

**CENTRO UNIVERSITÁRIO DE FORMIGA – UNIFOR-MG
CURSO DE MEDICINA VETERINÁRIA
ELSON ELIAS DE SOUZA**

**RESÍDUOS DE ANTIMICROBIANOS NO LEITE: REVISÃO DE
LITERATURA**

**FORMIGA - MG
2013**

ELSON ELIAS DE SOUZA

RESÍDUOS DE ANTIMICROBIANOS NO LEITE: REVISÃO DE
LITERATURA

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao curso de Medicina Veterinária do UNIFORMG, como requisito parcial para obtenção do título de bacharel em Medicina Veterinária.

Orientador: Prof. Fabiano Santos Junqueira

FORMIGA - MG
2013

FICHA CATALOGRÁFICA

Elson Elias de Souza

RESÍDUOS DE ANTIMICROBIANOS NO LEITE

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao curso de Medicina Veterinária do UNIFORMG, como requisito parcial para obtenção do título de bacharel em Medicina Veterinária.

BANCA EXAMINADORA

Prof. _____

Prof. _____

Prof. _____

Formiga, ___ de _____ de 2013.

*“Na vida devemos sempre correr atrás do SIM por que o NÃO na maioria das vezes
é certo.”*

AGRADECIMENTOS

Ao finalizar mais uma etapa de minha vida, não poderia deixar de agradecer primeiramente à Deus e a Nossa Senhora de Aparecida, a quem sou muito devoto por iluminar minha vida.

Aos meus pais Renato e Luciléia, meu avô Estevão, meu tio Zote, minha namorada Thaís, meus amigos inseparáveis Alisson e Flávia, Eliton e Marilza, Atailde, pelo incentivo e companheirismo constante.

Também não poderia deixar de agradecer meus colegas de sala, meus professores em especial os professores “Leozão” e Fabiano pelos conselhos e ensinamentos extraclasse e aqueles que contribuíram com suas vidas para que eu pudesse aprender a salvar outras vidas, os “ANIMAIS”.

RESUMO

O leite é considerado um dos mais completos alimentos *in natura* existentes. Para garantir sua qualidade, são avaliados, além de parâmetros físico-químicos e microbiológicos, são analisados quanto à presença de resíduos de antibióticos, pesticidas e outras drogas. Esses resíduos de antibióticos e outros medicamentos muitas vezes são provenientes do uso inadequado em animais, não respeitando o período de carência previsto. Com isso o leite contaminado com estes resíduos causa problemas sérios ao consumidor, dentre eles alergias e resistência bacteriana. Na indústria interfere negativamente nos processos tecnológicos. O Brasil possui uma legislação rígida quanto à presença destes resíduos em alimentos, principalmente em relação ao leite. Existem vários tipos de testes para detecção destes resíduos de antibióticos no leite, muitos deles possuem uma forma bem simplificada de utilização e apresentam resultados rápidos, sendo de extrema importância para determinar rapidamente o destino de um lote de leite dentro da indústria. Para minimizar o problema do resíduo de antibiótico no leite, faz-se necessário uma prescrição criteriosa de antimicrobianos, além da educação continuada de veterinários e médicos, com esclarecimentos à população sobre a real indicação destes produtos.

Palavras – chave: leite – resíduos - antibióticos

ABSTRACT

Milk is considered one of the most complete foods available in nature. To ensure their quality, are evaluated as well as physico-chemical and microbiological parameters are analyzed for the presence of antibiotic residues, pesticides and other drugs. These residues of antibiotics and other drugs often come from inappropriate use in animals, not respecting the grace period provided. With that milk contaminated with these wastes cause serious problems to the consumer, including allergies and bacterial resistance. Negative impact on industry in technological processes. Brazil has strict laws regarding the presence of these residues in food, especially in relation to milk. There are several types of tests for detection of antibiotic residues in milk, many of them have a quite simplified use and have quick results, it is extremely important to quickly determine the fate of a lot of milk within the industry. To minimize the problem of antibiotic residue in milk, it is necessary a careful prescription of antimicrobials, as well as continuing education for veterinarians and physicians, with explanations to the public about the real indication of these products.

Key- words: *milk – residues - antibiotics*

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Projeção de produção, consumo e exportação de leite no Brasil, no período de 2011 a 2022	12
Tabela 2. Persistência de eliminação de medicamentos pelo leite de acordo com a via de administração	15
Tabela 3. Duração mínima de eliminação de antimicrobianos pelo leite	16
Tabela 4. Kits para pesquisa de resíduos de antimicrobianos no leite	18
Tabela 5. Antimicrobianos que apresentam efeitos adversos para gestantes e fetos	23

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	11
2 REVISÃO DE LITERATURA	12
2.1 Leite	12
2.2 Produção de leite no Brasil e no mundo.....	12
2.3 Mastite e sua influência na qualidade do leite	13
2.4 Tipos de antimicrobianos usados em animais de produção.....	14
2.4.2 Tetraciclinas	15
2.4.3 Cloranfenicol	15
2.5 Resíduos de antibióticos no leite.....	16
2.6 Métodos de detecção de resíduos de antibióticos	17
2.7 Principais kits comerciais utilizados para detecção de antimicrobianos no leite	19
2.7.1 Delvotest	19
2.7.2 Teste <i>Copan</i>	20
2.7.3 BL Snap-Test	20
2.7.4 Charm SL Test	21
2.8 Conseqüências dos resíduos de antimicrobianos na produção de derivados.....	21
2.9 Conseqüências para saúde pública	22
2.10 Legislações e órgãos responsáveis pela normatização sobre resíduos de antibióticos	24
2.11 Pesquisas sobre resíduos de antibióticos em leite no Brasil	26
3 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	27
4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	29

1 INTRODUÇÃO

O leite, por ser considerado um dos mais completos alimentos *in natura* e, devido à grande importância que representa na alimentação humana, ele e seus derivados estão entre os alimentos mais avaliados e testados em relação à sua qualidade no Brasil (SANTOS e RODRIGUES, 2003).

De acordo com Tronco (2008 *apud* SILVA, SILVA E RIBEIRO, 2012), para garantir a qualidade deste leite, são avaliadas características físico-químicas e sensoriais como sabor, odor, além de definir parâmetros de baixa contagem de bactérias, ausência de microrganismos patogênicos, baixa contagem de células somáticas, ausência de conservantes químicos e de resíduos de antibióticos, pesticidas ou outras drogas, para que ele seja considerado apto para consumo.

Em situações específicas, o leite pode veicular resíduos de medicamentos ou drogas de uso veterinário, como os antibióticos, sendo considerado adulterado e impróprio para consumo, além de representar riscos para a saúde pública, riscos tecnológicos para a indústria de laticínios e riscos comerciais (ARAÚJO, 2010).

