno de acordo com a realidade, indicando falsamente uma melhora da qualidade bacteriológica.

Em trabalhos realizados por Fagundes & Molin (1988), para determinar as concentrações de antibióticos “in vitro” que interferem nos testes de qualidade bacteriológica (redutase, fosfatase, peroxidase) na fermentação do iogurte e na coagulação do queijo, verificaram que para ocorrer alterações na enzima peroxidase sob a presença dos antibióticos cloranfenicol e clortetraciclina são necessários elevadas concentrações (60 mg/mL e 0,05 mg/mL, respectivamente), a qual não seriam encontradas no leite. Porém, quanto às concentrações dos antibióticos penicilina/estreptomicina, não houve nenhuma influência da presença destes antibióticos sob a atividade da enzima peroxidase.

Outro fator de extrema importância dos resíduos de antimicrobianos no leite é sua termorresistência. Vários pesquisadores relatam que os antimicrobianos resistem aos métodos de conservação do leite, como calor e congelamento. Assim, o aquecimento do leite ou sua pasteurização não afetam a presença destes, e em alguns casos só modificam sua atividade (AURVALLE, 1981). Thamer (1964) encontrou que apenas 8% de penicilina foi inativada pela pasteurização do leite e 20% pelo aquecimento a 32ºC por 32 minutos. Entretanto, Marth & Ellickson (1959) mostraram que a pasteurização não elimina a penicilina no leite e afirmaram ainda que os antibióticos resistem também a ebulição durante 60 minutos e ao aquecimento em autoclave à pressão de 1 Kg/cm^2, durante 15 – 30 minutos.

Pillet & Thoma (1969) concluíram que a penicilina e a tetraciclina no leite foram eliminadas após aquecimento a 100ºC durante 3 horas. Segundo Brito (1998) o cloranfenicol é completamente resistente ao aquecimento. A fervura ou o aquecimento do leite a 100°C inativa a penicilina em 50%, a estreptomicina em 66% e a oxitetraciclina e tetraciclina em 90%.

Aurvalle (1981) afirma que as amostras de leite contendo penicilina, estreptomicina e neomicina, podem permanecer congeladas cerca de 12 semanas, sem perda da ação residual. Observaram também que a estocagem do leite refrigerado a 8ºC ou 10ºC por sete dias, não interfere na atividade antibiótica da penicilina, estreptomicina, clortetraciclina e bacitracina.

Sendo assim, para que seja seguro e de boa qualidade o leite deve ser isento de resíduos de químicos, como antimicrobianos e pesticidas, pois a presença de resíduos de antimicrobianos no leite é um fator que afeta negativamente a qualidade dos derivados lácteos.

2.4.3 Saúde Pública e o Uso de Antimicrobianos

A presença de resíduos de antimicrobianos tem sido um dos grandes desafios impostos à indústria de alimentos e causa de polêmica por parte dos órgãos competentes, pois gera riscos à saúde humana: farmacológicos e toxicológicos; microbiológicos (desenvolvimento de resistência de microrganismos patogênicos na flora intestinal) e imunopatológicos, como as alergias (BARROS et al., 2001; PORTO et al., 2002).

No aspecto toxicológico, a presença de resíduos de antimicrobianos no leite gera a possibilidade desses resíduos causarem reações alérgicas aos consumidores. As reações alérgicas se manifestam, geralmente, como urticárias, dermatites ou através de problemas respiratórios, rinites e asma brônquica, em humanos hipersensível à penicilina ao ingerirem concentrações de 1 ppb dessa substância . Além da penicilina, estas reações são freqüentes, em menor grau, em humanos hipersensíveis às tetraciclinas, estreptomicina, neomicina e às sulfonamidas (FAGUNDES & MOLIN, 1988; MARTINS & VAZ, 2000; NERO et al., 2007).

Lederer (1991) relata casos de reações de hipersensibilidade (tipo asmático, digestivas e cutâneas) após consumo de leite, em pessoas que apresentaram testes cutâneos positivos à penicilina e negativos ao leite. O

autor enfatiza que para provocar estas reações, não é relevante a quantidade destas drogas em alimentos, ou seja, pequenas quantidades são suficientes para desencadear o processo. Por ser elevada a percentagem de pessoas alérgicas à penicilina (aproximadamente 10%) e seu amplo uso em fazendas produtores de leite, os resíduos de penicilina constituem a maior preocupação com relação aos ricos oferecidos aos consumidores.

Segundo Brito & Lange (2005) as reações tóxicas são relacionadas a alguns antimicrobianos com potencial carcinogênico, isto é, que podem desenvolver tumores em animais de laboratório (sulfametazina, nitrofuoranos) ou mutagênico dando origem a alterações hematológicas (discrasia sangüínea, anemia aplástica) e nevrite óptica em indivíduos susceptíveis ao cloranfenicol, independente da dose.

Para Nascimento et al. (2001) o risco do consumo de antibióticos (metronidazol, rifampicina, trimetropim, estreptomicina e tetraciclina), por gestantes, se deve ao potencial teratogênico destes que podem causar otoxidade, alteração no desenvolvimento ósseo fetal e distúrbios dentários do quarto mês de vida fetal até os oito primeiros anos de vida, uma vez que as tetraciclinas possui a propriedade de se complexar com o cálcio (FAGUNDES & MOLIN, 1998).

Além do risco toxicológico, a continua exposição do indivíduo aos resíduos de antibióticos pode gerar um aumento da resistência bacteriana, quer pela transferência de bactérias resistentes ao homem por via da alimentação (*Salmonella*, *Campylobacter*, *E. coli*, *Listeria* e *Yersinia*), provenientes de animais tratados com antibióticos ou animais infectados pela bactéria resistente; quer pela transferência do fator de resistência (fator-R) de bactérias não patogênicas resistentes a outras bactérias (MARTINS, 1999; ANIL, 2002), através de mecanismos genéticos como o de conjugação bacteriana.

Deaguayo et al. (1992), isolaram inúmeras bactérias patogênicas em 231 amostras de leite pasteurizado, avaliando a ocorrência de resistência a penicilina, polimixina, cloranfenicol, ampicilina, carbenicilina, eritromicina, gentamicina, canamicina e tobramicina. Observaram que o aparecimento de

múltipla resistência nestas bactérias foi de 27,0% para coliformes fecais, 4,0% *Salmonella* e 3,0% em *Staphylococcus aureus.*

A ocorrência de resistência bacteriana múltipla aos antibióticos tem sérias implicações para o tratamento de infecções humanas. Desta forma, somente com o uso responsável e prudente dos antimicrobianos em animais de produção, a melhoria no controle de doenças e o aumento da capacidade imune dos animais podem reduzir os riscos do aparecimento de resistência bacteriana a partir dos sistemas de produção, em especial o leite (FONSECA & SANTOS, 2007).

O período de eliminação de antimicrobianos pelo leite varia de acordo com o produto e depende de vários fatores como dose, via de administração e solubilidade. Assim, para os medicamentos administrados via oral à persistência média de eliminação pelo leite é de 86 horas, para via intramuscular, 72 a 96 horas, via intravenosa de 44 horas, intra-uterina de 31 horas e para a via intramamária de 48 a 144 horas (COSTA, 1996; BARROS et al., 2001).

Para Costa (1996) a duração mínima do período de eliminação de antibióticos pelo leite, administrados via intramamária varia de 2 a 4 dias, sendo 2 dias para penicilina – procaína; 6 dias para a clortetraciclina; 4 dias para a oxitetraciclina; 3 dias para o cloranfenicol; 4 dias para a estreptomicina. Vale ressaltar, que o período de eliminação do antibiótico penicilina pelo leite varia também com o excipiente utilizado, assim, penicilina em solução aquosa é eliminada por no mínimo 3 dias, mas em forma de pomada, o mínimo é de 6 dias.

2.5 Limite Máximo de Resíduos de Antimicrobianos

O mercado brasileiro de produtos e medicamentos veterinários de uso na pecuária é bastante amplo, existindo mais de 121 princípios ativos diferentes, entre eles, os antimicrobianos. De forma geral para cada princípio ativo contido no medicamento existe um limite máximo de resíduo (LMR) e este

está intimamente correlacionado com o período de carência estabelecido. Por isso, o produtor de leite deve estar consciente da necessidade de um médico veterinário para orientá-lo quanto a utilização racional dos medicamentos LEME, 2005; BRASIL, 2008).

Resíduo de uma droga veterinária é a fração da droga, seus metabólitos, produtos de conversão ou reação e impurezas que permanecem nos tecidos dos animais tratados (CODEX ALIMENTARIUS FAO/OMS, 1997).

O Limite Máximo de Resíduos (LMR) determinado pelo *Codex Alimentarius* da FAO e da OMS é a concentração máxima de resíduos de uma substância química que pode ser encontrada no alimento, sem que represente risco ao ser humano que o ingere (expresso em mg/Kg ou µg/Kg), sendo, portanto, legalmente permitido, ou reconhecido, como aceitável no alimento. Seu cálculo é baseado na dose diária aceitável de ingestão da droga – IDA ou na IDA temporária, que utiliza um fator de segurança adicional (BRITO et al., 2003; FONSECA & SANTOS, 2007).

A IDA é a quantidade máxima de um agente químico que pode ser ingerido através da dieta, diariamente, por toda a vida do ser humano, sem provocar riscos de intoxicação. Este valor resulta da relação entre a NOEL (*no observable effect*), ou seja, a maior dose de uma substância química que se usada não produz efeito tóxico ou indesejável na espécie mais sensível analisada, por um fator de segurança da ordem de 100. Com o estabelecimento da IDA é determinado também o intervalo de tempo que deve decorrer para que os resíduos diminuam, atingindo os níveis de tolerância. Este intervalo é denominado período de carência (MIDIO & MARTINS, 2000; PALERMO NETO, 2001).

O período de retirada do leite para o consumo corresponde ao intervalo de tempo após a administração da última dose do antimicrobiano até o leite ser liberado para o consumo. Neste período a concentração detectável da substância cairá para dentro dos limites estabelecidos. Este intervalo é necessário para prevenir o aparecimento de resíduos, e alcançado através de análises farmacocinéticas específicas para cada medicamento, ficando sob

responsabilidade da indústria produtora dos antimicrobianos, o desenvolvimento de métodos analíticos que permitam a detecção e quantificação dos resíduos e cabe ao FDA aprová-los ou não (KISER, 1984; BRITO & LANGE, 2005).

O Plano Nacional de Controle de Resíduos em Produtos de Origem Animal – PNCR foi lançado em 1999, no Brasil, pelo MAPA onde está inserido o Programa de Controle de Resíduos em Leite – PCRL (BRASIL, 1999). A Portaria Nº 78, de 19 de dezembro de 2002, aprovou os programas para o Controle de Resíduos em Carne, Mel, Leite e Pescado em pontos de distribuição, estabelecendo os LMRs para tais produtos. Esta portaria está em vigor desde 2003. Os LMRs de resíduos de antimicrobianos de uso em animais produtores de leite estabelecidos pelo Codex Alimentarius e praticados no Brasil; Canadá; União Européia (EU) e Estados Unidos (EUA), que tem por objetivo comparar os LMRs praticados em diferentes países, por ser fator limitante na exportação de produtos são apresentados no (ANEXO 1).

2.6 Controle de Resíduos de Antimicrobianos no Leite

Desde 1950, a presença de substâncias químicas nos alimentos é uma preocupação da Organização Mundial da Saúde (OMS). Atualmente, diversas organizações internacionais estão envolvidas no desenvolvimento de mecanismos de controle dessas substâncias (antibióticos, hormônios, pesticidas e parasiticidas) usadas na produção animal. Esses mecanismos incluem o controle da distribuição, o controle do uso em animais, a determinação de níveis seguros de resíduos nos alimentos de origem animal e as tecnologias de detecção de resíduos (BRITO, 2003). Mas, vale ressaltar que a implementação de um procedimento de controle de resíduos químicos na produção é fundamental, pois é o único momento possível de se evitar a ocorrência, seja de resíduos de drogas veterinárias ou mesmo de toxinas fúngicas no leite. Visto que, as etapas posteriores da cadeia produtiva de lácteos não são capazes de reduzir ou inativar tais compostos, uma vez

presentes, isto porque, a atividade dos antibióticos não é, geralmente, afetada pela pasteurização (BRITO, 2001; ALMEIDA et al., 2003).

No Brasil, a prática de monitoramento de resíduos de antimicrobianos no leite encontra-se em implementação em algumas regiões, porém ainda em passos lentos, não atingindo os níveis necessários para um controle que garanta a qualidade da matéria-prima para o consumo e a manufatura dos derivados.

A Instrução Normativa Nº 51 do MAPA, regulamenta o monitoramento mensal da ocorrência de resíduos de antimicrobianos no leite, cuja responsabilidade é da indústria e, afirma ainda que as análises sejam realizadas somente por laboratórios oficiais ou credenciados no MAPA (BRASIL, 2002; NERO et al., 2007), conforme regulamentado na Instrução Normativa Nº 10, de 17/04/2008 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (Anexo 2), que aprova os Programas de Controle de Resíduos e Contaminantes em Carnes (Bovina, Aves, Suína e Eqüina), Leite, Mel, Ovos e Pescado, e determina o LMRs permitido para cada grupo específico (BRASIL, 2008).

No Brasil, estudos mostram a falta de controle quanto às substâncias indesejáveis no leite, tais como antibióticos, detergentes e sanitizantes. Mello Filho (1969) avaliou o leite consumido em São Paulo, observando que 1,9% das amostras analisadas apresentaram de 0,05 a 0,5 UI/mL de penicilina, concentrações de risco para ingestão por pessoas sensíveis a essa droga. Silva & Sena (1994), através da comparação de métodos analíticos, observaram que a ocorrência de resíduos de antibióticos nos leites pasteurizados distribuídos em Belo Horizonte, MG, foi de 4,1% no tipo B, 1,04% no leite integral na marca nº 1 e 2,08% no leite integral na marca nº 2. Albuquerque et al. (1996), analisando leite comercializado em Fortaleza, CE, encontraram que 69,7% das amostras continham inibidores, sendo que em 28,0% dessas amostras, eram contaminadas por penicilina. Em Salvador - BA, Barros et al. (2001) afirmam que 38,5% das amostras de leite pasteurizado tipo C apresentaram resultado positivo para a pesquisa de resíduos de antibióticos.

Nero et al. (2007), detectaram 11,4% de resíduos de antibióticos em 210 amostras de leite cru colhidas em quatros estados do Brasil, sendo 20,6% provenientes da região de Londrina - PR, 8,0% da região de Botucatu - SP, 8,5% da região de Viçosa - MG, e 6,0% da região de Pelotas - RS.

2.7 Métodos de Detecção de Resíduos de Antimicrobianos no Leite

Para garantir a qualidade do leite, quanto à ausência de resíduos antimicrobianos ou a presença dentro do LMRs permitido pela legislação nacional, vários métodos foram desenvolvidos e são usados para este tipo de análise. São exemplos, a inibição microbiológica, os testes enzimáticos, os testes imunológicos, a cromatografia gasosa, cromatografia em camada delgada e cromatografia líquida de alta eficiência (IDF, 1991; FONSECA & SANTOS, 2001; DENOBILE & NASCIMENTO, 2004).

