

SABRINA MARIA LINS GURJÃO SANTOS

**PESQUISA MICROBIOLÓGICA E DE RESÍDUOS
ANTIMICROBIANOS EM AMOSTRAS DE LEITE
COMERCIALIZADAS NO MUNICÍPIO DE BREJÃO-PE**

RECIFE

2012

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA VETERINÁRIA

SABRINA MARIA LINS GURJÃO SANTOS

PESQUISA MICROBIOLÓGICA E DE RESÍDUOS
ANTIMICROBIANOS EM AMOSTRAS DE LEITE
COMERCIALIZADAS NO MUNICÍPIO DE BREJÃO-PE

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Veterinária do Departamento de Medicina Veterinária da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciência Veterinária.

Orientadora:
Profa.Dra.Maria Cristina de Oliveira Cardoso
Coelho

Co-Orientadores:
Profa.Dra. Lílian Sabrina Silvestre de
Andrade
Dr. Éden Cavalcanti Albuquerque Júnior

RECIFE

2012

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA VETERINÁRIA

PESQUISA MICROBIOLÓGICA E DE RESÍDUOS
ANTIMICROBIANOS EM AMOSTRAS DE LEITE
COMERCIALIZADAS NO MUNICÍPIO DE BREJÃO-PE

Dissertação de Mestrado elaborada por

SABRINA MARIA LINS GURJÃO SANTOS

Aprovada em/...../.....

BANCA EXAMINADORA

Profa Dra MARIA CRISTINA DE OLIVEIRA CARDOSO COELHO
Orientadora – Departamento de Medicina Veterinária da UFRPE

Profa Dra LÍLIAN SABRINA SILVESTRE DE ANDRADE
Departamento de Medicina Veterinária da UFRPE

Profa Dra GRAZIELLE ANAHY DE SOUZA ALEIXO
Unidade Acadêmica de Garanhuns/UFRPE

Profa Dra ANDREA PAIVA BOTELHO LAPENDA DE MOURA
Departamento de Medicina Veterinária da UFRPE

Dedico este trabalho à DEUS, pois sem ele nada é possível.

AGRADECIMENTOS

A minha filha LUIZA, por ela existir e ser a razão da minha vida;

Ao meu marido EMERSON, pela paciência que teve em todos os momentos;

A minha mãe SOCORRO que acha que sou a melhor do mundo;

A minha orientadora MARIA CRISTINA pela oportunidade de realizar o mestrado;

A minha co-orientadora LÍLIAN SABRINA pela disponibilidade permanente para me ajudar e pela generosidade com que partilha comigo os vossos conhecimentos e principalmente pela sua amizade de “amiga-irmã”, que será para sempre motivo de muito orgulho para mim;

As minhas amigas NAIR, TÁSSIA, ANA ANÁLIA, GRAZIELLE ANAHY e DEINHA DOS GATOS pelo apoio, ajuda e companheirismo dados ao longo de todo o período do mestrado;

A professora ANDRÉA BOTELHO e monitora ANA ELIZABETH pela ajuda e orientação para a realização das análises microbiológicas;

A FACEPE pelo apoio financeiro;

E a todos que possam ter contribuído de alguma forma com resultados positivos para realização desta pesquisa.

RESUMO

Título: Pesquisa microbiológica e de resíduos antimicrobianos em amostras de leite comercializadas no município de Brejão-PE

Apesar do contínuo crescimento da bovinocultura de leite e deste fazer parte da alimentação humana como uma das principais fontes de proteína animal, muitos brasileiros consomem leite sem nenhum processamento, ou seja, *in natura*, o qual muitas vezes tem sua qualidade comprometida, tanto nos padrões físico-químicos e microbiológicos, quanto na presença de contaminantes ou resíduos acima dos níveis permitidos pela legislação. Nos últimos anos, a questão da qualidade e da segurança dos alimentos tem recebido maior atenção por parte das autoridades, dos produtores, dos industriais, dos profissionais responsáveis pela qualidade dos alimentos e por parte dos consumidores. Objetivou-se com este trabalho avaliar a qualidade do leite bovino *in natura* frente a presença de contaminação microbiana e de resíduos antimicrobianos. Para tanto foram analisadas 42 amostras de leite provenientes de propriedades no município de Brejão-PE, as quais foram submetidas à cultura microbiana para identificação de *Staphylococcus* spp., realização de antibiograma frente à Penicilina, Amoxicilina, Tetraciclina, Estreptomicina e Gentamicina e à detecção de resíduos microbianos através do teste qualitativo de inibição microbiana (ECLIPSE-50[®]). Em 88,09% das amostras ocorreu crescimento de *Staphylococcus* spp. Das cepas analisadas, 97,62% apresentaram resistência a algum dos antimicrobianos analisados, sendo observada em 76,19% das cepas resistência a Gentamicina, 83,33% a Estreptomicina, 80,95% a Tetraciclina, 33,33% a Amoxicilina e 47,62% a Penicilina. Em relação à presença de resíduos de antimicrobianos em 45,24%, detectou-se níveis acima dos limites permitidos na análise qualitativa. Concluindo-se que as amostras de leite comercializadas no município de Brejão apresentaram contaminação química e biológica, tornado-se impróprio para o consumo humano.

Palavras-chave: resíduos medicamentosos, contaminação, antibióticos, *Staphylococcus*.

ABSTRACT

Title: Search microbiology and antimicrobial residues in milk sold in the municipality Brejão-PE

Although the continuous growth of dairy cattle and its portion in human alimentation as one of most important source of animal protein, many Brazilians consume milk without any processing, that is, fresh milk, which, in many cases, has compromised its quality, such as under physicochemical and microbiological patterns, and the presence of contaminants or residues above the levels permitted by legislation. In the last years, the quality matter and food safety has been of major concern by the authorities, producers, industry and professionals responsible for food quality and by consumers. The piece of work has the objective to evaluate the quality of fresh milk dairy cattle against the presence of microbial contamination and antimicrobial residues. For that, 42 samples of milk were analysed from properties in the city of Brejão-PE, which were submitted to microbial culture for identification of *Staphylococcus* spp., realization of antibiogram gains penicillin, amoxicillin, tetracycline, streptomycin and gentamicin and for detection of microbial residues through the qualitative microbial inhibition test (ECLIPSE-50 ®). In 88,09% of the samples *Staphylococcus* spp. grew from the analysed strains, 97,62% presented resistance to some antimicrobial analysed, observing 76,19% resistance to Gentamicin, 83,33% to streptomycin, 80,95% to tetracycline, 33,33% to amoxicillin and 47,62% to penicillin. In relation with the presence of antimicrobial residues, in 45,24% were detected levels above permitted limits in the qualitative analysis. It is concluded that the milk samples commercialized in the city of Brejão present chemical and biological contamination, making them inappropriate to human consume.

Keywords: drug waste, contamination, antibiotics, *Staphylococcus*.

LISTA DE FIGURAS

		Página
Figura 1	Percentual da contaminação de <i>Staphylococcus</i> spp. nas amostras de leite analisadas...	52
Figura 2	Percentual de resistência das amostras de <i>Staphylococcus</i> spp. frente aos antimicrobianos pesquisados...	53
Figura 3	Percentual de amostras positivas e negativas para a presença de resíduos de antimicrobianos.	54

LISTA DE QUADROS

	Página
Quadro 01 Antimicrobianos monitorados no leite de acordo com o PNCRC (Programa Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes).....	24
Quadro 02 Limite Máximo de Resíduo de alguns antimicrobianos no leite estabelecidos pelo Codex Alimentarius, Estados Unidos, União Européia e Brasil.....	26

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

(R): Resistente.

(S): Sensível.

µL: Microlitros.

BHI: BactoBlain Heart.

CASP: Laboratório de Pesquisas de Inspeção de Carne e Saúde Pública do Departamento de Medicina Veterinária da Universidade Federal Rural de Pernambuco.

CRF: Fator de Reação com a Coagulase.

h: horas.

H₂O₂: Peróxido de Hidrogênio.

H₂O₂: peróxido de hidrogênio.

IBGE: Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística.

IN51: Instrução Normativa 51.

JECFA - Comitê para Aditivos Alimentares da FAO/WHO/FDA dos Estados Unidos

km²: Quilômetros quadrados.

LMR: limite máximo de resíduos.

MA: Ministério da Agricultura.

MAA: Ministério da Agricultura e Abastecimento.

MAPA: Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento.

ml: mililitros.

mm: milímetro.

°C: Graus centígrados.

PAMvet: Programa de Análise de Resíduos de Medicamentos Veterinários em Alimentos.