A principal fonte de resíduos de antibióticos no leite é originada do manejo inadequado de drogas. Essas substâncias são eliminadas pelo leite durante seu período de carência e a persistência dos resíduos varia com o antibiótico e depende de vários fatores como dose e via de administração (COSTA, 1996).

Dentre os efeitos deletérios à saúde humana que os resíduos de antibióticos no leite causam, incluem, por exemplo, problemas auditivos (estreptomicina), reações alérgicas, bem como podem causar choque anafilático em indivíduos sensíveis. Nas gestantes, medicamentos como nitrofuranos e tetraciclina possuem efeitos teratogênicos que podem levar a alterações no desenvolvimento fetal (MOREIRA, 2012). A presença de resíduos de antibióticos no leite também interfere no processo industrial de derivados, causando também sérios prejuízos econômicos, como, por exemplo, inibindo fermentos lácticos que são culturas de microrganismos usadas na produção de iogurtes, queijos e outros derivados (BOISON et al., 1994; *apud* DENOBILE e NASCIMENTO, 2004).

O objetivo do presente trabalho é realizar um levantamento bibliográfico sobre resíduos de antibióticos no leite, relatando quais os mais utilizados na terapia veterinária, além de analisar o risco do uso de medicamentos veterinários na

pecuária leiteira e seus mecanismos de controle sanitário no Brasil e métodos de detecção mais utilizados no leite.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Leite

O leite, por seu alto valor nutritivo, é considerado um dos mais completos e valiosos alimentos *in natura*, principalmente para lactantes, crianças e animais em desenvolvimento, já que contém todos os princípios nutritivos (BARROS *et al*, 2001). O equilíbrio na sua composição de nutrientes resulta em elevado valor biológico, constituindo-se principalmente de proteínas, gorduras, sais minerais, vitaminas e água (NASCIMENTO *et al*, 2001).

Veisseyre (1998) cita a composição do leite da seguinte forma:

Composto quimicamente de 87% de água, 3,8% de gordura, 3,5% de proteínas, 4,9% de lactose e 0,8% de sais, também apresenta pigmentos como riboflavina e caroteno; enzimas como lactoperoxidase, lipase, catalase, fosfatase e redutase e vitaminas lipossolúveis e hidrossolúveis. É um dos mais ricos alimentos por conter proteínas de alto valor biológico, pela digestibilidade de suas gorduras, por sua riqueza em cálcio e fósforo e por conter notáveis quantidades de vitaminas A e B2, além de exercer uma influência reguladora sobre a flora bacteriana do trato intestinal (VEISSEYRE, 1998; apud BARROS *et al*, 2001, p.69).

No entanto, a sua composição química pode ser alterada por uma série de fatores relacionados ao animal produtor deste leite, tais como raça, idade e alimentação, estágio de lactação, variações climáticas, ou ainda por infecções do úbere da vaca (SILVA, SILVA E RIBEIRO, 2012).

2.2 Produção de leite no Brasil e no mundo

De acordo com o trabalho desenvolvido pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) denominado de Projeções do Agronegócio – Brasil 2011/12 a 2021/22, este traz para o mercado produtor de leite uma visão prospectiva do setor. Elaborado com base em consultas a trabalhos de organizações brasileiras e internacionais, alguns deles baseados em modelos de projeções, o mesmo projeta para o ano de 2012/2013 (Quadro. 1), uma produção de leite no Brasil estimada em 33,2 bilhões de litros de leite, com uma taxa de crescimento anual de 1,9%. Isso

corresponde a uma estimativa de produção de 39,2 bilhões de litros de leite cru em 2021/2022, destacando-se no cenário internacional como o quinto país de maior produção de leite (BRASIL, 2012).

Tabela 1. Projeção de produção, consumo, importação e exportação de leite no Brasil, no período de 2011 a 2022

Leite em bilhões de litros (Projeção)

Ano	Produção	Consumo	Importação	Exportação
2011/2012	32.539	33.413	1.231	124
2012/2013	33.261	34.149	1.246	125
2013/2014	33.950	34.833	1.260	125
2014/2015	34.620	35.510	1.274	125
2015/2016	35.285	36.183	1.288	126
2016/2017	35.947	36.855	1.303	126
2017/2018	36.608	37.526	1.317	126
2018/2019	37.268	38.197	1.331	127
2019/2020	37.929	38.867	1.346	127
2020/2021	38.589	39.538	1.360	127
2021/2022	39.250	40.208	1.374	128

Fonte: Elaboração da AGE/MAPA e SGE/Embrapa com dados da Embrapa Gado de Leite e LSPA/IBGE (BRASIL, 2012)

Com 11,3 bilhões de litros em 2011, destaca-se a região Sudeste como maior produtora de leite. Minas Gerais ocupa um lugar de destaque com uma produção de 8,7 bilhões de litros neste mesmo período (ZOCCAL, 2012). Em relação ao consumo de leite fluido *per capita*, o Brasil ocupa o sétimo lugar com 83,2 kg/hab./ano, ficando atrás da Rússia, Nova Zelândia, Canadá, Estados Unidos, Austrália e em primeiro lugar a Ucrânia (EMBRAPA, 2012).

2.3 Mastite e sua influência na qualidade do leite

A mastite é considerada um dos problemas mais frequentes e importantes na produção leiteira, exercendo influência prejudicial sobre a composição e as características físico-químicas do leite. Caracteriza-se por um processo inflamatório da glândula mamária, provocado principalmente por bactérias, que interfere diretamente na produtividade, tanto em quantidade como em qualidade do leite. Tais alterações também são relevantes do ponto de vista nutricional, tecnológico e de saúde pública em relação ao leite (COSTA, 2006 *apud* SILVA, SILVA E RIBEIRO, 2012).

Com base nas fontes de infecção e vias de transmissão os microrganismos causadores de mastite são classificados em contagiosos e ambientais, sendo os de

maior incidência os contagiosos, representados pelos gêneros *Staphylococcus*, *Streptococcus* e *Corynebacterium*. Entre os ambientais destacam-se as enterobactérias (*Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* e *Enterobacter aerogenes*), *Nocardia* spp., *Pseudomonas aeruginosa*, algas (*Prototheca zopfii*), fungos e leveduras (LANGONI, SILVA e CABRAL, 1998).

2.4 Tipos de antimicrobianos usados em animais de produção

Segundo Vilela (1980, p.37) “denomina-se antibiótico todo composto químico produzido por um microrganismo possuindo a propriedade, em solução diluída, de inibir o crescimento de outros microrganismos, ou mesmo até de destruí-los”.