Os testes comerciais disponíveis no mercado (Anexo 3) encontram-se sob a forma de conjuntos reativos prontos para o uso em condição de campo. São denominados testes de triagem e, em sua maioria, são qualitativos ou semi-quantitativos. O teste de triagem, por definição, deve fornecer uma indicação segura e confiável da ausência de resíduos na amostra investigada, possuindo um limite de detecção abaixo do LMR permitido para cada antibiótico (BRITO, 2000).

Os métodos qualitativos usados para detectar resíduos de antimicrobianos no leite são importantes em levantamentos epidemiológicos na ocorrência desses compostos em alimentos prontos para consumo, sendo de extremo valor na execução dos programas de controle e fiscalização pelos órgãos oficiais (FAO/WHO, 2002). Os testes TTC (cloreto 2,3,5 trifenil tetrazólio), Método de Difusão em Disco e o Delvotest® são aceitos oficialmente pela comunidade internacional como teste de triagem (BRASIL, 1999), e apresentam variações quanto à classe do antimicrobiano detectável, sensibilidade e tempo de realização do teste. Ao contrário dos métodos qualitativos, os métodos quantitativos, por exemplo, a cromatografia são

capazes de detectar a presença de antimicrobianos em partes por milhão - ppm e em partes por bilhão - ppb (MITCHELL et al., 1998; PALERMO NETO, 2001).

De acordo com a Portaria nº 8, de 26/06/1984, do Serviço de Inspeção Federal do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) deve ser realizado, pelo menos uma vez por semana, obrigatoriamente a pesquisa de inibidores em amostras de leite de pequena mistura (em nível de produtor) pelo método TCC, método de difusão em disco e o Delvotest®, ou outro aprovado (BRASIL, 1984).

O método do cloreto 2,3,5 trifenil tetrazólio, nome comercial TTC, é baseado na redução do cloreto 2,3,5 trifenil tetrazólio pelo *Streptococcus thermophilus* sensível a antibióticos do grupo β-lactâmicos, incubados a temperatura de 37ºC, durante duas horas e meia. As amostras negativas apresentam uma coloração rosa intensa e as positivas, coloração branca. O limite de detecção deste teste para a penicilina é de 0,04 UI/mL (BARROS & PERCHES, 1981; LEME, 2005).

O método de difusão em disco com *Bacillus subtilis*, surgiu a partir dos anos 50 e suas modificações foram eficazes para detectar resíduos de antimicrobianos no leite. Para obtenção dos resultados é necessário incubar a amostra, a ser analisada, por um período de 12 horas, à temperatura de 32ºC. O limite de detecção do teste para a penicilina é de 0,05 UI/mL.

O método de inibição microbiana com meio de cultivo específico tem sido amplamente utilizado para detecção de resíduos de antimicrobianos no leite, em virtude do custo e da capacidade de evidenciar uma ampla gama de antibióticos e quimioterápicos (BARBERIO & SIGNORINI, 1996). Este método utiliza uma cultura de microrganismo teste, geralmente *Bacillus stearotermophilus, Bacillus subtilis, Bacillus cereus, Micrococcus luteus, Escherichia coli, Bacillus megaterium* ou *Streptococcus thermophilus,* semeada em meio de crescimento ágar ou líquido, inoculado com a amostra de leite e incubado por algumas horas. Durante a incubação a amostra se difunde pelo meio e a presença de substâncias inibidoras impede ou reduz o crescimento do microrganismo indicador. Dependendo do teste comercial as substâncias

inibidoras são indicadas por zonas de inibição de crescimento ou por mudança na coloração do meio, através de um indicador de pH (MITCHELL et al., 1998).

O Delvotest® SP é um teste padrão de difusão em ágar que tem como princípio a inibição da multiplicação do microrganismo *Bacillus stearotermophilus var. calidolactis* C953, sensível a antibióticos do grupo β-lactâmicos, principalmente à penicilina, com limite de detecção de 2,5 ppb. Para obtenção do resultado é necessário incubação de 64ºC ± 0,5ºC por um período de três horas. É um teste capaz de detectar antibióticos do grupo β-lactâmicos, sulfas, tetraciclinas, macrolídeos e aminoglicosídeos, sendo um teste de triagem e de levantamento qualitativo aprovado pelo FDA, reconhecido e aprovado pelo AOAC, desde 1982; além disso, é recomendado pelo *Codex Alimentarius* e pela ANVISA para análise de resíduos de antimicrobianos no leite e válido para MAPA, desde 1984 (MAPA, 1984; TRONCO, 1997; ANVISA, 2001).

As técnicas de radioimunoensaio e enzimáticas foram desenvolvidas nos anos 70 e 80 com a finalidade de determinar a presença de β-lactâmicos e outros antimicrobianos, tais como, as tetraciclinas, estreptomicinas, eritromicina, novobiocina e sulfonamidas; assim, outros testes baseados na inibição da reação de enzimas específicas determinam também a presença de resíduos da classe β-lactâmicos. Os testes utilizando anticorpos para resíduos específicos foram introduzidos durante os anos 80 (BISHOP & WHITE, 1984).

O método imunoenzimático, conhecido como ELISA (*Enzyme linked immunoadsorbant assay*), envolve duas etapas básicas. A primeira etapa consiste na reação de um antígeno e um anticorpo, um conhecido e outro proveniente da amostra testada, para a formação de imunocomplexos. A segunda etapa, na adição de um reagente denominado enzima conjugada, sendo assim, a reação detectada. O conjugado é um antígeno ou um anticorpo quimicamente unido a uma enzima, como por exemplo, a fosfatase alcalina, que quando o conjugado reage com o imunocomplexo é formado um produto colorido (RAIA JUNIOR, 2001).

A cromatografia é um método físico-químico de separação dos componentes de uma mistura, realizada através da distribuição destes componentes entre duas fases que estão em contato íntimo. A técnica baseia-se na capacidade diferente que uma molécula ou íon possui em distribuir-se através de duas fases. Uma das fases permanece estacionária enquanto a outra se move através dela. Durante a passagem da fase móvel sobre a fase estacionária, os constituintes da mistura são distribuídos em duas fases, de tal forma que cada um dos componentes é seletivamente retido pela fase estacionária, resultando em migrações diferentes destes (COLLINS et al., 1990; FELTRIN et al., 2007).

Material e Métodos

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Seleção das Propriedades Leiteiras e Caracterização da Área de Estudo

Para a realização deste estudo selecionou-se 96 propriedades rurais produtoras de leite, de quatro bacias leiteiras localizadas nos municípios de Itapecuru Mirim; Bacabal; Imperatriz e na ilha de São Luís (Paço do Lumiar, Raposa, São José de Ribamar e São Luís), Estado do Maranhão (Fig. 1). Foram selecionadas 12 propriedades em Itapecuru Mirim, município localizado a 96,1Km da capital do estado, São Luís, na mesorregião do Norte Maranhense e microrregião de Itapecuru Mirim; 22 propriedades no município de Bacabal, localizada a 250 Km de São Luís, na mesorregião Centro Maranhense e microrregião do Médio Mearim; 43 propriedades no município de Imperatriz, localizada no Sudoeste Maranhense a 530 Km de São Luís, tendo como limites as cidades de Cidelândia e São Francisco do Brejão, ao Norte; ao Sul a cidade Governador Edson Lobão; ao Leste e Sudeste, a cidades João Lisboa, Senador La Roque e Davinópolis; e a Oeste, o estado de Tocantins. Na Ilha de São Luís, formada pelos quatro municípios: Paço do Lumiar, Raposa, São José de Ribamar e São Luís, foram selecionadas 19 propriedades.

www.montenegroexpress.com.br

Figura 1: Distribuição geográfica dos municípios que compõem as bacias leiteiras de Itapecuru Mirim, Bacabal, Imperatriz e Ilha de São Luís, MA

Todas as propriedades são cadastradas na Agência de Defesa Agropecuária do Maranhão (AGED), e a escolha dos municípios foi determinada pela quantidade de leite produzido na região, sendo as propriedades divididas em: propriedades pequenas com produção diária de até 100 litros; médias com produção de 100 a 200 litros e grandes com produção acima de 200 litros. A produção de leite destas propriedades era destinada basicamente ao beneficiamento de leite pasteurizado (Tipo C) e derivados, além do comércio informal.

A determinação do número de unidades amostrais por município tomou como base a metodologia adotada por Levy & Lemeshow (1991).

3.2 Colheita das Amostras

De cada propriedade rural selecionada foi colhida um “pool” de amostra de leite “in natura” após a ordenha completa, representando toda a produção no dia da colheita, totalizando 96 amostras de leite, no período de janeiro a novembro de 2009.

As amostras de leite “in natura” foram colhidas diretamente do latão, após a ordenha completa, na quantidade de 500 mL por amostra e acondicionadas em frasco de vidro esterilizado, sem conservantes, devidamente identificados. As amostras de leite foram transportadas em caixas isotérmicas, contendo gelo reciclável para o Laboratório de Microbiologia de Alimentos e Água do Curso de Medicina Veterinária da Universidade Estadual do Maranhão – UEMA, onde foram analisadas. As amostras que ultrapassavam o tempo de 24 horas para chegar ao laboratório foram congeladas (DAVISON & BRANEN, 1993) e transportadas de modo a manter o congelamento até a chegada ao laboratório.

3.3 Procedimentos Laboratoriais

A detecção de resíduos de antimicrobianos nas amostras de leite foi realizada utilizando simultaneamente, Kits comerciais cujo princípio é a inibição do crescimento microbiano, Delvotest® SP-NT (inibição do *Bacillus stearotermophilus* var. *cadolactis*), Eclipse 50 (inibição do Geo*bacillus stearotermophilus)* e o Kit cujo princípio é baseado em receptores, Twinsensor – BT 20.

3.3.1 Delvotest® SP–NT

Para a pesquisa qualitativa dos antimicrobianos do grupo β-lactâmicos, Sulfonamidas, Tetraciclinas, Macrolidas e Aminoglicosídeos foi

utilizado o Kit comercial Delvotest® SP–NT (Fig. 2), conforme as recomendações do fabricante.

O teste consiste em ampolas contendo meio de cultura ágar sólido inoculado com um número padronizado de esporos de *Bacillus stearothermophilus var. calidolactis*, enriquecido com nutrientes necessários para o crescimento bacteriano e a substância antifolato trimetoprima. É um teste rápido, que permite detectar qualitativamente a presença de antimicrobianos no leite (ANEXO 3).

Figura 2: Componentes do Kit comercial Delvotest® SP-NT:

1: ampolas contendo esporos do microrganismo *Bacillus stearothermophilus var. calidolactis*, em meio de cultura contendo com indicador de pH Bromocresol púrpura;

2: seringa dosadora com pipeta descartável, capta 0,1 mL de leite

Na presença de antimicrobianos, o microrganismo do Kit é inibido e não há alteração do pH, o meio permanece azul, obtendo-se assim, um resultado positivo (Fig. 3); na ausência de antimicrobianos na amostra de leite, o microrganismo se multiplica, acidificando o meio e alterando sua coloração que muda da cor azul para amarelo, gerando um resultado negativo (Fig. 4).

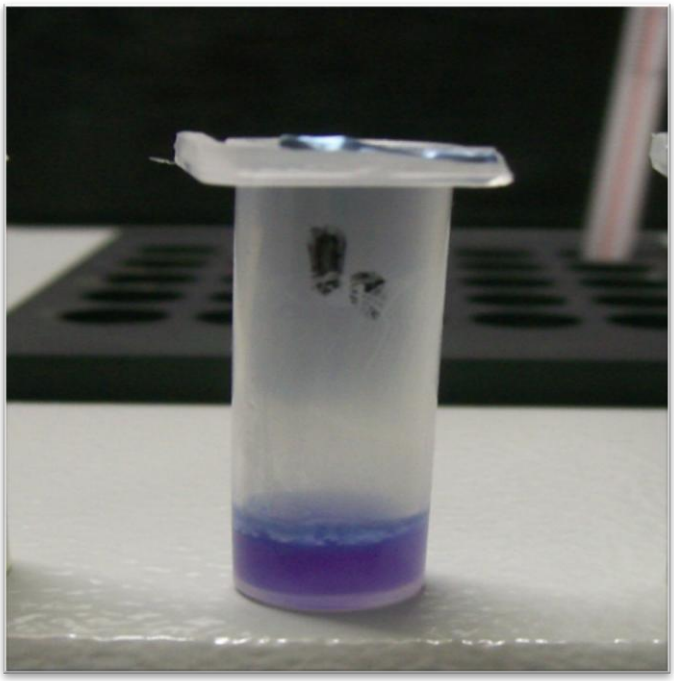

Figura 3: Resultado Positivo: presença de resíduos antimicrobianos

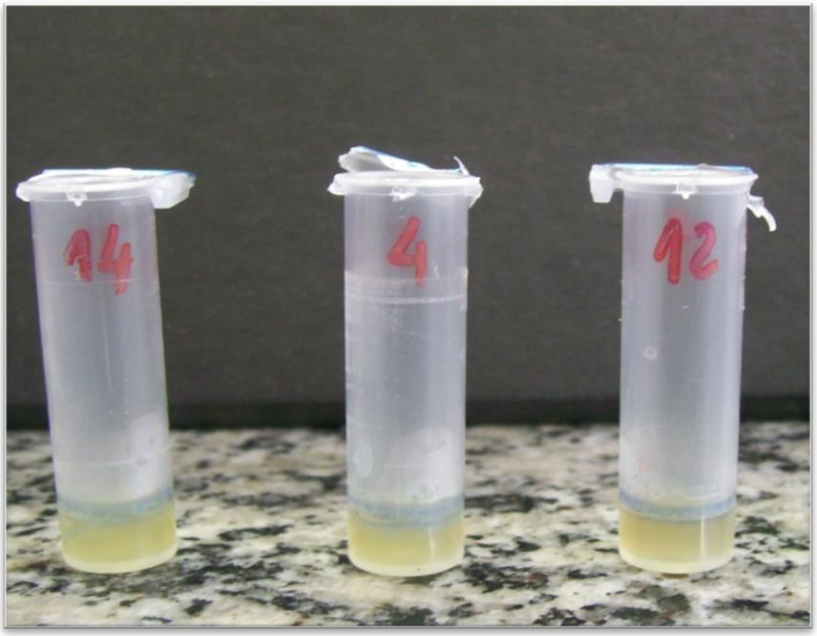

Figura 4: Resultado Negativo: ausência de resíduos de antimicrobianos no leite

3.3.2 Eclipse 50

Foi utilizado o Kit comercial Eclipse 50 (Fig. 5), para a pesquisa dos antimicrobianos do grupo β-lactâmicos, Sulfonamidas, Tetraciclinas, Macrolidas, Aminoglicosídeos, conforme as recomendações do fabricante.

O teste consiste de placa microtiter contendo meio de cultura específico com esporos de *Geobacillus steathermophilus* e um indicador ácido-base. É um teste rápido, que permite detectar qualitativamente a presença de antimicrobianos no leite (ANEXO 4).

Figura 5: Componentes do Kit comercial Eclipse 50:

1: ampolas contendo esporos do microrganismo *Geobacillus steathermophilus* e um indicador ácido-base

2: pipeta com ponteira descartável, capta 50 µL de leite

Na presença de antimicrobianos, o microrganismo *G. stearotermophilos* é inibido e não há alteração do pH, o meio permanece azul, obtendo-se assim, resultado positivo (Fig. 6.1). A mudança parcial da coloração indica a presença de antibiótico em uma concentração próxima ao limite de detecção e a viragem total de azul para amarelo esverdeado indica a

negatividade da prova, isto é, a amostra está livre de inibidores e o Geo*bacillus stearotermophilus* se multiplicou, causando acidificação da amostra (Fig. 6.2).