PARA: Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos.

PNCRB: Plano Nacional de Controle de Resíduos Biológicos em Produtos de Origem Animal.

PNCRC: Programa Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes.

PNQL: Programa Nacional de Melhoria da Qualidade do Leite.

ppb: parte por bilhão.

ppm: parte por milhão.

RDC: Diretoria Colegiada da Agência Nacional de Vigilância Sanitária.

S.: *Staphylococcus*.

SIDAN: Sindicato Nacional da Indústria para Saúde Animal.

UHT: Ultra Alta Temperatura.

µg: Microgramas.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
2	REVISÃO DE LITERATURA	14
2.1	Leite.....	14
2.2	Agreste Pernambucano.....	17
2.3	Antimicrobianos.....	17
2.4	Resistência microbiana.....	20
2.5	Legislação.....	22
2.6	Resíduo de antimicrobianos.....	26
2.7	Análises Laboratoriais do leite.....	29
2.7.1	Análises microbiológicas.....	29
2.7.2	Análises de resíduos de antimicrobianos.....	33
3.	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	34
4.	REFERÊNCIAS.....	35
5	Artigo Científico.....	44
5.1	Introdução.....	46
5.2	Material e Métodos.....	48
5.3	Resultados e Discussão.....	51
5.4	Conclusão.....	55
5.5	Referências.....	55
	ANEXO.....	61
	Entrevista semi-estruturada.....	62
	APÊNDICE.....	63
	Normas da revista Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia...	64

1. INTRODUÇÃO

No Brasil, as legislações como a Portaria MA nº 301 de 19 de abril de 1996, que regulam os produtos de uso veterinário delegam competência ao Ministério da Agricultura quanto às normas relativas ao registro e fiscalização destes produtos e dos estabelecimentos que os fabriquem, manipulem, fracionem, comercializem, importem ou exportem (BRASIL, 1998).

Dentre os produtos de origem animal, o leite é um dos alimentos de maior importância para a sociedade humana, do ponto de vista de saúde pública, pois ocupa lugar de destaque na nutrição humana, constituindo um alimento essencial para todas as idades (POSANO et al.,2001).

O leite deve apresentar condições sanitárias adequadas, sendo sua qualidade higiênica influenciada principalmente, pelo estado sanitário do rebanho, manejo dos animais e dos equipamentos durante a ordenha, além da presença de microrganismos, resíduos de drogas e odores estranhos (BRITO, 1997).

O uso indiscriminado de medicamentos em animais é cultural; criadores se acham aptos a diagnosticar, prescrever e medicar seus animais seja por conta própria ou através de terceiros sem competência também para fazê-lo, desconsiderando que essa prática pode vir a prejudicar seu animal, seu rebanho, ocasionando prejuízos econômicos, além de poder determinar riscos à saúde humana através de resíduos medicamentosos presentes em produtos e subprodutos de origem animal utilizados na alimentação humana (VILLA e PINTO, 2008).

A utilização inadequada destes medicamentos é de grande relevância, tendo em vista que desencadeia diversos problemas tanto na qualidade do leite quanto na saúde de quem o consome (VILLA e PINTO, 2008).

De acordo com Bishop e White (1984), os medicamentos mais utilizados são os antimicrobianos, por serem amplamente utilizados no tratamento de doenças no gado leiteiro e também como suplementos em sua dieta, como promotores de crescimento, em doses sub-terapêuticas.

A presença de resíduos de antimicrobianos representa um risco ao consumidor, tornando-se um sério problema na área econômica e de saúde pública (BERSOT et al., 2005), sendo também um fator de desclassificação, uma vez que torna a matéria-prima inadequada para uso na indústria e para o consumo humano, já que não há tratamento tecnológico que consiga inativar tais substâncias (SANTOS, 2009).

O uso indiscriminado de antibióticos e a não obediência do período de carência indicado após a última aplicação do medicamento no animal, para a utilização do leite para consumo humano, tem sido relatado há décadas por pesquisadores. A importância deste fato está relacionada, principalmente, ao aspecto da saúde pública, em que o consumo sistemático de leite contendo resíduos pode acarretar sérios riscos à saúde humana, além da possibilidade de favorecer o desenvolvimento de formação de resistência de microrganismos patogênicos (DENOBILO e NASCIMENTO, 2004).

Neste contexto, objetivou-se com este trabalho avaliar a qualidade do leite comercializado no município de Brejão-PE, quanto à presença de resíduos de antimicrobianos e a contaminação microbiana por *Staphylococcus* spp.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Leite

A produção mundial de leite em 2008 chegou a mais de 578 bilhões de litros. Os Estados Unidos lideram o ranking de países produtores de leite com mais de 86 bilhões de litros produzidos, seguido da Índia, com uma produção de 44 bilhões. O Brasil aparece como o sexto maior produtor com mais de 27 bilhões de litros; e vem apresentando constante crescimento na produção de leite (FAO, 1996).

A região Nordeste, em relação à produção nacional, vem ganhando força na última década, tendo sido a segunda região que mais cresceu em participação neste período (cerca de 69%). Atualmente o nordeste brasileiro é responsável por 12% de todo o leite produzido no País (FAO, 1996).

A distribuição geográfica da produção leiteira pernambucana demonstra que o Agreste continua sendo a principal mesorregião produtora, respondendo atualmente por 73% da produção estadual, bem acima do Sertão pernambucano, segunda mesorregião de maior produção (ALVES et al., 2010).

O leite é um dos alimentos mais utilizados na dieta humana em todas as etapas da vida, principalmente por ser tão completo do ponto de vista nutricional (PASCHOA, 1997; GARCIA et al., 2000).

Devido à sua riqueza nutricional, torna-se bastante susceptível ao desenvolvimento de microrganismos, provenientes do próprio animal, do ambiente, do homem, de utensílios utilizados na ordenha e do tanque (ATAÍDE et al., 2008).

No Brasil, de modo geral, o leite é obtido sob condições higiênico-sanitárias inadequadas e, em consequência, apresenta baixa qualidade microbiológica, constituindo um risco à saúde da população quando consumido sem tratamento térmico, situação comum no Nordeste. A baixa qualidade do produto pode ser atribuída a deficiências no manejo e higiene de ordenha, manutenção e desinfecção inadequada dos equipamentos, refrigeração ineficaz ou inexistente e mão de obra desqualificada. Assim, cuidados higiênicos para evitar a contaminação do leite devem ser tomados desde a ordenha até o produto final, por meio das Boas Práticas de Produção e Fabricação (MONTEIRO et al., 2007).

Infecções no úbere, mesmo que sub clínicas, influenciam grandemente a composição do leite, sendo que o principal efeito é o abaixamento da concentração de gordura, lactose e caseína, e aumento no conteúdo de proteínas do soro e cloretos. Estados mais avançados de infecção resultam em um leite com composição química diferente da normal. A mastite bovina é uma doença multifatorial, de etiologia complexa e variada, e se encontra disseminada em todas as regiões produtoras de leite. A maioria das infecções tem origem bacteriana, predominando os agentes etiológicos *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus agalactiae* (PELCZAR et al., 1996).

As bactérias pertencentes ao gênero *Staphylococcus* possuem elevada relevância, sendo causadores de toxinfecções alimentares, devido à sua capacidade de sobrevivência no meio e à produção de muitas toxinas, dentre elas as enterotoxinas e a toxina 1 da síndrome do choque tóxico (BAIRD-PARKER, 1990).

Logo, é importante além da contagem de bactérias mesófilas aeróbias viáveis, avaliar a presença de *Staphylococcus* spp., coliformes totais e termotolerantes no leite cru, ressaltando o *S. aureus* como principal contaminante do leite, devido a este ser causador das mastites (SILVA, 1998).

Pertencente à família Micrococaceae, o gênero *Staphylococcus* possui cocos Gram positivos, imóveis, mesófilos, não esporulados e estão agrupados irregularmente em forma de cachos. São catalase positivos e anaeróbios facultativos (SNEATH, 1986). Hoje o gênero tem um total de 33 espécies (DOWNES e ITO, 2001). Entre elas, o *Staphylococcus aureus* pode ser diferenciado por coagular plasma, produzir Dnase termoestável e fermentar o manitol (SNEATH, 1986; ICMSF, 1996).

A produção de coagulase como indicação de patogenicidade do *S. aureus* é muito utilizada (VANDERZANT e SPLITTSTOESSER, 1992; FDA, 1995).