Dentre os principais mecanismos de ação dos antimicrobianos, Silva, Silva e Ribeiro (2012) destacaram como principais: inibição da parede celular do microrganismo, inibição da biossíntese protéica, rompimento do metabolismo do ácido desoxirribonucléico (DNA), alteração da função normal da membrana celular e inibição da síntese de alguns metabólitos essenciais

Os antibióticos na Medicina Veterinária são amplamente utilizados no tratamento de doenças no gado leiteiro e também como suplementos em sua dieta. Podem ser administrados por diferentes vias como: via intramamária, para o tratamento de mastite; por via parenteral (intramuscular, intravenosa, subcutânea), na terapia de infecções; por via intrauterina, para o tratamento de infecções uterinas, cervicais e vaginais, e por via oral, para o tratamento de doenças ou como suplemento alimentar, em doses subterapêuticas (BISHOP e WHITE, 1984).

De acordo com Silva, Silva e Ribeiro (2012) alguns dos antimicrobianos mais usados em animais produtores de alimentos, baseados em seu modo de ação, são: beta-lactâmicos, tetraciclina, cloranfenicol e sulfonamidas.

2.4.1 Beta-lactâmicos

Os beta-lactâmicos são os antibióticos mais comumente administrados, principalmente no tratamento de mastites, pois possuem efeitos bactericidas e bacteriostáticos sobre um amplo espectro de bactérias gram-positivas e negativas, sendo assim, os mais detectados no leite (FONSECA e SANTOS, 2000). Estes agem inibindo a transpeptidase, uma enzima que participa da última etapa da

síntese da parede celular. Fazem parte do grupo dos antibióticos beta-lactâmicos as penicilinas (naturais, semi-sintéticas e de amplo espectro) e as cefalosporinas (primeira, segunda, terceira e quarta geração), sendo muito utilizados no tratamento da mastite (SPINOSA, 2002).

2.4.2 Tetraciclina

As tetraciclina são antibióticos produzidos por espécies de *Streptomyces*, podendo algumas delas serem semi-sintéticas. Atuam sobre bactérias Gram - positivas e Gram - negativas, *clamídias*, *riquétsias* e alguns protozoários (ARAÚJO, 2010).

Para tratamento do gado leiteiro, no caso de doenças infecciosas como a mastite as tetraciclina são utilizadas além de poderem também, ser adicionadas como aditivos em ração animal para melhorar a conversão alimentar (DENOBILE e NASCIMENTO, 2004).

2.4.3 Cloranfenicol

Pertencente à classe dos anfenicóis, possui amplo espectro e é altamente efetivo. Atua inibindo a síntese dos polipeptídeos bacterianos (ARAÚJO, 2010).

O uso de cloranfenicol em animais produtores de alimentos está banido em vários países como nos Estados Unidos e em toda União Européia. No Brasil foi proibida por meio da Portaria nº 448, de 10 de setembro de 1998 (MAPA), pois se constatou, por pesquisas, que estes antibióticos deixam resíduos potenciais em carne, leite e ovos, oferecendo risco para a saúde pública (BRASIL, 1998). Possui alta toxicidade e capacidade de provocar anemia aplástica em indivíduos hipersensíveis, discrasia sanguínea, supressão reversível da medula e neurite óptica (SILVA, SILVA e RIBEIRO, 2012).

2.4.4 Sulfonamidas

As sulfonamidas são análogos estruturais e antagonistas competitivos do ácido para-aminobenzóico (PABA) que impedem sua utilização na síntese do ácido fólico (MANDELL e PETRI JR., 1997 *apud* ARAÚJO, 2010). São, portanto, bacteriostáticos.

2.5 Resíduos de antibióticos no leite

Para Santos e Fonseca (2007), o leite para que seja seguro e de boa qualidade deve estar isento de resíduos de drogas veterinárias, como antibióticos e pesticidas. Segundo o *Codex Alimentarius*, citado em BRASIL (1999, p. 13) “resíduo de uma droga veterinária é fração da droga, de seus metabólitos, produtos de conversão ou reação, e impurezas que permanecem no alimento originário de animais tratados com tais drogas”.

Nero et al, (2007) citaram que a contaminação do leite por agentes químicos tem ocorrência mundial e que a maioria da população humana está freqüentemente exposta, sendo os resíduos de antimicrobianos os mais encontrados.

De acordo com Albuquerque et al (1996) citado por Silva, Silva e Ribeiro (2012), o tratamento dos animais com antimicrobianos, de uso interno e externo, implica no estabelecimento do tempo de carência para o consumo dos alimentos obtidos do mesmo para que a droga administrada seja totalmente eliminada. No entanto, na maioria das vezes, a dosagem recomendada, a freqüência de tratamento e o período de carência dos antimicrobianos não são respeitados (COSTA, 1996). A TAB. 2 mostra o período médio de eliminação de medicamentos no leite, de acordo com a via de administração utilizada.

Tabela 2. Persistência de eliminação de medicamentos pelo leite de acordo com a via de administração

Via de Administração	Persistência média (Horas)
Oral	86
Intramuscular	72 a 96
Intravenosa	44
Intrauterina	31
Intramamária	48 a 144

Fonte: Costa (1996)

Para Nero et al (2007) a principal fonte de resíduos de antibióticos em leite origina-se do manejo inadequado de drogas no controle de mastites. Essas substâncias podem ser eliminadas pelo leite durante seus períodos de carência, sendo

necessário o descarte deste leite. Dessa forma, a conscientização dos produtores é fundamental para prevenção de resíduos desses medicamentos no leite.

A presença de resíduos de antimicrobianos no leite pode advir da má higienização de equipamentos e utensílios da indústria e/ou a adição proposital de drogas para encobrir a deficiência na qualidade higiênica do leite e aumentar seu tempo de vida útil (ARAÚJO, 2010). Silva, Silva e Ribeiro (2012) relataram que grande parte destas substâncias encontradas no leite são resistentes à pasteurização. Algumas não são inativadas nem mesmo quando submetidas a temperaturas acima de 100°C. Por exemplo, para eliminar a penicilina do leite é necessário manter a temperatura de 100°C durante três horas.

Brito e Dias (1998) também afirmaram que a pasteurização e a esterilização comercial (UHT) não inativam os antimicrobianos supostamente presentes no leite. Comprovaram em sua pesquisa que a fervura foi capaz de inativar até 50% das penicilinas e 66% das estreptomicinas, 90% das oxitetraciclinas e tetraciclinas, não demonstrando qualquer ação sobre cloranfenicol.

A persistência destes resíduos de antimicrobianos no leite varia de acordo com a droga utilizada e de outros fatores como via de administração, dose e solubilidade (COSTA, 1996). A TAB. 3 mostra o período mínimo de eliminação, em dias, do antimicrobiano no leite.