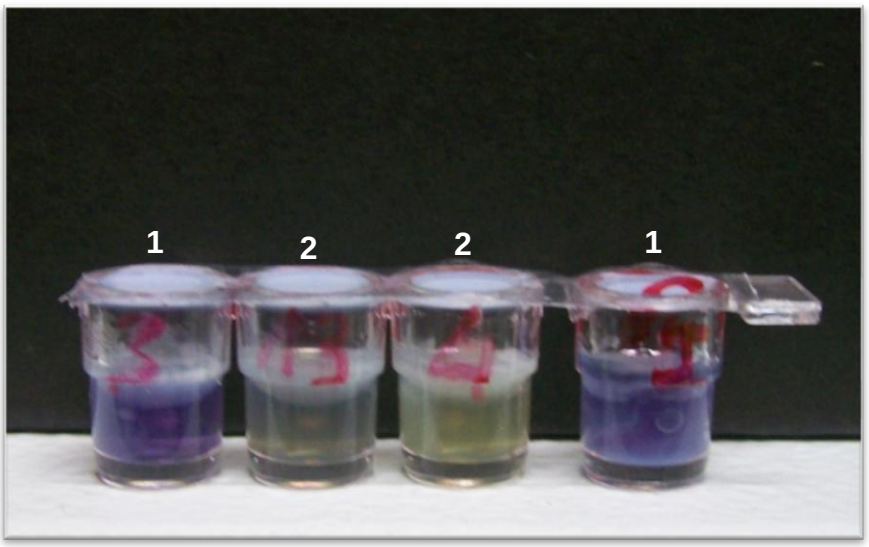

Figura 6: 1- Reação positiva: presença de resíduo de antimicrobianos no leite; 2– Reação Negativa: ausência de resíduo de antimicrobiano no leite

3.3.3 Twinsensor – BT 20

O Kit comercial Twinsensor – BT 20 (Fig. 7) foi utilizado para a pesquisa de antibióticos β-lactâmicos e Tetraciclinas, conforme as recomendações do fabricante do Kit.

É um teste comparativo que utiliza dois receptores em uma mesma reação, constituído de dois componentes para a detecção rápida de antibióticos β-lactâmicos e tetraciclinas. O primeiro é um microtubo que contém certa quantidade de ambos receptores e anticorpos fixados a partículas de ouro, e o segundo uma tira reativa ou “dispstick” que consta de uma série de membranas onde se situam as linhas de captura. A Figura 8 representa o resultado positivo e negativo ao teste controle para presença de resíduos β-lactâmicos e tetraciclinas.

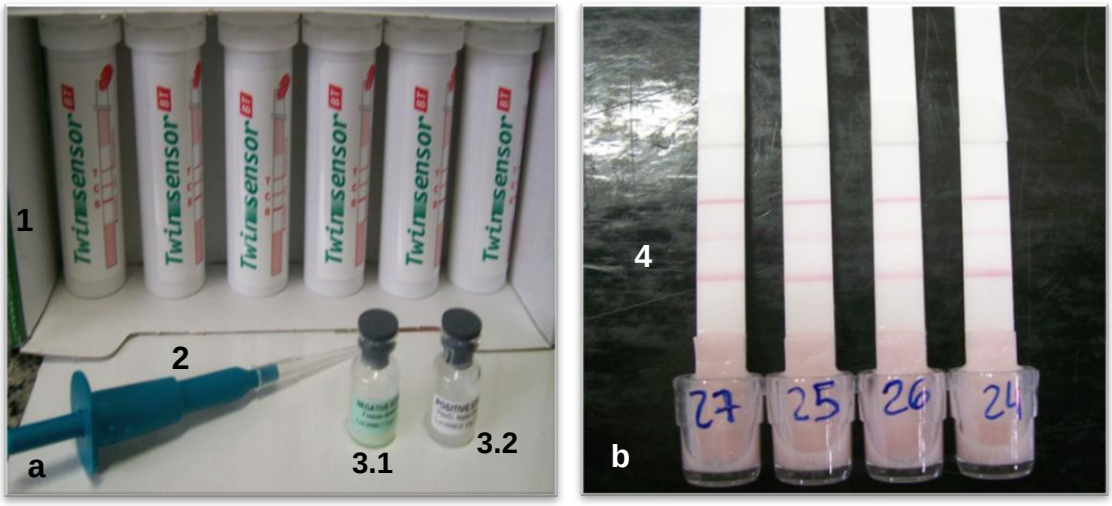

Figura 7(a; b): Componentes do Kit comercial Twinsensor – BT 20:

(a): 1- Embalagem de tiras reativas Twinsensor – BT 20; 2 – pipeta de 200 µL com ponteira descartável; 3.1 – Controle negativo: pó para reconstituição do "padrão negativo" de leite cru; 3.2 – Controle Positivo: pó para reconstituição do "padrão positivo" de leite com 4ppb de Penicilina G e 100 ppb de Oxitetraciclina; (b): 4 – tiras reativas e microtubos Twinsensor – BT 20

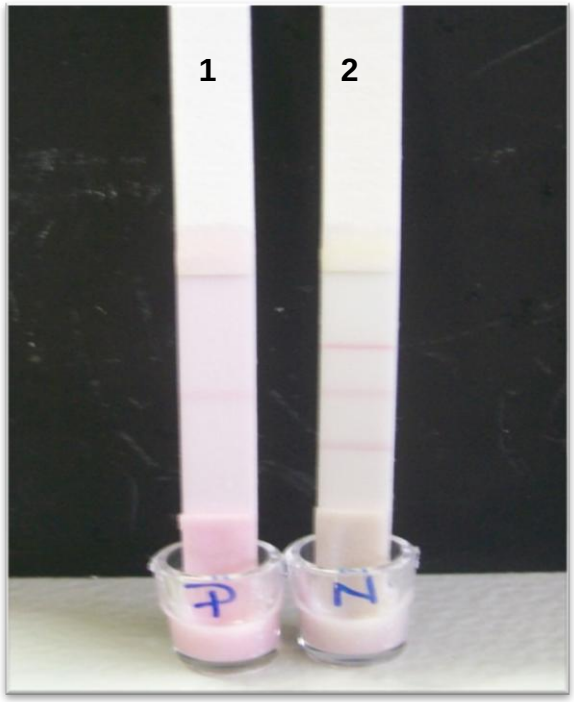

Figura 8: Controles positivo e negativo no Twinsensor – BT 20:

1- Controle Positivo para presença de resíduos β-lactâmicos e tetraciclinas;

2 - Controle Negativo para presença de resíduos β-lactâmicos e tetraciclinas

Quando se obtinha resultados negativos nos testes Delvotest® SP-NT, Eclipse 50 e Twinsensor – BT 20 a amostra era descartada. As amostras positivas nestes testes eram pré-aquecidas a temperatura de 80ºC por um período de cinco minutos, resfriada rapidamente até a temperatura de 37ºC e submetidas novamente ao Delvotest® SP-NT, Eclipse 50 e Twinsensor – BT 20. Este procedimento foi realizado com intuito de diminuir a ocorrência de resultados falso-positivos, pela interferência de substâncias naturais no leite (HILLERTON et al., 1999; RAIA JUNIOR, 2001).

3.4 Inquérito Epidemiológico

Durante as visitas para a colheita das amostras foram realizados inquéritos investigativos, por meio de um questionário (APÊNDICE), que abordava desde a produção diária de leite até aspectos relacionados aos fatores de risco para presença de resíduos antimicrobianos no leite, tais como doenças de maiores freqüências, utilização de aditivos na dieta, período de carência do antimicrobiano em uso, descarte do leite do animal em tratamento, dentre outros.

3.5 Análise Estatística

Os resultados obtidos foram registrados em fichas padronizadas, tabuladas em banco de dados, e as análises estatísticas realizadas utilizando-se o “software” GRAPHPAD INSTAT 1990/93, tendo sido empregado o teste Qui-quadrado.

Resultados e Discussão

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Pela análise das informações obtidas com a aplicação do questionário, nas 12 propriedades rurais visitadas no município de Itapecuru Mirim, MA, verificou-se que a produção de leite varia entre 25 a 2500 litros/diários, sendo sete (58,33%) propriedades de pequena produção, quatro (33,34%) consideradas de grande produção e apenas uma (8,33%) média produção. Quanto ao sistema de criação, em nove (75%) das propriedades os animais são criados sob sistema semi-intensivo e quatro (25%) sob sistema extensivo.

O rebanho de todas as propriedades, segundo os proprietários é vacinado contra aftosa, 58,33% contra brucelose, 33,33% raiva e 25% contra carbúnculo sintomático e botulismo. Sete (58,33%) das propriedades realizam apenas uma ordenha e cinco (41,67%) duas ordenhas diárias. Quanto ao tipo de ordenha, dez (83,33%) são ordenha manuais, onde destas uma (10%) realiza ordenha manual associada à mecânica, em virtude da não adaptação do animal ao aparelho; e três (25%) ordenha mecânica. O destino do leite em 8 (66,67%) das propriedades é diretamente para o consumidor sob a forma “in natura” (cru), onde destas, em uma (8,33%) a produção também é para o próprio consumo e entregue ao laticínio; em três (25%) o destino do leite é diretamente para o laticínio e em apenas uma (8,33%) para o consumo próprio. Quanto ao resfriamento do leite cru, após ordenha, oito (66,67%) propriedades estão em desacordo com a Instrução Normativa Nº 51 e quatro (33,33%) em acordo com a legislação nacional vigente, sendo o leite refrigerado e mantido em temperatura $\leq$ 4ºC, em resfriador próprio do estabelecimento. Em três (25%) dos estabelecimentos produzem algum tipo de derivado do leite para venda.

No município de Bacabal, MA, das 22 propriedades rurais visitadas, a produção de leite varia entre 10 a 250 litros/diários, sendo 13 (59,0%) de pequena produção de leite, quatro (18,18%) média e cinco (22,72%) grande. Quanto ao sistema de criação, em 15 (68,18%) das propriedades os animais

são criados sob sistema semi-intensivo e sete (31,82%) sob sistema extensivo. O rebanho de todas as propriedades, segundo o proprietário é vacinado contra aftosa, 86,36% raiva, 72,73% contra brucelose, 45,45% contra carbúnculo sintomático, 36,36% botulismo e 13,63% contra leptospirose. Em 21 (95,45%) das propriedades realizam uma ordenha e apenas uma (4,55%) duas ordenhas diárias, com todas as propriedades realizando a ordenha manual. O destino do leite em 19 (86,36%) das propriedades é diretamente para o consumidor sob a forma “in natura”, e três (13,64%) próprio para o consumo. Todas as propriedades estão em desacordo com a Instrução Normativa Nº 51(MAPA/2002), quanto ao resfriamento do leite cru, após ordenha. Em duas (9,1%) dos estabelecimentos produzem algum derivado do leite para venda.

No município de Imperatriz, MA, das 43 propriedades rurais visitadas, verificou-se que a produção de leite varia entre 8 a 535 litros/diários, sendo 33 (76,75%) de pequena produção de leite, cinco (11,63%) média e grande. Quanto ao sistema de criação, em 36 (83,72%) propriedades os animais são criados sob sistema extensivo e sete (16,28%) sob sistema semi-intensivo. O rebanho de todas as propriedades, segundo o proprietário é vacinado contra aftosa, 67,44% contra carbúnculo sintomático, 53,48% raiva, 41,86% botulismo, 20,93% brucelose e 2,32% contra tuberculose. Todas as propriedades realizam apenas uma ordenha, sendo todas do tipo manual. O destino do leite em 23 (53,49%) das propriedades é diretamente para o consumidor sob a forma “in natura”, onde destas quatro (17,39%) são entregue também ao laticínio, 15 (34,88%) ao posto de refrigeração, e em seguida transportado ao laticínio próximo à região, e cinco (11,63%) a produção é voltada para o próprio consumo. Em 28 (65,11%) das propriedades estão em desacordo com a Legislação Nacional vigente, quanto ao resfriamento do leite cru, após ordenha, e 15 (34,89%) em acordo com a legislação. Em seis (13,95%) dos estabelecimentos produzem algum derivado do leite para venda e para consumo próprio.

Na Ilha de São Luís, MA, das 19 propriedades visitadas a produção de leite varia entre 20 a 220 litros/diários, sendo 12 (63,16%) propriedades de pequena produção, quatro (21,0%) média e três (15,79%) pequena. Em todas

as propriedades os animais são criados sob sistema semi-intensivo. O rebanho de todas as propriedades, segundo o proprietário é vacinado contra aftosa, 31,58% brucelose, 26,31% botulismo, 15,79% carbúnculo sintomático, 5,26 raiva e leptospirose. Em 57,90% das propriedades realizam duas ordenhas diárias e 42,10% apenas uma ordenha. Quanto ao tipo de ordenha, 18 (94,73%) são ordenha manuais e uma (5,27%) ordenha mecânica. Em 18 (94,73%) propriedades estão em desacordo com a Legislação Nacional vigente, quanto ao resfriamento do leite cru após ordenha, e apenas uma (5,26%) em acordo, sendo o leite refrigerado e mantido em temperatura $\leq$ 4ºC, em resfriador próprio do estabelecimento. Em quatro (21,05%) dos estabelecimentos produzem algum derivado do leite para venda.

A Tabela 1 mostra os principais antimicrobianos utilizados pelos produtores de leite nos municípios de Itapecuru Mirim e Bacabal. Verifica-se que, do total de 96 propriedades visitadas, 76 (79,17%) utilizam antimicrobianos ou aditivos na dieta alimentar e 20 (20,83%) não utilizam antimicrobianos ou aditivos na dieta alimentar ou ainda, não souberam responder o princípio ativo utilizado para o tratamento das enfermidades que acometem o rebanho leiteiro. Observa-se que os princípios ativos utilizados com maior freqüência pelos produtores são Gentamicina correspondendo a cinco (41,67%), Oxitetraciclina três (25%), Oxitetraciclina e Gentamicina duas (16,67%), e a associação Penicilina G + diidroestreptomicina uma (8,33%), no município de Itapecuru Mirim; Oxitetraciclina nove (40,90%), Oxitetraciclina e Cefoperazone, Oxitetraciclina e a associação Penicilina G + diidroestreptomicina duas (9,09%) cada, Oxitetraciclina e Gentamicina, Oxitetraciclina e a associação Ampicilina + Cloxacilina, Oxitetraciclina, Penicilina G + diidroestreptomicina e Gentamicina, Gentamicina e Amoxilina, Oxitetraciclina, Amoxilina e Penicilina uma (4,54%), em Bacabal.