O método de eleição para contagem dos estafilococos em alimentos é o método de contagem em placas utilizando o ágar Baird - Parker. As colônias típicas são negras, brilhantes, delimitadas e com dois halos, sendo associadas estas características a capacidade do microrganismo em produzir a enzima coagulase, e conseqüentemente ser um potencial produtor de enterotoxina (SILVA et al., 1997).

A qualidade do leite tem sido muito discutida atualmente dentro do cenário nacional de produção leiteira (GUERREIRO et al., 2005), sendo influenciada por múltiplos fatores, entre os quais se destacam os zootécnicos, tipo de manejo, saúde das tetas, alimentação, potencial genético dos rebanhos e armazenagem do leite. Os parâmetros físico-químicos, microbiológicos e higiênicos sanitários são utilizados para verificar e determinar a qualidade do leite, como a contagem de células somáticas, contagem de microrganismos psicrótróficos e resíduos de antimicrobianos, constituindo-se como exigências quanto ao parâmetro de qualidade (SANTOS e FONSECA, 2001).

O controle higiênico-sanitário se faz necessário, desde a obtenção de leite cru nas propriedades até a embalagem do produto final, pois a sua produção sob condições indesejadas de higiene torna-o veículo de transmissão de doenças ao consumidor final (CARDOSO e ARAÚJO, 2003).

Para melhorar o crescimento na produção e consumo do leite, é indispensável à melhoria de sua qualidade e segurança, conseqüentemente, aumentando a vida de prateleira do produto final (ATAÍDE et al., 2008).

Sendo assim, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) criou novas políticas de incentivo à produção leiteira, resultando no desenvolvimento do Programa Nacional de Melhoria da Qualidade do Leite (PNQL) e na elaboração da Instrução Normativa 51-IN51 (ATAÍDE et al., 2008).

2.2 Agreste Pernambucano

Na região do Agreste Meridional de Pernambuco, encontra-se o município de Garanhuns. Sendo historicamente uma região produtora de leite, os excedentes gerados por ela contribuem para o abastecimento de todas as mesorregiões do estado. A atividade leiteira no município de Garanhuns é responsável pela captação de cerca de 70% da produção da bacia leiteira pernambucana, formando, assim, um eixo importante de produção e distribuição de leite para o Norte/Nordeste (BORGES et al., 2009).

Segundo dados do IBGE (2006), Brejão foi criado em dezembro de 1908 com a denominação de Brejão de SantaCruz, integrando o território do município de Garanhuns. Está localizado na mesorregião Agreste e na Microrregião Garanhuns do Estado de Pernambuco, limitando-se a norte e leste com Garanhuns, a sul com Lagoa do Ouro e a oeste com Terezinha.

A área municipal ocupa 161,2 km² e representa 0.16% do Estado de Pernambuco. Passou a constituir município autônomo em 1958. Possui uma população de 8812 habitantes (IBGE, 2010). Segundo o Censo Agropecuário de 2006, possui 203 estabelecimentos agropecuários produtores de leite (IBGE, 2006).

2.3 Antimicrobianos

Os antimicrobianos são substâncias químicas inespecíficas ou específicas que atuam sobre os microrganismos em geral, patogênicos ou não. Pertencem ao primeiro grupo os desinfetantes e anti-sépticos e ao segundo, os quimioterápicos e os antibióticos, que são substâncias sintetizadas em laboratório e produzidas parcial ou totalmente por microrganismos, respectivamente (SPINOSA, 2002).

O primeiro antimicrobiano foi descoberto em 1929, quando Alexander Fleming, observou a ação da penicilina frente ao crescimento de estafilococos. Na década de 40 este medicamento começou a ser produzido em grande escala no intuito de satisfazer as necessidades da guerra (FILHO, 2003). A descoberta científica da penicilina desencadeou profundas alterações no que concerne o tratamento das doenças infecciosas, proporcionando um alto investimento científico no estudo de outros antibióticos (PEREIRA, 2005).

Entre os anos de 1940 e 1960 foram descobertos diversos outros antimicrobianos derivados de produtos naturais, sendo a maior parte destes eficientes no tratamento de bactérias Gram-positivas como, por exemplo, cefalosporinas, estreptomicina, tetraciclina, eritromicina, vancomicina e cloranfenicol. Nessa época também foram introduzidos três derivados sintéticos: isoniazida, trimetropim e metronidazol (FERNANDES, 2006).

De acordo com Fernandes (2006), já entre os anos de 1960 a 1980 chegaram ao mercado os antibióticos semi-sintéticos, capazes de combater bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. Estes antibióticos são análogos aos antibióticos naturais já existentes, sendo grande parte destes obtida por meio de protótipos naturais microbianos: derivados β -lactâmicos (análogos de penicilina e cefalosporina, ácido clavulânico e aztreonam), análogos da tetraciclina e derivados aminoglicosídeos (gentamicina, tobramicina e ampicacina).

Entre os anos 1980 e 2000 para desenvolver novos tipos antimicrobianos, foram utilizados conhecimentos em genômica e as triagens de coleções de compostos. No entanto, houve uma significativa diminuição na identificação de novos protótipos antimicrobianos, ao mesmo tempo em que ocorreu um aumento da resistência

bacteriana. Esta fase é marcada pela modificação do mercado de antimicrobianos e pela introdução da classe das fluoroquinolonas sintéticas na metade dos anos 80, desenvolvidas a partir do ácido nalidíxico. Outros antibióticos baseados em protótipos naturais, como imipenem (derivado beta-lactâmico) e análogos da eritromicina (derivado macrolídeo) também foram introduzidos neste período (GUIMARÃES et al., 2010).

Em 2001 a linezolida (antibiótico de origem sintética da classe das oxazolidinonas) foi introduzido no mercado farmacêutico (GUIMARÃES, 2010). Segundo Soriano (2008), nos últimos anos foram desenvolvidos outros cinco novos antibióticos com atividade frente a bactérias Gram-positivas. Uma lipopeptidolactona (derivado semisintético de uma espécie de *Streptomyces*), sendo os demais são derivados de tetraciclina (tigeciclina), glucopeptídeo (dalbavancina e telavancina) e uma cefalosporina (ceftobiprole).

No que concerne à classificação, estes se dividem em bactericidas, quando causam a morte da bactéria, ou bacteriostáticos, quando promovem a inibição do crescimento microbiano (WALSH, 2003).

Existe ainda outra classificação deste grupo de fármaco, sendo que os de origem natural e seus derivados semi-sintéticos os quais abrangem a maioria dos antimicrobianos (denominados antibióticos) em uso clínico classificando-se em: β -lactâmicos (penicilinas, cefalosporinas, carbapeninas, oxapeninas e monobactamas), tetraciclinas, aminoglicosídeos, macrolídeos, peptídicos cíclicos (glicopeptídeos, lipodepsipeptídeos), estreptograminas, entre outros (lincosamidas, cloranfenicol, rifamicinas, etc). E os antimicrobianos sintéticos (também denominados quimioterápicos) são classificados em: sulfonamidas, fluoroquinolonas, oxazolidinonas (ABRAHAM, 2003; PATRICK, 2005; PUPO et al., 2006).

A utilização de antimicrobianos em animais sempre acompanhou o desenvolvimento e a utilização, destes, em medicina humana, e na década de 50, descobriu-se seu uso como aditivo alimentar, aumentando o crescimento animal e a eficiência produtiva (MITCHELL et al., 1998). É inegável a afirmativa que a descoberta destes teve grande influência no perfil epidemiológico das doenças (FERREIRA, 2008).

Os antimicrobianos podem ser utilizados terapêuticamente (no tratamento de doenças), profilaticamente ou como promotores de crescimento. Dados do Sindicato Nacional da Indústria para Saúde Animal revelam que estes fármacos representam 17,2% do total de medicamentos vendidos para animais por ano (SIDAN, 2007).

São amplamente utilizados no tratamento de doenças no gado leiteiro e também como suplementos. Sua administração pode ser feita via intramamária, para o tratamento de mastite; por via parenteral (intramuscular, intravenosa, subcutânea), na terapia de infecções, e por via oral, para o tratamento de doenças ou como suplemento alimentar, em doses sub-terapêuticas (BISHOP e WHITE, 1984). Em rebanhos leiteiros, devido à alta incidência de mastites, os antimicrobianos têm sido bastante utilizados nas fazendas e em muitos casos, de maneira indiscriminada (MINIUSI, 1992).

Tais procedimentos conduzem à presença de resíduos dos mesmos, representando um risco ao consumidor e sendo, portanto, um sério problema na área econômica e de saúde pública (BERSOT et al., 2005).