Tabela 3. Duração mínima de eliminação de antimicrobianos pelo leite

Antimicrobiano (Via intramamária)	Período Mínimo de eliminação (dias)
Penicilina (procaína)	2
Clortetraciclina	6
Oxitetraciclina	4
Cloranfenicol	3
Estreptomicina	4

Fonte: Costa (1996)

2.6 Métodos de detecção de resíduos de antibióticos

Podem-se utilizar de variados métodos para a detecção de resíduos de antibióticos no leite. De acordo com a *Association of Official Analytical Chemists* (AOAC) e *American Public Health Association* (APHA), muitas delas estão disponíveis

comercialmente (NASCIMENTO *et al*, 2001). Para o autor a maioria dos testes disponíveis para essas análises, leva em conta a segurança do processo tecnológico que envolve o uso de leite (produção de derivados), mas não enfatizam a questão toxicológica.

Dentre os métodos analíticos desenvolvidos para detecção de antimicrobianos no leite, pode-se citar os de inibição microbiana, enzimáticos, aglutinação em látex, receptores microbianos, imunoensaios, eletroforese e cromatografia. Entre os mais empregados na rotina dos laticínios destacam-se os testes enzimáticos (bL Snap-test e Charm SL-test) e os testes de inibição microbiana (Delvotest e Copan CH ATK) (FOLLY e MACHADO, 2001).

Cada método analítico está baseado em um conjunto de critérios como sensibilidade, especificidade, exatidão, precisão, limite de detecção, limite de quantificação, praticidade e aplicabilidade em condições normais de laboratório e susceptibilidade a interferentes (SILVA, SILVA e RIBEIRO, 2012).

Morais *et al* (2010) afirmaram que para que possa ser executado um bom programa de monitoramento do leite, deve-se basear na integração dos métodos de triagem e confirmação, já que nenhum teste isolado atende a todos os requisitos analíticos requeridos. Esses métodos devem ser usados na definição de uma estratégia de monitoramento, na qual a análise cromatográfica seja realizada apenas em amostras positivas e assim, reduzindo substancialmente o custo do monitoramento por análise cromatográfica.

Os testes enzimáticos são empregados preferencialmente para detecção de tetraciclina, amoxicilina, ampicilina, cefapirina e penicilina G em leite cru, realizado em vacas de forma individual. Já os testes de inibição microbiana utilizam uma matriz contendo esporos de *Bacillus stearothermophilus* var. *calidolactis*, nutrientes e um indicador de pH. São empregados para beta-lactâmicos, tetraciclina e sulfonamidas ao mesmo tempo (FOLLY e MACHADO, 2001).

A Cromatografia Líquida de Elevada Eficiência (HPLC) citada por Feltrin *et al*. (2007) detecta, separa e discrimina cada fármaco presente no leite. É uma técnica que apresenta como vantagens o uso de pequenos volumes de amostra e de solvente para extração, sendo realizado de forma rápida e apresentando facilidade na sua execução.

O MAPA por meio da Resolução nº 02, de 12 de julho de 2002, criou o Comitê Técnico Consultivo, para executar a avaliação dos kits analíticos destinados à

detecção de microrganismos, resíduos de drogas, medicamentos ou outras substâncias, no processo de Autorização de Uso de Produto – AUP (BRASIL, 2002).

2.7 Principais kits comerciais utilizados para detecção de antimicrobianos no leite

Existem vários kits comerciais disponíveis para a pesquisa de resíduos de antimicrobianos em leite conforme a TAB. 4 (CULLOR, 1992; COSTA, 1996 *apud* SILVA, SILVA e RIBEIRO, 2012). No Brasil, a utilização de testes para a detecção de resíduos de antimicrobianos no leite é uma das exigências das normas oficiais para a produção, beneficiamento e industrialização do leite e uma das preocupações tecnológicas das grandes empresas do setor (BRASIL, 1999).

Tabela 4. Kits para pesquisa de resíduos de antimicrobianos no leite

Princípio do Teste	Nome do Teste
Inibição do crescimento microbiano	Teste do Disco BR-Test (Brilliant Black Reduction Test); BR-Test Charm Farm Test, Charm inhibition assay Delvotest-P, Delvotest-SP Copan® ATK P & S Microplate; Copan® ATK P & S
Receptor	Charm Cowside Test; Charm I Test, Charm II Test
Ligação à proteína	CITE Probe (β-lactâmico)
ELISA	CITE Probe® (Tetraciclinas); CITE Probe® Lactek (Beta-lactâmicos); Lactek (sulfametazina); Signal (gentamicina); Signal (sulfametazina); Signal
Enzima	Penzyme ® Snap™ (Beta-lactâmicos); Snap™ (tetraciclina) Método de bioluminescência

Fonte: Cullor (1992), Costa (1996) *apud* Silva, Silva e Ribeiro (2012)

2.7.1 Delvotest

O Delvotest é um teste muito utilizado nas usinas de beneficiamento de leite e tem como princípio a inibição da multiplicação do microrganismo *Bacillus stearothermophilus* sensível a antibióticos do grupo beta-lactâmicos, principalmente à penicilina. O agente é semeado em meio de crescimento ágar e incubado à 64 °C por um período três horas. Neste período, a amostra se difunde pelo meio e a

presença de substância inibidora impede ou reduz o crescimento do microrganismo, e o meio, que contém indicador de pH, não muda de cor (SILVA, SILVA e RIBEIRO, 2012). É muito utilizado quando não se sabe qual é o princípio ativo a ser pesquisado, nem sua concentração, podendo detectar uma diversidade de compostos (DSM *Food Specialties*, 2012). Trata-se de um teste com limites de detecção inferiores aos LMR estipulados na legislação vigente no Brasil (BRASIL, 1999).

2.7.2 Teste Copan

Possui as versões *Microplate* e *Single*. Baseia-se no crescimento do *Bacillus stearothermophilus* var. *calidolactis*, que promove mudança de pH detectada como uma alteração da cor do meio-teste de violeta para amarelo, por produção de ácido no meio e conseqüente diminuição do pH (TENÓRIO, 2007). São adicionados 100 µL de leite ao tubo contendo a matriz (cultura bacteriana e indicador púrpura de bromocresol) e incubados a 64,5°C por três horas e avaliada a cor desenvolvida (MACEDO e FREITAS, 2009). Quando as substâncias inibitórias estão presentes, não há crescimento do microrganismo e o pH não se altera, assim a cor do meio permanece a mesma (violeta) (TENÓRIO, 2007).