Tabela 1: Antimicrobianos utilizados pelos produtores de leite dos municípios de Itapecuru Mirim e Bacabal, MA, 2009

MUNICÍPIO	n	%	PRINCÍPIO ATIVO
Itapecuru Mirim	5	41,67	Gentamicina
	3	25	Oxitetraciclina
	2	16,67	Oxitetraciclina e Gentamicina
	1	8,33	Penicilina G + diidroestreptomicina*
Bacabal	9	40,90	Oxitetraciclina
	2	9,09	Oxitetraciclina e Cefoperazone
	2	9,09	Oxitetraciclina e Penicilina G + diidroestreptomicina*
	1	4,54	Oxitetraciclina e Gentamicina
	1	4,54	Oxitetraciclina e Ampicilina + Cloxacilina
	1	4,54	Oxitetraciclina, Penicilina G + diidroestreptomicina* e Gentamicina
	1	4,54	Gentamicina e Amoxilina
	1	4,54	Oxitetraciclina, Amoxilina e Penicilina
TOTAL	**29**	**38,15**	

n: número de amostra por propriedade; ***AGROVET PLUS:** Penicilina G + diidroestreptomicina

No município de Imperatriz, conforme mostra a Tabela 2, os princípios ativos utilizados com maior freqüência pelos produtores são Oxitetraciclina 18 (41,86%), Gentamicina e Oxitetraciclina três (6,98%), Gentamicina e a associação Penicilina G + diidroestreptomicina duas (4,65%), Oxitetraciclina e a associação Estreptomicina + benzilpenicilina, Oxitetraciclina, a associação Penicilina G + diidroestreptomicina e ampicilina uma (2,32%) cada. Na Ilha de São Luís, MA, Tabela 2, são Oxitetraciclina, Oxitetraciclina e a associação Penicilina G + diidroestreptomicina com cinco (26,31%) cada, Gentamicina duas (10,52%), Tilosina e Penicilina, Tilosina e Gentamicina,

Oxitetraciclina e Cefoperazone, Oxitetraciclina e Gentamicina, Oxitetraciclina, Gentamicina e a associação Penicilina G + diidroestreptomicina, a associação Penicilina G + diidroestreptomicina, Penicilina e Neomicina uma (5,26%). Esses resultado difere dos obtidos por Netto et al. (2005) que realizando um levantamento dos principais fármacos utilizados no rebanho leiteiro do estado do Paraná, encontraram 38,22% para Penicilina, 25,19% para os Aminoglicosídeos e 15,41% para as Tetraciclinas.

Tabela 2: Antimicrobianos utilizados pelos produtores de leite dos municípios de Imperatriz e Ilha de São Luís, MA, 2009

MUNICÍPIO	n	%	PRINCÍPIO ATIVO
Imperatriz	18	41,86	Oxitetraciclina
	3	6,98	Gentamicina e Oxitetraciclina
	2	4,65	Gentamicina
	2	4,65	Penicilina G + diidroestreptomicina*
	1	2,32	Oxitetraciclina, Estreptomicina + Benzilpenicilina
	1	2,32	Oxitetraciclina, Penicilina G + diidroestreptomicina*
	1	2,32	Ampicilina
Ilha de São Luís	5	26,31	Oxitetraciclina
	5	26,31	Oxitetraciclina e Penicilina G + diidroestreptomicina*
	2	10,52	Gentamicina
	1	5,26	Tilosina e Penicilina
	1	5,26	Tilosina e Gentamicina
	1	5,26	Oxitetraciclina e Cefoperazone
	1	5,26	Oxitetraciclina e Gentamicina
	1	5,26	Oxitetraciclina, Gentamicina e Penicilina G + diidroestreptomicina*
	1	5,26	Penicilina G + diidroestreptomicina*
	1	5,26	Penicilina e Neomicina
TOTAL	**47**	**61,85**	

n: número de amostra por propriedade; ***AGROVET PLUS:** Penicilina G + diidroestreptomicina

Verificou-se na pesquisa que as infecções da glândula mamária (Mastite) correspondem a 17,09% e as infecções do casco (20,39%), são as enfermidades de maior freqüência e que são utilizados os princípios ativos Gentamicina e Oxitetraciclina para tratá-las. É importante ressaltar que os

riscos à saúde humana associados aos aminoglicosídeos são hipersensibilidade e perda de audição (FAO/WHO, 1999). Quanto as tetraciclinas, segundo Khune et al. (2001), os resíduos de tetraciclinas podem promover o surgimento de bactérias resistentes.

A Tabela 3 demonstra que do total de 12 amostras examinadas, provenientes de 12 propriedades rurais produtoras de leite no município de Itapecuru Mirim, nenhuma apresentou resíduos de antimicrobianos acima do Limite Máximo permitido (LMR's) no teste Delvotest® SP–NT, portanto estão de acordo com a Instrução Normativa N° 10, de 17 de abril de 2008, do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (BRASIL, 2008). Esse resultado, provavelmente, se deve a não utilização de aditivos na dieta alimentar verificado em 11 (91,67%) das propriedades, a não ocorrência de perda de partida do leite em todas as propriedades e pela não utilização do leite dos animais em tratamento, conforme relato dos produtores. Destas propriedades, quatro (33,33%) apresentaram resultados suspeitos quando submetidos ao teste Eclipse 50, sugerindo que uma (25%) das amostras apresenta uma concentração de antimicrobianos próxima ao limite de detecção do teste, pois o proprietário afirmou estar fazendo uso de antimicrobianos para o tratamento de vacas com mastite, não confirmando, portanto, a retirada desse animal da linha de ordenha ou a realização da ordenha em separado. A presença de resultados suspeitos, considerados falso-positivos, é justificada pela presença de substâncias antimicrobianas naturais, como é o caso da lactoferrina e da lisozima ou de mediadores do processo inflamatório, que interferem nos resultados dos testes microbiológicos. Esse resultado foi semelhante ao obtido por Silva & Sena (1984); Lopes et al. (1998) e Mendes et al. (2006).

Quanto às amostras submetidas ao teste Twinsensor – BT 20 verificou-se que das 12 amostras examinadas, uma (8,33%) foi positiva para a presença de resíduos de antibióticos β-lactâmicos, e nenhuma apresentou positividade para as tetraciclinas, conforme demonstra a Tabela 3. Esses resultados podem ser justificados pelo não cumprimento do período de carência de utilização do produto, em que três (25%) proprietários responderam esperar apenas 24 horas, quatro (33,34%) esperava entre 72 –

96 horas e quatro (33,34%) responderam esperar mais de 96 horas (em média 10 a 15 dias); a não realização do controle de resíduos de antimicrobianos, em 10 (83,34%) das propriedades. Esse resultado diferem dos obtidos por Porto et al. (2002) e Almeida et al. (2003) que encontraram 1,16% de resíduos de antibióticos nas propriedades leiteiras da região de Uberlândia – MG e 1,89% no Rio Grande do Sul, respectivamente, utilizando o teste SNAP.

Verifica-se que do total de 22 amostras de leite "in natura" provenientes das propriedades leiteiras do município de Bacabal, conforme demonstra a Tabela 3, duas (9,09%) foram positivas para a presença de resíduos de antimicrobianos nos testes Delvotest® SP–NT e Eclipse 50, mostrando não estarem de acordo com a Instrução Normativa N° 10, de 17 de abril de 2008, do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (BRASIL, 2008). Verificou-se também que nove (40,90%) das amostras apresentaram resultados suspeitos no teste Eclipse 50, sugerindo que nestas amostras há uma concentração de antimicrobianos próxima ao limite de detecção ou interferência nos resultados ao teste Eclipse 50 pela presença de substâncias antimicrobianas naturais presentes no leite "in natura". Quando submetidas ao teste Twinsensor – BT 20, das 22 amostras analisadas, nenhuma foi positiva para presença de resíduos de antibióticos β-lactâmicos e tetraciclinas. Estes achados se assemelham aos obtidos por Borges et al. (2000) que verificaram 9,95% de freqüência de resíduos de antibióticos em leite pasteurizado integral e padronizado produzido e comercializado no Estado de Goiás; Gelli et al. (1984) que detectaram 11,67% de resíduos de antibióticos em amostras de leite pasteurizado analisadas na cidade de São Paulo; Nero et al. (2007) que detectaram 8,0% de amostras de leite "in natura" contaminadas por resíduos de antimicrobianos na região de Botucatu - SP e 8,5% na região de Viçosa. Por outro lado, é inferior ao percentual de contaminação por resíduos de antimicrobianos obtidos por Nunes & D'Angelino (2007) que encontraram 20% das amostras de leite "in natura" provenientes das fazendas leiteiras do Estado de São Paulo, contaminadas por resíduos de antimicrobianos, e por Tetzner et al. (2005) que encontraram 33,33% de amostras de leite "in natura"

provenientes da região do Triângulo Mineiro, contaminadas por resíduos de antimicrobianos.

A freqüência de resíduos de antimicrobianos detectada em Bacabal é justificada pelos procedimentos de manejo adotados, nas propriedades, tais como, utilização de aditivos na dieta alimentar, utilização do leite dos animais em tratamento, não cumprimento do período de carência dos antimicrobianos utilizados para tratar vacas em lactação, onde 18,18% dos produtores disseram esperar apenas 12 horas, após aplicação do antimicrobiano para a retirada do leite, assim como a não realização do controle de resíduos de antimicrobianos através dos testes de triagem disponíveis no mercado.

De acordo com a Portaria nº 8, de 26/06/1984, do Serviço de Inspeção Federal do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) deve ser realizado, pelo menos uma vez por semana, obrigatoriamente a pesquisa de inibidores em amostras de leite de pequena mistura (em nível de produtor) pelo método TCC, método de difusão em disco e o Delvotest®, ou outro aprovado (BRASIL, 1984), visto que, na presença de resultados positivos, medidas preventivas sejam tomadas, evitando desta forma, a chegada do leite contendo resíduos de antimicrobianos ao consumidor.

Das 43 amostras provenientes do município de Imperatriz, MA, submetidos ao Delvotest® SP–NT e Twinsensor – BT 20, nenhuma apresentou contaminação por resíduos de antimicrobianos. Entretanto, seis (13,95%) do total de 43 amostras, foram classificadas como suspeitas no teste Eclipse 50, sugerindo que nestas amostras há uma concentração de antimicrobianos próxima ao limite de detecção do teste. Esses resultados se assemelham aos obtidos por Lopes et al. (1998) e Silva & Sena (1984) que não encontram contaminação por resíduos de antibióticos em leite na cidade de Campinas – SP e Belo Horizonte (MG), respectivamente; e por Mendes et al. (2006) que verificaram ausência de contaminação em amostras de leite “in natura” provenientes do município de Muriaé – MG e região. Por outro lado, difere dos obtidos por Villa & Pinto (2008) que verificaram seis amostras positivas sendo duas acima do limite de detecção no Delvotest® SP; por Lopes et al. (2002) que

verificaram uma freqüência de 25% para resíduos de antibióticos com amostras de leite na região metropolitana do Paraná.

Quanto a freqüência de amostra de leite “in natura” com resíduos de antimicrobianos identificada nas propriedades rurais da Ilha de São Luís, MA, utilizando o Delvotest® SP–NT, Eclipse 50 e Twinsensor – BT 20, conforme demonstra a Tabela 3, observa-se que em uma (5,26%) propriedade foi detectado resíduos de antimicrobianos pelo Delvotest® SP–NT e Eclipse 50. Verifica-se também, na Tabela 3, que três (15,79%) amostras apresentaram resultados suspeitos no teste Eclipse 50, entretanto estas amostras quando submetidas ao teste Twinsensor – BT 20, não foi detectado resíduos de antibióticos β-lactâmicos e tetraciclinas. Os resultados sugerem tratar-se realmente de amostras não contaminadas por resíduos de antibióticos β-lactâmicos e tetraciclinas. Esses resultados se assemelham aos obtidos por Nero et al. (2007) que verificaram 6,0% de amostras de leite “in natura” contaminadas por resíduos de antimicrobianos na região de Pelotas - RS.

A contaminação do leite por resíduos de antimicrobianos, apesar de baixa na Ilha de São Luís, MA, provavelmente se deve à antibioticoterapia utilizada de forma incorreta, principalmente no tratamento das mastites, visto que, verificou-se nestas propriedades que o leite de animais em tratamento foi usado tanto para consumo humano como para produção de derivados, que não havia o cumprimento das recomendações da bula do medicamento e do período de carência por parte de alguns produtores, assim como a utilização de aditivos na dieta alimentar. Isso é um fato preocupante, principalmente para a saúde pública, uma vez que a produção leiteira da região é pequena, o destino do leite em 18 (94,73%) das propriedades é diretamente para o consumidor sob a forma “in natura” e os produtores desconhecem ou não estão realizando os procedimentos necessários para evitar que o leite, contendo resíduos de antimicrobianos, chegue ao consumidor.

Já, no teste Twinsensor – BT 20 verificou-se que nenhuma das amostras analisadas apresentou contaminação por β-lactâmicos e tetraciclinas, provenientes dos quatros municípios da Ilha de São Luís, MA. Esses resultados

permitem concluir que o antimicrobiano detectado no Delvotest® SP–NT e no Eclipse 50 não pertencem à classe dos β-lactâmicos e tetraciclinas, mas possivelmente a classe Macrolida, uma vez que o proprietário afirmou fazer uso do princípio ativo Tilosina, princípio este não detectado pelo teste Twinsensor – BT 20. De acordo com o Regulamento de Inspeção Industrial e Sanitário de Produtos de Origem Animal (BRASIL, 1980), o leite só deve ser utilizado para o consumo humano após 72 horas da aplicação do antibiótico, não ressaltando a via de administração. No entanto, Seymour et al. (1988) e Suliman et al. (1990) relataram que os resíduos de antimicrobianos, de alguns princípios ativos, persistem após 72 horas da aplicação. Além disso, outros fatores, como a dose, a via de administração, a solubilidade e outros, podem também influenciar (COSTA, 1996).

Tabela 3: Freqüência de amostras de leite “in natura” com resíduos de antimicrobianos frente aos testes Delvotest® SP–NT, Eclipse 50 e Twinsensor – BT 20, provenientes das bacias leiteiras de Itapecuru Mirim, Bacabal, Imperatriz e Ilha de São Luís, MA, 2009

MUNICÍPIO	DELVOTEST® SP – NT						ECLIPSE 50						TWINSENSOR - BT 20							
													β – Lactâmicos				Tetraciclinas			
	P		S		N		P		S		N		P		N		P		N	
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	N	%	N	%	n	%	n	%	n	%
Itapecuru Mirim	0	0	0	0	12	100	0	0	4	33,33	8	66,67	1	8,33	11	91,67	0	0	12	100
Bacabal	2	9,09	0	0	20	90,91	2	9,09	9	40,90	11	50	0	0	22	100	0	0	22	100
Imperatriz	0	0	0	0	43	100	0	0	6	13,95	37	86,05	0	0	43	100	0	0	43	100
Ilha de São Luís	1	5,26	0	0	18	94,74	1	5,26	3	15,79	15	78,95	0	0	19	100	0	0	19	100

n: número de amostra; **P**: positivo; **S**: suspeito; **N**: negativo

Quanto à correlação entre produção de leite das propriedades rurais, do município de Itapecuru Mirim e presença de resíduos de antimicrobianos, verifica-se na Tabela 4, que as amostras submetidas ao Delvotest® SP-NT e ao Eclipse 50 não apresentaram contaminação por resíduos de antimicrobianos independentemente da quantidade de leite produzida na propriedade. Entretanto, a freqüência de contaminação por resíduos de antibióticos β-lactâmicos nas amostras submetidas ao teste Twinsensor – BT 20 foi de uma (8,33%) nas propriedades consideradas de pequena produção de leite. O que, pode representar um risco maior à população consumidora de leite em função da falta de assistência veterinária e o uso indiscriminado de antibióticos para o tratamento de infecções da glândula mamária, trato reprodutivo, ou outra enfermidade que necessite de antibioticoterapia. Esses resultados diferem de Almeida et al. (2003) que encontraram a prevalência de 1,89% de amostras contaminadas por resíduos de antibióticos β-lactâmicos, onde 16 (15,8%) das amostras foram provenientes de grandes propriedades produtoras de leite.

