



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS DOMÉSTICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E
TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

**QUALIDADE DO LEITE CRU
PRODUZIDO NO AGRESTE DE PERNAMBUCO**

LUCIANA MARTINS VALENÇA

Recife

2013

LUCIANA MARTINS VALENÇA

**QUALIDADE DO LEITE CRU
PRODUZIDO NO AGRESTE DE PERNAMBUCO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como requisito para obtenção do Grau de Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

ORIENTADOR: Prof. Dr. José do Egito de Paiva (DTR/UFRPE)

CO-ORIENTADORES: Prof. Dr. Severino Benone Paes Barbosa (DZ/UFRPE)

Prof. Dr. Irapuan Oliveira Pinheiro (ICB/UPE)

Recife

2013

Ficha Catalográfica

V152q Valença, Luciana Martins
Qualidade do leite cru produzido no Agreste de
Pernambuco / Luciana Martins Valença – Recife, 2013.
68 f. : il.

Orientador: José do Egito de Paiva.

Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia dos
Alimentos) – Universidade Federal Rural de Pernambuco,
Departamento de Ciências Domésticas, Recife, 2013.

Referências.

1. Pernambuco 2. Leite – Qualidade 3. Antibiótico -
Resíduos 4. Legislação I. Paiva, José do Egito de,
orientador II. Título

CDD 664

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS DOMÉSTICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E
TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

**QUALIDADE DO LEITE CRU
PRODUZIDO NO AGRESTE DE PERNAMBUCO**

Por Luciana Martins Valença

Esta dissertação foi julgada para obtenção do título de Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos e aprovada em 29/05/2013 pelo Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos em sua forma final.

Banca Examinadora:

Prof. Dr. José do Egito de Paiva (presidente)
Universidade Federal Rural de Pernambuco

Prof. Dr. Irapuan Oliveira Pinheiro (membro externo)
Universidade de Pernambuco

Prof^a Dr^a: Ângela Maria Vieira Batista (membro externo)
Universidade Federal Rural de Pernambuco

Prof^a Dr^a Celiane Gomes Maia da Silva (membro interno)
Universidade Federal Rural de Pernambuco

Prof. Dr. Severino Benone Paes Barbosa (membro suplente)
Universidade Federal Rural de Pernambuco

Agradecimentos

Ao meu Deus e pai que no seu profundo amor tem cuidado de mim, derramado as mais ricas bênçãos e concedido a realização dos meus sonhos, mesmo quando eles aos meus olhos parecem impossíveis, minha eterna gratidão, pois sei que não sou merecedora de nenhum de seus benefícios.

A minha mãe Lindalva Maria da Silva pela sua presença em todos os momentos de minha vida, por sempre está disponível para me ajudar e comemorar comigo todas as minhas vitórias.

Ao meu esposo Roberto Valença por me substituir em todas as minhas ausências, possibilitando a minha chegada em cada uma das conquistas alcançadas, pela sua confiança em Deus e em meu potencial que me fortalecem na caminhada.

Aos meus filhos Mateus Martins Valença, Isabele Martins Valença e Letícia Martins Valença que, pelo simples fato de existirem, sempre me inspiram a assumir e vencer novos desafios.

Ao meu irmão Crystiano Carlos Alves Pequeno pelo seu carinho e alegria.

A minha tia Lucineide Maria da Silva que muito tem me ajudado, por suas continuas intercessões a Deus ao meu respeito.

A toda minha família pelo apoio incondicional, estímulo e presença fundamentais na minha existência.

Aos meus irmãos em Cristo que através de palavras e orações me ajudaram nesta trajetória desafiadora.

Ao meu orientador, Prof. Dr. José do Egito de Paiva, pela contínua disponibilidade em me orientar e ensinar.

Ao meu co-orientador, Prof. Dr. Severino Benone Paes Barbosa, pela orientação, ensinamentos e pela contribuição fundamental para a realização deste projeto.

Ao meu co-orientador, Prof. Dr. Irapuan Oliveira Pinheiro, por estar disponível sempre que precisei de sua orientação e ensinamentos.

A professora, Dr^a. Ângela Maria Vieira Batista, pelos conselhos e contribuições que foram muito importantes para a realização deste projeto.

Ao Programa de Gerenciamento de Rebanhos Leiteiros do Nordeste (PROGENE), na pessoa do seu coordenador Severino Benone Paes Barbosa, por permitir que realize este mestrado e pelo financiamento majoritário deste projeto. A responsável Técnica Ângela Maria Vieira Batista pela sua valiosa ajuda. Aos integrantes Ricardson Carlos Barboza da Silva, Maria do Carmo da Silva, Débora Maria de Farias Magalhães que realizaram as análises de CCS, Composição e CBT. Aos demais integrantes Maria José de Araújo Silva, Lucineide Maria da Silva e Juliana Wanderley de Barros Travassos, aos estagiários e bolsistas, Ney Bráulio de Oliveira Lins, Anidene Christina Alves de Moraes, Catarina Xavier da Silva, Rosimere Valença, Meirilice do Nascimento Rosa, Raissa Camila da Silva, e a consultora Carla Daniela Paes de Andrade, que me ajudaram nos momentos que mais precisei meu profundo agradecimento.

Ao Laboratório de Análise de Resíduos de Pesticidas e Medicamentos Veterinários do Laboratório Nacional Agropecuário do Rio Grande do Sul (Laboratório RPM / LANAGRO/RS), na pessoa de seu responsável técnico Fabiano Barreto que não hesitou em me ajudar, desde o primeiro contato, num momento importante do meu projeto de pesquisa. A Louise Jank e Magda Targa Martins que realizaram as análises e juntamente com Fabiano Barreto me explicaram a metodologia das análises. Tenho certeza que foi por meio das análises realizadas neste laboratório que a pesquisa de resíduos de antibiótico em leite foi viabilizada. Agradeço a todos que colaboram e me receberam tão bem quando estive nesse laboratório.

A Agência de Defesa e Fiscalização Agropecuária de Pernambuco (ADAGRO), na pessoa de sua gerente geral Erivânia Camelo de Almeida que disponibilizou veículo e combustível para realização das coletas das amostras. Ao gerente regional de Garanhuns Joaquim Fausto Filho, fiscais agropecuários e demais funcionários que me ajudaram durante as coletas realizadas no Agreste de Pernambuco. Ao técnico agrícola e doutorando Marcelo José Ferreira Batista da Silva que dirigiu o veículo e realizou as coletas comigo agradeço sua imensa ajuda e presteza no serviço.

A todos os laticínios e produtores do Agreste de Pernambuco que forneceram as amostras e as informações necessárias durante as coletas.

Ao Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos por oferecer este mestrado e contribuir para realização das análises.

A todos os professores pelos conhecimentos transmitidos.

Aos colegas de turma pelos momentos que compartilhamos o aprendizado, em especial a Náira Paes Moura com quem fiz algumas pesquisas e amizade.

A todos aqueles que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho o meu mais profundo agradecimento.

*“Que darei ao Senhor por todos os seus
benefícios para comigo? Tomarei o cálice
da salvação e invocarei o nome do Senhor”*

Salmos 116.12-13

RESUMO

Qualidade e segurança alimentar têm recebido cada vez mais atenção da população mundial, especialmente em relação a perigos microbiológicos e químicos presentes nos alimentos. A presença de resíduos de antibióticos em níveis acima do limite máximo de resíduo (LMR) torna o leite inadequado para uso na indústria e consumo humano, uma vez que nenhum tratamento tecnológico pode degradar essas substâncias, sem comprometer o valor nutricional do leite. O presente estudo teve o objetivo avaliar a composição química, contagem de células somáticas (CCS), contagem bacteriana total (CBT) e presença de resíduos de antibiótico no leite cru produzido no agreste de Pernambuco. Foram coletadas 184 amostras, entre o inverno de 2012 e o verão de 2013, de produtores que fornecem leite cru para laticínios com Serviço de Inspeção Federal (SIF), Serviço de Inspeção Estadual (SIE) e Sem Serviço de Inspeção (SSI). Para detecção de resíduos de antibióticos utilizou-se cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa (LC-MS/MS). Os resultados físico-químicos e de CCS, em geral, estavam em conformidade com a Instrução Normativa 62 (IN 62, MAPA). Já para CBT, houve diferença significativa entre os serviços de inspeção: mais de 80% dos resultados para SIF estavam em conformidade com a IN 62, enquanto, para SIE e SSI menos de 50% alcançaram o mesmo resultado. Na análise qualitativa de multirresíduos, nenhuma amostra apresentou violação para os antibióticos analisados. Na análise quantitativa de β -lactâmicos uma amostra, dos produtores que fornecem a laticínios com SIE, no verão de 2013, apresentou resultado superior ao LMR para cloxacilina (464 ppb). Portanto, o leite produzido no Agreste de Pernambuco atende, em geral, aos valores estabelecidos pela legislação vigente para composição química, CCS e resíduos de antibióticos. No entanto, para SIE e SSI os resultados de CBT estavam, em grande parte, superiores aos limites estabelecidos pela legislação vigente.

Palavras-chave: Pernambuco, leite, qualidade, resíduo de antibiótico, legislação.

ABSTRACT

Quality and food safety have received increasing attention of the world population, especially in relation to chemical and microbiological hazards in foods. The presence of antibiotic residues at levels above the maximum residue limit (MRL) renders the milk unsuitable for use in industry and human consumption, since no technological treatment can degrade these substances, without compromising the nutritional value of milk. This study aimed to evaluate the chemical composition, somatic cell count (SCC), total bacterial count (TBC) and the presence of antibiotic residues in raw milk produced in rural Pernambuco. 184 samples were collected, between winter 2012 and summer 2013, the producers supplying raw milk to dairy Federal Inspection Service (SIF), State Inspection Service (SIE) and No Inspection Service (SSI). For detection of antibiotic residues used liquid chromatography coupled to mass spectrometry (LC-MS/MS). The results of physicochemical and CCS in general, were in accordance with Instruction 62 (IN 62, MAP). As for CBT, there was significant difference between the inspection services: over 80% of the results for SIF were in accordance with the IN 62, while for SIE and SSI less than 50% achieved the same result. Qualitative analysis of multiresidues, none had violation for antibiotics analyzed. The quantitative analysis of a sample β -lactams, the producers supplying the dairy SIE in the summer of 2013, showed superior results to the MRLs for cloxacillin (464 ppb). So the milk produced in the arid zone of Pernambuco caters generally to the values established by legislation for chemical composition, SCC and antibiotic residues. However, for SIE and SSI CBT results were largely in excess of the limits established by law.

Keywords: Pernambuco, milk quality, antibiotic residue, legislation.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Ranking dos maiores produtores de leite em 2011	19
Tabela 2 – Requisitos químicos da Instrução Normativa 62 para o leite cru refrigerado	24
Tabela 3 – Requisitos microbiológicos e de contagem de células somáticas (CSS) da Instrução Normativa 62 para o leite cru refrigerado nas regiões Norte e Nordeste	24
Tabela 4 – Valores de limite máximo de resíduo para os grupos de antibióticos pesquisados no leite cru	25
Tabela 5 – Quantidade de amostras de leite cru analisadas em função do serviço de inspeção e da estação do ano	42
Tabela 6 – Parâmetros analíticos obtidos para β -lactâmicos em leite em ppb	45
Tabela 7 – Cromatografia líquida de alta eficiência – Gradiente de fase móvel	46
Tabela 8 – Condições de monitoramento de múltiplas reações utilizadas no espectrômetro de massa	47
Tabela 9 – Médias, Coeficientes de Variação (CV) e Nível de probabilidade para composição química, CCS e CBT de leite cru produzido no Agreste de Pernambuco, em função do serviço de inspeção e da estação do ano	53
Tabela 10 – Percentual de amostras fora do padrão, segundo a IN 62, em função do serviço de inspeção e da estação do ano	54
Tabela 11 - Percentual de amostras em três diferentes intervalos de CCS em função do serviço de inspeção e da estação do ano	55

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Taxa de crescimento da produção mundial de leite de vaca	18
Figura 2 – Evolução da produção de leite no Brasil e previsão da produção para 2012	20
Figura 3 – Estruturas químicas das sulfonamidas	33
Figura 4 – Estruturas químicas das tetraciclina	34
Figura 5 – Estruturas químicas dos antibióticos β -lactâmicos: (a) estrutura genérica das penicilinas, onde o R dos analitos é descrito; e (b) estrutura do ceftiofur ..	35
Figura 6 – Estruturas químicas das fluoroquinolonas	36
Figura 7 – Estrutura química do cloranfenicol	38
Figura 8 – Agreste de Pernambuco	43
Figura 9 – Equipamento CombiScope FTIR	49
Figura 10 – Equipamento Bactocount IBC	50

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
2 OBJETIVOS	17
2.1 GERAL	17
2.2 ESPECÍFICOS	17
3 REVISÃO DA LITERATURA	18
3.1 PANORAMA DO LEITE	18
3.2 QUALIDADE DO LEITE	22
3.3 ANTIMICROBIANOS	27
3.3.1 Grupos de antibióticos	32
3.3.1.1 Sulfonamidas	32
3.3.1.2 Tetraciclínas	33
3.3.1.3 β -lactâmicos: penicilinas e cefalosporinas	34
3.3.1.4 Quinolonas	35
3.3.1.5 Aminoglicosídeos	37
3.3.1.6 Macrolídeos	37
3.3.1.7 Anfenicóis	38
3.4 MÉTODOS ANALÍTICOS QUALITATIVOS PARA RESÍDUOS DE ANTIBIÓTICOS	39
3.5 MÉTODOS ANALÍTICOS QUANTITATIVOS PARA RESÍDUOS DE ANTIBIÓTICOS	40
3.6 REDE BRASILEIRA DE LABORATÓRIOS DE CONTROLE DE QUALIDADE DO LEITE	41
4 MATERIAL E MÉTODOS	42
4.1 AMOSTRAGEM	42
4.2 ANÁLISE QUALITATIVA DE MULTIRRESÍDUOS POR LC-MS/MS	44
4.3 ANÁLISE QUANTITATIVA DE RESÍDUOS DE ANTIBIÓTICOS β -LACTÂMICOS POR LC-MS/MS	45
4.3.1 Preparo de soluções	45
4.3.2 LC-MS/MS	46
4.3.3 Extração das amostras	48
4.3.4 Efeito de matriz	48

4.4 ANÁLISE DE COMPOSIÇÃO, CCS E CBT.....	49
4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA	50
5 RESULTADOS	51
5.1 ANÁLISE QUALITATIVA DE MULTIRRESÍDUOS POR LC-MS/MS	51
5.2 ANÁLISE QUANTITATIVA DE RESÍDUOS DE ANTIBIÓTICOS β-LACTÂMICOS POR LC-MS/MS	51
5.3 ANÁLISE DE COMPOSIÇÃO, CCS E CBT	52
6 DISCUSSÃO	56
6.1 RESÍDUOS DE ANTIBIÓTICOS	56
6.2 COMPOSIÇÃO, CCS E CBT	57
7 CONCLUSÃO	59
8 CONSIDERAÇÕES FINAIS	60
9 REFERÊNCIAS	61

1 INTRODUÇÃO

O leite é um alimento de vital importância para as pessoas, independente da faixa etária, dado o seu grande valor nutricional. Em virtude disso e para atender a demanda de consumo da população, a produção de leite tem aumentado a cada ano em todo mundo. No Brasil, o volume de leite produzido, também tem crescido ao longo dos anos, colocando o país entre os maiores produtores de leite do mundo, uma vez que a atividade leiteira é praticada em milhares de propriedades rurais, sendo um sistema agroindustrial de notada relevância para a economia nacional e de grande importância social. Por outro lado, o leite produzido no Brasil precisa ter melhor qualidade para atender as exigências do consumidor interno e do mercado mundial, e o mais importante, que este alimento não perca o valor nutritivo. Diante disso, se faz necessária a adoção de políticas públicas que reflitam na melhoria da qualidade do leite e, desta forma, é fundamental o conhecimento da composição do leite produzido, de sua carga bacteriana e de células somáticas e de possíveis contaminantes, para que se possa entender qual a realidade desta cadeia produtiva.