2.7.3 BL Snap-Test

É um teste qualitativo e possui as versões SNAP Tetraciclina e SNAP Beta-lactâmicos. Estes detectam substâncias inibitórias no leite por reação imunoenzimática, que poderão alterar a intensidade da cor no círculo de ativação da amostra e do controle, de azul escuro em ambos os orifícios (Teste negativo) a azul claro ou ausência de coloração no círculo teste (teste positivo). (RUGGED..., 2012). 450 µL da amostra de leite é adicionada ao dispositivo do conjunto reativo e incubada em estufa a 45°C por cinco minutos. Como etapa seguinte, o conjunto reativo contendo a alíquota da amostra era submetido à etapa de ativação a 45°C durante quatro minutos. A leitura do resultado é feita conforme a seguinte interpretação: resultado negativo - coloração da mancha da amostra igual ou mais escura que a mancha do controle; resultado positivo - coloração da mancha da amostra mais clara que a mancha do controle (MACEDO e FREITAS, 2009).

2.7.4 Charm SL Test

Este teste tem como princípio um ensaio de inibição microbiana (*Charm Sciences, Inc., USA*), que detecta resíduos de β -lactâmicos, sulfonamidas e outros antibióticos (gentamicina, tilosina) que sempre são utilizados em gado leiteiro. Baseia-se na afinidade específica que os antimicrobianos têm com certos sítios de receptores na parede celular de microrganismos. Quando a amostra não contém resíduos destes antimicrobianos marcados, todos os sítios dos receptores serão ocupados com o antimicrobiano marcado, mas quando a amostra contém resíduos alguns sítios serão ocupados com a droga não-marcada (BRITO, 2000).

Assim, a utilização deste teste simples e rápido é de extrema importância para determinar se há resíduos de antibióticos em um lote de leite. Também é importante que a sensibilidade destes testes seja superior aos LMRs das substâncias a serem detectadas, a exemplo do que ocorre com os β -lactâmicos mais utilizados na pecuária leiteira quando avaliados pelo *Charm-test*TM (NERO et al, 2007).

2.8 Conseqüências dos resíduos de antimicrobianos na produção de derivados

Apesar de microrganismos patogênicos serem os agentes mais relacionados a enfermidades veiculadas por alimentos, a presença de resíduos de substâncias químicas também é muito comum em todo o mundo (ALBUQUERQUE et al, 1996). A presença de resíduos de antimicrobianos no leite pode interferir no processo industrial de derivados de leite, prejudicando a produção destes e, conseqüentemente, causando também sérios prejuízos econômicos, como, por exemplo, inibindo fermentos lácticos que são culturas de microrganismos usadas para produzir iogurtes, queijos e outros derivados (BOISON et al, 1994).

A interferência no crescimento das culturas iniciadoras durante a elaboração de queijos e leites fermentados leva a alteração em fatores de qualidade e impede a manutenção do padrão de identidade e qualidade dos produtos. Para Brito (2005) *apud* Silva, Silva e Ribeiro (2012), é o principal problema para a indústria. Isto pode ocasionar em maturação inadequada de queijos durante sua fabricação, coagulação inadequada do leite e redução da acidificação durante a produção de leites fermentados. No queijo, a presença dos resíduos provoca fermentação indesejada,

maturação incompleta, além de sabor anormal, tornando o produto com características indesejáveis. No iogurte, ocorre um desequilíbrio do fermento lácteo proporcionando um sabor desagradável e aspecto não característico do produto. Na manteiga, altera o aroma característico do produto por inibirem parcialmente ou totalmente, a fermentação láctea.

A presença destas substâncias em leite pode causar também a inibição na multiplicação de sua microbiota, interferindo de forma fraudulenta nos resultados de análises laboratoriais de controle de qualidade. Antibióticos são usualmente utilizados de forma ilegal como agentes na preservação e redução da carga microbiana do leite (NERO et al, 2007).

2.9 Conseqüências para saúde pública

De acordo com Feltrin (2007) os resíduos de antibióticos em alimentos em geral levantam a preocupação quanto à saúde humana, em decorrência dos graves problemas que podem provocar.

A presença de resíduos de antimicrobianos no leite pode causar graves efeitos na saúde do consumidor, entre os quais: hipersensibilidade, choque anafilático, teratogenia, resistência microbiana e desequilíbrio da microbiota intestinal (MACEDO e FREITAS, 2009).

Os resíduos de antibióticos no leite de consumo podem representar riscos à saúde humana, podendo causar reações alérgicas em indivíduos sensíveis. Aproximadamente 5 a 10% da população é hipersensível à penicilina, e apresentam reações alérgicas ao ingerirem concentrações de 1 ppb dessa substância. Além disso, ao consumir pequenas quantidades de antibióticos corre-se o risco de desencadear um processo de resistência crônica de microrganismos presentes no trato intestinal humano (COSTA, 1996).

A ingestão de resíduos de antibióticos presentes nos alimentos oferece risco para a saúde humana, seja sobre a flora intestinal, favorecendo o crescimento de microrganismos com resistência natural ou adquirida, ou para o desenvolvimento de resistência em bactérias enteropatogênicas. Esta resistência se deve ao uso indiscriminado e inadequado de antibióticos. Como conseqüência, tanto as drogas consideradas clássicas, como aquelas recentes no comércio, vêm se tornando

ineficientes, havendo possibilidade de transferência de resistência entre bactérias, inclusive em espécies diferentes (COSTA, 1996).

A importância de se ingerir bactérias resistentes a partir de alimentos de origem animal está mais relacionada à capacidade que possuem estes microrganismos de causar manifestações patológicas, caso sejam capazes de superar as barreiras impostas pelo sistema de defesa do organismo hospedeiro (PALERMO NETO; ALMEIDA, 2006).

Para Pezza et al, (2006) outro risco a ser considerado é o consumo de leite com altos níveis de resíduos de antibióticos por gestantes, tendo em vista que alguns antibióticos, como nitrofuranos e tetraciclina, possuem efeitos teratogênicos, que podem levar a alterações no desenvolvimento ósseo fetal. Além de reações alérgicas e de indução de quadros patológicos (ex.: cloranfenicol pode levar a quadros de anemia crônica), estes resíduos possibilitam o risco de indução bacteriana e a transferência de multirresistência entre os microrganismos através de plasmídios.

Demais efeitos adversos que determinados antimicrobianos podem causar em gestante e feto estão relatados na Tabela. 5.