2.4 Resistência microbiana

Os antimicrobianos têm fundamental importância por proporcionar aumento da expectativa e melhora na qualidade de vida da população mundial. Porém, ao mesmo tempo, eles trazem o risco da resistência bacteriana (CRFSP, 2011).

A popularização do uso de antimicrobianos, fez com que as bactérias também desenvolvessem defesas relativas aos agentes antibacterianos, com o consequente aparecimento da resistência (SILVEIRA et al., 2006). Atualmente, a resistência bacteriana, ocorre em praticamente todas as espécies de bactérias (JACOBY, 1991; CUNHA, 1998; JACOBY, 1998).

A resistência ocorre através dos mecanismos de transdução, transformação e conjugação e, frequentemente, envolve genes situados em plasmídios e transposons. A resistência aos antimicrobianos é uma manifestação genética, relacionada à existência de genes contidos na bactéria que codificam diferentes mecanismos bioquímicos que impedem a ação dos fármacos, pode surgir em mutações que ocorrem no microrganismo

durante seu processo reprodutivo e resultam de erros de cópia na sequência de bases que formam o DNA cromossômico, responsáveis pelo código genético. Pode também resultar da importação dos genes causadores do fenômeno (ZULIANI, 1972; LACEY, 1973; TRABULSI, 1973; NOVICK, 1980; LEVY, 1982; SUASSUNA, 1983; SAUNDERS, 1984; LACEY, 1984; CUNHA, 1998).

Doza (1998) destaca três principais mecanismos de resistência, sendo eles: a inativação do antimicrobiano por enzimas; as modificações bacterianas que impedem a chegada do mesmo no ponto alvo e as alterações por parte da bactéria que impede a ação do antimicrobiano.

A resistência de uma dada bactéria à determinado medicamento pode ser classificada inicialmente como intrínseca ou adquirida. A intrínseca é aquela que faz parte das características naturais, fenotípicas da bactéria, transmitidas apenas verticalmente para seus descendentes; faz parte de sua herança genética e geralmente, está associada à presença ou ausência de alvo para a ação do medicamento, enquanto a adquirida ocorre quando ela aparece em uma espécie de bactéria antes sensível aquele fármaco, resultante de mudanças estruturais ou bioquímicas da bactéria (FIO et al., 2008). Ainda pode ocorrer outro tipo de resistência, a induzida, quando se ministra um antimicrobiano e inicialmente a bactéria se mostra sensível a este, mas passando o tempo o paciente tem uma recaída, significando a multiplicação da bactéria, ou seja, a diminuição do efeito do antimicrobiano (TAVARES, 2001).

Com relação aos grupos de antimicrobianos, observa-se nos antibióticos β -lactâmicos que a principal forma de mecanismo de resistência bacteriana se faz através da produção de enzimas que apresentam grupos nucleofílicos (em geral, resíduos de serina) capazes de promover a abertura do anel β -lactâmico. Nesta situação, a modificação molecular responsável pelo aumento de resistência às β -lactamases foi à introdução no mercado das penicilinas semi-sintéticas (meticilina, oxacilinas), que impedem o acesso dos antibióticos ao sítio ativo da enzima β -lactamase por impedimento estérico (DURANTE et al., 2009). Já em relação aos glicopeptídicos, o desenvolvimento de resistência bacteriana a estes antibióticos é mais lento (PATRICK, 2005). Em se tratando ao aumento de resistência bacteriana às tetraciclinas, o seu uso como primeira escolha na terapia antimicrobiana contribuiu em muito para o aparecimento de resistência. Entretanto, o desenvolvimento recente de um derivado

semi-sintético deste grupo, a tigeciclina, que inibe a bomba de efluxo, indica o interesse contínuo nesta classe de antimicrobianos (WALSH, 2003).

A compreensão dos processos relacionados à ação de antimicrobianos e ao surgimento da resistência, o planejamento, a síntese e avaliação farmacológica de novos agentes antimicrobianos mais potentes, sua utilização terapêutica de forma racional e o uso de normas para controle de infecções representam vários níveis de ações contínuas e interligadas. Recentes estudos na identificação de novas moléculas importantes e na compreensão dos mecanismos de ação de antimicrobianos revelam uma situação muito adversa, onde diversos efeitos podem ser responsáveis pela potência de uma determinada substância, a partir de processos que ocorrem em consonância e contribuem de maneira diferenciada para a atividade antibacteriana (SILVEIRA et al., 2006).

Neste contexto, ressalta-se que para uma nova molécula ser lançada no mercado leva-se em média 20 anos, sendo envolvidos muitos gastos (em torno de 500 milhões de euros) desde as pesquisas até o lançamento do novo princípio. Diante da importância do uso racional para evitar o surgimento de cepas bacterianas multi-resistentes, governantes mundiais vêm implantando programas que visam analisar a presença de resíduos de medicamentos veterinários em alimentos (LÖNNROTH, 2003).

2.5 Legislação

O abuso de medicamentos veterinários, especialmente nos países onde o seu emprego não é controlado rigorosamente, poderia ser corrigido através de informações suficientes e exatas aos usuários, veiculadas por cooperativas e centros de apoio técnico governamentais. A difusão de boas práticas veterinárias e agrícolas levaria a uma redução dos níveis destas substâncias, deixando de ser motivo de preocupação pública. No Brasil, não há uma política à longo prazo para organizar, e principalmente, manter a estrutura adequada para o controle do uso de medicamentos veterinários (MINIUSSI, 1992).

Para Oliveira e Carneiro (1998), a persistência dos resíduos de antibióticos no leite depende de uma série de variáveis, e dentre elas destacam as mais importantes:

quantidade da produção de leite no momento do tratamento, tipo e quantidade do antibiótico usado, via de administração, tipo do veículo usado na formulação do antibiótico e solubilidade e estado de saúde do animal.

Segundo resultados de Folly et al. (2008), em pesquisa utilizando antibiótico cujo período de descarte era de 48 horas, foram detectados resíduos no leite das vacas analisadas após 72 horas. Mostrando que nem sempre o período recomendado é seguro.

De acordo com Nero (2007), a presença de resíduos de antibiótico no leite produzido no Brasil pode ser preocupante, e indica um perigo químico associado ao produto.

Para minimizar este problema, visto atualmente como uma questão de saúde pública, o Ministério da Saúde implantou no Brasil, em 2000, o Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos (PARA), que visa, por análise laboratorial, monitorar no país os resíduos de agrotóxicos em alimentos. Da mesma forma, objetivando controlar resíduos de medicamentos veterinários nos alimentos, foi criado, em 2001, o Programa de Análise de Resíduos de Medicamentos Veterinários em Alimentos (PAMvet) (BRASIL, 2008).

Na implantação do Programa Nacional, elegeu-se o leite como primeiro alimento a ser pesquisado, com base nos dados do IBGE, nos quais o leite é a proteína de origem animal mais consumido pela população brasileira. Definiu-se através do Programa Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes (PNCRC) os seguintes princípios ativos a serem pesquisados: substâncias antibacterianas (antimicrobianos), antihelmínticos/antiparasitários, carbamatos, piretróides, micotoxinas, antiinflamatórios não esteroidais e esteroidais, organoclorados, metais pesados, organofosforados, e outras substâncias como fipronil e fluzuron, sendo os antimicrobianos e os antiparasitários classificados como os grupos de maior prioridade (BRASIL, 2008). Dentre os antimicrobianos, as substâncias monitoradas se encontram dispostas no quadro 1.

Quadro1. Antimicrobianos monitorados no leite de acordo com o PNCRC.

<i>Substância a ser monitorada</i>	<i>Composto ou resíduo</i>
Substâncias Antibacterianas	Amoxicilina
	Ampicilina
	Benzil-penicilina
	Cefquimoma
	Cefoperazone
	Cefalônio
	Cefapirina
	Ceftiofur
	Clortetraciclina
	Oxitetraciclina
	Tetraciclina
	Cloxacilina
	Enrofloxacina
	Danofloxacina
	Norfloxacina
	Fluorfenicol
	Gentamicina
	Neomicina
	Espiramicina
	Estreptomicina
	Sulfadiazina
	Sulfatiazol
	Sulfametazina
	Sulfadimetoxina
Sulfamerazina	
Sulfadoxina	
Trimetropim	
Tilmicosina	
Tilosina	

As organizações internacionais envolvidas com a saúde pública, como o JECFA (Comitê para Aditivos Alimentares da FAO/WHO e o FDA dos Estados Unidos), estabelecem as diretrizes para o Limite Máximo de Resíduo ou Limite de Tolerância definidos como a concentração máxima de resíduo resultante do uso de um medicamento veterinário, expresso em parte por milhão (ppm) ou parte por bilhão (ppb) que é legalmente permitido, ou reconhecido, como aceitável no alimento e é estabelecido para cada antibiótico, sendo o valor de limite máximo de resíduo correlacionável à Ingestão Diária Aceitável obtida a partir de ensaios de experimentação animal, avaliando-se a toxicidade, teratogenicidade e carcinogenicidade desses aditivos não intencionais (FAO, 1996).