A obtenção de produtos lácteos de qualidade começa com o manejo do rebanho, pois a saúde e a nutrição da vaca interferem diretamente na qualidade do leite, além disso, os cuidados com a higiene durante a ordenha, a estocagem em equipamentos limpos e em temperatura adequada, bem como o transporte e o processamento conforme normas estabelecidas pela legislação vigente são de vital importância.

Um problema que afeta frequentemente os rebanhos leiteiros no mundo inteiro e causa enormes prejuízos financeiros e a qualidade do produto é a inflamação da glândula mamária, conhecida como mastite. Para o controle desta enfermidade e de outras doenças reprodutivas são administrados antibióticos, que deixam resíduos no leite do animal tratado, sendo necessário o descarte durante o período de carência informado pelo fabricante do medicamento. Neste contexto, a conscientização dos produtores é imprescindível para prevenir o consumo e processamento do leite com resíduos de antibióticos.

Vale ressaltar que a presença de resíduos de antibióticos no leite é preocupante por vários aspectos, vez que causam problemas de saúde, seleção de cepas bacterianas resistentes e hipersensibilidade. Cerca de 5 a 10% da população é hipersensível a penicilina e pode apresentar reações alérgicas e choque anafilático ao ingerirem concentrações superiores a 1 ppb dessa substância (JONES, 1999; JANK et al., 2012). Além disso, antimicrobianos geram diversos problemas para a indústria de laticínios, pois alteram os resultados de análises laboratoriais de controle de qualidade, retardam a atividade de culturas *starter* na produção de derivados como queijos, manteiga e iogurtes e diminuem a produção de ácidos e sabores na manteiga e queijos (NASCIMENTO et al., 2001; VAN SCHAİK et al., 2002).

Com o propósito de melhorar a qualidade do leite produzido no Brasil, a Instrução Normativa 62/2011 (IN 62), do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), determina a coleta de amostras de leite para análise da composição química, contagem de células Somáticas (CCS), contagem bacteriana total (CBT) e pesquisa de resíduos de antibióticos em leite cru refrigerado, pelo menos, uma vez por mês. Os resultados obtidos para composição química, CCS e CBT são comparados com os limites estabelecidos na IN 62. Na pesquisa de resíduos de antibióticos os valores não devem ser superiores ao Limite Máximo de Resíduo (LMR), previsto para cada grupo químico específico (BRASIL, 2011a).

Pernambuco é o oitavo maior produtor de leite brasileiro e o segundo maior do nordeste. O Agreste desse estado, onde se encontra a bacia leiteira, tem na atividade leiteira sua principal fonte de recursos econômicos (IBGE, 2011). No entanto, ainda são escassas na literatura informações sobre a influência do sistema de inspeção e da estação do ano na composição química, na CCS, na CBT e na presença de resíduos de antibióticos no leite de vaca produzido em Pernambuco.

Diante do exposto, o presente estudo teve o objetivo avaliar a composição química, CCS, CBT e presença de resíduos de antibiótico no leite cru produzido no agreste de Pernambuco fornecido pelos produtores aos laticínios com Serviço de Inspeção Federal (SIF), Serviço de Inspeção Estadual (SIE) e Sem Serviço de Inspeção (SSI) no inverno de 2012 e verão de 2013.

2 OBJETIVOS

2.1 GERAL

Avaliar a qualidade do leite cru produzido no agreste de Pernambuco fornecido pelos produtores aos laticínios com SIF, SIE e SSI no inverno de 2012 e verão de 2013.

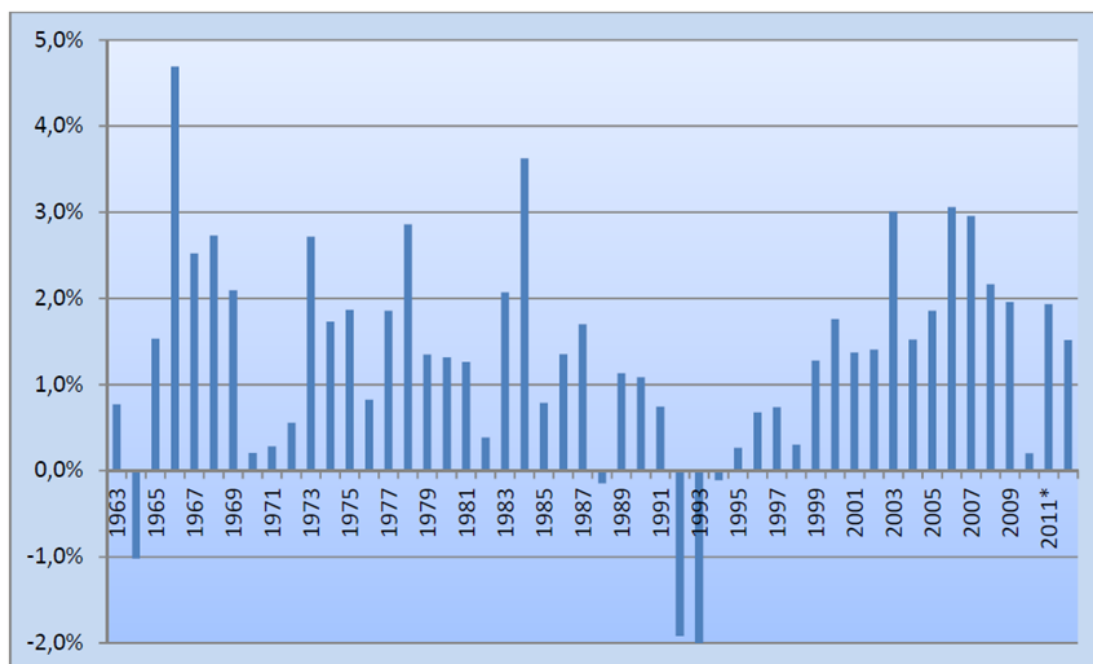
2.2 ESPECÍFICOS

- Identificar e quantificar resíduos de antibióticos (sulfonamidas, tetraciclina, quinolonas, fluoroquinolonas, trimetoprima e β -lactâmicos) em leite;
- Determinar a composição química (gordura, proteína, lactose, sólidos totais, extrato seco desengordurado, ureia e caseína) do leite;
- Determinar a contagem bacteriana total (CBT) e a contagem de células somáticas (CCS);
- Comparar os resultados obtidos com os valores estabelecidos pela legislação vigente.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 PANORAMA DO LEITE

A produção de leite no mundo atingiu, em 2011, 727 milhões de toneladas, incluindo leite de vaca, búfala, camela, cabra e ovelha. O leite de vaca sozinho respondeu por 606,7 milhões de toneladas, o que representa incremento de 1,5% em relação a 2010, conforme é mostrado na **Figura 1** (EMBRAPA, 2013).



Fonte: EMBRAPA (2013).

Figura 1. Taxa de crescimento da produção mundial de leite de vaca

Em 2011, os países que tiveram os maiores aumentos, em termos absolutos, na produção de leite de vaca foram: Índia, Estados Unidos, Turquia e Brasil com 2,54, 1,54, 1,38 e 1,37 milhões de toneladas, respectivamente (EMBRAPA, 2013).

Em função dos aumentos ocorridos em 2011, o Brasil passou para quarta posição no *ranking* mundial de produção de leite, ultrapassando a Rússia (**Tabela 1**). Logo após os Estados Unidos estão os países do BRICs (Brasil, Rússia, Índia e China). Isto representa que, além de se destacarem em termos econômicos como propulsores da economia mundial pós- crise financeira, eles também se destacam na produção de leite. Por outro lado, Brasil, Rússia, Índia e China também apresentam em comum o fato de

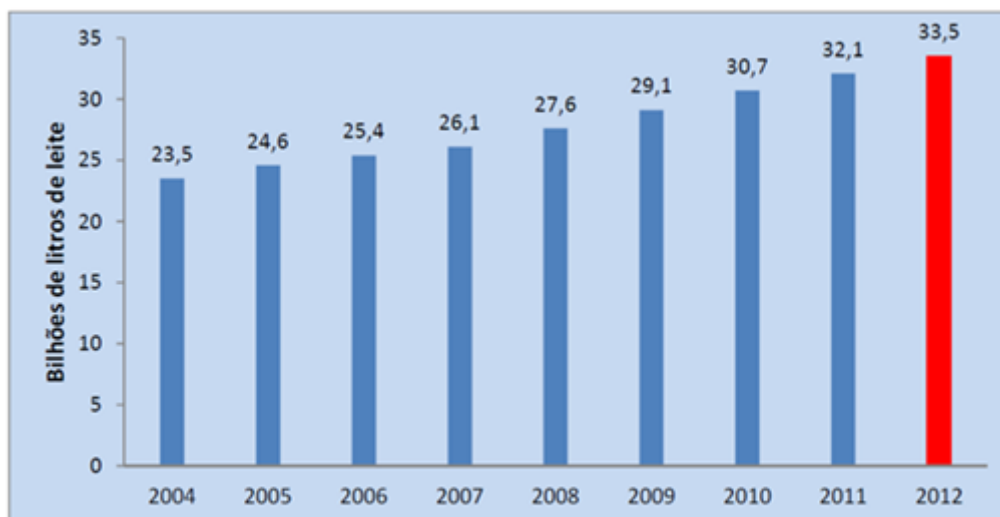
serem grandes importadores de lácteos e suas produções são voltadas principalmente para atender a um mercado interno de grandes proporções. Adicionalmente, com o recente desenvolvimento econômico, seus mercados consumidores estão em crescente expansão (EMBRAPA, 2013).

Tabela 1. Ranking dos maiores produtores de leite em 2011

País	Produção (Mil toneladas)
Estados Unidos	89.015.200
Índia	52.500.000
China	36.928.901
Brasil	32.091.000
Rússia	31.385.700
Alemanha	30.301.400
França	24.426.500
Nova Zelândia	17.893.800
Reino Unido	14.246.000
Turquia	13.802.400

Fonte: EMBRAPA (2013).

O Brasil, além de ser um grande produtor de leite tem aumentado sua produção substancialmente nos últimos anos. Considerando-se o período de 2004 a 2011, a produção de leite aumentou 37%, passando de 23,5 para 32,1 bilhões de litros produzidos. Isto corresponde a um crescimento anual médio absoluto de 4,7% (**Figura 2**). Neste contexto, a estimativa da produção brasileira, em 2012, é de 33,5 bilhões de litros de leite produzidos, conforme é observado na Figura 2 (EMBRAPA, 2012a; EMBRAPA, 2013).



Fonte: EMBRAPA (2012a)

Figura 2. Evolução da produção de leite no Brasil e previsão da produção para 2012

O aumento da produção de leite ocorreu na mesma proporção que o crescimento urbano para atender o mercado consumidor das cidades, e demonstra o objetivo da formação das bacias leiteiras (CARVALHO et al., 2009). Atualmente é difícil encontrar um município brasileiro, entre os 5.562 existentes, que não possua ao menos uma vaca leiteira, por menor que seja sua produção. O valor que a atividade conquistou é notório, não só no desempenho econômico como na criação de empregos permanentes (ZOCCAL et al., 2008).

Por outro lado, os indicadores de produtividade e principalmente de qualidade ainda carecem de melhorias em vários aspectos (ZOCCAL et al., 2008). A produção de leite no Brasil é formada por dois grandes grupos: o de produtores empresariais especializados, que representa um pequeno número com boa produtividade, e o de pequenos produtores, na maioria, pouco ou nada especializados, que visam à venda sazonal de pequenos volumes de leite, de baixo custo e qualidade, e que constitui grande parte do mercado (MILINSKI et al, 2008).

A qualidade do leite produzido entre os estados brasileiros é diferente e isto pode ser atribuído às condições existentes em cada região, como perfil do produtor, maior acesso à assistência técnica, presença de órgãos extensionistas e programas regionais de controle sanitário de rebanhos e, principalmente, laticínios com políticas de pagamento por qualidade (MONTEIRO, et al., 2007).

Esta realidade não impediu o Brasil de permanecer competitivo no mercado lácteo mundial pelo fato do país apresentar um dos menores custos de produção, em virtude de prevalecer a exploração a pasto e de ainda existir grande capacidade de aumento de produção, na horizontal e na vertical. Na horizontal, o País têm 105 milhões de ha a serem acrescidos de modo sustentável à produção. Quanto à capacidade vertical, com o aumento da produtividade por meio de melhoramento genético, nutricional e de manejo, permitindo ao país se tornar uma das grandes potências na produção mundial de lácteos (BELLINI et al., 2008).

Entre os estados brasileiros, que tem apresentado aumento na produção de leite, está Pernambuco, que é o oitavo maior produtor de leite do Brasil e o segundo do Nordeste, com uma produção, em 2011, de 953 milhões de litros, que representa 3% do leite brasileiro, 23% do leite nordestino e uma taxa de crescimento de 9% em relação a 2010; período em que a taxa de crescimento nacional foi de 4% (IBGE, 2011; EMBRAPA, 2012a). Neste estado, a atividade leiteira tem grande importância social e econômica na geração de empregos e para a manutenção da agricultura familiar no campo. De acordo com a Agência de Desenvolvimento Econômico de Pernambuco – ADDIPER, os pequenos e médios produtores são a maioria na cadeia produtiva do leite no Estado, que se firma como sendo uma atividade econômica importante para a geração de renda e permanência de famílias no campo (CARVALHO E RIOS, 2007).

Pernambuco está dividido em cinco mesorregiões (São Francisco, Sertão, Agreste, Mata e Metropolitana do Recife). O Agreste, zona intermediária entre a Mata e o Sertão, é formado por seis microrregiões (Alto Capibaribe, Brejo, Garanhuns, Médio Capibaribe, Vale do Ipanema e Vale do Ipojuca). Como bacia leiteira de Pernambuco, o Agreste, tem na atividade leiteira sua principal fonte de renda com produção de leite estimada em 2011 de 666 milhões de litros, que representa cerca de 70% do leite pernambucano e um crescimento, em relação aos últimos cinco anos, de 7,8%, segundo dados da Pesquisa da Pecuária Municipal do IBGE (EMBRAPA, 2012b).

3.2 QUALIDADE DO LEITE

“Entende-se por leite, sem outra especificação, o produto oriundo da ordenha completa e ininterrupta, em condições de higiene, de vacas sadias, bem alimentadas e descansadas. O leite de outros animais deve denominar-se segundo a espécie que o proceda” (BRASIL, 2011a). Biologicamente, o leite é o produto da secreção das glândulas mamárias de fêmeas mamíferas, cuja função natural é a alimentação dos recém-nascidos. Quimicamente, é uma mistura homogênea de substâncias diversas, das quais algumas estão em emulsão, algumas em suspensão e outras em dissolução verdadeira (ORDÓÑEZ et al., 2005).