Tabela 4: Freqüência de amostras de leite “in natura" com resíduos antimicrobianos frente aos testes Delvotest® SP-NT, Eclipse 50 e Twinsensor – BT 20 em relação à produção de leite das propriedades, do município de Itapecuru Mirim, MA, 2009

Propriedades Leiteiras	Número de propriedades analisadas	Delvotest® SP – NT						Eclipse 50						Twinsensor - BT 20							
														β – Lactâmicos				Tetraciclinas			
		P		S		N		P		S		N		P		N		P		N	
		n	%	n	%	n	%	N	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
Pequenas (até 100 L)	7	0	0	0	0	7	58,33	0	0	3	25	4	33,34	1	8,33	6	50	0	0	7	58,33
Médias (100-200 L)	1	0	0	0	0	1	8,33	0	0	0	0	1	8,33	0	0	1	8,33	0	0	1	8,33
Grandes (> 200 L)	4	0	0	0	0	4	33,34	0	0	1	8,33	3	25	0	0	4	33,33	0	0	4	33,34
Total	**12**	**0**	**0**	**0**	**0**	**12**	**100**	**0**	**0**	**4**	**33,33**	**11**	**66,67**	**1**	**8,33**	**12**	**91,66**	**0**	**0**	**12**	**100**

n: número de amostras; **P**: positivo; **S**: suspeito; **N**: negativo

Quanto à freqüência de amostras de leite “in natura” com resíduos de antimicrobianos em relação à quantidade de leite produzido nas propriedades rurais, do município de Bacabal, utilizando os métodos microbiológicos Delvotest® SP–NT e Eclipse 50, conforme mostra a Tabela 5, verificou-se que de um total de 22 amostras analisadas duas (9,09%) provenientes de propriedades pequenas (até 100 litros/diários) estavam contaminadas por resíduos de antimicrobianos. Nas amostras obtidas de propriedades médias e grandes não foi detectado resíduos de antimicrobianos no leite. Quanto aos resultados obtidos no teste Eclipse 50, do total de 22 amostras, nove (40,90%) foram classificadas como suspeitos de conter resíduos de antimicrobianos, sendo cinco (22,72%), duas (9,09%) e duas (9,09%), provenientes de propriedades pequenas, médias e grandes, respectivamente. Esses resultados diferem dos obtidos por Almeida et al. (2003) que encontraram 16 (15,8%) amostras de leite “in natura” contaminadas por resíduos de antimicrobianos, provenientes de propriedades de grande produção leiteira. Estas mesmas amostras, quando submetidas ao teste Twinsensor – BT 20 não apresentaram resíduos de antibióticos β-lactâmicos e tetraciclinas, nos três tipos de propriedades (pequena, média e grande). Esses resultados diferem do obtido por Porto et al. (2002) que encontraram uma freqüência de 1,16% de resíduos de antibióticos em leite, através da utilização do teste SNAP, provenientes de grandes propriedades, no Rio Grande do Sul.

Tabela 5: Freqüência de amostras de leite “in natura” com resíduos de antimicrobianos frente aos testes Delvotest® SP-NT, Eclipse 50 e Twinsensor – BT 20 em relação à produção de leite das propriedades, do município de Bacabal, MA, 2009

Propriedades Leiteiras	Número de propriedades analisadas	Delvotest® SP – NT						Eclipse 50						Twinsensor - BT 20							
														β – Lactâmicos				Tetraciclinas			
		P		S		N		P		S		N		P		N		P		N	
		n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	N	%	n	%	n	%	n	%	n	%
Pequenas (até 100 L)	13	2	9,09	0	0	11	50	2	9,09	5	22,72	6	27,28	0	0	13	59	0	0	13	59
Médias (100-200 L)	4	0	0	0	0	4	8,33	0	0	2	9,09	2	9,09	0	0	4	18,18	0	0	4	18,18
Grandes (> 200 L)	5	0	0	0	0	5	33,34	0	0	2	9,09	3	13,64	0	0	5	22,72	0	0	5	22,72
Total	**22**	**2**	**9,09**	**0**	**0**	**20**	**90,91**	**2**	**9,09**	**9**	**40,90**	**11**	**50,01**	**0**	**0**	**22**	**100**	**0**	**0**	**22**	**100**

n: número de amostras; **P**: positivo; **S**: suspeito; **N**: negativo

A Tabela 6 mostra a freqüência de amostras de leite “in natura” com resíduos de antimicrobianos em relação ao tamanho da produção de leite nas propriedades, utilizando o Delvotest® SP-NT, o Eclipse 50 e o Twinsensor - BT 20, provenientes do município de Imperatriz, MA. Observa-se ausência de resíduos nas amostras de leite independentemente do volume da produção de leite, no Delvotest® SP-NT. O percentual de amostras suspeitas no teste Eclipse 50 foi de três (6,98%), nas propriedades de pequena produção, duas (4,65%) provenientes de propriedades de média produção e uma (2,32%) nas de grande produção. Observa-se também que não foi detectado resíduo de antibióticos no leite, no teste Twinsensor – BT 20, nos três tipos de propriedades, pequenas, médias e grandes. Esses resultados diferem dos obtidos por Nero et al. (2007) que detectaram 11,4% de resíduos de antibióticos em amostras de leite “in natura” em grandes propriedades de quatro estados do Brasil, e que 20,6% eram amostras contaminadas por resíduos de antimicrobianos provenientes da região de Londrina - PR. Estes achados sugerem que estas amostras sejam provenientes de propriedades que não utilizaram, no período da colheita das amostras, antimicrobianos para tratamento de alguma enfermidade ou se utilizou, respeitou o período de carência do produto ou ainda que o leite ordenhado não era destinado para o consumo. Vale ressaltar que, mesmo com a ausência de resíduos de antimicrobianos nas amostras de leite in natura provenientes das propriedades do município de Imperatriz, MA, é necessário educação e sensibilização dos produtores, bem como a fiscalização permanente pelos órgãos competentes para obter-se um produto saudável sem resíduos de antimicrobianos.

Tabela 6: Freqüência de amostras de leite “in natura” com resíduos antimicrobianos frente aos testes Delvotest® SP-NT, Eclipse 50 e Twinsensor – BT 20 em relação à produção de leite das propriedades, do município de Imperatriz, MA, 2009

Propriedades Leiteiras	Número de propriedades analisadas	Delvotest® SP – NT						Eclipse 50						Twinsensor - BT 20							
														β – Lactâmicos				Tetraciclinas			
		P		S		N		P		S		N		P		N		P		N	
		n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	N	%	N	%	n	%	n	%	n	%
Pequenas (até 100 L)	33	0	0	0	0	33	76,74	0	0	3	6,98	30	69,77	0	0	33	76,74	0	0	33	76,74
Médias (100-200 L)	5	0	0	0	0	5	11,63	0	0	2	4,65	3	6,98	0	0	5	11,63	0	0	5	11,63
Grandes (> 200 L)	5	0	0	0	0	5	11,63	0	0	1	2,32	4	9,30	0	0	5	11,63	0	0	5	11,63
Total	**43**	**0**	**0**	**0**	**0**	**43**	**100**	**0**	**0**	**6**	**13,95**	**11**	**86,05**	**0**	**0**	**43**	**100**	**0**	**0**	**43**	**100**

n: número de amostras; **P**: positivo; **S**: suspeito; **N**: negativo

Quanto à freqüência de amostras de leite “in natura” com resíduos de antimicrobianos em relação ao volume da produção de leite nas propriedades rurais da Ilha de São Luís, MA, utilizando o Delvotest® SP–NT, o Eclipse 50 e o Twinsensor – BT 20, na Tabela 7, observa-se que uma (5,26%) das amostras proveniente de propriedades classificadas como de média produção de leite (180 litros/diários) foi detectado resíduos de antimicrobianos no Delvotest® SP–NT e Eclipse 50. Quanto às amostras suspeitas no teste Eclipse 50, três (15,78%) apresentaram esta característica, independente do tamanho da produção de leite nas propriedades: pequena, média e grande. Esses resultados diferem dos obtidos por Almeida et al. (2003) que verificaram 15,8%, de amostras contaminadas por resíduos de antimicrobianos no leite, provenientes de propriedades de grande produção leiteira. Porém se assemelham ao obtido por Mesquita et al. (1986) que detectaram a ocorrência de resíduos antimicrobianos em 7,47%, das amostras de leite “in natura”, provenientes de indústrias laticinista, localizadas na bacia leiteira de Goiânia e de postos de resfriamento no interior de Goiás. Pelos dados apresentados na Tabela 7, verifica-se também que não foram detectados, no teste Twinsensor – BT 20, β-lactâmicos e tetraciclinas, nas amostras provenientes de propriedades de pequena, média e grande produção de leite.

Tabela 7: Freqüência de amostras de leite “in natura” com resíduos antimicrobianos frente aos testes Delvotest® SP-NT, Eclipse 50 e Twinsensor – BT 20 em relação à produção de leite das propriedades, na Ilha de São Luís, MA, 2009

Propriedades Leiteiras	Número de propriedades analisadas	Delvotest® SP – NT						Eclipse 50						Twinsensor - BT 20							
														β – Lactâmicos				Tetraciclinas			
		P		S		N		P		S		N		P		N		P		N	
		n	%	n	%	n	%	N	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
Pequenas (até 100 L)	12	0	0	0	0	12	63,16	0	0	1	5,26	11	57,90	0	0	12	63,16	0	0	12	63,16
Médias (100-200 L)	4	1	5,26	0	0	3	15,79	1	5,26	1	5,26	2	10,53	0	0	4	21,05	0	0	4	21,05
Grandes (> 200 L)	3	0	0	0	0	3	15,79	0	0	1	5,26	2	10,53	0	0	3	15,79	0	0	3	15,79
Total	**19**	**1**	**5,26**	**0**	**0**	**18**	**94,74**	**1**	**5,26**	**3**	**15,78**	**15**	**78,96**	**0**	**0**	**19**	**100**	**0**	**0**	**19**	**100**

n: número de amostras; **P**: positivo; **S**: suspeito; **N**: negativo

A Tabela 8 mostra as freqüências de detecção de resíduos de antimicrobianos, nas amostras provenientes das bacias leiteiras de Itapecuru Mirim, Bacabal, Imperatriz e Ilha de São Luís, MA detectados pelo Delvotest® SP-NT, Eclipse 50 e Twinsensor – BT 20. Observa-se que nas propriedades do município de Bacabal houve utilização de um maior número de antimicrobianos, portanto teve o maior número de amostras contaminadas por resíduos, no Delvotest® SP-NT e Eclipse 50. Das 22 (22,91%) amostras suspeitas no teste Eclipse 50, nove (40,91%) amostras foram provenientes do município de Bacabal, que houve utilização de um maior número de antimicrobianos.

Pelo teste do Qui-quadrado para independência verificou-se significância entre o uso de medicamentos a base de antimicrobianos, no período da colheita das amostras e a presença de resíduos antimicrobianos no teste Delvotest® SP-NT e Eclipse 50 ($p = 0,0038$), mostrando que existe uma associação entre a presença de resíduos de antimicrobianos no leite e animais em tratamento. Ainda na Tabela 9, nota-se que apesar das propriedades do município de Bacabal utilizar um maior número de antimicrobianos, não foi detectado resíduos de β-lactâmicos e tetraciclinas no teste Twinsensor – BT 20. Entretanto, nas amostras provenientes das propriedades do município de Itapecuru Mirim que apresentou quatro (33,33%) amostras suspeitas de conter resíduos de antimicrobianos, no teste Eclipse 50, foi confirmado que uma (8,33%) estava contaminado por resíduos de β-lactâmicos.

Tabela 8: Número e percentual de amostras de leite, colhidas de rebanhos submetidos a tratamento com antimicrobianos no período da colheita, e positivas, suspeitas ou negativas ao Delvotest® SP–NT, Eclipse 50 e Twinsensor – BT 20, 2009

MUNICÍPIO	Número de propriedades submetidas ao tratamento com antimicrobianos	DELVOTEST® SP – NT				ECLIPSE 50					TWINSENSOR - BT 20							
											β – Lactâmicos				Tetraciclinas			
		P		N		P		S		N	P		N		P		N	
		n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
Itapecuru Mirim	1	0	0	12	100	0	0	4	33,33	8	66,66	1	8,33	11	91,67	0	0	12	100
Bacabal	4	2	9,09	20	90,91	2	9,09	9	40,91	11	50	0	0	22	100	0	0	22	100
Imperatriz	1	0	0	43	100	0	0	6	13,95	37	86,05	0	0	43	100	0	0	43	100
Ilha de São Luís	1	1	5,26	18	0	1	5,26	3	15,78	15	78,94	0	0	19	100	0	0	19	100
Total	**7**	**3**	**3,13**	**93**	**96,87**	**3**	**3,12**	**22**	**22,91**	**71**	**73,97**	**1**	**1,04**	**95**	**98,96**	**0**	**0**	**96**	**100**

n: número de amostras; **P**: positivo; **S**: suspeito; **N**: negativo

Pelo teste do Qui-quadrado para independência verificou-se que não houve significância entre o uso de antimicrobianos no período da colheita das amostras e a presença de resíduos de antibióticos β-lactâmicos e tetraciclinas no Twinsensor – BT 20 (p = 0,7780). Isso é justificado pelo limite de detecção do teste Twinsensor – BT 20 ser menor em relação ao limite de detecção dos testes Delvotest® SP-NT e o Eclipse 50 para antibióticos β-lactâmicos. Vários autores relatam que a produtividade elevada e o estado fisiológico da glândula mamária são capazes de alterar a farmacocinética e a farmacodinâmica dos antimicrobianos. De fato, independentemente do princípio ativo e da via de administração, nos animais com mastite ocorre o aumento da permeabilidade tecidual, o que facilita a permanência e difusão do fármaco, levando ao aparecimento de resíduos de antimicrobianos em todos os quartos da glândula mamária (FAGUNDES, 1981; COSTA et al., 2000, RAIA JÚNIOR, 2001; BRITO, 2004).

Para Coelho (2002) em animais de alta produtividade os resíduos de antimicrobianos são detectados no leite, mais precocemente, quando comparado aos de baixa produtividade e, que desta forma, o cumprimento do período de carência, determinado para o medicamento aplicado, reduz a probabilidade de se detectar resíduos no leite. O tratamento de animais com mastite, no período seco é o mais indicado para se evitar a presença de resíduos de antimicrobianos no leite (FAGUNDES, 2003).

Diante dos resultados obtidos nesta pesquisa há que se considerar que a freqüência da ocorrência de resíduos antimicrobianos na matéria-prima sofre influência do *status* sócio-econômico e cultural do produtor, do sistema de manejo e produção, das condições climáticas, do ecossistema microbiano, entre outros, e são determinantes no estado de saúde da glândula mamária, conseqüentemente no uso dos antimicrobianos. A escassez de alimentos, a falta de tecnologia e a situação econômica das propriedades leiteiras estudadas, além do desconhecimento do risco que representa a contaminação do leite por resíduos de antimicrobianos para o consumidor, contribuem para o aproveitamento do leite de todos os quartos da glândula mamária de animais com mastite e submetidos ao tratamento com antimicrobianos. Deve-se

ressaltar a possível ocorrência de resultados falso-positivos, algumas vezes devido à presença de substâncias antimicrobianas naturais, como é o caso da lactoferrina e da lisozima ou de mediadores do processo inflamatório, que interferem nos resultados dos testes microbiológicos (COSTA, 1996). Estes inibidores aumentam, principalmente no colostro, ou seja, em vacas recém-paridas, decrescendo a partir da quinta ordenha, ao final do período de lactação e nos casos de mastite, com aumento do processo inflamatório.