No Brasil, a competência para estabelecer limites máximos de resíduos em alimentos, seja de medicamentos veterinários, agrotóxicos, contaminantes ou aditivos, é do Ministério da Saúde através da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (BRASIL, 2008).

No caso de medicamentos veterinários, até o momento, esses limites nacionais não foram definidos pelo setor de saúde e, portanto, vêm-se utilizando o Plano Nacional de Controle de Resíduos Biológicos em Produtos de Origem Animal (PNCRB) Instrução Normativa/MAA Nº 42, de 20 de dezembro de 1999, instituído pelo Ministério da Agricultura com a finalidade de sistematizar os meios de controle da contaminação desses produtos por resíduos de compostos de uso na agropecuária, bem como de poluentes ambientais (BRASIL, 2008).

No âmbito nacional, qualquer medicamento para uso veterinário deve ser previamente aprovado pelo MAPA e deve-se respeitar o período de carência, de modo que, quando da permanência de resíduos no produto final, estes ocorram em concentrações menores do que os LMRs fixados para os mesmos (Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2001; BRASIL, 2002). O LMRs de antimicrobianos no leite nos Estados Unidos, União Européia e Brasil estabelecidos pelos Codex Alimentarius encontram-se dispostos no quadro 2.

Quadro 2. Limite Máximo de Resíduo de alguns antimicrobianos no leite estabelecidos pelo Codex Alimentarius, Estados Unidos, União Européia e Brasil.

ANTIMICROBIANO	CODEX	EUA	UE	BRASIL
	LMR	LMR	LMR	LMR
	(µg/kg)	(µg/kg)	(µg/kg)	(µg/kg)
Penicilina G	4	5	4	4
Ampicilina	-	10	4	4
Amoxicilina	-	10	4	4
Ceftiofur	100	100	100	100
Cefapirina	-	20	60	60
Tetraciclina	100(a)	300(b)	100	100(a)
Cortetraciclina	100(a)	300(b)	100	100(a)
Oxitetraciclina	100(a)	300(b)	100	100(a)
Estreptomicina /Dihidroestreptomicina	200	-	-	200
Estreptomicina	-	-	200	-
Dihidroestreptomicina	-	125	200	-
Gentamicina	200	30	100	200
Neomicina	1500	150	1500	500

(a) Somatória de tetraciclina, clortetraciclina e oxitetraciclina. (b) Limite de tolerância inclui ambos, a soma e o resíduo individual de clortetraciclina, oxitetraciclina e tetraciclina.

Fontes: Codex Alimentarius Commission Maximum Residue Limits for Veterinary Drugs in Foods (2005), FDA –Food Compliance Program(2005), Commission Regulation (EC N° 508/1999, N° 804/1999, N° 1553/2001, N° 868/2002, N° 1181/2002, N° 1530/2002), Mercosul (2000).

2.6 Resíduos de Antimicrobianos

A presença de resíduos antimicrobianos é um fator de desclassificação do leite, uma vez que torna a matéria-prima inadequada para uso na indústria e para o consumo

humano, já que não há tratamento tecnológico que consiga inativar tais substâncias (SANTOS, 2009).

O uso indiscriminado de antibióticos e a não obediência do período de carência indicado após a última aplicação do medicamento ao animal, para a utilização do leite para consumo humano, tem sido relatado há décadas por pesquisadores. A importância deste fato está relacionada, principalmente, ao aspecto da saúde pública, em que o consumo sistemático de leite contendo resíduos pode acarretar sérios riscos à saúde humana, além da possibilidade de favorecer o desenvolvimento de formação de resistência de microorganismos patogênicos (DENOBILE e NASCIMENTO, 2004).

Dentre os riscos à saúde humana, associados à presença de resíduos antimicrobianos, destacam-se reações alérgicas em indivíduos sensíveis, desequilíbrio na flora intestinal, discrasias sanguíneas e ação teratogênica (BRANDY e KATZ, 1992; BRANDY e KATZ, 1993; HONKANEN-BUZALSKI e REYBROECK, 1997; MITCHELL, 1998).

O leite contaminado com resíduo de antimicrobiano, ao dar entrada na indústria, praticamente nada pode ser feito para evitar sua presença no leite fluido ou nos produtos lácteos. Os tratamentos usuais aos quais, o leite é submetido, como filtração, resfriamento e tratamento térmico na faixa de 72-75°C por 15 a 20 segundos, têm pouca ou nenhuma influência sobre o conteúdo de antimicrobianos. Mesmo o tratamento UHT a 130-140°C por 2 a 4 segundos não é suficiente para destruir 100% dos antimicrobianos (GIGANTE, 2004). Gallina (1997), ressalta que os tratamentos térmicos usualmente empregados pelas indústrias de laticínios não inativam totalmente os resíduos de antimicrobianos.

O leite contaminado por resíduos de antibiótico pode criar, ainda, problemas críticos para a indústria de laticínios, interferindo, principalmente, nos processos de fermentação, onde se utilizam culturas acidoláticas para a produção de queijos, iogurtes e manteigas (STRASSER et al., 2003).

Em estudo recente realizado nos municípios de Pedra e Venturosa – PE, utilizando-se leite caprino de propriedades produtores de leite observou-se que 86% das amostras analisadas apresentaram resíduos antimicrobianos acima do permitido (PAULA et al., 2010).

Denobile e Nascimento (2002) pesquisaram resíduos de tetraciclina em amostras de leite em um laticínio mineiro observando resíduos de oxitetraciclina em 32 das 231 amostras analisadas.

Raia Júnior (2001), observou que no tratamento intramamário de mastite que em 18,7% das amostras de leite analisadas no Estado de São Paulo e Minas Gerais foram positivas para cefacetil, 18,1% para gentamicina e 11,1% para tetraciclina mesmo após o período de carência.

Em estudo realizado em Piracicaba, Nascimento et al. (2001), relatou que 50% das 96 amostras de leites pasteurizados analisadas, apresentaram resíduos de antibióticos, sendo em uma das marcas 72,5% resíduos de penicilina e outra com 50,0% de outros inibidores não identificados pelo método de halo de inibição.

Segundo os resultados de Pilon e Duarte (2010) os produtores devem ter melhores informações técnicas sobre como tratar seus animais, evitando assim certos tipos de doenças, que possam vir a prejudicar seus animais e até mesmo a população que irá consumir produtos de origem animal.

Inúmeros testes qualitativos e quantitativos para detectar resíduos de antimicrobianos e fármacos no leite e em derivados lácteos têm sido desenvolvidos, desde a década de 40. Os métodos mais usados são os de inibição do crescimento microbiano, ou microbiológicos, e se baseiam no princípio geral de que todos os antimicrobianos inibem bactérias sensíveis (BRITO, 2000). De acordo com Fagundes (1997), os métodos para detecção de antibióticos no leite mais indicados são: químicos, físicos, biológicos, tecnológicos e adição de corantes.

Existem muitos testes disponíveis no mercado, como os testes de inibição de crescimento bacteriano que incluem: método do disco em placas, Delvotest-P[®] Delvotest-SP[®] (Gist-brocades Food Ingredients, Inc., King of Prússia, Pa.), BR-Test (Idetek, Inc., Sunnyvale, Calif.), o Charm Inhibition e Charm Farm (Charm Sciences, Inc., Sunnyvale, Calif.), os testes imunológicos que incluem o Radioimunoensaio, o b-lactam CITE probe (IDEXX Corp., Portland, ME), o b-lactam LacTek (Idetek, Sunnyvale, CA), o teste Charm II receptor e o Spot Test; das cromatografias há o "HPLC-receptogram" (cromatografia líquida), e a cromatografia a gás; e, por fim, das provas enzimáticas há o Penzime (UCB Bioproducts, Chemindu Foriest, Belgium)10,6,

e o IDEXX SNAP test, (BELL et al., 1995) e também o Eclipse 50[®] (Souza, 2010) de inibição de crescimento microbiano.