O leite é um alimento altamente nutritivo, pois possui em sua composição, entre outras substâncias, água, gordura, proteínas, sais minerais, vitaminas, carboidratos (NASCIMENTO et al., 2001) e cálcio, essencial para a formação e manutenção dos ossos. O leite é um alimento importante para pessoas de todas as faixas etárias (FERREIRA, 2007).

Em contrapartida nem sempre o leite produzido e consumido no Brasil possui a qualidade desejada e isto tem gerado discussão e desenvolvimento de novas políticas de incentivo à produção leiteira (NERO et al., 2005). Uma vez que a qualidade do leite cru determina a qualidade dos produtos lácteos, a produção de leite de alta qualidade deve ser a prioridade para estabelecer um mercado forte para o leite e seus derivados (SANTOS E BERGMANN, 2003).

A qualidade do leite depende de vários fatores, tais como: higiene do ordenhador e das tetas do animal, limpeza do local de ordenha, dos utensílios e dos equipamentos que entram em contato com as tetas e com o produto, visto que as condições de produção, armazenagem e transporte do leite, além dos cuidados na administração de drogas veterinárias, podem interferir diretamente na qualidade higiênica deste produto (DÜRR, 2007).

A saúde do rebanho também é importante para que o leite possua os requisitos esperados de qualidade. A mastite, inflamação da glândula mamária, ocorre frequentemente em bovino leiteiro e causa enormes prejuízos à produção leiteira, principalmente devido à queda na produção e a inviabilidade do leite para processamento e consumo. Para evitar sua ocorrência, muitos produtores realizam o

tratamento preventivo com antibióticos no seu rebanho, durante o período em que os animais não estão produzindo leite. Quando algum animal apresenta mastite no período de produção leiteira, deve ser afastado dos demais, para evitar a contaminação de animais sadios. Ao administrar antibiótico, deve-se descartar o leite desde o início do tratamento até o término do período de carência recomendado para o medicamento, evitando-se, assim, que o leite produzido neste período seja consumido, tendo em vista que ocorre a passagem de resíduos do antibiótico administrado da corrente sanguínea para o leite (LAGE, 2010).

A mastite é um sério problema em rebanhos de gado leiteiro, pois provoca mudanças nas concentrações dos componentes do leite e em alguns casos a perda do animal. Os principais mecanismos pelos quais ocorre alteração nos níveis dos componentes do leite são: lesão às células epiteliais produtoras de leite, que pode resultar em alteração da concentração de lactose, proteína e gordura, e aumento da permeabilidade vascular, que determina o aumento da passagem de substâncias do sangue para o leite, tais como sódio, cloro, imunoglobulinas e outras proteínas (PALES et al., 2005).

Dentre os micro-organismos causadores de mastite podem ser encontrados *Corynebacterium* spp, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus* spp, *Streptococcus agalactiae* e *Streptococcus* spp (BIRGEL JUNIOR, 2006).

De um modo geral, as doenças provocadas por micro-organismos causam enormes prejuízos para a produção leiteira, devendo ser tratadas da forma correta a fim de evitar a contaminação do leite e sua transmissão para o consumidor. Entre os micro-organismos de origem endógena que podem ser veiculados pelo leite ao homem são predominantes, mesmo em condições higiênicas adequadas, *Micrococcus*, *Corynebacterium*, *Streptococcus* e lactobacilos saprófitos do úbere e canais galactóforos (JAY, 2005).

Do ponto de vista legal, no Brasil, a IN 62 estabelece normas de produção, identidade e qualidade do leite, com o propósito de ajustar a produção leiteira nacional às exigências mínimas de qualidade do leite cru industrializado, previstas na legislação internacional. Entre as exigências de controle de qualidade, dessa Instrução Normativa, encontram-se as análises mensais de CCS, composição química, CBT e a pesquisa de resíduos de antibióticos em leite. A IN 62 determina valor mínimo para a composição

química (gordura, proteína e extrato seco desengordurado) e máximo para a CCS e CBT, e valores não superiores ao LMR, previstos para cada grupo químico específico, na pesquisa de resíduos de antibióticos (BRASIL, 2011a) (**Tabelas 2, 3 e 4**).

Tabela 2. Requisitos químicos da Instrução Normativa 62 para o leite cru refrigerado

Requisitos	Limite mínimo (g/100g)
Gordura	3,0
Extrato seco desengordurado	8,4
Proteína	2,9

Fonte: BRASIL (2011a)

Tabela 3. Requisitos microbiológicos e de contagem de células somáticas (CCS) da Instrução Normativa 62 para o leite cru refrigerado nas regiões Norte e Nordeste

Índice medido	Limite máximo			
	A partir de 01/07/10 até 31/12/12	A partir de 01/01/13 até 30/06/15	A partir de 01/07/15 até 30/06/17	A partir de 01/07/17
Contagem Padrão em Placas – UFC/mL	750.000	600.000	300.000	100.000
CCS – CS/mL	750.000	600.000	500.000	400.000

Fonte: BRASIL (2011a)

Tabela 4. Valores de limite máximo de resíduo para os grupos de antibióticos pesquisados no leite cru

GRUPO	ANALITO	LMR (ppb)
β-lactâmicos	penicilina G, penicilina V	4
	oxacilina, cloxacilina, dicloxacilina	30
	ceftiofur	100
Sulfonamida	sulfadimetoxina, sulfaquinoxalina, sulfadiazina, sulfatiazol, sulfapiridina, sulfametoxazol, sulfametazina, sulfaclorpiridazina, sulfizoxazol, sulfadoxina, sulfamerazina	100
Tetraciclina	clortetraciclina, tetraciclina, oxitetraciclina	100
Quinolona	Ácido Oxolínico	20
	Ácido Nalidíxico	20
	Flumequina	50
Fluoroquinolona	Ciprofloxacino	50
	Difloxacino	100
	Enrofloxacino	50
	Sarafloxacino	20
	Danofloxacino	30
	Norfloxacino	10

Fonte: JANK et al., 2012; LANAGRO-RS/MET RPM 10 02, 2012

Laboratórios autorizados e/ou credenciados pelo MAPA realizam análises de composição química, CCS e CBT e os resultados obtidos são usados como indicadores da qualidade do leite cru.

A análise da composição do leite é fundamental para o conhecimento de sua qualidade, e serve de indicador para diversas propriedades sensoriais e industriais do leite. Os parâmetros de qualidade são cada vez mais utilizados para detecção de falhas nas práticas de manejo e são utilizadas como referência na valorização da matéria-

prima. Os principais parâmetros utilizados pela maioria dos programas de qualidade industrial do leite são os teores de gordura, proteína, sólidos totais e a contagem de células somáticas (NORO et al., 2006). A composição varia de acordo com diversos fatores, tais como, espécie, raça, idade, estágio de lactação, ordenhas, alimentação, fraudes e adulterações (WALSTRA et al., 2006).

As células somáticas são provenientes do animal, estão presentes naturalmente no leite e podem ser células de descamação, oriundas do processo de renovação natural do epitélio da glândula mamária, e células brancas de defesa (leucócitos), derivadas da circulação do animal (GIGANTE E COSTA, 2008). A CCS no leite bovino é um indicador da saúde da glândula mamária. Altas contagens de células somáticas reduz o tempo de prateleira de leite e derivados e ocasiona a inibição do crescimento de culturas *starters* para a produção de derivados lácteos, causando enormes prejuízos nas indústrias de laticínios (LINDMARK-MANSSON et al., 2000; TRONCO, 2008).

De outra parte, a CBT é um indicador das condições gerais de higiene no processo de produção do leite. A presença e multiplicação de micro-organismos provocam alterações físico-químicas no leite, o que diminui sua durabilidade e, conseqüentemente, ocasionam problemas econômicos e de saúde pública (ALMEIDA et al., 1999). Os principais prejuízos industriais causados pela alta contagem microbiana são: acidificação e coagulação, produção de gás, sabor amargo, coagulação sem acidificação, aumento da viscosidade, alteração de cor, produção de sabores, odores variados, dentre outros, os quais diminuem a vida de prateleira e o rendimento industrial (MARTINS et al., 2008).

3.3 ANTIMICROBIANOS

Os antimicrobianos são substâncias químicas usadas para combater os micro-organismos. Estes agentes podem ser inespecíficos, aqueles que agem sobre os micro-organismos patogênicos ou benéficos e são compostos pelos antissépticos e desinfetantes; ou específicos, aqueles que atuam sobre os micro-organismos responsáveis pelas doenças infecciosas que acometem os animais e compreende os quimioterápicos e antibióticos. Os quimioterápicos são compostos químicos sintéticos, que exibem as mesmas atividades de um antibiótico (SPINOSA, 2002a). Os antibióticos são substâncias químicas produzidas pelo metabolismo de determinadas bactérias, fungos e actinomicetos. Podem, em soluções diluídas, impedir temporária ou definitivamente as funções vitais de outros micro-organismos, resultando em efeitos bacteriostáticos e bactericidas (BRASIL, 1999).

Os antibióticos quando administrados em animais deixam resíduos em seus produtos. Resíduo de drogas veterinárias, segundo o *Codex Alimentarius*, é “a fração da droga, seus metabólitos, produtos de conversão ou reação e impurezas que permanecem no alimento originário de animais tratados” (BRASIL, 1999). Os antibióticos mais utilizados em bovinos são aqueles dos grupos dos β -lactâmicos, sulfonamidas, macrolídeos, aminoglicosídeos e tetraciclina. Dentre esses, os mais utilizados para tratamento de bovinos leiteiros e, portanto os mais detectados no leite, são os β -lactâmicos (TENÓRIO, 2007).

Os resíduos de antibióticos são subprodutos da biotransformação dos medicamentos e passam para o leite independente da via de aplicação (oral, tópica, alimentar, intramamária, intrauterina ou intramuscular), pois são absorvidos pelas células de secreção do alvéolo da glândula mamária e passam para o leite nos quatro quartos do úbere (FONSECA E SANTOS, 2001).

A presença de resíduos de medicamentos veterinários em alimentos é um assunto muito discutido nos dias atuais, uma vez que influencia o consumo alimentar quanto a aspectos econômicos, comerciais e sanitários. Seu controle deve ser baseado na análise de risco, uma ferramenta que ajuda nas tomadas de decisão nas questões de segurança alimentar (FAO, 2006).

Uma vez que o leite esteja contaminado com resíduo de antimicrobiano praticamente nada pode ser feito para remover o contaminante, pois os tratamentos aos quais o leite é submetido na indústria, como filtração, resfriamento e tratamento térmico, de 72-75°C por 15 a 20 segundos, têm pouca ou nenhuma ação sobre os resíduos de drogas veterinárias. Nem o tratamento UHT a 130-140°C por 2 a 4 segundos é suficiente para destruir 100% dos antimicrobianos (GIGANTE, 2004). Para eliminar a penicilina e a tetraciclina do leite é preciso aquecê-lo a 100°C, por três horas (MEDEIROS et al., 1999). Dessa forma, por meio do consumo de leite fluido, o resíduo de antibiótico chega ao consumidor e representa um problema de saúde pública, cujos aspectos toxicológicos, microbiológicos e de desenvolvimento de reações de hipersensibilidade são de grande importância (GIGANTE, 2004).

O aumento da resistência dos micro-organismos aos antibióticos é um dos mais importantes problemas da medicina moderna e gera sérias ameaças à saúde humana e animal. Os primeiros trabalhos sobre a utilização de antibióticos contra as infecções bacterianas trouxeram esperança de que as doenças infecciosas não seriam mais um problema, especialmente para os humanos. Porém, com os avanços da sua utilização, surgiram casos de resistência, não só a monorresistência como também a multirresistência, e a transferência da resistência entre as diferentes estirpes e espécies de bactérias. A situação é cada vez mais complexa com os diversos mecanismos de resistência bacteriana, incluindo a vasta gama de enzimas β -lactamases (NUOWS et al., 1998).

Na década de 50, a *Food and Drug Administration* (FDA) chamou uma junta médica a Washington (USA) para orientar na formulação de planos para um programa de ação eficiente em relação ao controle de antibióticos no mercado do leite (SIVAKESAVA E IRUDAYARAJ, 2002). Desde então, estratégias e técnicas estão sendo desenvolvidas com o objetivo de reduzir a ocorrência da droga nos alimentos (ALBRIGHT et al., 1961). Ainda que a FDA tenha a meta de atingir tolerância zero para os antibióticos no leite, na prática isso é incompatível com a realidade dos rebanhos leiteiros, especificamente, pela ocorrência de mastites bovinas e a consequente utilização dos antibióticos para os tratamentos da doença (MITCHELL et al., 1998).

No Brasil, desde 1952, a legislação tem se preocupado com os resíduos de drogas veterinárias que chegam ao consumidor, por meio do leite. Assim, o Regulamento de Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal – RIISPOA preconiza, no artigo 488, que devem ser afastadas da produção leiteira as fêmeas que estejam em tratamento, ou que sejam portadoras de doenças infectocontagiosas, que estejam febris, com corrimento vaginal ou qualquer outro sintoma patológico, e reforça, no artigo 514, que o emprego de produtos químicos para a conservação do leite é proibido, admitindo única e exclusivamente a utilização da refrigeração do leite na propriedade rural como forma de conservação (BRASIL, 1952).

A portaria 005, de 24 de abril de 1980, do MAPA, determina prazo mínimo de 72 horas para utilização do leite de vacas tratadas com antibióticos. Todavia, o tempo de eliminação do antibiótico depende da via de inoculação, da dosagem, do estado fisiológico da glândula mamária e tipo de antibiótico aplicado, atingindo às vezes até 141 horas (BRASIL, 1980; FAGUNDES, 1980).

Em atuação contínua e entre as diversas ações do MAPA foi aprovado, por meio da Portaria 193, de 12 de maio de 1998, o Regulamento Técnico para Licenciamento e Renovação de Licença de Antimicrobianos de uso veterinário. O regulamento confirma que os antimicrobianos não devem ser utilizados como aditivos na ração, como promotores de crescimento ou como conservantes de alimentos para animais, sendo vedado o uso de cefalotina, penicilinas, tetraciclinas e sulfonamidas para estas finalidades (BRASIL, 1998).

Resíduos de antibióticos no leite podem ocasionar vários comprometimentos à saúde, desde distúrbios gastrointestinais até hipersensibilidades, teratogênias e choque anafilático em pessoas alérgicas; além de provocar resistência bacteriana, trazer prejuízos aos laticínios pela inibição do crescimento de micro-organismos benéficos para a produção de derivados de leite (NERO et al., 2007) e ocasionar restrições à exportação.

O controle de resíduos de medicamentos veterinários em alimentos é realizado por meio do PNCRC, que foi instituído pela Portaria Ministerial 51, de 06 de maio de 1986, adequado pela Portaria Ministerial 527, de 15 de agosto de 1995, e alterado pela Instrução Normativa 42, de 20 de dezembro de 1999, do MAPA. O PNCRC tem como

função regulamentar basicamente o controle e a vigilância destes resíduos em alimentos (BRASIL, 1999).