Tabela 5. Antimicrobianos que apresentam efeitos adversos para gestantes e feto

Antimicrobiano	Potencial Toxicidade
Aminoglicosídeos	Ototoxicidade
Eritromicina	Hepatite colestática
Metronidazol	Possível Teratogenicidade
Nitrofurantoína	Anemia hemolítica
Sulfonamidas	Hemólise no recém-nascido. Pode apresentar desordens no Sistema Nervoso Central
Tetraciclina	Alteração no desenvolvimento ósseo do feto e alteração na coloração dos dentes posteriormente
Trimetopim	Possível Teratogenicidade
Quinolonas	Anormalidade na formação das cartilagens
Vancomicina	Possível ototoxicidade

Fonte: Costa (1996)

2.10 Legislações e órgãos responsáveis pela normatização sobre resíduos de antibióticos

As organizações internacionais envolvidas com a saúde pública e que estabelecem as diretrizes para o Limite Máximo de Resíduo ou Limite de Tolerância (LMR) desses medicamentos em alimentos é a JECFA - Comitê para Aditivos Alimentares da FAO/WHO e o FDA (*Food and Drug Administration*) dos Estados Unidos, (FDA, 2012), definindo da seguinte forma:

Limite máximo de resíduo (LMR) é definido em parte por milhão (ppm) ou parte por bilhão (ppb), para o uso de um medicamento veterinário que é legalmente permitido, ou reconhecido, como aceitável no alimento, para cada antibiótico aprovado para uso em animal produtor de alimento. O valor do limite máximo de resíduo refere-se à Ingestão Diária Aceitável (IDA), ou seja, a dose diária que se ingerida durante toda a vida do indivíduo, não causará riscos apreciáveis à saúde.

A determinação dos LMRs dos antibióticos é considerada o principal parâmetro para validação dos testes de detecção de resíduos de drogas em alimentos. No Brasil, o órgão responsável para estabelecer limites máximos de resíduos em alimentos, seja de medicamentos veterinários ou agrotóxicos, contaminantes ou aditivos, é do Ministério da Saúde através da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (BRASIL, 1998).

A Resolução GMC nº 54/2000 (MERCOSUL, 2000), que harmoniza alguns antimicrobianos, seus respectivos valores de LMRs e de Ingestão Diária Aceitável (IDA), é utilizada pelos órgãos brasileiros de fiscalização e controle.

Dentre as legislações específicas para leite, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), estabelece algumas legislações sobre resíduos de medicamentos em leite, dentre elas destacam-se:

- Decreto nº 30.691/1952 - Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal (RIISPOA), no Art. 514, parágrafo Único, estabelece que é proibido o uso de substâncias químicas na conservação do leite (BRASIL, 1952).

- Instrução Normativa nº 51, de 18 de setembro de 2002 (MAPA) exige a pesquisa periódica de antibióticos em leite, os quais não devem ultrapassar aos Limites Máximos de Resíduos (LMRs) previstos para cada grupo químico específico. Obriga também o monitoramento mensal da ocorrência de resíduos de antimicrobianos no leite, cuja responsabilidade é das indústrias e, afirma ainda que, as análises devem

ser realizadas somente por laboratórios oficiais ou credenciados no MAPA. Todo mês, o responsável pelos produtos oferecidos ao consumidor deve enviar amostras de leite a um laboratório da rede credenciada do Ministério da Agricultura para análise de monitoramento oficial (BRASIL, 2002a).

- Instrução Normativa Nº 42, de 20 de dezembro de 1999 (MAPA): define o Plano Nacional de Controle de Resíduos Biológicos em Produtos de Origem Animal (PNCRB), com a finalidade de sistematizar os meios de controle da contaminação desses produtos por resíduos de compostos de uso na agropecuária, bem como de poluentes ambientais (BRASIL, 1999). Este programa estipula como LMR para oxitetraciclina, tetraciclina e clortetraciclina o valor de 100 ppb no leite para cada tetraciclina.

Especificamente existe o Programa de Controle de Resíduos em Leite (PCRL) que tem por objetivo garantir a produção e a produtividade do leite no território nacional, bem como contribuir com os produtos similares importados. Suas ações estão direcionadas em conhecer as violações em decorrência ao uso indevido de medicamento veterinário ou de contaminantes ambientais (SILVA, SILVA e RIBEIRO, 2012).

- Portaria nº 78, de 19 de dezembro de 2002 (MAPA), que regulamenta os programas para o Controle de Resíduos em Carne, Mel, Leite e Pescado em pontos de distribuição, estabelecendo LMRs para tais produtos (BRASIL, 2002c).

O uso de medicamentos veterinários em animais produtores de alimentos, cujos resíduos poderiam significar risco à saúde pública, deu início ao PAMVet (Programa Nacional de Análise de Resíduos de Medicamentos Veterinários em Alimentos Expostos ao Consumo) em 2002. O primeiro produto escolhido foi o leite, por ser o alimento de origem animal mais consumido pela população brasileira, além de ter relevante papel na alimentação de grupos populacionais mais susceptíveis, como crianças e idosos, e por ser a fonte protéica de origem animal mais consumido pela população brasileira (SILVA, SILVA e RIBEIRO, 2012).

Em 16 de setembro de 2003, a própria ANVISA define o Programa pela Resolução RDC nº 253, com o objetivo de operacionalizar, controlar e fiscalizar a presença de resíduos de medicamentos veterinários em alimentos (BRASIL, 2003).

2.11 Pesquisas sobre resíduos de antibióticos em leite no Brasil

O estudo sobre a presença de antibióticos em leite no Brasil é feita de forma intensa já alguns anos. Diante do estabelecimento dos limites máximos de resíduos em leite (LMR), diversos estudos têm sido realizados para a pesquisa da presença desses resíduos em leites comerciais, por meio de testes variados, de forma a tornar mais eficiente o controle de qualidade das indústrias e conseqüentemente levando um leite mais seguro na mesa do consumidor.

Borges et al. (2000) ao utilizarem o método de difusão de resíduos de antimicrobianos em ágar e *Bacillus subtilis* e *Bacillus stearothermophilus* como microrganismos reveladores ao avaliarem a ocorrência de resíduos de antimicrobianos em leite pasteurizado integral e padronizado produzido e comercializado no estado de Goiás, no período de junho de 1997 a agosto de 1998, observaram 9,95 % de amostras positivas para resíduos de antimicrobianos.

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

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

Macedo e Freitas (2009) analisaram 103 amostras de leite de mistura, ou seja, de várias propriedades rurais, usinas de beneficiamento e mercado varejista, através de dois testes enzimáticos e um de inibição microbiana, revelando uma considerável freqüência de resíduos (10,68%) nas amostras, provavelmente β -lactâmicos e/ou sulfonamidas, duas procedentes de propriedades rurais da região de Conceição do Araguaia, Tucuruí e Santarém.

Leme et al (2005) pesquisaram a presença de resíduos de antimicrobianos de uso veterinário em amostras de diferentes tipos de leite comercializados na cidade de São Paulo. Foram analisadas, através do *Delvotest SP*, 1.500 amostras de leite, durante os meses de abril de 2003 a março de 2004 e obteve-se dez amostras

positivas, o que significa uma freqüência de ocorrência de antimicrobiano no leite de 0,66%.