Quanto à freqüência observada dos fatores fisiopatológicos e os resultados suspeitos no teste Eclipse 50, na Tabela 9, observa-se que 18 (22,79%) das amostras apresentaram resultados positivos quanto aos fatores fisiopatológicos: vacas em final do período de lactação ou vacas com processo inflamatório da glândula mamária, alterando assim o resultado do teste, sendo, portanto um falso-positivo. Esse resultado se assemelha aos obtidos por Eenennaam et al. (1993) que verificaram um percentual de 18,8% para falso-positivos no método de difusão em disco *Bacillus stearothermophilus var. calidolactis*, diferindo para os testes CITE® (β-lactâmicos), Delvotest® P, Charm Farm®, Lack Teck® (β-lactâmicos) com 43,6%, 37,7%, 81,7% e 2,6%, respectivamente.

Tabela 9: Número de amostras de leite suspeitas de conter resíduos de antimicrobianos no teste Eclipse 50, obtidas de vacas com mastite e em final de lactação, provenientes das bacias leiteiras de Itapecuru Mirim, Bacabal, Imperatriz e Ilha de São Luís, MA, 2009

Município	Eclipse 50 Suspeito (n)	Fatores Fisiopatológicos	
		Casos de Mastite (n)	Vacas em Final de Lactação (n)
Itapecuru Mirim	4	1	3
Bacabal	9	4	6
Imperatriz	6	2	6
Ilha de São Luís	3	2	3
Total	**22 (100%)**	**9 (40,90%)**	**18 (22,79%)**

n: número de amostras

Pelo teste do Qui-quadrado para independência verificou-se uma significância entre os fatores fisiopatológicos (final do período de lactação e processo inflamatório da glândula mamária) e os resultados suspeitos no teste Eclipse 50 ($p = 0,0133$), mostrando que existe associação entre as variáveis, fatores fisiopatológicos e a presença de resultados falso-positivos neste teste, visto que o aumento de substâncias inibidoras naturais no leite, interfere nos resultados dos testes microbiológicos.

Raia (2001) avaliou a interferência do processo inflamatório sobre a positividade do teste microbiológico (Delvotest® SP), quanto à presença de inibidores naturais e verificou reações falso-positivas em 33% dos quartos mamários com mastite clínica e em 18% dos casos de mastite subclínica. Por outro lado, em quartos mamários sem mastite, ou seja, na ausência de processo inflamatório, não houve reações falso positivas, demonstrando que os inibidores naturais estão presentes quanto maior for a intensidade do processo inflamatório.

Conclusões

5 CONCLUSÕES

Diante das análises realizadas e dos resultados obtidos pode-se concluir que:

1) O leite produzido nas bacias leiteiras dos municípios de Itapecuru Mirim, Bacabal e Ilha de São Luís, Estado do Maranhão, contém resíduos de antimicrobianos;

2) Os testes de triagem, Delvotest® SP-NT e Eclipse 50, utilizados para detectar resíduos de antimicrobianos no leite, mostraram-se eficazes em relação ao Twinsensor – BT 20, que é um teste rápido e prático, porém com limite de detecção para β-lactâmicos baixo em relação ao testes Delvotest® SP-NT e Eclipse 50, mostrando-se não eficiente como método de triagem para detectar resíduos de antibióticos no leite;

3) O Delvotest® SP-NT mostrou-se mais eficiente em relação ao Eclipse 50, porém tem custo elevado, por se tratar de um produto importado;

4) No Estado do Maranhão não há um programa de monitoramento de resíduos de antimicrobianos no leite;

5) As propriedades rurais das bacias leiteiras de Itapecuru Mirim, Bacabal, Imperatriz e Ilha de São Luís, MA são de pequena produção leiteira, que realizam ordenha manual e não dispõem de assistência médica veterinária;

6) O destino do leite nas propriedades rurais das bacias leiteiras dos municípios de Itapecuru Mirim, Bacabal e Ilha de São Luís, MA, é diretamente ao consumidor, estando em desacordo com a Instrução Normativa Nº 51 quanto à temperatura de refrigeramento;

7) Para o tratamento das enfermidades do gado leiteiro nas bacias leiteiras de Itapecuru Mirim, Bacabal, Imperatriz e Ilha de São Luís, MA, são utilizados com maior freqüência, os princípios ativos Gentamicina e Oxitetraciclina.

Consideração Final

6 CONIDERAÇÃO FINAL

Faz-se necessário, a execução, no Estado do Maranhão, o programa de monitoramento de resíduos de antimicrobianos no leite, conforme preconiza a Legislação Nacional, Instrução Normativa Nº 51, de 20 de setembro de 2002, do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento.

Referências

REFERÊNCIAS

ALBUQUERQUE, L.M.B.; MELO, V.M.M.; MARTINS, S.C.S. Investigação sobre presença de resíduos de antibióticos no leite comercializado em Fortaleza – CE, Brasil. **Hig. Aliment.**, São Paulo, v.10, n.41, p. 29-32, 1996.

ALMEIDA, L.P.; VIEIRA, R.L.; ROSSI, D.A.; CARNEIRO, A.L.; ROCHA, M.L., Resíduos de antibióticos em leite de propriedades rurais da região de Uberlândia – MG. **Biosci. J.**, Uberlândia, v.19, n.3, p.83-87, set./dez., 2003.

AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION. **Standard Methods for the examination of dairy Products**, Washington, DC: APHA, p. 265-288, 1984.

ANIL – Associação Nacional das Indústrias de Laticínios. **Segurança alimentar: pesquisa de resíduos de antibióticos em leite**, 2002.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Medicamentos veterinários e saúde pública**: uma proposta de ação para a ANVISA. São Paulo: ANVISA, 2001. 19 p.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Dairy products**, Washington, DC, v.2, p. 38-45, 1995.

AURVALLE, A.E. A Questão Alimentar: Repressão ou Prevenção? **Hig. Aliment.**, São Paulo, v.3, n.1, p. 20-26, 1981.

BALLARINI, G. Terapia della mastite bovina e farmacocinética. **Obiettivi Doc. Vet.**, Bologna, v.17, n.12, p. 29-36, 2001.

BARBERIO, A.; SIGNORINI, F. Antibiotici e sulfamidicini nel latte. **Obiettivi Doc. Vet.**, Bologna, v.17, n. 12, p.29-36, 1996.

BARROS, V.R.M.; PERCHES, E.M.C. Pesquisa de Inibidores no leite tipo “B” ao consumo da grande São Paulo. **Rev. do ILCT**, Juiz de Fora, v.36, n.216, p. 39-42, 1981.

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

BIACCHI, N. C.; JORGE, A. O. C.; UENO, M. Detecção de resíduos antibióticos em leite bovino na região do Vale do Paraíba, São Paulo. **Rev. biociên.**, Taubaté, v.10, n. 1-2, p. 47-49, 2004.

BISHOP,J.R.; WHITE, C.H. Antibiotic residue detection in milk – A review. **J. Food Prot.**, Ames, v.47, n.8, p. 647-652, 1984.

BORGES, G.T.; SANTANA, A.P.; MESQUITA, A.J.; MESQUITA, Q.P.; SILVA, L.A.F.; NUNES, V.Q. Ocorrência de resíduos de antibióticos em leite pasteurizado integral e padronizado produzido e comercializado no estado de Goiás. **Ciên. Anim. Bras.**, Goiás, v.1, n. 1, p. 59-63, 2000.

BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento - Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal, Brasília, DF, 1981.

BRASIL. Leis, Decretos, etc. Portaria nº 8, de 26 jun. 1984. In: **Balde Branco**, São Paulo, v.18, n.238, p. 30-35, 1984. [Ministério da Agricultura, Secretaria Nacional de Defesa Agropecuária e Secretaria de Inspeção de Produto Animal definem normas técnicas e higiênico-sanitárias para a produção de leite tipo "B"].

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento - Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal - RIISPOA, 1952... **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 05 jun. 1997.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Portaria n.448, de 10 set. 1998. Dispõe sobre a proibição de fabricação, importação, comercialização e o emprego de preparações farmacêuticas de uso veterinário, de rações, e de aditivos alimentares contendo cloranfenicol, furazolidona e nitrofurazona, em animais cujos produtos sejam destinados à alimentação humana. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, p.38, 11 set. 1998. Seção 1.

BRASIL. Instrução Normativa nº 7, de 17 de maio de 1999. Normas Disciplinadoras para a Produção, Tipificação, Processamento, Envase, Distribuição, Identificação e Certificação de Qualidade de Produtos Orgânicos, sejam de Origem Animal ou Vegetal. **Diário Oficial da União**, Brasília, p.11, 19 maio.1999. Seção 1.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 42, de 20 dez. 1999. Aprovada pela Portaria Ministerial nº. 574, de 6 dez. 1998, tendo em vista a determinação do art. 6º da Portaria Ministerial nº. 527, de 15 agost. 1995, alterar o Plano Nacional de Controle de Resíduos em Produtos de Origem animal – PNCR e os programas de controle em carnes – PCRC, mel – PCRM, leite – PCRL e pescado – PCRP. Revogar a Instrução Normativa nº 3, de 22 jan. 1999. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 17 fev. 1999.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 51, de 20 de setembro de 2002. Aprova os regulamentos técnicos de produção, identidade e qualidade do leite tipo... **Diário Oficial da União**, Brasília, p.13, 21 set. 2002. Seção 1.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Portaria nº 78, de 19 dez. 2002, Aprova os programas para o Controle de Resíduos em Carne, Mel, Leite e Pescado para o exercício de 2003, em conformidade aos ANEXOS da presente Portaria. **Diário Oficial da União**, Brasília, 06 jan. 2003, p.6, Seção 1.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Autorização de uso de produto para Kits analíticos. Brasília, 2004.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 10, de 17 de abril de 2008. Aprova os Programas de Controle de Resíduos e Contaminantes em Carnes (Bovina, Aves, Suína e Eqüina), Leite, Mel, Ovos e Pescado. **Diário Oficial da União**, Brasília, p.29, 17 abr. 2008. Seção 1.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 64, de 18 dez. 2008. Aprova o Regulamento Técnico para os Sistemas Orgânicos de Produção Animal e Vegetal. **Diário Oficial da União**, Brasília, p.21, 18 dez. 2008, Seção 1.

BRESSAM, P. A.; SILVA, L. B.; PINTO, E. A. T. Metrite. **Rev. Cient. Eletrôn. de Med. Vet.**, Garça – São Paulo, ano VI, n.10, jan. 2008.

BRITO, J.R.F.; CALDEIRA, G.A.V.; VERNEQUE, R.S.; BRITO, M.A.V.P. Sensibilidade e especificidade do "Califórnia mastitis test" como recurso diagnóstico da mastite subclínica em relação à contagem de células somáticas. **Pesq. Vet. Bras.**, Rio de Janeiro, v. 17 n. 2, p. 49–53, 1997.

BRITO, J.R.F.; DIAS, J.C. Qualidade do leite. Juiz de Fora: Embrapa – CNPGL. Tortuga, 1998. 98p.

BRITO, M.A.V.P. **Resíduos de antimicrobianos no leite**. Juiz de Fora: Embrapa - CNPGL, 2000. 28p. (Circular técnica, 60).

BRITO, J.R.F. Coleta de amostras de leite para determinação da composição química e contagem de células somáticas. Juiz de Fora: Embrapa Gado de Leite, 2001. 16p. (Embrapa Gado de leite. Circular Técnica, 62).

BRITO, J.R.F.; BRITO, M.A.V.P.; ARCURI, E.F. Como (re)conhecer e controlar a mastite em rebanhos bovinos. Juiz de Fora: Embrapa Gado de Leite, 2002. 8p. (Circular técnica 70).

BRITO, J.R.F.; SOUZA, G.N; BRITO, M.A.V.P.; RUBIALE, L.; SILVA, M.R.P. Normas internacionais e exigências do *Codex Alimentarius* e comparação entre blocos comerciais sobre a adoção de testes para a detecção de resíduos de antibióticos no leite. In: Diagnóstico da qualidade do leite, impacto para a indústria e a questão dos resíduos de antibióticos. Juiz de Fora: Embrapa Gado de Leite, p.67, 2003.

BRITO, J.F.R. **É possível transferir resíduos de antimicrobianos para quartos mamários não tratados após sua aplicação em outro quarto mamário ou por via parenteral?** (2004). Disponível em: <http://www.cbql.com.br/noticias.htm>. Acesso em: 10 fev. 2010.

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

CODEX MAXIMUM RESIDUE LIMITS FOR VETERINARY DRUGS IN FOODS. Adopted by the Codex Alimentarius Comission up to and including its twenty second session (july, 1997). FAO/WHO Food Standards Program. Viale delle Terme di Caracalla, Rome. Italy.

COELHO, V. R. P.; COSTA, E. O. Avaliação da influência da intensidade da mastite do quarto tratado por via intramamária na ocorrência de resíduos de antimicrobianos no leite de quartos mamários não tratados. **Napgama**, São Paulo, v.5, n.1, p. 11-15, 2002.

COLLINS, C.H.; BRAGA, G.L.; BONATO, P.S. **Introdução a métodos cromatográficos**. 4.ed. Campinas: Unicamp, 1990. 279 p.

COMISSÃO DAS COMUNIDADES EUROPÉIAS - Comunicação da Comissão - COM (2001). In: Associação Nacional dos Industriais de Lacticínios - ANIL. 15 jul. 2002. Disponível em: <http://www.agroportal.pt>. Acesso em: 04 set. 2009.

COSTA, E.O. Resíduos de antibióticos no leite: um risco à saúde do consumidor. **Hig. Aliment.**, São Paulo, v.10, n.44, p.15-17, 1996.

COSTA, E.O.; RAIA, R.B.; GARINO JÚNIOR, F.; WATANABE, E.T.; RIBEIRO, A.R.; GROFF, M.R. Presença de resíduos de antibióticos no leite de pequena mistura em propriedades leiteiras. **Napgama**, São Paulo, v.2, n.1, p. 10-13, 1999.

COSTA, E.O. RAIA, R.B.; GARINO JÚNIOR, F.; WATANABE, E.T.; COELHO, V.R.P. Influência do tratamento intramamário de casos de mastite de bovinos em lactação em relação à presença de resíduos de antibióticos nos quartos sadios não tratados. **Napgama**, São Paulo, v.3, n.4, p. 14-17, 2000.

COSTA, E.O. Uso de antimicrobianos na mastite, p.443-445. In: Spinosa H.S., Gorniak S.L. & Bernardi M. (Ed.), **Farmacologia Aplicada à Medicina Veterinária**. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 2001.

COVA, W.G. Prática simétrica de detecção de penicilina no leite. **Hig. Aliment.**, São Paulo,v.3, n.2, p. 100-112, 1984.

CULLOR, J.S. Antibiotic residue test for mammary gland secretion. **The Vet. Clinics of North Am.: Food An. Pract.**, v.9, n.3, p.609-620, 1993.

DAVISON, P.M.; BRANEN, A.H. **Antimicrobials in food**. 2. ed. rev. e exp. Moscow: University of Ydaho, 1993. 647p.