O PNCRC foi criado para atender ao desafio de produzir e comercializar um produto puro e de qualidade, priorizando a saúde do consumidor, e em concordância às exigências nacionais e internacionais. Mensalmente, amostras da produção brasileira de leite são coletadas e monitoradas, junto aos estabelecimentos sob SIF, no âmbito do Programa de Controle de Resíduos e Contaminantes em Leite – PCRCL, subprograma do PNCRC, e responsável pelo monitoramento e controle de resíduos a partir do produtor rural, até a chegada e recepção do leite na indústria (BRASIL, 1999).

Para tanto têm sido estabelecido o nível de tolerância ou LMR que se refere à presença de antimicrobianos em alimentos de origem animal. O LMR é estipulado para os níveis residuais do fármaco e se baseia no tipo e quantidade do resíduo que não permite perigo toxicológico para a saúde humana, sendo expresso de acordo com a dose de ingestão diária aceitável (IDA) ou por uma IDA temporária que utiliza um fator adicional de segurança. A IDA é a quantidade de uma substância que pode ser ingerida diariamente, durante toda a vida do indivíduo, sem que provoque prejuízo à saúde, é expressa em mg kg^{-1} de peso corpóreo. A determinação da IDA se fundamenta nas informações toxicológicas disponíveis para cada substância no período de sua avaliação (MAMANI, 2007).

O estabelecimento do LMR para cada antibiótico, no Brasil, é de competência do Ministério de Saúde. Caso não esteja fixado por este Ministério, utiliza-se o internalizado no MERCOSUL, recomendado pelo Codex Alimentarius, constante nas Diretivas da União Europeia e utilizado pela FDA.

Uma estratégia complementar às ações de controle oficial exercidas na produção primária por outras instâncias governamentais, em especial pelo MAPA, e em conjunto com este Ministério, deu-se início ao Programa de Análise de Resíduos de Medicamentos Veterinários em Alimentos de Origem Animal (PAMVet), da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). O programa iniciou-se em sete estados das regiões sul e sudeste, depois de discutidos os preparativos técnico-operacionais e definidas parcerias com as Vigilâncias Sanitárias e Laboratórios Centrais de Saúde Pública. Alguns critérios foram determinados e o leite bovino foi escolhido como a

primeira matriz de análise para a pesquisa de resíduos de medicamentos veterinários (ANVISA, 2006).

O programa foi desenvolvido pela ANVISA com o objetivo de operacionalizar sua competência legal de controlar e fiscalizar resíduos de medicamentos veterinários em alimentos, conforme determina a lei 9.782, de 26 de janeiro de 1999. A implantação do programa de controle é resultado de recomendações originárias do fórum de discussão promovido pela ANVISA, em 2000 e 2001 (RDC 5/2000), que teve a participação de vários personagens do governo e da sociedade civil, com debates exaustivos que culminaram em uma proposta de ação de vigilância sanitária intitulada “Medicamentos Veterinários x Saúde Pública” (ANVISA, 2005).

Em virtude da necessidade de conhecer a realidade do leite no tocante a presença de resíduos de antibióticos, diversas pesquisas tem sido realizada e relatam a ocorrência de resíduos de antibióticos em leite.

Kang'ethe et al.(2005) analisaram 854 amostras de leite cru e 110 amostras de leite pasteurizado coletados de diferentes locais do Quênia, entre 1999 e 2000. Utilizaram testes de triagem específicos para β -lactâmicos e tetraciclinas, e identificaram que as amostras de áreas rurais apresentaram uma proporção muito maior de resíduos de que as amostras colhidas em áreas urbanas, possivelmente devido à diluição resultante da mistura do leite nos laticínios.

Raia e Costa (2001) avaliaram 60 amostras de tanques de refrigeração de diferentes propriedades leiteiras e observaram que as amostras com alta percentagem de mastite clínica apresentavam resíduo de antimicrobiano, que confirma ser a ocorrência de mastite clínica um fator predisponente importante para a presença de resíduos no leite de tanques resfriadores das propriedades.

Shitandi e Sternesjo (2004) estudaram a prevalência de *Staphylococcus aureus* multirresistente em leite de grandes e pequenos produtores no Quênia, pelo perfil de susceptibilidade à penicilina G, tetraciclina, eritromicina, trimetoprima / sulfametazina, e cloranfenicol em 402 isolados de leite com mastite subclínica, constatando a existência de resistência múltipla, definida como a falta de sensibilidade a pelo menos dois antimicrobianos de diferentes classes, em 69 (34,3%) dos isolados nas pequenas propriedades e em 36 (17,9%) dos isolados das grandes fazendas.

Carlos et al. (2004), analisando leite tipo “C” do município de Campos dos Goytacazes, RJ, por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), verificaram que apenas 7 (32,56%) das 43 amostras de leite não apresentaram resíduo de penicilina.

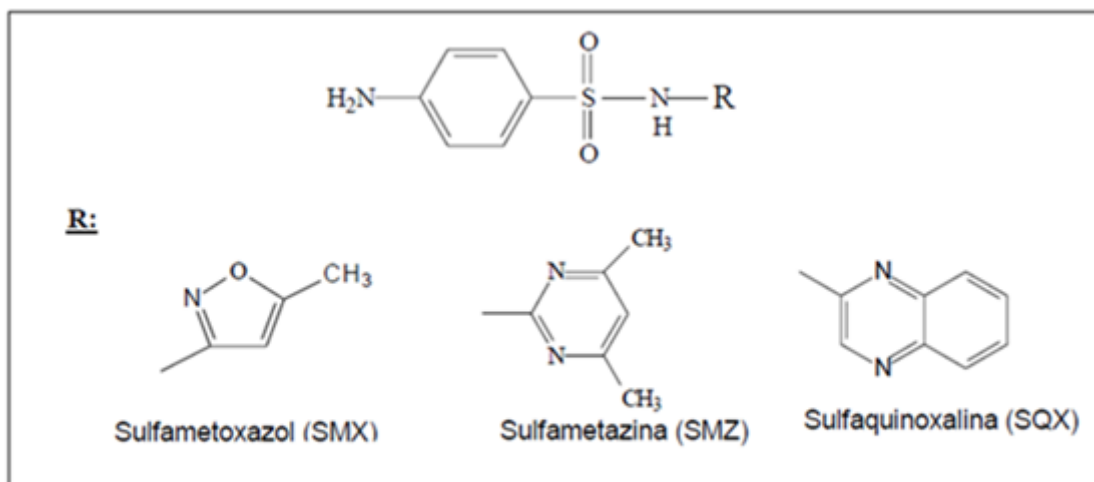
Fonseca et al. (2009) ao avaliarem 100 amostras de leite UHT de dez marcas provenientes de diferentes unidades industriais nos estados de Minas Gerais, Rio de Janeiro, Goiás, São Paulo e Rio Grande do Sul, utilizando o método rápido do iogurte, verificaram 4% de resultados positivos para resíduos de antimicrobianos.

3.3.1 Grupos de antibióticos

3.3.1.1 Sulfonamidas

As sulfonamidas (**Figura 3**) são substâncias bacteriostáticas. A presença de seus resíduos nos alimentos preocupa devido seu poder carcinogênico e pela possibilidade do desenvolvimento de resistência aos antibióticos nos seres humanos. Ainda que as sulfonamidas sejam utilizadas como medicamentos veterinários para fins profiláticos e efeitos terapêuticos, estes antimicrobianos também agem como promotores de crescimento de bovinos (STOLKER E BRINKMAN, 2005).

A trimetoprima exerce efeito potencializador quando administrada com sulfonamida, inibindo a diidrofolato-reductase microbiana, enzima que reduz o diidrofolato a tetrahidrofolato, produzindo efeito antimicrobiano sinérgico. Esses antimicrobianos apresentam amplo espectro (GORNIAK, 2002).



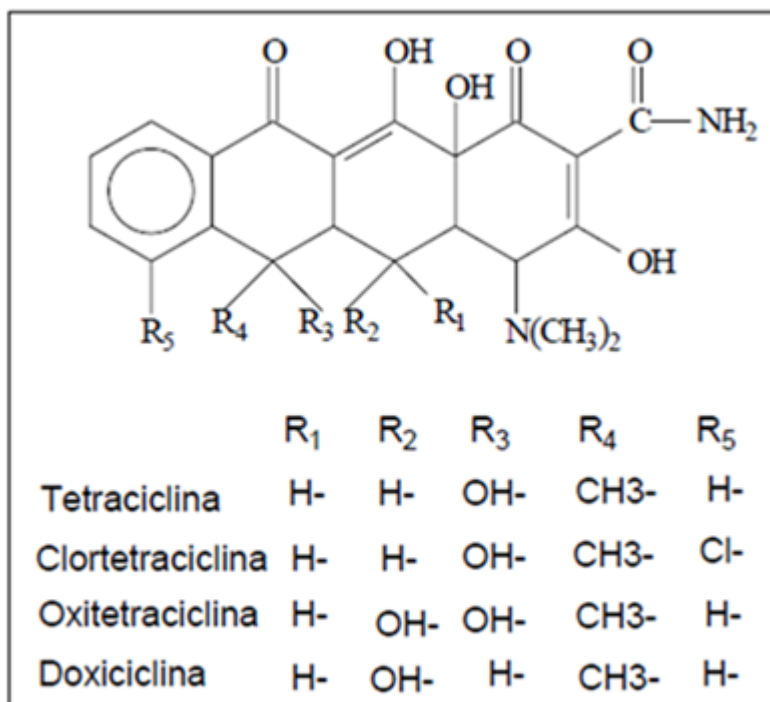
Fonte: MAMANI (2007)

Figura 3. Estruturas químicas das sulfonamidas

3.3.1.2 Tetraciclina

As tetraciclina são antibióticos, de largo espectro, produzidos por diversas espécies de *Streptomyces*, sendo algumas semissintéticas. Esta denominação é relacionada à sua estrutura química constituída por quatro anéis (**Figura 4**). Elas atuam por inibição a síntese proteica, ligando-se a subunidade 30S do ribossoma impedindo que o RNA transportador se fixe ao ribossoma. Agem sobre bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, clamídias, riquetsias e alguns protozoários como *Plasmodium falciparum*, *Trichomonas* spp., *Entamoeba coli*, *Giardia lamblia* e outros. Estes antibióticos podem ocasionalmente se ligar a subunidade 40S do ribossoma dos animais superiores, o que justifica reações adversas como náusea, vômito, diarreia, quando administrado por via oral, e dor local, quando por via intramuscular (KAPUSNIK-UNER et al.,1997; GIGUÈRE, 2006a). Podem também provocar reações alérgicas em humanos, comprometer o desenvolvimento ósseo de crianças, interferir na reabsorção de cálcio pelos ossos, além de provocar alterações na dentição. São ainda pouco absorvidos no trato gastrointestinal, onde continuam em altas concentrações atuando na microbiota intestinal (ANVISA, 2009).

Podhorniak et al. (1999) estudaram a estabilidade de resíduos de seis tetraciclina (clorotetraciclina, demeclociclina, metaciclina, minociclina, oxitetraciclina e tetraciclina) em leite cru, armazenado a 4 e 25 °C. Os resultados obtidos indicaram perdas, 4 a 13%, de tetraciclina depois de 72 horas, a 4 °C, bem como, 0 a 18%, quando estocados por 48 horas a 25 °C.



Fonte: MAMANI (2007)

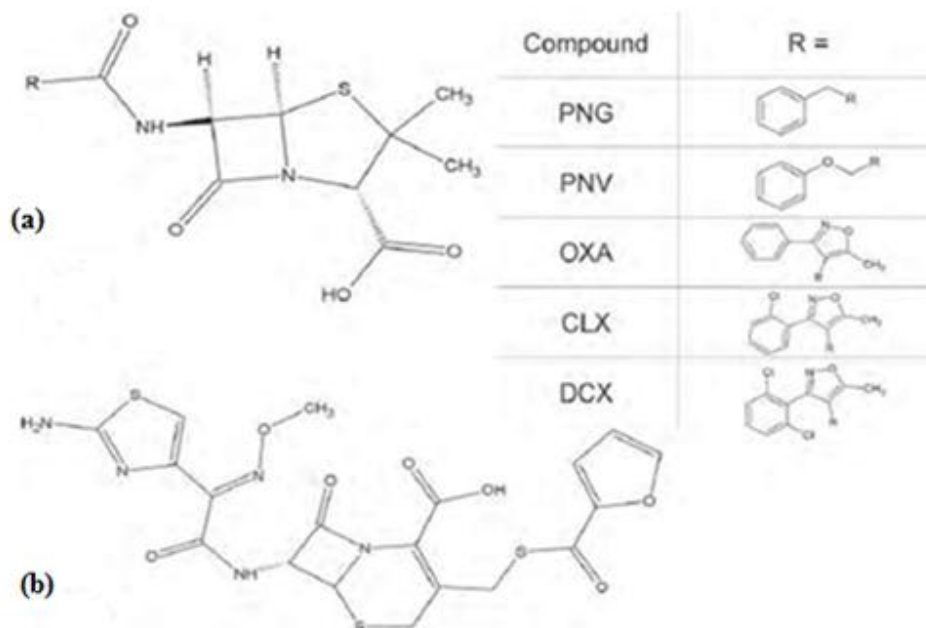
Figura 4. Estruturas químicas das tetraciclina

3.3.1.3 β-lactâmicos: penicilinas e cefalosporinas

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

A penicilina foi descoberta por Alexander Fleming em 1928, como um metabólito do *Penicillium notatum*, ao qual deu origem ao nome do medicamento. As penicilinas apresentam anel β-lactâmico fundido a um anel sulfúrico com cinco membros contendo tiazolidina (**Figura 5a**). Uma alteração na posição seis da cadeia lateral do anel β-lactâmico resulta em antibióticos com diferentes propriedades antibacterianas e farmacológicas (ANVISA, 2009).

A primeira cefalosporina foi descoberta em 1945, por Giuseppe Botzu, a partir de *Cephalosporium acremonium*. As cefalosporinas apresentam um anel β -lactâmico ligado a um anel de dihidrotiazina de seis membros contendo enxofre (**Figura 5b**). O núcleo das cefalosporinas é mais resistente à ação de muitas enzimas bacterianas, propriedade que define seu amplo espectro de ação (ANVISA, 2009).