Nero et al. (2007) realizaram em estudo da presença de resíduos de antibióticos pelo kit *Charm-test*TM (principalmente β -lactâmicos e sulfonamidas) em 210 amostras de leite cru, coletadas em quatro regiões produtoras de leite no Brasil: 47 em Viçosa - MG, 50 em Pelotas - RS, 63 em Londrina -PR e 50 em Botucatu - SP. Resíduos de antibióticos foram detectados em 24 amostras (11,4%), sendo 13 (20,6%) da região de Londrina - PR, 4 (8,0%) da região de Botucatu - SP, 4 (8,5%) da região de Viçosa - MG, e 3 (6,0%) da região de Pelotas - RS. Os resultados obtidos foram qualitativos, mas ficou evidenciado que resíduos de antibióticos podem ser considerados perigos químicos presentes no leite produzido no Brasil.

Vieira et al (2012) fizeram uma pesquisa apurada sobre resíduos de antibióticos em leite no estado do Paraná. Objetivou-se detectar os resíduos de antibióticos em 79 amostras de leite pasteurizado do tipo B de diferentes fabricantes adquiridos em estabelecimentos comerciais do Estado. A detecção de resíduos de estreptomicina, cloranfenicol, β -lactâmicos, tetraciclina e gentamicina foi realizada utilizando kits comerciais de ensaio imunoenzimático. Foram detectados resíduos de antibióticos em 15/79 (19%), das quais 6/15 (40%) estavam contaminadas por cloranfenicol, 3/15 (20%) por tetraciclinas, 1/15 (6,7%) por gentamicina, 3/15 (20%) por estreptomicina e 2/15 (13.3%) por β -lactâmicos e três amostras estavam contaminadas por dois tipos de resíduo simultaneamente.

Embora a normatização exista e com a exigência cada vez maior do mercado por um leite livre de resíduos de antibióticos, o problema ainda persiste, independente do tipo de leite analisado, da região onde foi feita a coleta e do método utilizado para detecção.

3 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A presença de resíduos de antibióticos no leite pode resultar em prejuízos econômicos e danos à saúde, tornando-se fundamental monitorar a qualidade desse produto de consumo, o que demonstra a necessidade das indústrias de laticínios implantarem sistema de fiscalização da qualidade do leite recebido, visitando e acompanhando melhor os seus fornecedores em relação à presença de resíduos de antibióticos, a fim de evitar prejuízos econômicos decorrentes de

possíveis interferências no processo de produção de derivados causadas pela presença destes no leite.

O sucesso dos programas de controle do uso de medicamentos veterinários depende de mudanças de atitude e de manejo, em que o produtor e os funcionários desempenham um papel primordial (consciência). O que pode ser corrigido através de informações (treinamento) aos usuários, veiculados por cooperativas e empresas de apoio técnico, ou seja, a difusão de boas práticas veterinárias.

Embora vários estudos sejam realizados com o intuito de detectar rapidamente a presença de antimicrobianos no leite, estes são isolados e eventuais, o que impede o reconhecimento confiável da situação do país. Assim, é necessária maior atenção por parte dos serviços oficiais de inspeção no controle sanitário desde a ordenha até a comercialização do leite, além de maior intensificação na pesquisa e identificação de amostras positivas.

O uso racional destes fármacos baseado no conhecimento dos agentes infecciosos (isolamento bacteriano), das medicações em doses corretas por tempo adequado e respeitando o período de carência de cada produto utilizado nos animais produtores de alimentos ainda é a melhor atitude a ser tomada.

4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBUQUERQUE, L. M. B.; MELO, V. M. M.; MARTINS, S. C. S. Investigação sobre a presença de resíduos de antibióticos em leite comercializado em Fortaleza – CE – Brasil. **Higiene Alimentar**, v. 10, n. 41, p. 29-31, jan./fev. 1996.

ARAÚJO, M. M. P. **Validação de métodos imunoenzimáticos para determinação de resíduos de antimicrobianos no leite**. 2010. 46p. (Mestrado em Ciência Animal) – UFMG.

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

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

BOISON, J.O.K.; KENG, L.J.Y.; MACNEIL, J.D. Analysis of penicillin G in milk by liquid chromatography. **J. Assoc. Off. Anal. Chem.**, Washington, v.77, n.3, p. 565-570, 1994.

BORGES, G. T. et al. Ocorrência de resíduos de antibióticos em leite pasteurizado integral e padronizado produzido e comercializado no estado de Goiás. **Ci. Anim. Bras.**, v. 1, n.1, 2000.

BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento – MAPA . Regulamento de inspeção industrial e sanitária de produtos de origem animal (RIISPOA). Decreto nº 30.691 de 29 de março de 1952, alterado pelo Decreto nº 1.255 de 25 de junho de 1962. **Diário Oficial da União**, 7 jul. 1952

BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento – MAPA – Instrução Normativa nº 42, de 20 de dezembro de 1999, que altera o Plano Nacional de Controle de Resíduos em Produtos de Origem Animal – PNCR. Publicado no **Diário Oficial da União**: Brasília, Distrito Federal, em 22 de dezembro de 1999. Seção 1, página 13.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). 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. 2002a. Seção 1.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). Resolução nº 02, de 12 de julho de 2002b. Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 15 de julho de 2002.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). Portaria nº 78, de 19 de dezembro de 2002c. Controle de Resíduos em Carne, Mel, Leite e Pescado. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 06 de janeiro de 2003, Seção 1.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Cria Programa de Análise de Resíduos de Medicamentos Veterinários em Alimentos de Origem Animal - PAMVet Resolução nº 253, de 16 de setembro de 2003. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 18 de setembro de 2003, Seção 1.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). BRASIL: projeções do agronegócio 2011/2012 a 2021/2022. Disponível em: <[http://www.agricultura.gov.br/arq_editor/file/Ministerio/gestao/projecao/Projecoes%20do%20Agronegocio%20Brasil%202011-2012%20a%202021-2022%20\(2\)\(1\).pdf](http://www.agricultura.gov.br/arq_editor/file/Ministerio/gestao/projecao/Projecoes%20do%20Agronegocio%20Brasil%202011-2012%20a%202021-2022%20(2)(1).pdf)> Acesso em: 18 abr. 2012.

BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria nº 685, de 27 de agosto de 1998. Regulamento Técnico de Princípios Gerais para o Estabelecimento de Níveis Máximos de, Contaminantes Químicos em Alimentos. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF: Ministério da Saúde, Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 1998, de 24/09/98, nº 165- E, Seção 1, p. 28 e 29.

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

BRITO, M. A. V. P. **Resíduos de antimicrobianos no leite**. Juiz de Fora: Embrapa Gado de Leite, 2005. 28 p.

BRITO, M. A. V. P. **Resíduos de antimicrobianos no leite**. Juiz de Fora: Embrapa Gado de Leite; 2000.