Segundo Brito e Lange (2008), algumas práticas podem ser empregadas para evitar a presença de resíduos, tais como: ler o rótulo e a bula do antimicrobiano selecionado para o tratamento; observar se o medicamento é licenciado no Ministério da Agricultura; o princípio ativo; respeitar o período de descarte do leite ou período de carência para abate do animal ou uso dos subprodutos; observar as recomendações gerais quanto ao uso e via de aplicação, o prazo de validade e a dosagem recomendada; assim como só usar medicamentos sob prescrição de veterinários devidamente habilitados.

Assim sendo, o monitoramento frequente de medicamentos e seus derivados metabólicos e o controle de resíduos de agentes antimicrobianos no leite é muito importante à indústria de produtos lácteos e conseqüentemente, ao consumidor. Este último incapacitado de perceber se o leite consumido contém antimicrobianos, é suscetível a enfermidades à sua revelia. Neste contexto, a produção intensiva de leite de alta qualidade sem resíduos de antibióticos, reveste-se de extrema importância para os produtores, haja vista os prejuízos e as penalidades decorrentes da rejeição do leite contaminado com valores acima dos níveis de tolerância. Para evitar tais transtornos se faz necessário a utilização de recursos apropriados comercialmente disponíveis para a detecção de resíduos de antibióticos no leite do gado leiteiro (BRITO, 2000).

2.7 Análises Laboratoriais do Leite

2.7.1 Análises Microbiológicas

- Contagem de *Staphylococcus* spp.

Entre os indicadores comumente utilizados da qualidade higiênico-sanitária dos alimentos, encontram-se as contagens de *Staphylococcus*. Estes são de grande

importância, principalmente os coagulase-positiva, pois podem produzir enterotoxinas termoestáveis, que têm capacidade de resistir ao processo de pasteurização (CARDOSO et al., 1985).

O Ágar Baird Parker é o meio indicado para se realizar o isolamento de *S. aureus* em alimentos. Este meio utiliza a capacidade do *Staphylococcus aureus* em se desenvolver na presença de agentes seletivos como telurito de potássio, glicina, cloreto de lítio e polimixina. Suas características diferenciais são baseadas na redução do telurito de potássio à telureto de potássio, gerando colônias negras capazes de hidrolisar gema do ovo, formando halos ao redor das colônias (LANCETTE, 2001). O piruvato de sódio é acrescentado ao meio de cultura para recuperar as células injuriadas, precavendo o acúmulo de peróxido de hidrogênio, que é tóxico para as células. Após isso, as colônias suspeitas típicas são identificadas por meio do teste de coagulase em tubos, ou em lâminas (BANWART, 1983).

Colônias típicas de *S. aureus* têm coloração preta, são brilhantes, delimitadas com diâmetro aproximado de 1 a 1,5 mm, halo opaco e área mais clara ao redor de cada colônia. A área opaca se refere à atividade da lipase, enquanto a zona mais clarificada à ação proteolítica (MURPHY et al., 2010; VIÇOSA et al., 2010).

- Prova de Coagulase

A identificação do *S. aureus* ocorre em presença da enzima coagulase, que tem a capacidade de coagular o plasma “*in vitro*”. Esta coagulação deriva da transformação da protrombina em trombina que a partir do fibrinogênio ativa a polimerização da fibrina (PEREIRA et al., 2000; TRABULSI e ALTERTHUM, 2008).

O teste de coagulase é usado para classificar os estafilococos em dois grupos: coagulase positiva e coagulase negativa. No primeiro grupo estão incluídos: *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus intermedius* e algumas cepas de *Staphylococcus hyicus*. No grupo coagulase negativa está incluído, entre outros, o *Staphylococcus epidermidis* com colônias não hemolíticas e não pigmentadas (SEARS, 1993; CARTER, 1995).

As espécies coagulase positivas têm um maior grau de importância devido aos seus fatores de patogenicidade (FONSECA e SANTOS, 2007). Já as espécies coagulase-negativas, rotineiramente isoladas em leite bovino, são consideradas patógenos secundários e, em geral, causam reação inflamatória moderada na glândula mamária (HARMON e LANGLOIS, 1989; BRAMLEY et al., 1996).

A coagulase em tubo, com plasma de coelho é, possivelmente, o teste mais utilizado na diferenciação das espécies coagulase positivas das negativas (GUARDATI et al., 1993). A coagulase livre é uma substância análoga à trombina e está presente em filtrados de cultivos. É secretada extracelularmente e reage com uma substância presente no plasma chamado Fator de Reação com a Coagulase (CRF), para formar um complexo que, por sua vez, reage com fibrinogênio, formando fibrina (coágulos) (BRASIL, 2004).

- Prova da Catalase

A catalase é uma enzima, que promove a conversão de peróxido de hidrogênio (originado pelo organismo como mecanismo de lise bacteriana) em água e oxigênio (ROSSI et al., 2005). Essa reação ocorre na maior parte das bactérias aeróbias e anaeróbias facultativas que contêm citocromo, sendo as espécies de *Streptococcus* e de *Enterococcus* exceções (TEIXEIRA, 2010).

O *Staphylococcus* spp. é um microorganismo muito frequente na produção e beneficiamento do leite é uma bactéria mesófila caracterizada por ter a maioria das espécies anaeróbia facultativa e catalase positiva (QUINN et al., 2005). O teste da catalase é empregado na diferenciação de *Streptococcus* spp., catalase negativo, de *Staphylococcus* spp., catalase positivo (MASSANO, 2010).

O teste de catalase é positivo quando ao adicionar peróxido de hidrogênio (H₂O₂) sobre colônias de microrganismos ocorre a formação de bolhas, caracterizando os *Staphylococcus* (PERESI et al., 2006).

- Coloração de Gram

A coloração de Gram é o método mais amplamente utilizado para a observação direta de microrganismos nas amostras por meio das suas características tintoriais, tamanho, forma e arranjo celular, com capacidade de fornecer um resultado presuntivo e rápido do agente infeccioso (RUIZ, 2000; STINGHEN, 2002; DAUR, 2004).

O processo de coloração Gram se dá pelo tratamento de esfregaços bacterianos, de maneira sucessiva, com cristal violeta ou violeta de genciana, lugol, etanol e fuccina. Este método demonstra alterações estruturais na parede celular bacteriana, classificando-as em Gram-positivas ou Gram-negativas. O cristal violeta e o lugol penetram na parede celular formando em seu interior um complexo de cor roxa, a pararosanilina. O banho em etanol, devido a sua ação desidratante, torna a espessa camada de peptidoglicano das Gram-positivas menos permeável retendo o complexo e corando-as em roxo. Já nas Gram-negativas, devido à pequena espessura e às descontinuidades dessa camada nas zonas de aderência entre as membranas interna e externa, o complexo é removido, deixando-as descoradas. No intuito de facilitar a visualização das Gram-negativas é realizada coloração com fuccina, que irá dar uma coloração rósea, diferenciando-as das demais bactérias (TRABULSI e ALTERTHUM, 2008).

- Cultura e Antibiograma

A cultura é uma técnica de diagnóstico laboratorial das doenças infecciosas. O cultivo bem-sucedido depende de procedimentos apropriados visando minimizar a destruição do microrganismo ou proliferação do não patógeno utilizando material e técnicas apropriadas (NELSON e COUTO, 2001).

As culturas bacterianas podem ser associadas ao antibiograma no intuito de determinar a melhor opção terapêutica. O antibiograma é um teste laboratorial *in vitro* utilizado para determinar a suscetibilidade ou a resistência do patógeno frente aos fármacos antimicrobianos (HENDRIX, 2005).

O método mais comumente utilizado para realização do antibiograma é o de disco-difusão em ágar, que usa discos de papel impregnados com os antimicrobianos a serem testados. É um teste qualitativo, onde é realizada medição de tamanhos de zona para dar uma estimativa de suscetibilidade antimicrobiana (MIMICA et al., 2005). A concentração do fármaco no disco é escolhida para se correlacionar com os níveis séricos e teciduais do medicamento no animal tratado (HENDRIX, 2005).

A base química contida nos discos se difunde no meio de cultura, de forma que a concentração do antimicrobiano diminui à medida que se distancia do disco, formando-se assim uma espécie de gradiente de concentração do fármaco ao redor dos discos. Conjuntamente com a difusão do antimicrobiano, o microrganismo inoculado na superfície desse meio de cultura e que não é inibido pela concentração do fármaco persiste a se multiplicar de modo que seu crescimento se torna aparente. Nas áreas onde a concentração do antimicrobiano é inibitória, não ocorre crescimento do microrganismo, formando-se, então, uma zona de inibição ao redor dos discos (MIMICA et al., 2005; QUINN et al., 2005).