Fonte: JANK et al. (2012)

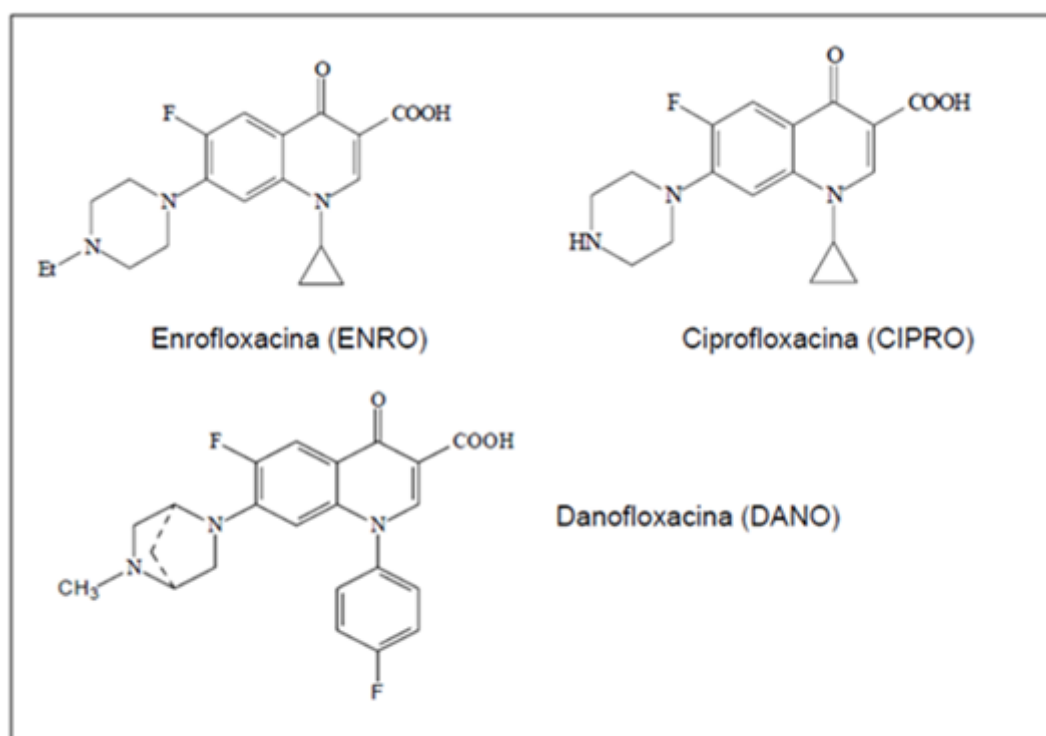
Figura 5. Estruturas químicas dos antibióticos β -lactâmicos: (a) estrutura genérica das penicilinas, onde o R dos analitos é descrito; e (b) estrutura do ceftiofur

3.3.1.4 Quinolonas

A base estrutural das quinolonas é o anel 4-quinolona que foi modificado na tentativa de obter um aumento no espectro do antimicrobiano que atua inibindo as topoisomerasas bacterianas do tipo II (DNA girase), impedindo o enrolamento da hélice de DNA. A disponibilização de quinolona fluorada representa um progresso terapêutico, visto que estas drogas são dotadas de amplo espectro de ação (MANDELL E PETRI JR., 1997).

As fluoroquinolonas (**Figura 6**) são antibióticos sintéticos de segunda geração, oriundas das quinolonas, apresentando um átomo de flúor na posição 6 e um grupo piperazinila na posição 7, os quais são responsáveis por uma maior atividade

antibacteriana e menor toxicidade do que as quinolonas de primeira geração (POSYNIAK et al., 1999). As fluoroquinolonas têm uma ampla faixa de atividade antibacteriana e seu uso tem sido incrementado na medicina veterinária pela grande efetividade em tratamentos de infecções bacterianas. Verdadeiramente essas substâncias têm sido utilizadas de forma satisfatória no tratamento de infecções causadas por microorganismos Gram-positivos, Gram-negativos e *Mycoplasma*, em infecções pulmonares, urinárias e digestivas. Agem principalmente inibindo a DNA-girase bacteriana. Os resíduos destes antimicrobianos em animais podem ser encontrados no leite e tecidos (BAUDITZ, 1990; GILLES et al., 1991).



Fonte: MAMANI (2007)

Figura 6. Estruturas químicas das fluoroquinolonas

3.3.1.5 Aminoglicosídeos

Os aminoglicosídeos são formados por um núcleo de hexose unido a aminoglicosídeos por meio de ligações glicosídicas. Atuam interferindo na síntese proteica bacteriana, promovendo a formação de proteínas defeituosas. Os aminoglicosídeos ligam-se a subunidade 30S do ribossoma, causando a leitura incorreta do código genético com consequente interrupção da síntese da proteína. A proteína defeituosa resultante é vital para o metabolismo da bactéria, levando a morte celular. Contudo, antimicrobianos dessa classe são considerados bactericidas. Eles têm espectro de ação relativamente curto, predominando sobre os micro-organismos Gram-negativos (CHAMBERS E SANDE, 1997; DOWLING, 2006a).

Os aminoglicosídeos mais conhecidos são a gentamicina, lincomicina, neomicina e estreptomicina. Embora possam ocasionar efeitos colaterais de nefrotoxicidade e ototoxicidade, eles ainda são ocasionalmente usados para o tratamento de infecções graves (STOLKER E BRINKMAN, 2005).

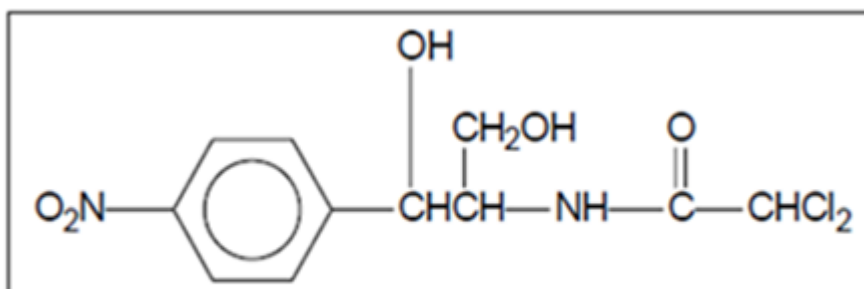
3.3.1.6 Macrolídeos

Os macrolídeos apresentam um anel lactônico macrocíclico ao qual se ligam açúcares. Atuam impedindo a translocação do RNAt na subunidade 50S do ribossoma, inibindo a enzima peptidiltransferase, inviabilizando a síntese proteica bacteriana, sendo portanto, bacteriostáticos. Eles são ativos contra bactérias Gram-positivas e *Mycoplasma*, com atividade satisfatória contra bactérias anaeróbias (GIGUÈRE, 2006b).

3.3.1.7 Anfenicóis

Anfenicóis são antibióticos bacteriostáticos que inibem a síntese dos polipeptídeos bacterianos. Pertencem a este grupo, o cloranfenicol, o tianfenicol e o florfenicol. O cloranfenicol (**Figura 7**), inicialmente produzido pelo *Streptomyces venezuelae*, também, pode na atualidade ser obtido por síntese laboratorial. Estes antimicrobianos possuem largo espectro de ação agindo sobre bactérias, riquetsias, espiroquetas e *Mycoplasma*. Eles atuam inibindo a síntese proteica dos microorganismos sensíveis, ligando a subunidade 50S, o que interfere na formação do peptídeo pelo bloqueio da enzima peptidiltransferase. Inibem também a síntese proteica mitocondrial das células da medula óssea dos mamíferos, sendo um de seus efeitos mais graves a anemia aplástica (SPINOSA, 2002c; DOWLING, 2006b).

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



Fonte: MAMANI (2007)

Figura 7. Estrutura química do cloranfenicol

3.4 MÉTODOS ANALÍTICOS QUALITATIVOS PARA RESÍDUOS DE ANTIBIÓTICOS

Os métodos de triagem para resíduos de antibióticos em leite são procedimentos de monitoramento eficiente, simples e rápido. Todavia, eles não são específicos e respondem apenas a resíduos biologicamente ativos que inibem o crescimento do microorganismo. Antes de 1991, o método de disco de *Bacillus stearothermophilis* (BSDA) era o método oficial para analisar a presença de resíduos de drogas veterinárias em leite cru. Desde então, contínuas melhorias nos kits comerciais existentes, bem como desenvolvimento de novos kits de triagem foram realizados e introduzidos no mercado. Entretanto, não existe kit ideal atualmente disponível para a detecção de resíduos de antibióticos em leite. O método de triagem para resíduos específicos possui limites de detecção que estão muitas vezes acima do LMR (MAMANI, 2007).

Os métodos rápidos de rastreamento imunológicos ou métodos de inibição microbiana, embora sejam frequentemente utilizados para detectar a presença de resíduos de antibióticos na alimentação não permitem a identificação precisa dos resíduos de antibióticos presentes no leite e por isso métodos mais precisos como os cromatográficos são exigidos pelas agências governamentais a fim de identificar e confirmar a presença desses compostos. Desta forma, a cromatografia se destaca na detecção de resíduos de antimicrobianos no leite, sendo considerado um método específico e confirmatório nesta linha de detecção. Muitas pesquisas utilizam a cromatografia líquida para detecção simultânea de tetraciclinas, sulfonamidas e cloranfenicol no leite (MAMANI et al., 2009).

Entre as desvantagens dos métodos de triagem destacam-se os seguintes aspectos: não permitem identificar o analito que foi responsável pela resposta positiva do ensaio, não permitem obter informações quantitativas, bem como, várias vezes, detectam os antibióticos apenas quando as concentrações destes se encontram muito acima do LMR. Os resultados positivos de um método de triagem podem ser devido à resposta positiva da presença de um ou mais analitos. A presença de altas contagens de células somáticas ou secreções naturais no leite pode resultar em falsos positivos (NIELSEN, 1999).

Para solucionar estes problemas com a utilização de kits comerciais um método de triagem diferente é utilizado pelo Laboratório de Análise de Resíduos de Pesticidas e Medicamentos Veterinários (RPM), do Laboratório Nacional Agropecuário do Rio Grande do Sul (LANAGRO – RS), órgão do MAPA, responsável pela análise de amostras de laticínios com SIF, para detecção qualitativa de resíduos de sulfonamidas, tetraciclina, quinolonas, fluoroquinolonas e trimetoprima empregando LC-MS/MS em diferentes matrizes (músculo bovino, músculo de frango, fígado e leite).

3.5 MÉTODOS ANALÍTICOS QUANTITATIVOS PARA RESÍDUOS DE ANTIBIÓTICOS

A determinação de resíduos de antimicrobianos envolve a quantificação de concentrações na ordem de ppm ou ppb; o que dificulta os procedimentos analíticos, especialmente em amostras complexas como alimentos, fazendo com que a utilização de técnicas cromatográficas seja, na maioria dos casos, indispensável. Tendo em vista as propriedades físico-químicas dos antimicrobianos, CLAE tem sido a mais empregada dentre as técnicas analíticas, associada a diferentes detectores como UV, arranjo de diodos, fluorescência e espectrômetro de massa. Outros métodos empregados na determinação de resíduos de drogas veterinárias em alimentos são a cromatografia gasosa (MEETSCHEN E PETZ, 1990) e a eletroforese capilar (MARZUELA E MORENO-BONDI, 2004). O método de espectrometria de massa é o mais recomendado para a confirmação do resíduo.

A técnica de LC-MS/MS foi utilizada por Martins-Júnior et al. (2007) para detecção e confirmação de múltiplas classes de medicamentos, tais como β -lactâmicos, tetraciclina, sulfonamidas, cefalosporinas e macrolídeos em leite bovino. Nesta pesquisa, nove marcas de leite foram obtidas em mercados da capital de São Paulo e a presença dessas drogas foi observada em limites de quantificação que variavam entre 0,75 e 7,5 ppb, exceto na eritromicina, validada na concentração de 37,5 ppb.

3.6 REDE BRASILEIRA DE LABORATÓRIOS DE CONTROLE DE QUALIDADE DO LEITE

O leite produzido e consumido no Brasil ainda se caracteriza por uma alta informalidade, aproximadamente 30%, e por uma qualidade duvidosa, na maioria das vezes fora dos padrões internacionais. A necessidade de estipular medidas para melhorar a qualidade do leite no País incentivou a elaboração do Plano Nacional da Qualidade do Leite (PNQL), no ano de 2000, por iniciativa do MAPA. Entre os objetivos do PNQL destacam-se a melhoria da qualidade do leite e derivados para possibilitar a segurança da população e o crescimento da competitividade de produtos lácteos em novos mercados (BRASIL, 2002).

Para atingir suas metas o PNQL realizou diversas ações, que incluíram a implantação e o aparelhamento de uma Rede Brasileira de Laboratórios de Controle de Qualidade do Leite (RBQL) que analisasse, mensalmente, pelo menos uma amostra de leite de cada propriedade produtora quanto a parâmetros internacionais de avaliação da qualidade do leite (BRASIL, 2002). Atualmente dez laboratórios, distribuídos em sete estados brasileiros, fazem parte da RBQL. Em Pernambuco, encontra-se o Programa de Gerenciamento de Rebanhos Leiteiros do Nordeste (PROGENE), que realiza análises de amostras de leite cru refrigerado de bovinos leiteiros para determinação da CCS, da composição (gordura, proteína, lactose, sólidos totais, extrato seco desengordurado, ureia e caseína) e da CBT (BARBOSA et al, 2008).

As atividades da RBQL visam o atendimento a Instrução Normativa 51 (IN 51), publicada em 18 de setembro de 2002, pelo MAPA, que aprova os regulamentos técnicos de produção, identidade e qualidade de leites tipo A, B e C, pasteurizado e cru refrigerado. No entanto, devido à necessidade de realizar alguns ajustes na IN 51 a mesma foi alterada em 2011, pela IN 62, do referido órgão, onde entre outras modificações contemplam a extinção de leite do tipo C.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 AMOSTRAGEM

Foram utilizadas 184 amostras de leite cru, sendo 92 coletadas no inverno de 2012, nos meses de julho e setembro e 92 no verão de 2013, mês de janeiro, de acordo com a **Tabela 5**.

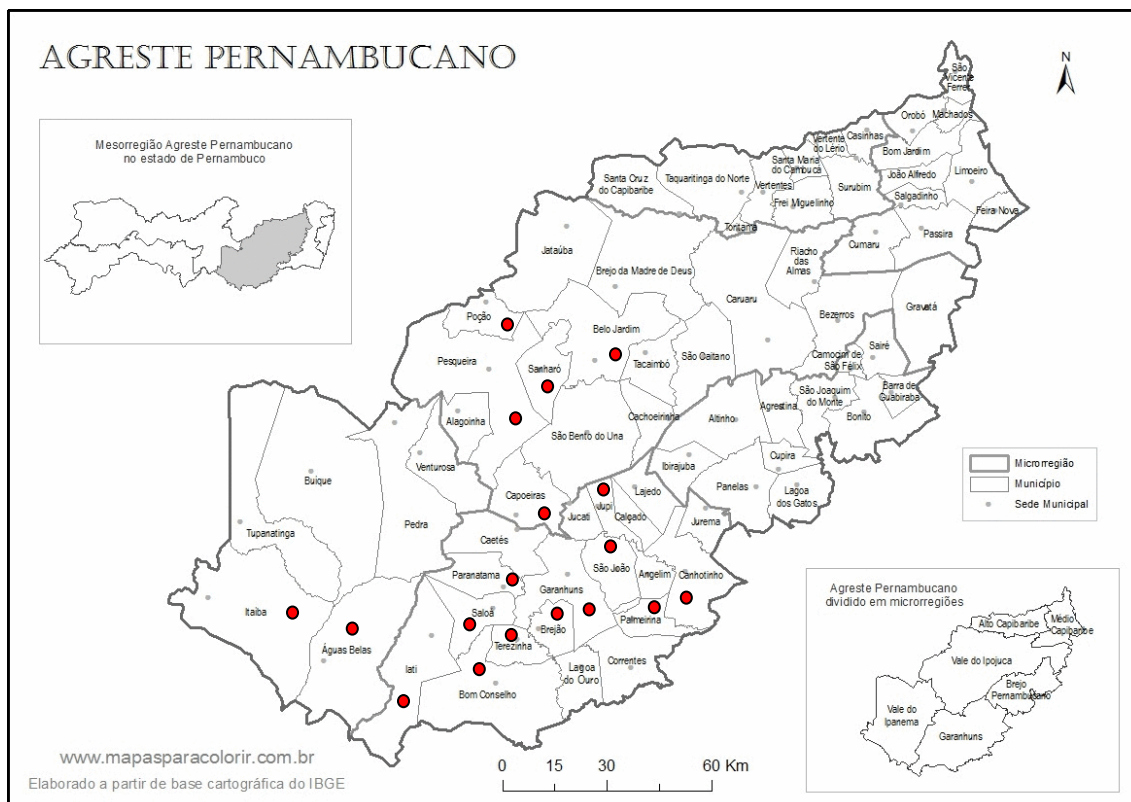
Tabela 5. Amostras de leite cru coletadas e analisadas em função do serviço de inspeção e da estação do ano

Serviço de Inspeção	Estação do ano	
	Inverno	Verão
SIF	27	28
SIE	36	36
SSI	29	28
Total	92	92

SIF – Serviço de Inspeção Federal; SIE – Serviço de Inspeção Estadual; SSI – Sem Serviço de Inspeção

A escolha dos produtores foi aleatória e para cada laticínio coletou-se apenas uma amostra do mesmo produtor, por estação do ano; desta forma, foram coletadas amostras de leite cru de 92 produtores em cada período.