DEAGUAYO, M.E.D.; DUARTE, A.B.L.; CANASTILLO, F.M.D. Incidence of multiple antibiotic-resistant organisms isolated from retail milk-products in Hermosillo, Mexico. **J. Food Prot.**, Ames, v.55, n.5, p.370-373, 1992.

DELLA LIBERA, A.M.M.P.; ARAUJO, W.P.; COSTA, E.O.; GARCIA, M.; TÁVORA, J.F.P.; BENATTI, L.A.T. Características físico-químicas e microbiológicas do leite de vacas sem alterações ao exame físico da glândula mamária e com alta contagem de células somáticas. **Rev. Bras. Saúde Prod. An.**, Bahia, v.1, n.2, p. 42-47, 2001.

DENOBILE, M.; NASCIMENTO, E.S. Validação de método para determinação de resíduos dos antibióticos oxitetraciclina, tetraciclina, clortetraciclina e doxiciclina, em leite, por cromatografia líquida de alta eficiência. **Rev. Bras. de Ciênc. Farmac.**, São Paulo, v. 40, n.2, abr./jun., 2004.

FAGUNDES, C.M. Persistência de antibióticos no leite em condições experimentais. **Rev. do ILCT**, Juiz de Fora, v.36, n.216, p. 27-29, 1981.

FAGUNDES, C.M., MOLIN, L. Interferência dos resíduos de antibióticos no controle da qualidade do leite e derivados. **Inf. Agropecuário**, Belo Horizonte, v.13, n.155, p. 24–30, 1988.

FAGUNDES, H. **Ocorrência de resíduos de antimicrobianos no leite no pós-parto de animais tratados na interrupção da lactação**. 2003, 76f. Dissertação mestrado. (Nutrição Animal) - Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo.

FAGUNDES, H.; OLIVEIRA, C.A.F. Infecções intramamárias causadas por *Staphylococcus aureus* e suas implicações em saúde pública. **Ciênc. Rural**, Santa Maria, v.34, n.4, p. 1315-1320, 2004.

FAO/WHO - **Residues of Some Veterinary Drugs in Animals and Foods**, Monographs prepared by the 52nd Meeting of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. Rome: JECFA, 2002, 133 p.

FELTRIN, C.W.; MELLO, A.M.S.; SANTOS, J.G.R.; MARQUES, M.V.; SEIBEL, N.M.; FONTOURA, L.A.M. Quantificação de sulfadimetoxina em leite por cromatografia líquida de alta eficiência. **Quim. Nova**, São Paulo, v. 30, n. 1, p. 80-82, 2007.

FOLLY, M.M.; MACHADO, S.C.A. Determinação de resíduos de antibióticos, utilizando-se métodos de inibição microbiana, enzimático e imuno-ensaios no leite pasteurizado comercializado na região norte do estado do Rio de Janeiro, Brasil. **Ciênc. Rural**, Santa Maria, v.31, n.1, jan./feb., 2001.

FONSECA, L.F.L.; SANTOS, M.V.; PEREIRA, C.C. Qualidade higiênica do leite: efeitos sobre a qualidade dos produtos lácteos e estratégias de controle. In: VILELA et al. Sustentabilidade da pecuária de leite no Brasil: qualidade e segurança alimentar. Goiânia. CNPq - Serrana Nutrição Animal; Embrapa Gado de Leite, 2001.

FONSECA, L.F.L; SANTOS, M.V. **Qualidade do leite e controle da mastite**, São Paulo: Lemos Editorial, 2007, 175p.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS/WORLD HEALTH ORGANIZATION – FAO/WHO. **EVOLUTION of certain veterinary drug residues in food**. Geneva: FAO, 2002.

GUELLI, D.S.; JAKABI, M.; SOUZA, A. Inibidores microbianos em leite pasteurizado do comércio da cidade de São Paulo. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, São Paulo, v.44, n.1, p. 19–24, 1984.

HILLERTON, J.E; HALLEY, B.I; NEAVES, P.; ROSE, M.D. Detection of antimicrobial substances in individual cow and quarter milk samples using Delvotest microbial inhibitor test. **J. Dairy Sci.**, Champaign, v.82, n.4, p. 704-707, 1999.

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (2008). Disponível em: <http://www.ibge.gov.br>. Acesso em: 04 jan. 2010.

IDF: International Dairy Federation. Detection & Confirmation of inhibtors in Milk and Milk products. **Bull. of the Intern. Dairy Feder. Bruxelas**, Bélgica, n. 258, p. 2-81, 1991.

JACQUET, J. La presence d'antibiotiques Dan de lait et sés consequences pour l' industrie laitere. Proc. 13 th. Interm. **Dairy Congr.**, v.3, n.1143, 1953.

KHUNE, M. et al. Formation of anhydrotetracycline during a high-temperature treatment of animal-derived feed contaminated with tetracycline. **Food Chem.**, Orlando, v. 75, p. 423-429, 2001.

KISER, J.S. Subtherapeutic uses of antibiotics and sulfonamides in animal agriculture. In: STEELE, J.H; JUKES, T.H.; DUPONT, H.L.; CRAWFORD, L.M. eds. Antibiotics, sulfonamides, and public health. **Boca Raton: CRC Press**, v. 1, p. 81-107, 1984.

KOSIKOWSKI, F.V.; MOCQUOT, G. Antibiotics residues in milk for cheese. Advances in cheese in technology. **FAO. Agr.Studies**, Roma, v.38, 1958. Apud: FAGUNDES, C.M. Inibidores e controle de qualidade do leite. Pelotas: Editora Universitária, 1997, 128p.

KUKUROVA, I.; HOZOVA, B. Interactions of antimicrobials in milk their detection by the disk diffusion method and Delvotest SP. **J. of Assoc. of Official Analyt. Chemistry Internat.**, v.86, n.3, p. 529-533, 2003.

LEDERER, J. **Enciclopédia moderna de higiene alimentar: intoxicações alimentares**. São Paulo: Manole, p. 205-215, 1991.

LEME, F.B.P. **Presença de resíduos de antimicrobianos em amostras de diferentes tipos de leite comercializados no município de São Paulo, 2005**. Dissertação (Mestrado), Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina Veterinária, São Paulo.

LEVY, P.S. & LEMESSHOW, S. **Sampling of populations: Methods and applications**. John Wiley, New York, 1991.

LOPES, L.T.; GANDARA, A.L.N.; CRISTIANINI, M. Detecção de resíduos de antibióticos em leite comercializado na cidade de Campinas. **Rev. do ILCT**, Juiz de Fora, v.53, n.301-303, p. 64–67, 1998.

LOPES, M.O. **Levantamento do uso e detecção da presença de antimicrobianos no leite produzido na região metropolitana de Curitiba-Pr**. 2002. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) - Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2002.

MARTH, E.H.; ELLICKSON, B.E. Antibiotic residue em milk and milk products. A. Review, **J. Milk and Food Technol.**, v.22, 241p., 1959.

MARTINS, S.C.S.; ALBUQUERQUE, L.M.B. Qualidade do Leite Pasteurizado Tipo C comercializado no município de Fortaleza – CE. Bactérias multiresistentes a antimicrobianos. **Hig. Aliment.**, São Paulo, v.13, n.59, p. 39-42, 1999.

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

MARTINS, M.C. Agronegócio do leite. **Inf. Econ. do leite,** Juiz de Fora, ano 3, n.3, p.2, 2003.

MARTINS, R.P.; MARQUES, M.R.H.; CUNHA, A.N. Etiologia da mastite subclínica em vacas de rebanho de uma queijaria em Nossa Senhora do Livramento, MT. **Hig. Aliment.**, São Paulo, v.20, n.139, 2006.

MAUPOUNÉ, R., Mammite des Femelles Bonnes: Prophylaxie et Therapeutique et leur Repercussion sur la Qualité des Produtis Laitiers. **Bull. Off. Intern. des Epizooties**, v.40, p. 208-223, 1953.

MEDEIROS, N.G.A.; CARVALHO, M.G.X.; SANTOS, M.G.O.; LIMA, S.C.P. Detecção de antibióticos no leite *in natura* consumido no município de Patos, Paraíba. **Hig. Aliment.**, São Paulo, v.18, n.124, p. 85-88, 2004.

MELO FILHO, A. Penicilina no leite de consumo na cidade de São Paulo e risco de sensibilização. **Rev. Paul. de Med**., São Paulo, v.25, p.21-34, 1969.

MENDES, L.T.; BASTOS, K.P.L.; GOMES, D.M.; PÓVOA, H.C.C.; ARÊDES, E.M. **Detecção de resíduos de antibióticos e de microrganismos em leite cru comercializado no município de Muriaé - MG e região...** Anais da 58ª Reunião Anual da SBPC – Florianópolis: SC, Jul./2006.

MESQUITA, A.J.; COSTA, F.M.A.; BRANCO, A.N.R.C.; PRADO FILHO, S.R. Detecção de antimicrobianos no leite cru de latões. Anais das Escolas de Agronomia e Veterinária da UFG, v.14-16, n.1, p. 5-18, 1986.

MIDIO, A.F.; MARTINS, D.I. **Toxicologia de Alimentos**. São Paulo: Varela, 2000. 295p.

MITCHELL, J.M.; GRIFFITHS, M.W.; McEWEN, S.A.; McNAB, W.B.; YEE, J. Antimicrobial drug residues in milk and meat: causes, concerns, prevalence, regulations, tests, and test performance. **J. Food. Prot**., Des Moines, v.61, n.6, p. 742-756, 1998.

MOL, H. Antibiotics and Milk: a contribuition to the evaluation and solution of a problem. **Dissert. abst. intern.**, v.37, n.1, 1976, 107 p.

MOREIRA NETO, C.N.F. **Metrite bovina**. (2000). Disponível em:<http://www.unipinhal.edu.br>. Acesso em: 03 out. 2009.

NASCIMENTO, G.G.F.; MAESTRO, V.; CAMPOS, M.S.P. Ocorrência de resíduos de antibióticos no leite comercializado em Piracicaba, SP. **Rev. Nutr.**, Campinas, v.14, n.2, 2001.

NASCIMENTO, E.S.; ESTEBAN, C.; DENOBILE, M.; OLIVEIRA, M.W.M. Resíduos de antibióticos em alimentos no Brasil e potenciais riscos à saúde humana. **ILSI BRASIL**, São Paulo, ano 16, n.1, 2008.

NERO, L.A.; MATTOS, M.R.; BELOTI, V.; BARROS, M.A.F.; PINTO, J.P.A.N.; ANDRADE, N.J.; SILVA, W.P.; FRANCO, B.D.G.M. Leite cru de quatro regiões leiteiras brasileiras: perspectivas de atendimento dos requisitos microbiológicos estabelecidos pela instrução normativa 51. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, Campinas, v.1, n.25, p. 191-195, 2005.

NERO, L.A.; MATTOS, M.R.; BELOTI, V.; BARROS, M.A.F.; FRANCO, B.D.G.M. Resíduos de antibióticos em leite cru de quatro regiões leiteiras no Brasil. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, Campinas, v. 2, n. 27, p. 391-393, 2007.

NETTO, D.P.; LOPES, M.O.; OLIVEIRA, M.C.S.; NUNES, M.P.; JUNIOR, M.M.; BOSQUIROLI, S.L.; BENATTO, A.; BENINI, A.; BOMBARDELLI, A.L.C.; FILHO, D.V.; MACHADO, E.; BELMONTE, I.L.; ALBERTON, M.; PEDROSO, P.P.; SCUCATO, E.S. Levantamento dos principais fármacos utilizados no rebanho leiteiro do Estado do Paraná. Maringá, **Acta Scient.. An. Sciences**, v. 27, n.1, p. 145-151, 2005.

NUNES, M.T., D'ANGELINO, J.L. Ocorrência de resíduos de antibióticos no leite, em fazendas produtoras e no leite pronto para consumo. **Hig. Aliment.**, São Paulo, v.21, n. 149, p. 57 – 61, 2007.

OCB – ORGANIZAÇÃO DAS COOPERATIVAS DO BRASIL (2008). Disponível em: <http://www.brasilcooperativo.com.br>. Acesso em: 10 jan. 2010.

OLIVEIRA, C.A.F., FONSECA, L.F.L., GERMANO, P.M.L. Aspectos relacionados à produção, que influenciam a qualidade do leite. **Hig. Aliment.**, São Paulo, v.13, n.62, p.10-16, 1999.

PALERMO NETO, J. Resíduos de antimicrobianos em leite. **Rev. CFMV**, Brasília, v.7, n.22, p. 65-71, jan/fev/mar/abr, 2001.

PILET, C.; THOMA, B. Essais sur La thermostabilité de quelques antibiotiques. **Cahiers Méd. Vét.**, v.38, p. 227-231, 1969.

PORTO, C.R.; ANSELMO, M.S.; TIMM, C.D.; GONZALEZ, H.L.; OLIVEIRA, D.S.; ALEXIS, M.A.; ROSS, T.; MORAES, C.M. Ocorrência de resíduos de antibióticos beta-lactâmicos no leite cru entregue à indústria na região sudeste do Rio Grande do Sul. **Rev. do ILCT**, Juiz de Fora, v.57, n.327, p.313-316, 2002.

RAIA, R.B.; COSTA, E.O.; GARINO JÚNIOR, F.; WATANABE, E.T.; THIERS, F.O.; GROFF, M.R. Estudo da persistência de eliminação de resíduos de antibióticos no leite após o tratamento sistêmico e intramamáriode mastite. **Napgama**, São Paulo, n.3, p. 4-8, 1999.

RAIA JUNIOR, B.R. **Influência da mastite na ocorrência de resíduos de antimicrobianos no leite, 2001**. Dissertação (Mestrado), Universidade de São Paulo, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, São Paulo.

RIBEIRO, M.G.; GERALDO, J.S.; LANGONI, H.; LARA, G.H.B.; SIQUEIRA, A.K.; SALERNO, T.; FERNANDES, M.C. Microrganismo patogênico, celularidade e resíduos de antimicrobianos no leite bovino produzido no sistema orgânico. **Pesq. Veter. Bras.**, Rio de Janeiro, n. 29, v.1, p. 52–58, 2009.

SANTOS, M.V. CCS e a qualidade do leite e derivados. **Balde Branco**, São Paulo, v.37, n.448, p.32-35, fev.2002.

SANTOS, M.V.; FONSECA, L.F.L. **Estratégias para o controle de mastite e melhoria da qualidade do leite**. Manole, São Paulo. 314p, 2007.

SBAMPATO, C.G.; ABREU, L.R.; MENDONÇA, A.T. Aspectos tecnológicos de fabricação de iogurte e queijo utilizando leite com resíduos de antibióticos. **Rev. do ILCT**, Juiz de Fora, v.54, n.313, p.13-19, 2000.

SEYMOUR, E.H.; JONES, G.M.; McGILLIARD, M.L. Persistence of residues in milk following antibiotic treatment. **J. Dairy Science**, Champaign, v.71, p. 2292-2296, 1988.

SILVA, T.J.P.; SENA, M.C. Prevalência de antibióticos no leite pasteurizado tipo B e especial (3,2% de gordura) consumidos em Belo Horizonte entre 1982 e 1983. **Rev. do ILCT**, Juiz de Fora, v.39, n.235, p. 7-12, 1994.