2.7.2 Análises de resíduos de antimicrobianos

- Teste Qualitativo para detecção de antimicrobianos

Existem diversos kits de detecção de resíduos de antimicrobianos no leite, como os das provas enzimáticas; o Penzime, o IDEXX SNAP test, (BELL et al., 1995) e também aquelas baseadas na inibição de crescimento bacteriano, dentre eles o kit Eclipse 50[®], que segundo Souza (2010), é um teste qualitativo na detecção de substâncias inibidoras no leite, permitindo comprovar se o leite contém antibióticos acima do limite máximo de resíduos. O teste se baseia na inibição do crescimento microbiano. A apresentação do kit é em formato de placa microtiter, onde cada recipiente contém um meio de cultivo específico com esporos de *Geobacillus stearo thermophilus* e um indicador ácido-base (SOUZA, 2010).

O resultado do teste é negativo quando os esporos germinam e se multiplicam, acidificando o meio e provocando a modificação do indicador de uma coloração azul para amarelo esverdeado, já em resultados positivos (onde a concentração de antibiótico é superior ao limite de detecção do teste), o crescimento do microorganismo é inibido, sendo assim, não há produção do ácido e a coloração do meio permanece inalterada (SOUZA, 2010).

De acordo com o fabricante, os antimicrobianos detectados são estreptomicina, neomicina, tilosina, eritromicina, tetraciclina, oxitetraciclina, sulfatiazol, sulfonamida, sulfametacina, cefapirina, cefalexina, cloxacilina, oxacilina, amoxicilina, ampicilina e penicilina.

3. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A qualidade do leite pode ser influenciada por diversos fatores, entre os quais os a contaminação microbiológica e química, padrões higiênico-sanitários inadequados do rebanho levam ao uso indiscriminado de antibióticos e o consumo sistemático deste leite contendo resíduos pode acarretar sérios riscos à saúde humana, além da possibilidade de favorecer o desenvolvimento de formação de resistência de microrganismos patogênicos, fazendo-se necessário a implementação de programas de monitoramentos mais efetivos para controle destes resíduos, minimizando desta forma este problema de saúde pública.

4. REFERÊNCIAS

- ABRAHAM, D. J. **Burger's Medicinal Chemistry & Drug Discovery**. Chemotherapeutic Agents, John Wiley & Sons: San Francisco, 2003, vol. 5, pag. 42.
- ALVES, A.R.; MARINHO, C.M.; BARROS, K.M.; ABREU,V. **Bovinocultura leiteira**. Boletim setorial do agronegócio, n.03, maio, 2010, SEBRAE/PE. Disponível em: <http://www.pe.sebrae.com.br/uf/pernambuco>. Acesso em 25 de abril de 2011.
- ALVES, F. N. R. Desafio para a inovação em Fitomedicamentos no Contexto da Indústria Farmacêutica Nacional. **Revista Fitos**, v. 1, p. 18-29, 2005.
- ATHAÍDE, W. S.; MACIEL, J. F.; LIMA, P. L. A.; LIMA, A. R. C.; SILVA, F. V. G.; SILVA, J. A. Avaliação microbiológica e físico-química durante o processamento do leite pasteurizado. Comunicado Breve. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, v. 67, p. 73-77, 2008.
- BAIRD-PARKER, A.C. The staphylococci: an introduction. **Journal of Applied Bacteriology Symposium Supplement**, v. 69, n. 19, p. 1-8, 1990.
- BANWART, G. J. **Basic Food Microbiology**. 3ª edição. Westport: AVI, p. 113, 1983, cap 2.
- BELL, C.; RHOADES, J. R.; NEAVES, D; SCANELLA, D. An evaluation of IDDEXSNAP test for the detection of b-lactams antibiotics in ex farm milks. **Netherlands Milk Journal**, v. 49, p. 15-25, 1995.
- BERSOT, L. S.; BARCELLOS, V. C.; MOTTA, D. S.; GALVÃO, J. A. Perfil dos consumidores de leite informal em Palotina, PR. **Revista do Conselho Regional de Medicina Veterinária do Paraná**, v.4, p.20, 2005.
- BEZERRA, P.S.; RAYMUNDO, D.L.; SPANAMBERG, A.; CORRÊA, A.M.R.; BANGEL-JÚNIOR, J.J.; FERREIRO, L.; DRIEMEIER, D. Neurotoxicose em bovinos associada ao consumo de bagaço de malte contaminado por *Aspergillus clavatus*. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, 2009, v. 29, n.3, p.220-228.
- BISHOP, J. R.; WHITE, C. H. Antibiotic residue detection in milk – A review. **J. Food Prot.**, v.47, n.8, p. 647-652, 1984.
- BORGES, J. M.; JÚNIOR, M. A. P.; AZEVEDO, D. S.; FILHO, E. L. B. **Administração das propriedades com pecuária leiteira no município de Garanhuns**. 2009. Disponível em: <http://www.eventosufrpe.com.br/jepex2009/cd/resumos/r1002.pdf>. Acesso em 20 de junho de 2010.
- BRADY, M.S.; KATZ, S.E. In vitro effect of multiple antibiotic/antimicrobial residues on the selection for resistance en bacteria. **J. Assoc. Off. Anal.Chem.**, v.75, n.4, p.738-742, 1992.
- BRADY, M.S.; WHITE, N.; KATZ, S.E. Resistance development potencial of antibiotic/antimicrobial residues levels designated as “safe level”. **J. Food Prot.**, v.56, n.3, p.229-233, 1993.

BRAMLEY, A. J.; CULLOR, J. S.; ERSKINE, R. J. Current concepts of bovine mastitis. 4ed. Madison : **National Mastitis Council**, 1996. 64p.

BRASIL, Ministério da Saúde. Descrição dos Meios de Cultura Empregados nos Exames Microbiológicos. Módulo IV. In: Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Manual de Microbiologia Clínica para o Controle de Infecção em Serviços de Saúde**. Brasília: Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2004.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Regulamento de Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal – RIISPOA. Aprovado pelo Decreto nº. 30.691 de 29/03/1952, alterado pelos Decretos nº. 1.255 de 25/06/1962, nº. 1.236 de 02/09/1994, nº. 1.812 de 08/02/1996, nº. 2.244 de 04/06/1997 e nº. 6385 de 27/02/2008. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 27 fev. 2008.

BRASIL. Portaria n.72, de 03 junho de 1998. **Diário Oficial da União**, Brasília, n.107, 08 jun. 1998. Seção 1, p.131.[O Ministério da Agricultura, do Abastecimento e da Reforma Agrária estabelece o Programa de Controle e Resíduos Biológicos em Leite – PCRBL].

BRITO, M. A. V. P. Resíduos de antimicrobianos no leite. Juiz de Fora: Embrapa Gado de Leite, 2000. 20 p. **Circular Técnica**, n. 60.

BRITO, M.A.V.P. Perigos dos resíduos antimicrobianos. **Leite Brasil**, n.2, out, 1997.

BRITO, M.A.V.P.; LANGE, C.C. **Resíduos de antibióticos no leite**. Panorama do leite on line. EMBRAPA/GADO DE LEITE. Ano 2, n. 19, maio, 2008.

C. R.F.E.S.P. Conselho Regional de Farmácia do Estado de São Paulo. Antibióticos. São Paulo: Conselho Regional de Farmácia do Estado de São Paulo, 2011. 90 p.(**Projeto Farmácia Estabelecimento de Saúde**; Fascículo VI).

CARDOSO, L.; ARAÚJO, W. M. C. Parâmetros de qualidade em leite comercializados no Distrito Federal, no período 1997-2001. **Revista Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 17, n. 114-115, p. 34-40, 2003.

CARDOSO, W. M. Contagem de microrganismos. In: CARDOSO, W. M. **Análise microbiológica de alimentos**. Rio de Janeiro: Merk, 1985. p. 20-27.

CARTER, G. R.; CHENGAPPA, M. M.; ROBERTS, A. W. **Essentials of Veterinary Microbiology**. 1ª Ed. Williams & Wilkins, 5ª edição, 394p. 1995, cap 2.

CUNHA, B. A. Antibiotic resistance. **Drugs of Today**.v. 34, 691-698p, 1998.

DAUR, A. V.; COGO, L. L.; BOTÃO, G. D.; COSTA, L. M. D.; KLIMAK JR, F. MONTEIRO, C. L. B. Sensibilidade da coloração de gram no diagnóstico prévio das infecções em sítios corporais esteréis. **Visão Acadêmica**. v. 5, n. 2, p. 91-94, 2004.