As amostras foram coletadas de três microrregiões do Agreste de Pernambuco (Vale do Ipojuca, Vale do Ipanema e Garanhuns), distribuídas conforme pode ser observado na **Figura 8**.



Fonte: IBGE

Figura 8. Mapa do agreste de Pernambuco

Os círculos vermelhos sinalizam os municípios onde foram realizadas as coletas de leite

As amostras foram coletadas em frascos apropriados fornecidos pelo PROGENE. O leite foi devidamente homogeneizado antes de cada coleta e colocado, com auxílio de concha de inox, em três frascos distintos. Um frasco com aproximadamente 200 mL para amostra destinada a análise de resíduo de antibiótico, um frasco de 40 mL, contendo conservante de brometo de etídio, para amostra destinada as análises de composição e CCS e outro com capacidade de 40 mL, com conservante de azida sódica, para amostra destinada a análise de CBT. As conchas de inox utilizadas nas coletas foram higienizadas com água destilada e álcool a 70% vv antes e após cada coleta para evitar contaminação cruzada. Todos os frascos foram devidamente identificados com numeração unívoca e com informação do tipo de amostra de forma a garantir a rastreabilidade. Imediatamente após a coleta, foram registrados em planilha específica os dados necessários à pesquisa em questão, tais como: número do frasco, data da coleta, hora, temperatura da amostra, laticínio, tipo de serviço de inspeção, produtor e município. Todas as amostras foram colocadas em caixas de isopor com cubos de gelo imediatamente após a coleta.

As amostras destinadas a análise de resíduo de antibiótico foram posteriormente congeladas em freezer e encaminhadas ao Laboratório de análises RPM do LANAGRO-RS para ser realizada a Análise Qualitativa de Multirresíduos e Quantitativa de resíduos de antibióticos β -lactâmicos por LC-MS/MS.

As amostras destinadas as análises de composição, CCS e CBT foram encaminhadas ao PROGENE, localizado no Departamento de Zootecnia da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE).

4.2 ANÁLISE QUALITATIVA DE MULTIRRESÍDUOS POR LC-MS/MS

As análises foram realizadas conforme procedimento descrito no Método de triagem para detecção qualitativa de resíduos de sulfonamidas, tetraciclinas, quinolonas, fluoroquinolonas e trimetoprima, empregando LC-MS/MS. Método validado para amostras de leite e acreditado pelo INMETRO (LANAGRO-RS/MET RPM 10 02, 2012).

“A análise qualitativa de multirresíduos pode apresentar resultado positivo ou negativo para cada um dos analitos dos grupos de antibióticos em questão. Resultado negativo significa amostra com ausência de analito ou com quantidade inferior a capacidade de detecção ($CC\beta$). Resultado positivo significa amostra com concentração de analito acima do $CC\beta$. As amostras identificadas como positivas neste método de triagem devem ser analisadas em metodologia confirmatória específica para cada classe de substância. Os valores de $CC\beta$ representam os níveis de fortificação onde os procedimentos desta metodologia apresentam um número de falsos negativos inferiores a 5%” (LANAGRO-RS/MET RPM 10 02, 2012).

4.3 ANÁLISE QUANTITATIVA DE RESÍDUOS DE ANTIBIÓTICOS β -LACTÂMICOS POR LC-MS/MS

Foram realizadas análises quantitativas para detecção e quantificação de resíduos de seis antibióticos β -lactâmicos (ceftiofur, penicilina G, penicilina V, oxacilina, cloxacilina e dicloxacilina) empregando LC/MS/MS, método validado por JANK et al. (2012).

Os parâmetros analíticos dos analitos analisados neste método estão descritos na **Tabela 6**.

Tabela 6. Parâmetros analíticos obtidos para β -lactâmicos em leite em ppb

β -lactâmicos	Limite de detecção	Limite de quantificação	Limite de decisão	Capacidade de detecção
Ceftiofur	10,0	25,0	120,4	147,9
Penicilina G	0,4	1,0	4,7	5,7
Penicilina V	0,4	1,0	4,7	6,1
Oxacilina	3,0	7,5	36,5	53,7
Cloxacilina	3,0	7,5	35,6	52,8
Dicloxacilina	3,0	7,5	36,3	56,6

Fonte: JANK et al., 2012.

4.3.1 Preparo de soluções

“As soluções estoque padrão foram preparadas por dissolução de todos os antibióticos (ceftiofur, penicilina G, penicilina V, oxacilina, cloxacilina, dicloxacilina) individualmente em 0,5% de polipropileno glicol 3000 em tampão de acetato (pH 4,5), a uma concentração de 0,5-3,75 mg mL⁻¹, para fazer dissoluções mais fáceis para o pool de concentração de trabalho. Penicilina G e soluções de penicilina V estoque foram diluídas 1000 vezes para se obter 0,5 μ g mL⁻¹. Oxacilina, cloxacilina e dicloxacilina foram também diluídas 1000 vezes para se obter 3,75 μ g mL⁻¹; para ceftiofur, um fator de diluição de 1:800 foi aplicado para se obter uma concentração final de 12,5 μ g mL⁻¹. As diluições de soluções estoque, para preparar um pool, foram feitas com água ultrapura” (JANK et al., 2012).

4.3.2 LC-MS/MS

“O sistema consiste de um CLAE AGILENT série 1100 com uma bomba quaternária, um desgaseificador a vácuo e um amostrador automático, acoplado com um espectrômetro de massa API 5000 triplo quadrupolo (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)” (JANK et al., 2012).

“A separação cromatográfica dos compostos foi realizada utilizando uma coluna de CLAE C18 Synergy[®] (150 x 3,0 mm; 4,0 μ m), precedido por uma pré-coluna de C18, 5 μ m, 4,0 x 3,0 mm, ambas obtidas a partir de Phenomenex. Uma fase móvel binária foi utilizada, com um fluxo de 0,5 mL min⁻¹, num tempo total de funcionamento de 12 min.” (JANK et al., 2012). Ver **Tabela 7**.

Tabela 7. Cromatografia líquida de alta eficiência - Gradiente de fase móvel

Tempo (min)	A (%) – água ultrapura com 0,1% de ácido fórmico	B (%) – acetonitrila com 0,1% de ácido fórmico
2	100	0
3	5	95
3	5	95
4	100	0

Fonte: JANK et al., 2012.

“A ionização por electrospray (ESI) no modo positivo foi utilizada para a detecção e quantificação dos antibióticos específicos. A voltagem ajustada em 4000 V; e a temperatura para 300°C. A aquisição foi realizada por meio do monitoramento de múltiplas reações para obter pontos de observação suficientes para confirmar cada analito” (JANK et al., 2012).

“Parâmetros de massa foram otimizados por meio de infusão dos compostos, em uma concentração de 250 ppb, por meio de uma bomba de seringa a uma taxa de fluxo de 10 $\mu\text{l min}^{-1}$, em fase móvel (componente A: componente B, 50:50). Após a identificação de mais íons abundantes fragmentados para todos os compostos, assim como os parâmetros de ionização para cada transição particular, os cromatogramas de monitoramento de múltiplas reações foram obtidos, indicando a ordem de retenção para os compostos selecionados. A análise de fluxo de injeção foi, em seguida, executada para todos os compostos para otimizar as condições de fonte de íons no espectrômetro de massa: fonte temperatura a 300°C, cortina de gás (CUR) em 12 psi, tensão de pulverização do íon em 4000 V, fonte de gás 1 (GS1) em 50V e gás 2 (GS2) a 50 V, o gás de colisão em 4V e potencial de entrada a 10 V. Todos os dados foram processados por versão do software Analyst 1.4.2 (Applied Biosystems)” (JANK et al., 2012).

“Condições de monitoramento de múltiplas reações, tempos de retenção típicos, potencial de desagregação ótimo, célula de colisão potencial e as energias de colisão são mostrados na **Tabela 8** para todos os componentes, bem como típicos produtos iônicos gerados sob estas condições” (JANK et al., 2012).

Tabela 8. Condições de monitoramento de múltiplas reações utilizadas no espectrômetro de massa

Composto	Íon Precursor [M+H] ⁺	Transições observadas	Potencial de degradação ótimo (V)	Energia de colisão (V)	Célula de colisão potencial (V)	Tempo de retenção (min)
Ceftiofur	524	524>241	126	25	16	7,30
		524>210	126	79	10	
Penicilina G	335	335>176	96	17	20	7,57
		335>160	96	17	18	
Penicilina V	351	351>114	86	45	16	7,70
		351>160	86	19	22	
Oxacilina	402	402>160	96	19	16	7,82
		402>243	96	19	26	
Cloxacilina	436	436>160	101	19	16	7,95
		436>277	101	19	30	
Dicloxacilina	467	467>114	106	47	24	8,10
		467>160	106	19	16	

Fonte: JANK et al., 2012.

4.3.3 Extração das amostras

“O procedimento de extração otimizado consistiu de subsequente adição de quatro alíquotas de 1,0 mL de acetonitrila a um volume de 2,0 mL de amostra de leite, misturando, num vórtice por cerca de 10 s, aproximadamente, entre cada adição. Após este passo, a amostra foi misturada em um agitador orbital durante 15 min, em seguida, 1,0 g de cloreto de sódio foi adicionado, e mais 15 min de mistura no agitador orbital foram realizadas. As amostras foram, em seguida, centrifugadas durante 5 min, a cerca de 3000 G sob-refrigeração (5°C). Alíquotas de sobrenadante foram transferidas para frascos de CLAE e submetidas à análise LC-MS/MS. Um volume de 10 µl de extrato foi injetado no sistema de análise” (JANK et al., 2012).

4.3.4 Efeito de matriz

“A avaliação do efeito de matriz foi realizada através da preparação e análise de três curvas de calibração. Curva tipo I, chamada de curva de solvente, foi preparada por diluição da solução padrão na fase móvel diretamente dentro do frasco, dando um intervalo de concentrações de 1-200 ppb, de acordo com o LMR para cada substância. Curva tipo II, ou curva de recuperação, foi preparada pela adição de amostras brancas com as quantidades desejadas de β-lactâmicos, que foram extraídos e analisados como amostras convencionais. Curva tipo III, ou curva padrão tecido, foi preparada por adição de uma solução padrão de β-lactâmicos em extratos de amostras brancas depois da extração. Todas as curvas foram feitas no mesmo intervalo de concentração” (JANK et al., 2012).

4.4 ANÁLISE DE COMPOSIÇÃO, CCS E CBT

Foram realizadas análises de composição (gordura, proteína, lactose, sólidos totais, extrato seco desengordurado, ureia e caseína) em espectrômetro FTIR - LactoScope FTIR Analyser, fabricado pela Delta Instruments, pelo método secundário de espectroscopia de infravermelho – Transformada de Fourier (FTIR).

As análises de CCS foram realizadas utilizando um medidor de fluorescência por citometria de fluxo – SomaScope MKII, fabricado pela Delta Instruments.

Os equipamentos para as análises de Composição e CCS trabalham em um sistema combinado denominado CombiScope FTIR (**Figura 9**).

As análises de CBT foram realizadas em um equipamento automático que utiliza citometria de fluxo para contagem de bactérias no leite cru – Bactocount IBC (**Figura 10**), fabricado pela Bentley Instruments.



Fonte: VALENÇA (2013)

Figura 9. Equipamento CombiScope FTIR



Fonte: VALENÇA (2013)

Figura 10. Equipamento Bactocount IBC

4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados obtidos nas análises de Composição, CCS e CBT foram submetidos à análise de variância pelo método dos quadrados mínimos (PROC GLM) e, quando necessário, as médias foram comparadas pelo teste de Tukey com nível de significância de 5%. Para isto foi utilizado o pacote estatístico SAS®.

5 RESULTADOS

5.1 ANÁLISE QUALITATIVA DE MULTIRRESÍDUOS POR LC-MS/MS

As amostras não apresentaram violação para os antibióticos analisados, indicando que não possuíam os analitos pesquisados em valores acima do LMR, entretanto, seis amostras (6,5%) coletadas no verão de 2013 foram positivas para oxitetraciclina, significando que essas amostras apresentavam concentração desta substância acima do CC β (CC β > 25 ppb). As amostras identificadas como positivas pelo método de triagem foram analisadas em metodologia confirmatória específica para o grupo das tetraciclinas. Dentre as seis amostras que foram positivas pelo método de triagem três possuíam concentração acima do CC β pelo método confirmatório, as quais foram: duas amostras do SIE (49,73 ppb e 31,35 ppb) e uma amostra SSI (26,89 ppb); e três amostras apresentaram concentrações inferiores ao CC β , que foram: uma amostra do SIF (11,92 ppb), uma amostra do SIE (13,46 ppb) e uma amostra SSI (7,08 ppb).

5.2 ANÁLISE QUANTITATIVA DE RESÍDUOS DE ANTIBIÓTICOS β -LACTÂMICOS POR LC-MS/MS

As amostras coletadas no inverno de 2012 não apresentaram resíduo de antibióticos β -lactâmicos em concentrações acima do LMR. No entanto, três amostras possuíam resíduos de penicilina G em concentração inferior ao LMR, as quais foram: uma amostra de SIF (0,16 ppb), uma amostra de SIE (2,03 ppb) e uma amostra SSI (0,44 ppb).

No verão de 2013, uma amostra dos fornecedores de leite a laticínios com SIE (1,1% das amostras coletadas nesta estação ou 2,8% das amostras submetidas ao SIE coletadas nesta estação) apresentou resíduo de cloxacilina em concentração superior ao LMR (464 ppb). Este resultado representa uma concentração superior a 15 vezes o LMR.

5.3 ANÁLISE DE COMPOSIÇÃO, CCS E CBT

A estação do ano influenciou a concentração de gordura, proteína, sólidos totais, ureia e caseína, mas não afetou os teores de lactose e extrato seco desengordurado (ESD) e CCS. Foram verificados para os componentes avaliados, com exceção da ureia, valores mais altos no inverno de 2012, comparativamente ao verão de 2013. Todavia o serviço de inspeção não teve efeito sobre a composição química nem sobre a CCS (**Tabela 9**).

De outra parte, houve interação do serviço de inspeção e da estação do ano sobre a CBT. Nas amostras submetidas à inspeção estadual ou sem inspeção, a CBT foi maior no verão de 2013, no entanto, nas amostras submetidas à inspeção federal a CBT foi menor nesta estação do ano. Observa-se também que os resultados do SIE e SSI foram superiores aos encontrados pelo SIF nas duas estações (**Tabela 9**).