SILVA, T.F.; FOLLY, M.M.; SILVA, H.M.; SILVA, L.G.; QUIRINO, C.R. Estudo da correlação entre o crescimento bacteriano em placa com a contagem de células somáticas (CCS) e a contagem bacteriana total (CBT), de leite proveniente de vacas com mastite subclínica do norte e noroeste fluminense. **Hig. Aliment.**, São Paulo, v.22, n.165, p. 86-92, 2008.

SOUZA, G.N.; BRITO, J.R.F.; MOREIRA, E.C.; BRITO, M.A.V.; BASTOS, R.R. Fatores de risco associados à alta contagem de células somáticas do leite do tanque em rebanhos leiteiros da Zona da Mata de Minas Gerais. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, Minas Gerais, v.57, supl. 2, p.251-260, 2005.

SOUZA, R.C. **Resíduos de antibiótico no leite. 2006**. 44f. Monografia (Especialização “Lato Sensu” em Higiene e Inspeção de Produtos de Origem Animal/Vigilância Sanitária de Alimentos) Universidade Castelo Branco, Rio de Janeiro, 2006.

SULIMAN, H.B.; SHADDAD, S.A.; SHOMMEIN, A.M., ABDELRARAHEIM, A.I.; IBRAHIM, M.E.M. Antibiotic residues in milk following treatment of bovine mastists. **Bull. Anim. Hlth. Prod. Afr**., v.38, p. 65-67, 1990.

TETZNER, T.A.D.; BENEDETTI, E.; GUIMARÃES, E.C.; PERES, R.F.G. Prevalência de resíduos de antibióticos em amostras de leite cru na região do Triângulo Mineiro. **Hig. Aliment.**, São Paulo, v.19, n.130, p. 69-72, 2005.

THAMER, J. Les antibiotiques dans Le lait. **J. Soc. Dairy Technol.**, v.2, n.17, 1964, 95p.

TRONCO, V.M. **Manual para inspeção da qualidade do leite**. Santa Maria: UFSM, 1997. 151p.

VEISSEYRE, R. **Lactologia técnica: composicion, recogida, tratamiento y transformacion de la leche**. Zaragoza: Ed. Acribia, 1988. 629p.

VAN EENENNAAM, A.L.; CULLOR, J.S.; PERANI, L.; GARDNER, I.A; SMITH, W.LL; DELLINGER, J.; GUTERBOCK, W.M. Evaluation of milk antibiotic residue screening tests in cattle with naturally occurring clinical mastitis. **J. Dairy Sci.**, Champaign, v.76, p. 3041-3053, 1993.

VILLA, F.B.; PINTO, J.P.A.N. Qualidade físico-química, microbiológica e presença de resíduos de antimicrobianos, no leite *in natura* comercializado informalmente em Brotas, SP. **Hig. Aliment.**, São Paulo, v.22, n.158, p. 98-103, 2008.

ZOCCAL, R. Pesquisa radiografa produção familiar. **Rev. DBO: Mundo do Leite***,* São Paulo, n.8, p.32-33, 2004.

WATTIAUX, M. A. **Essência do gado de leite**. In: The Babcock Institute. 1994. Disponível em: <http://babcock.cals.wisc.edu>. Acesso em: 30 ago. 2009.

WORLD HEALTH ORGANIZATION – WHO. **Global principles for the containment of antimicrobial resistance in animals intended for food**. Geneve, 2002. 28 p.

Anexos

ANEXO 1

Limite Máximo de Resíduos – LMRs estabelecidos pelo *Codex Alimentarius* e praticados no Brasil; Canadá; União Européia e Estados Unidos para leite

Princípio Ativo	**LMR (µg/Kg)**				
	Brasil	**Codex**	**Canadá**	**EU**	**EUA**
Amoxicilina	4	-	-	4	4
Ampicilina	4	-	10	4	10
Oxacilina	-	-		30	-
Ceftiofur	100	100	100	100	50
Cefquinone	-	-		20	-
Cefapirima	-	-	20	60	20
Cloxacilina	-	-	30	30	10
Cloranfenicol	0	0	0	0	0
Dicloxacilina	-	-	-	30	-
Penetamato	-	-	-	4	-
Etracilina	100	100		100	80
Dihidroestreptomicina	200	200	125	200	125
Eritromicina	40	-	50	40	50
Espectinomicina	-	200		200	30
Estreptomicina	200	200	125	200	125
Gentamicina	-	200		100	30
Neomicina	500	500	250	500	150
Novobiocina	-	-	125	50	100
Tetraciclina	100		-	100	-
Clortetraciclina	100	100	-	100	30
Oxitetraciclina	100	100	150	100	30
Penicilina G	4		6	4	5
Benzilpenicilina procaína	4			4	

Continuação. Limite Máximo de Resíduos – LMRs estabelecidos pelo *Codex Alimentarius* e praticados no Brasil; Canadá; União Européia e Estados Unidos para leite

Sulfonamida	-	-		100	-
Sulfadimidina	-	25		-	10
Sulfadimetoxina	100	-	10	100	10
Sulfadoxina	-		10	100	-
Sulfamerazina	-	-		-	10
Sulfadiazina	-	-		-	10
Sulfametazina	100		10	100	10
Sulfatiazol	100	-	-	-	10
Trimetropin	-	-	-	50	-
Tylosina	-	-		50	50
Espiramicina	200	-	-	200	-

Fonte: ANVISA, 2001; MAPA, 2003

ANEXO 2

Limite Máximo de Resíduos permitido pelo Programa de Controle de Resíduos e Contaminantes em Leite – PNCRC/MAPA/2008

Grupo	Analito	LQ (µg/kg ou µg/L)	LMR/NA (µg/kg ou µg/L)	Nº de itens de ensaio
Antimicrobianos	Clortetraciclina	50	100	120
	Oxitetraciclina	10		
	Tetraciclina	20		
	Sulfatiazol	25	100	60
	Sulfametazina	25		
	Sulfadimetoxina	25		
	Clorafenicol	0,1	0,3	60

Fonte: BRASIL, 2008

ANEXO 3

Kits para detecção de resíduos de antibióticos no leite disponíveis no mercado

Princípio do Teste	Teste
Inibição do Crescimento Bacteriano	Teste do Disco
	BR – Test
	BR – Test “Blue Star”
	BR – Test AS
	Charm Farm Test
	Charm Inhibition assay
	Delvotest P
	Delvotest SP
Receptor	Charm Cowside Test
	Charm I Test
	Charm II Test
Ligação à Proteína	CITE Probe (β-lactâmicos)
ELISA	CITE Probe (tetraciclina, gentamicina)
	CITE sulfa trio
	EZ – screen
	Lac tek (β-lactâmicos, gentamicina, sulfametazina)
ENZIMA	Penzyme
	IDEXX SNAP Test
	Charm II Test
Aglutinação em Látex	SPOT Test

Fonte: Cullor, 1993

ANEXO 4

Limites de detecção do Kit Delvotest ® SP – NT para diferentes classes de medicamentos expressos em ppb

Medicamento	Nível de detecção Após o tempo de controle	Nível de detecção Após tempo de leitura 3 horas
β – lactâmicos		
Penicilina G	1 – 2	2 – 3
Ampicilina	4	6 – 7
Amoxicilina	2 – 3	3 – 5
Ceftiofur	25 – 50	50 – 100
Cefapirina	4 – 6	6 – 8
Cloxacilina	20	20 – 30
Dicloxacilina	10	10 – 20
Oxacilina	10	10
Sulfonamidas		
Sulfadiazina	25 – 50	25 – 50
Sulfametazina	25 – 100	100 – 250
Tetraciclinas		
Tetraciclina	250 – 500	800
Oxitetraciclina	250 – 500	800
Macrolidas		
Tilosina	30	50
Spiramicin	400 – 600	800 – 1000
Eritromicina	40 – 80	200
Outros		
Trimetoprima	50 – 100	200 – 300
Dapsna	0,5 – 1	1 – 2,5
Aminoglicosídeos		
Gentamicina	50	200
Neomicina	100 – 200	300 – 600

Fonte: manual do fabricante Delvotest ® SP – NT

ANEXO 5

Limites de detecção do Kit ECLIPSE 50 para diferentes inibidores (µg/mL)

INIBIDOR	NEGATIVO	POSITIVO
Penicilina G	0,002	0,004
Ampicilina	0,003	0,005
Amoxicilina	0,003	0,005
Cloxacilina	0,025	0,04
Oxacilina	≤ 0,005	0,025
Cefalexina	0,025	0,075
Cefapirina	0,005	0,008
Oxitetraciclina	0,05	0,15
Tetraciclina	0,02	0,15
Sulfatiazol	0,02	0,075
Sulfametazina	0,1	0,2
Sulfanilamida	0,1	0,6
Eritromicina	0,2	0,4
Tilosina	0,02	0,1
Neomicina	< 0,500	0,800

Fonte: manual do fabricante Eclipse 50

ANEXO 6

Limites de detecção do Kit Twinsensor – BT 20 para diferentes inibidores expresso em partes por bilhão (µg/l)

Medicamento	Limite de detecção - ppb
β-lactâmicos	
Penicilina G	2 – 3
Benzilpenicilina	2 – 3
Ampicilina	3 – 5
Amoxicilina	3 – 5
Cloxacilina	6 – 8
Nafcilina	30 – 40
Cefapirina	6 – 8
Cefazolina	18 – 22
Cefoperazona	3 – 4
Ceftiofur	10 – 15
Tetraciclinas	
Clortetraciclina	45 – 55
Doxiciclina	20 – 40
Oxitetraciclina	56 – 75
Tetraciclina	75 – 100

Fonte: manual do fabricante Twinsensor – BT 20

Apêndice

APÊNDICE

INQUÉRITO INVESTIGATIVO

Nº _____

1. ***Identificação:***

Município: _____ Região _____ U. F.: ____

Proprietário: _____

Propriedade: _____

2. Data da visita e colheita ____/____/_____. Horário: _____.

Dados do Rebanho:

3. Nº total de animais: _____ Nº de vacas: _____

4. Produção de leite: a) Nº de vacas em lactação: _____

b) Produção diária de leite na fazenda: _____ litros

5. Raça predominante: □ zebu □ europeu de leite □ mestiço □ outras raças

6. Tipo de exploração: □ corte □ leite □ mista

7. Sistema de criação: □ confinado □ semi-confinado □ extensivo

8. Tipo de alimentação: □ forragem □ concentrado □ forragem + concentrado + suplemento mineral □ concentrado + suplemento mineral □ outros: _____

9. Nº de ordenhas/dia: □ 1 ordenha □ 2 ou 3 ordenhas □ não ordenha

Horário da ordenha: _____

10. Tipo de ordenha:

□ manual □ mecânica ao pé □ mecânica em sala de ordenha

11. Armazenamento do leite ordenhado:

□ latão (tipo plástico) □ latão (tipo inox) □ tanques □ baldes

Destino do Leite

12. A quem entrega leite? □ Cooperativa □ Laticínio □ direto ao consumidor

□ não está entregando no momento □ não entrega

13. Resfriamento do leite: □ não faz □ faz

Como: □ em resfriador ou tanque de expansão próprio

□ em resfriador ou tanque de expansão coletivo

14. A entrega do leite é feita a granel: □sim □ não

15. Produz queijo e/ou manteiga na propriedade? □ sim □ não

Finalidade: □ para consumo próprio □ para venda

16. Perda de partida na produção: □ sim □ não

17. Consome leite cru? □ sim □ não

18. Realiza testes de triagem no controle de resíduos de antibióticos no leite:

□ sim □ não

<u>Manejo do Rebanho</u>

19. Tem assistência veterinária (regular)? □ sim □ não

Qual o tipo? □ veterinário da cooperativa □ veterinário particular

20. Casos de alguma doença infecciosa no rebanho: □ sim □ não

21. Qual a enfermidade que ocorre no rebanho com maior freqüência? _____

22. Tratamento antibiótico em vacas doentes: □ sim □ não

23. Produto e duração do tratamento: _____

24. Qual tipo de enfermidade: □ articular □ reprodutivo □ mamário

25. Há casos de mastite (mamite) no rebanho: □ sim □ não

26. Trata as vacas com mastite utilizando antibióticos:

□ sim □ não □ raramente

27. Qual o produto e duração do tratamento: _____

28. Qual a via de administração do medicamento:

□ subcutânea □ intravenosa □ intramamária □ intramuscular

29. O tratamento é realizado com sucesso: □ sim □ não

30. Uso de suplemento alimentar na ração: □ sim □ não

31. Qual produto e duração:_____

32. Os animais são ordenhados quando realizado o tratamento a base de antibióticos: □ sim □ não

33. Quais os tetos ordenhados:

□ todos os tetos □ o lado não tratado com antibiótico

□ o quarto não tratado com antibiótico

34. Observa na bula do medicamento o período de carência recomendado pelo laboratório? □ sim □ não

35. Qual o período de carência usado para realizar a ordenha:

□ < 24 h após o término do tratamento □ 24 h após término do tratamento

□ 48 h após término do tratamento □ 72 - 96 h após término do tratamento

□ > 96 h após término do tratamento

36. O rebanho é vacinado? □ sim □ não

Contra quais doenças? _____

37. O rebanho é vermifugado? □ sim □ não

Produto e período: _____

38. Após o parto: qual o intervalo para a retirada do leite?

□ < 5 dias □ entre 5 a 10 dias □ > 10 dias

39. Há vacas nessa situação no rebanho? □ sim □ não

40. Tempo de retirada do leite: □ < 8 meses □ entre 8 meses e 1 ano □ > 1 ano

41. Há vacas nessa situação no rebanho? □ sim □ não

42. Quem receita o antibiótico utilizado nas vacas doentes:

□ médico veterinário particular □ próprio tratador (prática)

□ farmacêutico do comércio

43. Possui na família alguém com alergia a algum tipo de antibiótico ou quimioterápico? □ sim □ não

Livros Grátis

(http://www.livrosgratis.com.br)

Milhares de Livros para Download:

Baixar livros de Administração
Baixar livros de Agronomia
Baixar livros de Arquitetura
Baixar livros de Artes
Baixar livros de Astronomia
Baixar livros de Biologia Geral
Baixar livros de Ciência da Computação
Baixar livros de Ciência da Informação
Baixar livros de Ciência Política
Baixar livros de Ciências da Saúde
Baixar livros de Comunicação
Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE
Baixar livros de Defesa civil
Baixar livros de Direito
Baixar livros de Direitos humanos
Baixar livros de Economia
Baixar livros de Economia Doméstica
Baixar livros de Educação
Baixar livros de Educação - Trânsito
Baixar livros de Educação Física
Baixar livros de Engenharia Aeroespacial
Baixar livros de Farmácia
Baixar livros de Filosofia
Baixar livros de Física
Baixar livros de Geociências
Baixar livros de Geografia
Baixar livros de História
Baixar livros de Línguas

Baixar livros de Literatura
Baixar livros de Literatura de Cordel
Baixar livros de Literatura Infantil
Baixar livros de Matemática
Baixar livros de Medicina
Baixar livros de Medicina Veterinária
Baixar livros de Meio Ambiente
Baixar livros de Meteorologia
Baixar Monografias e TCC
Baixar livros Multidisciplinar
Baixar livros de Música
Baixar livros de Psicologia
Baixar livros de Química
Baixar livros de Saúde Coletiva
Baixar livros de Serviço Social
Baixar livros de Sociologia
Baixar livros de Teologia
Baixar livros de Trabalho
Baixar livros de Turismo