COSTA, E. O. Resíduos de antibióticos no leite: um risco à saúde do consumidor. **Higiene Alimentar**, v. 10, n. 44, p. 15-16, jul./ago. 1996.

COSTA, E. O. Uso de antimicrobianos na mastite. In: SPINOSA, H. S.; GÓRNIK, S. L.; BERNARDI, M. M. **Farmacologia aplicada à medicina veterinária**. 4 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006. p. 501-515.

CULLOR, J. S. The control, treatment, and prevention of the various types of bovine mastitis. **Veterinary Medicine Food Animal Practice**, v.88, p. 571-579, 1993.

DELVOTEST®. Boletim técnico. **DSM Food Specialties**. Disponível em:<www.dsm-foodspecialties.com> Acesso em: 18 abr. 2012.

DENOBILO, M.; NASCIMENTO, E. S. Validação de método para determinação de resíduos dos antibióticos oxitetraciclina, tetraciclina, clortetraciclina e doxiciclina, em leite, por cromatografia líquida de alta eficiência. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 40, n. 2, p. 210-218, abr./jun., 2004.

EMBRAPA. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Consumo per capita mundial de leite fluido - 2000/2008*. Disponível em: <<http://www.cnpqgl.embrapa.br/nova/informacoes/estatisticas/consumo/tabela0703.php>> Acesso em : 22 Abr 2012.

FDA. U. S. **Food and Drug Administration**. Guidance for industry – Bioanalytical methods validation for human studies Disponível em: <<http://www.fda.gov>>. Acesso em: 14 abr. 2012.

FELTRIN, C.W. et al. Quantificação de sulfadimetoxina em leite por cromatografia líquida de alta eficiência. **Química Nova**, v.30, p.80-82, 2007.

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

FONSECA, L. F. L.; SANTOS, M. V. **Qualidade do leite e controle de mastite**.2000.

LANGONI, H. et al. Aspectos etiológicos na mastite bovina: flora bacteriana aeróbica. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, v. 24, p. 204-210, 1998.

LEME, F. B. P. **Presença de resíduos de antimicrobianos em amostras de diferentes tipos de leite comercializados no município de São Paulo**. 2005. 102 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.

MACEDO, L. C. S.; FREITAS, J. A. Ocorrência de resíduos de antimicrobianos em leite. **Rev. ciênc. agrár., Belém**, n. 52, p. 147-157, jul./dez. 2009.

MANDEL, G. L.; PETRI JR, W. A. Farmacos Antimicrobianos: Sulfonamidas, trimetropina-sulfametoxazol, quinolonas e agentes para infecção das vias urinárias. In: GILMAN, A. G. **As bases farmacológicas da terapêutica**. 9 ed. McGraw-Hill Companies. 1997. p. 775-789.

MERCOSUL. Resolução GMC (Grupo Mercado Comum) nº 54, de 29 setembro de 2000. Regulamento Técnico Metodologias Analíticas, Ingestão Diária Admissível e Limites Máximos de Resíduos Para Medicamentos Veterinários em Alimentos de Origem Animal. Disponível em:< http://www.mercosur.int/msweb/Normas/normas_web/Resoluciones/PT/Res_054_000_RTM%20Res%C3%ADduos%20Medic%20Veterin%C3%A1rios_At%203_00.PDF> Acesso em: 25 abr. 2012..

MORAIS, C. M. Q. et al. Presença de resíduos de antibióticos em leite bovino pasteurizado. **Revista Ciência e Tecnologia de Alimentos**. Campinas, v.30, supl.1 Maio 2010.

MOREIRA, R. P. L. **Desenvolvimento e validação de métodos multirresíduos para determinação de medicamentos veterinários em alimentos e em ração utilizando CL-EM/EM**. 2012, 188p. (Tese de Doutorado em Química). UFMG.

NASCIMENTO, G. G. F.; MAESTRO, V.; CAMPOS, M. S. P. Ocorrência de resíduos de antibióticos no leite comercializado em Piracicaba, SP. **Revista de Nutrição**, Campinas, v.14, n. 2, p. 119-124, mai./ago. 2001.

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. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 27, n. 2, p. 391-393, 2007.

PALERMO NETO, J. P.; ALMEIDA, R. T. Antimicrobianos como Aditivos em Animais de Produção. In: SPINOSA, H. S.; GÓRNIK, S. L.; BERNARDI, M. M. **Farmacologia aplicada à medicina veterinária**. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006.

PEZZA, L.; et al. Determinação simultânea de resíduos de cloranfenicol, tianfenicol e florfenicol em leite bovino por cromatografia eletrocinética micelar. **Quim. Nova**, Vol. 29, No. 5, 926-931, 2006.

RUGGED results in a snap. 2009. **IDEXX Laboratories Inc**, Westbrook, Maine . Disponível em: <
http://www.idexx.com/view/xhtml/en_us/dairy/snap.jsf?conversationId=308538>
Acesso em : 15 jun 2012.

SANTOS, A. F. R.; RODRIGUES, M. A. M. Resíduos inibidores em leite UHT. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 17, n. 104- 105, p. 174-175, jan./fev. 2003.

SANTOS, M. V.; FONSECA, L. F. L. **Estratégias para o Controle de Mastite e Melhoria da Qualidade do Leite**. 1ª Ed. Barueri-SP: Manole/Vallé, 2007, 314p. São Paulo: Lemos Editorial, 2000.

SILVA, R. M.; SILVA, R. C.; RIBEIRO, A. B. Resíduos de Antibióticos em Leite. **SaBios: Rev. Saúde e Biol.**, v.7, n.1, p.30-44, jan./abr., 2012.

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

TENÓRIO, C. G. M. S. C. **Avaliação da eficiência do teste copan (microplate e single) na detecção de resíduos de antimicrobianos no leite**. 2007. 59p. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – UFMG.

VEISSEYRE, R. **Lactologia técnica**: composición recogida, tratamiento y transformacio de la leche. Zaragoza: Acribia, 1998. p. 1-10.

VIEIRA, t. S. W. J. et al. **Detecção de resíduos de antibióticos em amostras de leite pasteurizado do Estado do Paraná, Brasil**. Semina: Ciências Agrárias, Londrina, v. 33, n. 2, p. 791-796, abr. 2012.

VILELA, S. C. Identificação rápida de resíduos antibióticos no leite. **Rev. Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v.35, n.210, p.37-39, 1980.

ZOCCAL, R. Evolução da produção de leite na Região Sudeste, 1990/2010. **Embrapa Gado de Leite**. Disponível em: <
<http://www.cnpqgl.embrapa.br/nova/informacoes/estatisticas/producao/grafico02.53.php>> Acesso em : 22 Abr 2012.