Tabela 9. Médias, Coeficientes de Variação (CV) e Nível de probabilidade para composição química, CCS e CBT de leite cru produzido no Agreste de Pernambuco, em função do serviço de inspeção e da estação do ano

Análise	Serviço de Inspeção						CV (%)	Nível de probabilidade (p)		
	Federal		Estadual		Sem Inspeção			Serviço de Inspeção (SI)	Estação do Ano (EA)	SI *EA
	Inverno	Verão	Inverno	Verão	Inverno	Verão				
Gordura (g/100g)	3,54	3,42	3,46	3,23	3,55	3,35	12,4	ns	0,0041	ns
Proteína (g/100g)	3,04	2,99	3,06	2,96	3,03	2,95	7,1	ns	0,0142	ns
Lactose (g/100g)	4,45	4,41	4,40	4,36	4,41	4,35	5,0	ns	ns	ns
Sólidos Totais (g/100g)	12,02	11,84	11,90	11,57	11,98	11,68	5,4	ns	0,0042	ns
ESD (g/100g)	8,48	8,42	8,44	8,34	8,44	8,33	4,2	ns	ns	ns
Ureia (mg/100 mL)	13,94	15,03	13,29	15,05	14,11	15,59	34,0	ns	0,0505	ns
Caseína (g/100g)	2,34	2,29	2,32	2,27	2,31	2,27	7,9	ns	0,0567	ns
CCS (CS/mL)	371.852	454.462	386.250	441.625	369.776	326.833	79,6	ns	ns	ns
CBT (UFC/mL)	429.963	307.268	1.213.778	2.633.972	1.522.862	2.162.286	126,1	< 0,0001	0,0170	0,0596

ESD – Extrato Seco Desengordurado, CCS – Contagem Células Somáticas, CBT – Contagem Bacteriana Total, ns – não significativo

O percentual de amostras fora dos limites estabelecidos pela IN 62 para gordura, proteína e ESD aumentou no verão de 2013 em comparação ao inverno de 2012, exceto nas amostras submetidas ao SIF, nas quais o percentual de amostras fora do limite de gordura caiu de 11,1%, no inverno de 2012, para 3,6%, no verão de 2013; e nas amostras do SIE, que o percentual de amostras fora do limite de ESD diminuiu de 36,1%, no inverno de 2012, para 33,3%, no verão de 2013. Vale salientar que, no verão de 2013, 50% das amostras, submetidas ao SIF e SSI, estavam com teores de ESD abaixo do limite inferior fixado pela IN 62 (**Tabela 10**).

Nos resultados de CCS foram observados também que, o percentual de amostras acima dos limites estipulados pela IN 62 subiu no verão de 2013 em comparação ao inverno de 2012. Já o percentual de amostras com resultados superiores ao valor fixado por esta Instrução Normativa para CBT diminuiu, no verão, para o SIF e o SSI, no entanto, o SIE e SSI apresentaram percentuais de amostras fora do padrão acima de 40% nas duas estações (**Tabela 10**).

Tabela 10. Percentual de amostras fora do padrão, segundo a IN 62, em função do serviço de inspeção e da estação do ano

Análise	Serviço de inspeção					
	Federal		Estadual		Sem Inspeção	
	Inverno 2012	Verão 2013	Inverno 2012	Verão 2013	Inverno 2012	Verão 2013
Gordura	11,1	3,6	11,1	27,8	10,3	25,0
Proteína	14,8	28,6	19,4	25,0	24,1	46,4
ESD	40,7	50,0	36,1	33,3	27,6	50,0
CCS	7,4	25,0	8,3	19,4	10,3	14,3
CBT	18,5	14,3	44,4	63,9	69,0	67,9

IN 62 – Instrução Normativa 62, ESD – Extrato Seco Desengordurado, CCS – Contagem Células Somáticas, CBT – Contagem Bacteriana Total

Avaliando os resultados de CCS, observou-se ainda que, com exceção das amostras submetidas ao SIF no verão de 2013, mais de 50% das amostras apresentaram valores entre 100.000 a 399.000 CS/mL. Vale ressaltar que as amostras sem inspeção possuíam o maior percentual de amostras com CCS inferior a 400.000/mL (68,9% no inverno e 75% no verão), conforme **Tabela 11**.

Tabela 11. Percentual de amostras em três diferentes intervalos de CCS em função do serviço de inspeção e da estação do ano

CS/mL	Serviço de Inspeção					
	Federal		Estadual		Sem Inspeção	
	Inverno 2012	Verão 2013	Inverno 2012	Verão 2013	Inverno 2012	Verão 2013
< 100.000	7,4	3,6	5,6	5,6	17,2	17,9
100.000 a 399.000	51,9	39,3	58,3	55,6	51,7	57,1
≥ 400.000	40,7	57,1	36,3	38,9	31,0	25,0

CCS – Contagem de Células Somáticas

6 DISCUSSÃO

6.1 RESÍDUOS DE ANTIBIÓTICOS

Os resultados encontrados podem indicar respeito às boas práticas agropecuárias na produção leiteira, pois, de acordo com Andrew et al. (2009), se a aplicação de antibióticos ocorrer apenas no período em que a vaca não está produzindo leite e for respeitado o período de carência indicado pelo fabricante do antibiótico para o descarte do leite, quando a aplicação ocorrer no período que o animal está em lactação, será baixo o risco de passagem de resíduos de antibióticos para o leite. Todavia também pode indicar baixa frequência de tratamento com antimicrobianos.

Uma condição observada durante as coletas e que também pode ter contribuído para estes resultados foi a utilização de “plantas medicinais” por alguns produtores, principalmente os denominados pequenos, no tratamento da mastite, em razão do baixo poder aquisitivo deste grupo. Por outro lado, não pode ser descartado o efeito da diluição, que ocorre após a mistura de leite isento de resíduo de antibiótico com o leite contaminado, o que também pode refletir a realidade encontrada nessas amostras. Estes resultados foram semelhantes àqueles observados por Mattos et al. (2010), no Agreste de Pernambuco, em estudo da qualidade do leite, que detectaram a presença de β -lactâmicos em apenas uma amostra (1,89%) utilizando o kit Charm MRL Test.

A baixa taxa de violação das amostras verificada neste trabalho está em conformidade com os resultados reportados pelo PNCRC, que também indicam pouco risco para o consumidor de leite cru, já que não foram encontrados resultados de violações ao LMR para resíduos de antimicrobianos nas amostras de leite analisadas nos últimos anos (SILVA, 2009; BRASIL, 2010; BRASIL, 2011b). Adicionalmente, os resultados do Programa de análises de Medicamentos Veterinários em Produtos de Origem Animal (ANVISA, 2008) indicam que o risco de exposição aos resíduos de antibióticos devido à ingestão de leite UHT e leite em pó é baixo.

6.2 COMPOSIÇÃO, CCS E CBT

Os resultados demonstram que, embora tenha havido redução nas concentrações médias de gordura, proteína, e ESD no verão de 2013, estas se encontravam acima dos limites mínimos estabelecidos pela IN 62, para o leite cru refrigerado, exceto as médias de ESD nas amostras submetidas ao SIE e sem inspeção (**Tabela 9**). Em consequência da diminuição das concentrações destes parâmetros nas amostras desta estação, ocorreu o aumento significativo do percentual de amostras fora do padrão nestes atributos no mesmo período. Entre estes, os teores de ESD, para amostras submetidas ao SIF e SSI, foram os que atingiram maiores percentuais (50%). Provavelmente as menores concentrações desses componentes no verão sejam decorrência de maior participação de alimentos concentrados, provocada pela seca prolongada ora ocorrendo na região, o que concorda com as observações de Zoccal e Carneiro (2008) e EMBRAPA (2010).

Pacheco (2011), em pesquisa realizada no Agreste de Pernambuco também obteve valores médios de composição química dentro dos limites determinados para o leite cru refrigerado, conforme IN 62 (BRASIL, 2011a).

Verificou-se também que, apesar dos valores médios de CCS estarem abaixo do limite máximo estabelecido pela IN 62 em ambas as estações do ano, no verão de 2013 o percentual de amostras fora desse limite aumentou, independentemente das amostras estarem submetidas à inspeção ou não (**Tabela 10**). Isto não significa que tenha aumentado a incidência de mastite, mas foi consequência da mudança do limite Máximo de 750.000 CS/mL até 31/12/12 para 600.000 CS/mL a partir de 01/01/13.

Outro aspecto importante identificado foi que das 184 amostras analisadas, 62% estavam com CCS inferior a 400.000/mL e 9% abaixo de 100.000/mL, todavia, se for considerada apenas as amostras sem inspeção, o percentual de amostra com célula somática menor que 100.000/mL aumenta para, aproximadamente, 17% nas duas estações. CCS inferior a 100.000/mL sugere ausência do processo inflamatório da glândula mamária.

Lima et al. (2006) avaliando leite cru tipo C produzido no Agreste de Pernambuco, observaram que das 301 amostras analisadas, 71% apresentaram CCS menor que 400.000/mL, 14,95% entre 401.000 a 750.000/mL, 5,67% entre 751 0000 a 1.000.000/mL e 7,97%, superior a 1.000.000 CS/mL. O total de 86,38% das amostras, atenderiam aos limites máximos estabelecidos para o Nordeste até o ano de 2010. Dentre as amostras que apresentaram CCS inferior a 400.000/mL, 41,86% tinham valores inferiores a 100.000/mL.

A concentração média de CBT das amostras submetidas ao SIF está dentro dos parâmetros estabelecidos pela IN 62 nas duas estações. Entretanto, os teores médios das amostras com SIE e sem inspeção estão superiores ao limite estipulado por esta Instrução Normativa. Em decorrência disto, os percentuais de amostras acima do limite máximo estabelecido pela IN 62 para o SIE e SSI foram de até 63,9% (SIE, no verão de 2013) e 69,0% (SSI, no inverno de 2012). Altas contagens bacterianas, em amostras com CCS abaixo de 400.000 CS/mL, sugerem deficiência na higiene durante a ordenha e, conseqüentemente, perda de qualidade do produto (YAZID E MOHD YAZID, 1990).

7 CONCLUSÃO

Os resultados encontrados, para os atributos de qualidade avaliados nesta pesquisa, evidenciam que o leite cru produzido no Agreste de Pernambuco apresenta em geral, resíduo de antibiótico abaixo do LMR estabelecido pelo PNCRC, e CCS e composição química, em grande parte, dentro dos padrões exigidos pela IN 62 do MAPA. No entanto, os resultados de CBT, dos produtores que fornecem leite cru a laticínios com SIE e a laticínios sem inspeção, estavam, em sua maioria, superiores ao permitido pela legislação vigente. Estes resultados refletem o efeito do tipo de inspeção sobre a qualidade higiênica do leite cru produzido nesta região.

8 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Diante o exposto, se faz necessária a adoção de procedimentos de ordenha e higienização de equipamentos eficientes, assim como a refrigeração adequada, que associada ao manejo correto, permita a melhoria da qualidade do leite. Para isso é de fundamental importância a implantação de um programa de educação sanitária, junto aos produtores e beneficiadores desse produto.

9 REFERÊNCIAS

- ALBRIGHT, J. L.; TUCKEY, S. L.; WOODS, G. T. General interest: antibiotics in milk: a review. **Journal of Dairy Science**, v. 44, p. 779-807, may, 1961.
- ALMEIDA, A. C. et al. Características físico-químicas e microbiológicas do leite cru consumido na cidade de Alfenas, MG. **Revista Universidade Alfenas**, Alfenas, vol. 5, p. 165-168, 1999.
- ANDREW, S. M. et al. Factors associated with the risk of antibiotic residues and intramammary pathogen presence in milk from heifers administered prepartum intramammary antibiotic therapy. **Veterinary microbiology**, USA, v. 134, p. 150-156, feb. 2009.
- ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Requisitos mínimos para laboratórios de referência em validação de imunoenaios e outras técnicas para a detecção e triagem de resíduos de medicamentos veterinários em alimentos de origem animal, voltados para o Programa de Análises de Resíduos de Medicamentos Veterinários – PAMVet**. 2005
- ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Programa de análise de resíduos de medicamentos veterinários em alimentos de origem animal – PAMVet**. Relatório 2004/2005 - Monitoramento de resíduos em leite exposto ao consumo, 2006.
- ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Perspectiva sobre a análise de risco na segurança dos alimentos**. Curso de sensibilização. Rio de Janeiro: Área de Vigilância Sanitária, prevenção e controle de Doenças, OPAS/OMS, 2008.
- ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Programa de análise de resíduos de medicamentos veterinários em alimentos de origem animal – PAMVet**. Relatório 2006/2007 - Monitoramento de resíduos em leite exposto ao consumo (4º e 5º anos de atividade), 73p. 2009.
- BARBOSA, S. B. P.; JATOBÁ, R. B.; BATISTA, A. M. V. A Instrução Normativa 51 e a qualidade do leite na região nordeste e nos estados do Pará e Tocantins. In: **3º Congresso Brasileiro de Qualidade do Leite**. Recife: CCS Gráfica e Editora, p. 25-33, 2008.
- BAUDITZ, R. Enrofloxacin, clinical evaluation in several animal species, in: **Veterinary Pharmacology, Toxicology and Therapy in Food Producing Animals**, University of Veterinary Science–Unipharma, Budapest, p. 21, 1990.
- BELLINI, J. L. et al. Comércio mundial de lácteos e a participação brasileira. **Revista Balde Branco**, n. 527, p. 68-72, 2008.
- BIRGEL JUNIOR, E. H. Características físico-químicas, celulares e microbiológicas do leite de bovinos das raças Holandesa, Girolando e Gir, criados no estado de São Paulo. 2006. 335 f. Tese (Livre Docência) – **Universidade de São Paulo**, São Paulo, 2006.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal – RIISPOA, 1952.** Rio de Janeiro, RJ, 29 de março de 1952.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Portaria 005 de 24 de abril de 1980 – SIPAMA, MA, DF, Brasília. 24 de abril de 1980.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Portaria 193 de 12 de maio de 1998. **Regulamento Técnico para o Licenciamento e a Renovação de Licença de Antimicrobianos de uso Veterinário.** 12 de maio de 1998.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa n. 42, de 20 de dezembro de 1999. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil.** Brasília, DF, 20 de dezembro de 1999.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa n. 51, de 18 de setembro de 2002. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil.** Brasília, DF, 18 de setembro de 2002.

BRASIL. Instrução Normativa n. 06, de 16 de março de 2010. Publica Resultados do Acompanhamento dos Programas de Controle de Resíduos e Contaminantes em carnes (Bovina, Suína, Aves e Equina), Leite, Ovos, Mel e Pescado, do exercício de 2009, na forma dos anexos à presente Instrução Normativa, em conformidade com a Instrução Normativa n. 14, de 25 de maio de 2009. In: BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil.** Brasília, DF, 23 de março de 2010.

BRASIL. Instrução Normativa n. 06, de 25 de fevereiro de 2011. Publica Resultados do Acompanhamento dos Programas de Controle de Resíduos e Contaminantes em carnes (Bovina, Suína, Aves e Equina), Leite, Ovos, Mel e Pescado, do exercício de 2010. In: BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil.** Brasília, DF, 28 fevereiro de 2011b.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa n. 62 de 29 de dezembro de 2011. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil.** Brasília, DF, p. 6-11, seção 1, 30 de dezembro de 2011a.

CARLOS, L. A. et al. Avaliação físico-química, microbiológica e de resíduos de penicilina, em leite tipo “C” comercializado no município de Campos dos Goytacazes, RJ. **Higiene Alimentar**, v.18, n.123, p.57-60, 2004.

CARVALHO, D. M.; RIOS, G. S. L. Modernização rural: o papel das parcerias numa associação de produtores de leite. In: **XLV Congresso da Sociedade Brasileira de Economia, Administração e Sociologia Rural.** Universidade Estadual de Londrina (UEL) – Londrina- PR, 2007.

CARVALHO, G. R. et al. Competitividade da cadeia produtiva de leite em Pernambuco. Juiz de Fora: **Embrapa Gado de Leite**, 376p., 2009.

CHAMBERS, H. F.; SANDE, M. A. Fármacos antimicrobianos: os aminoglicosídeos. In: GILMAN, A.G. **As bases farmacológicas da terapêutica.** 9 ed. McGraw-Hill Companies. p. 812 - 826, 1997.

DOWLING, P. M. Aminoglycosides. In: GIGUÈRE, S. et al. **Antimicrobial Therapy in Veterinary Medicine**. 4. ed. Ames: Ed. Blackwell publishing. p. 207-230, 2006a.

DOWLING, P. M. Chloramphenicol, Thiamphenicol, and Florfenicol. In: GIGUÈRE, S. et al. **Antimicrobial Therapy in Veterinary Medicine**. 4. ed. Ames: Ed. Blackwell publishing. p. 241-248, 2006b.

DÜRR, J. W. **Como produzir leite de qualidade**. Brasília: SENAR, 36 p. 2007.

EMBRAPA, EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. Uso da Palma Forrageira na alimentação de bovinos leiteiros no semiárido brasileiro. **EMBRAPA Gado de Leite**, Comunicado Técnico 62, ISSN 1678-3131, Juiz de Fora, MG, dez., 2010.

EMBRAPA, EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA– **EMBRAPA Gado de Leite**, Informações Técnicas/Estatística do leite/Produção - Tabela 02.40, fev., 2012b. Disponível em: <http://www.cnp.gl.embrapa.br/nova/informacoes/estatisticas/producao/tabela0242.php>. Acesso em: 22 mai. 2013.

EMBRAPA, EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. **Panorama do Leite – EMBRAPA Gado de Leite**, Boletim eletrônico mensal, Juiz de Fora, Ano 6, n. 71, out., 2012a.

EMBRAPA, EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. Fonte: Adaptado FAO, 2013. **Panorama do Leite – EMBRAPA Gado de Leite**, Boletim eletrônico mensal, Juiz de Fora, Ano 6, n. 75, fev., 2013.

FAGUNDES, C. M. Persistência de antibióticos no leite bovino em condições experimentais e prevalência nos leites tipo “B” e “C” consumidos em Belo Horizonte, 1978. Belo Horizonte: **Universidade Federal de Minas Gerais**; 1980.

FAO. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Food Safety Risk Analysis. A Guide for National Food Safety Authorities. **Food and Nutrition Paper 87**, Rome, 2006.

FERREIRA, M. A. **Controle de qualidade físico químico em leite fluido**. Brasília: Universidade de Brasília, 2007. 17 p. Dossiê Técnico.

FONSECA, L. F. L.; SANTOS, M. V. **Qualidade do leite e Controle de Mastite**. 2. ed. São Paulo: Lemos Editorial, p.169-174, 2001.

FONSECA, G. P. et al. Antibiotic residues in Brazilian UHT milk: a screening study. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 29, n. 2, p. 451–453, abr.– jun., 2009.

GIGANTE, M. L. Importância da qualidade do leite no processamento de produtos lácteos. In: DÜRR, J. W.; CARVALHO, M. P.; SANTOS, M. V. (Org.). **O compromisso com a qualidade do leite no Brasil**. 1. ed. Passo Fundo: Universidade Passo Fundo, p. 235-254, 2004.

GIGANTE, M. L.; COSTA, M. R. Influência das células somáticas nas propriedades tecnológicas do leite e derivados. In: **III Congresso Brasileiro de Qualidade do Leite – CBQL**. Recife - PE, 2008.

GIGUÈRE, S. Tetraciclins and glycolcyclines. In: _____. **Antimicrobial Therapy in Veterinary Medicine**. 4. ed. Ames: Ed. Blackwell publishing, p. 231 - 240, 2006a.

GIGUÈRE, S. Macrolides, Azalides, and Ketolides. In: _____. **Antimicrobial Therapy in Veterinary Medicine**. 4. ed. Ames: Ed. Blackwell publishing, . p. 191 - 205, 2006b.

GILLES, C. J. et al. 231 for ciprofloxacin were used, according to the RISK, J. E.; LYNCH, M. J.; RICE, J. R. J. **Veterinary Pharmacology**. Ther. 14, 400, 1991.

GÓRNIK, S. L. Quimioterápicos. In: SPINOSA, H. S.; GÓRNIK, S. L.; BERNARDI, M. M. **Farmacologia Aplicada à Medicina Veterinária**. 3 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p.398-408, 2002.

KANG'ETHE, E. K. et al. Investigation of the risk of consuming marketed milk with antimicrobial residues in Kenya. **Food Control**, v. 16, p. 349–355, 2005.

KAPUSNIK-UNER, J. E.; SANDE, M. A.; CHAMBERS, H. F.; Fármacos antimicrobianos: Tetraciclins, cloranfenicol, eritromicina e outros fármacos antibacterianos. In: GILMAN, A. G. **As bases farmacológicas da terapêutica**. 9 ed. McGraw-Hill Companies. p. 826–849, 1997.

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Produção da Pecuária Municipal**. Rio de Janeiro, v. 39, p. 1-63, 2011.

JANK, L. et al. β -lactam antibiotics residues analysis in bovine Milk by LC-ESI-MS/MS: a simple and fast liquid-liquid extraction method. **Food Additives and Contaminants**. v. 29, n. 4, p. 497-507, abr. 2012.

JAY, J. M. **Modern food microbiology**. 7th. Ed. ASPEN Publishers, Gaithersburg, MD. 854p. 2005.

JONES, G. M. **On-farm test for drug residues in milk**. Petersburg: Virginia State University, 6 p. 1999.

LAGE, A. D. **Avaliação de Kits de inibição microbiana para a detecção de resíduos de antimicrobianos em diferentes concentrações no leite**. 2010. 44f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2010.

LANAGRO – RS/MET RPM 10 02. Laboratório Nacional Agropecuário – Rio Grande do Sul/Laboratório de Análise de Resíduos de Pesticidas e Medicamentos Veterinários /Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. **Método de ensaio**. 15p, 2012.

LIMA, M. C. G.; SENA, M. J.; MOTA, R. A.; MENDES, E. S.; ALMEIDA, C. C.; SILVA, R. P. P. E. Contagem de Células Somáticas e Análises Físico-Químicas e Microbiológicas do leite cru tipo c produzido na região Agreste do estado de Pernambuco. **Arquivos do Instituto Biológico**. São Paulo, v.73, n.1, p.89-95, jan. - mar., 2006.

- LINDMARK-MANSSON, H. et al. Influence of milk components, somatic cells and supplemental zinc on milk processability. **International Dairy Journal**, vol. 10, p. 423-433, 2000.
- MAMANI, M. C. V. Desenvolvimento e validação de métodos para a determinação de antimicrobianos em leite e fármacos usando cromatografia líquida de alta eficiência e eletroforese capilar. 2007. Tese (Doutorado) – **Universidade Estadual de Campinas**, São Paulo, 2007.
- MAMANI, M. C. V.; REYES, F. G. R.; RATH, S. Multiresidue determination of tetracyclines, sulfonamides and chloramphenicol in bovine milk using CLAE-DAD. **Journal Food Chemistry**, v. 117, n. 3, p. 545–552, 2009.
- MANDELL, G. L.; PETRI JR, W. A. Fármacos 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. p. 775-789, 1997.
- MARTINS, M. E. P. et al. Qualidade de leite cru produzido e armazenado em tanques de expansão no estado de Goiás. **Ciência Animal Brasileira**, Goiânia, v. 9, n. 4, p. 1152-1158, 2008.
- MARTINS-JÚNIOR, H. A. et al. A rapid method to determine antibiotic residues in milk using liquid chromatography coupled to electrospray tandem mass spectrometry. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 18, n. 2, p. 397-405, 2007.
- MARZUELA, M. D.; MORENO-BONDI, M. C. Multiresidues determination of fluoroquinolones in milk by column liquid chromatography with fluorescence and ultraviolet absorbance detection. **Journal of Chromatography A**. v. 1034, p. 25-32, 2004.
- MATTOS, M. R. et al. Qualidade do leite cru produzido na região do Agreste de Pernambuco, Brasil. Semina: **Ciências Agrárias**, Londrina, v. 31, n. 1, p. 173-182, jan. - mar., 2010.
- MEETSCHEN, U.; PETZ, M. Capillary gas chromatographic method for determination of benzylpenicillin and other beta-lactam antibiotics in milk. **Journal of the Association of Official Analytical Chemists**. v. 7, p. 373-378, 1990.
- MEDEIROS, N. G. A. et al. Detecção de antibióticos no leite “in natura” consumido no município de Patos-PB. In: **Congresso pernambucano de medicina Veterinária, 4, 1999**, Recife. **Anais...** Recife: SPEMVE, p. 225-226, 1999.
- MILINSKI, C. C.; GUEDINE, P. S. M.; VENTURA, C. A. A. **O sistema agroindustrial do leite no Brasil: Uma análise sistêmica**. In: Anais do IV Congresso Brasileiro de Sistemas: Centro Universitário de Franca – Uni-FACEF, 2008.
- MITCHELL, J. M. et al. Antimicrobial drug residues in milk and meat: causes, concerns, prevalence, regulations, tests, and test performance. **Journal of Food Protection**, Ames, v.61, n.6, p.742-756, jun., 1998.

MONTEIRO, A. A. et al. Características da produção leiteira na região do agreste do estado de Pernambuco. **Seminário de Ciências Agrárias**, Londrina, v. 28, n. 4, p. 665-674, out.–dez., 2007.

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. et al. Leite cru de quatro regiões leiteiras brasileiras: Perspectivas de atendimento dos requisitos microbiológicos estabelecidos pela Instrução Normativa 51. **Ciências e Tecnologia dos Alimentos**. v. 25, n.1, p.191-195, jan–mar, 2005.

NERO, L. A. et al. Resíduos de antibióticos em leite cru de quatro regiões leiteiras no Brasil. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.27, p. 391-393, abr.–jun., 2007.

NIELSEN, S. S., **Food Analysis**, second ed., New York, Kluwer Academic/Plenum Publishers, 1999.

NORO, G. et al. Fatores ambientais que afetam a produção e a composição do leite em rebanhos assistidos por cooperativas no Rio Grande do Sul. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.35, n.3, p.1129-1135, 2006.

NOUWS, J. F. M. et al. Testing of raw milk for tetracycline residues. **Journal of Dairy Science**. v. 81, p. 2341-2345, set., 1998.

ORDÓÑEZ, J. A. et al. **Tecnologia de alimentos** – Alimentos de origem animal. Porto Alegre: Artmed, v. 2, p. 13, 2005.

PACHECO, M. S. Leite cru refrigerado do Agreste Pernambucano: caracterização da qualidade e do sistema de produção, 2011, 87f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia dos Alimentos) – **Universidade Federal Rural de Pernambuco**, Recife, 2011.

PALES, A. P. et al. A importância da contagem de células somáticas e contagem bacteriana total para a melhoria da qualidade do leite no Brasil. **Revista Eletrônica Faculdade Montes Belos**, Goiás, v.1, n.2, p. 162-173, 2005.

PODHORNIK, L. V.; LEAKE, S.; SCHENCK, F. J. Stability of tetracycline antibiotics in raw milk under laboratory storage conditions. **Journal of Food Protection**, v. 62, n. 5, p. 547-548, may, 1999.

POSYNIK, A. et al. Determination of fluoroquinolones residues in animal tissues by liquid chromatography. **Biomedical Chromatography**, v. 13, p. 279-285, 1999.

PRESCOTT, J. F. Beta-lactam Antibiotics: penam penicilins. In: GIGUÈRE, S. et al. **Antimicrobial Therapy in Veterinary Medicine**. 4. ed. Ames: Ed.Blackwell publishing. p.159-170, 2006.

RAIA JÚNIOR, R. B.; COSTA, E. O. Influence of mastitis on the withdraw period of several intramammary and parenteral antimicrobial agents used in lactating cows. In: **International Mastitis Congress**. Vancouver, CA., Set., 2001.

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

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

SILVA, T. S. Abordagem crítica sobre o Programa Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes em Leite com ênfase em antibióticos. 2009. 39f. Seminário (Mestrado em Ciência Animal) – **Universidade Federal de Goiás**, Goiânia, 2009.

SIVAKESAVA, S.; IRUDAYARAJ, J. Rapid determination of tetracycline in milk by FT-MIR and FT-NIR Spectroscopy. **Journal of Dairy Science**, v. 85, p. 487-493, mar., 2002.

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, p. 379-385, 2002a.

SPINOSA, H. S. Antibióticos: Beta-lactâmicos: penicilinas e cefalosporinas. In: SPINOSA, H. S.; GÓRNIK, S. L.; BERNARDI, M. M. **Farmacologia Aplicada à Medicina Veterinária**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p.409-415, 2002b.

SPINOSA, H. S. Antibióticos: Tetraciclina, cloranfenicol e análogos. In: _____. **Farmacologia Aplicada à Medicina Veterinária**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 420-424, 2002c.

STOLKER, A. A. M.; BRINKMAN, U. A. Th. Analytical strategies for residue analysis of veterinary drugs and growth-promoting agents in food-producing animals—a review **Journal of Chromatography A**. v. 1067, p. 15–53, 2005.

TENÓRIO, C. G. M. S. C. Avaliação da eficiência do teste COPAN (Microplate e Single) na detecção de resíduos de antimicrobianos no leite. 2007. 59f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – **Universidade Federal de Minas Gerais**, Belo Horizonte, 2007.

TRONCO, V. M. **Manual para Inspeção da Qualidade do Leite**. 3.ed. São Paulo: Editora da Universidade de Santa Maria, 206p, 2008.

VAN SCHAİK, G.; LOTEM, M.; SCHUKKEN, Y. H. Trends in somatic cells counts, bacterial counts, and antibiotic residue violations in New York State during 1999-2000. **Journal of Dairy Science**, Savoy, v.85, n. 4, p. 782-789, abr. 2002.

WALSTRA, P.; WOUTERS, J. T. M.; GEURTS, T. J. **Dairy Science and Technology**. 2 ed. Boca Raton: CRC Press, 808p., 2006.

YAZID, B. H. A. M. M. & MOHD YAZID, B. H. A. M. Effects of low temperature storage and thermisation on the quality of raw and heat treated milk. **Universities of Great Britain and Ireland and the Council for National Academic Awards**, p.1585, (Index to Theses), 1990.

ZOCCAL, R. et al. A nova pecuária leiteira brasileira. In: **3º Congresso Brasileiro de Qualidade do Leite**. Recife: CCS Gráfica e Editora, p.85 - 95, 2008.

ZOCCAL, R.; CARNEIRO, A. V. Conjuntura atual do leite brasileiro. **Balde Branco**, São Paulo, v. 44, n. 528, p. 94-95, out. 2008.