DENOBILE, M.; NASCIMENTO, E.S. Validação de método para determinação de resíduos de antibióticos, tetraciclina, clortetraciclina e doxiciclina em leite, por cromatografia líquida de alta eficiência. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 40, n.2, p.211-218, 2004.

DOZA, P. R. M. Resistencia bacteriana a antimicrobianos: su importância en la toma de decisiones en la práctica diária. **Información Terapéutica del Sistema Nacional de Salud.**, v. 22, n.3, 1998.

DOWNES, F. P.; ITO, K. **Compendium of methods for the microbiological examination of foods.** 4ed. 34p. Washington: American Public Health Association, 2001. 676p.

DUARTE, K.M.R.; SILVA, F.M.S.M.; MEIRELLES, C.F. Resíduos de anabolizantes na produção animal: importância e métodos de detecção. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.32, n.4, p.731-737, 2002.

DURANTE-MANGONI, E.; GRAMMATIKOS, A.; UTILI, R.; FALAGAS, M. E.; **Int. J. Antimicrob.**, v. 33, p. 201, 2009.

FAGUNDES, C. M. **Inibidores e controle de qualidade do leite.** Pelotas: UFPEL, 1997.

FAO. **Residues of veterinary drugs in foods**, v. 3, Rome, 1996.

FELTRIN, C.W.; MELLO, A.M.S.; SANTOS, J.G.R.S.; MARQUES, M.V.; SEIBEL, N.M.; FONTOURA, L.A.M. Sulfadimethoxyne quantification in milk by high performance liquid chromatography. **Química Nova**, São Paulo, 2007, v.30, n.1, p.80-82.

FERNANDES, 2006. **Antibacterial discovery and development-the failure of success?** Disponível em: <http://www.nature.com/nbt/journal/v24/n12/full/nbt1206-1497.html>. Acesso em: 01/08/2011.

FERREIRA, M. V. C.; PAES, V. R.; LICHTENSTEIN, A. Penicilina: oitenta anos. **Revista Médica**. São Paulo. v.87, n. 4, p.272-276, 2008.

FILHO, P. L. P.; PAN, S. S. K. Cadeia Farmacêutica no Brasil: objetivos, critérios e setores prioritários. Rio de Janeiro: **BNDES setorial**, n. 18, p. 3-22, 2003.

FIO, F. S. D.; FILHO, T. R. M.; GROppo, F. C. **Resistência bacteriana.** Faculdade de Odontologia de Piracicaba da Universidade Estadual de Campinas. Dissertação. Unicamp-SP. 2008.

FOLLY, M. M.; UÉBE, P. M.; TEIXEIRA, G. N.; LESSA, S. S. A.; CARLOS, L. A.; MARTINS, M. L. L. Determinação de resíduos do antibiótico cloxacilina em leite de vacas com elevada contagem de células somáticas. **JBCA – Jornal Brasileiro de Ciência Animal**, v. 1, n. 1, p. 13-24, 2008.

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

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION (FDA). **Bacteriological analytical manual.** 8ed. Gaithersburg : AOAC International, 1995.

GALLINA, D. A. **Avaliação de tratamentos térmicos industriais sobre resíduos inibidores presentes no leite utilizando o teste de inibição de iogurte.** 1997. 69 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos), Universidade Federal de Viçosa.

GARCIA, C. A.; SILVA, N. R.; LUQUETTI, B. C.; SILVA, R. T.; MARTINS, I. P.; VIEIRA, R. C. Influência do ozônio sobre a microbiota do leite “in natura”. **Hig. Aliment.**, v.14, n.70,p.36-50, 2000.

GIGANTE, M. L. Importância da qualidade do leite no processamento de produtos lácteos. In: DÜRR, J. W. et al. (Org.) **O compromisso com a qualidade do leite no Brasil**. Passo Fundo – RS. Universidade de Passo Fundo, 2004. p. 235-254.

GUARDATI, M. C.; GUZMAN, C. A.; PIATFRI, G.; PRUZZO, C. Rapids methods for identification of *Staphylococcus aureus* when both human and animal staphylococci are tested: Comparison with a new immunoenzymatic assay. **Journal of clinical microbiology**, Italy. v. 31, n. 6, p., 1993.

GUEDES, C. C.; MATOS, C. M.; MOUTINHO, C. G.; SILVA, C. S. Avaliação da utilização da espectrofotometria de UV/VIS na quantificação de antibióticos em extratos de leite de vaca. **Revista da Faculdade de Ciências da Saúde**. Portugal, p.232-243, 2009.

GUERREIRO, P. K.; MACHADO, M. R. F.; BRAGA, G. C.; GASPARINO, E.; FRANZENER, A. S. M. Qualidade microbiológica de leite em função de técnicas profiláticas no manejo de produção. **Ciênc. agrotec.**, Lavras, v. 29, n. 1, p. 216-222, jan./fev. 2005.

GUIMARÃES, D. O; MOMESSO, L.S; PUPO, M.T. Antibióticos: importância terapêutica e perspectivas para a descoberta e desenvolvimento de novos agentes. **Quim. Nova**, v.15, n. 10, p.1-13, 2010.

HARMON, R. J., LANGLOIS, B. E. Mastitis due to coagulase-negative *Staphylococcus* species. **Agri-Practice**, v.10, n.1, p.29-34, 1989.

HARRIS, D. C. 2005. **Análise Química Quantitativa**. Ed. LTC, 6° ed., Rio de Janeiro/RJ, p. 507–575.

HENDRIX, C. M. **Procedimentos Laboratoriais para Técnicos Veterinários**. 4. ed. São Paulo: Roca, 2005. cap. 4, p. 109-197.

HONKANEN-BUZALSKI, T.; REYBROECK, W. Antimicrobials. In: International dairy federation. **Monography on residues and contaminants in milk and milk products**. Brussels. 1997. p.26-34.

IBGE. Biblioteca virtual. **Censo 2006**. Disponível em:<http://www.biblioteca.ibge.gov.br>. Acesso em: 27 de março de 2011.

IBGE. Biblioteca virtual. **Censo 2010**. Disponível em:<http://www.biblioteca.ibge.gov.br>. Primeiros resultados. Acesso em: 05 de janeiro de 2012.

ICMSF.INTERNATIONAL COMISSION ON MICROBIOLOGICAL SPECIFICATIONS FOR FOODS.**Técnicas de análises microbiológicas**. 2ed. Zaragoza: Acribia, 1982. 431p.

JACOBY, G. A., ARCHER, G. L. New mechanisms of bacterial resistance to antimicrobial agents.**New England Journal of Medicine**, v.324, p. 601-612, 1991.

JACOBY, G. A. Epidemiology of extended-spectrum b-lactamases. **Clinical Infectious Diseases**.v.27, p.81-83, 1998.

LANCETTE, G. A.; BENNET, R. W. Staphylococcus aureus and Staphylococcal enterotoxins. In: DOWNES, F. P.; ITO, K. (Ed.) **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. 4 ed. Washington D.C.: SHERIDAN, 2001. p. 387-404.

LANCEY, R. W. Genetic basis, epidemiology and future significance of antibiotic resistance in Staphylococcus aureus. A review. **Journal of Clinical Pathology**,v. 26, p. 899-913, 1973.

LÖNNROTH, A. Contrar restar la resistencia a los microbios. **Revista de La Investigación Europea**, n 37 - maio de 2003 - Publicação oficial da Comunidade Européia. Disponível em: http://ec.europa.eu/research/rtdinfo/37/article_60_es.html. Acesso em: 07/01/2012.

LEVY, S. B. Microbial resistance to antibiotics. **Lancet**.,v. 2, p. 83-88, 1982.

MASSANO, E. S. B.; RAMOS, E. R. P. Prevalência de *Streptococcus pyogenes* em Secreção de Orofaringe de Acadêmicos da Área da Saúde. **Saúde e Pesquisa**, v. 3, n. 2, 2010.

MIMICA, L. M. J.; MENDES, C. M. F.; MIMICA, I. M. Controle laboratorial do tratamento das infecções bacterianas. In: TRABULSI, L. R.; ALBERTHUM, F. **Microbiologia**. 4. ed. São Paulo: Atheneu, 2005. cap. 11, p. 91-97.

MINIUSSI, J. T. Resíduos de medicamentos veterinários em alimentos de origem animal. In: CHARLES, T. P., FURLONG, J. (Ed.). **Doenças dos bovinos de leite adultos**.Coronel Pacheco: EMBRAPA-CNPGL, 1992. p.169-174.

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

MONTEIRO, A. A.; TAMANINI,R.; SILVA, L. C. C.; MATTOS, M. R.; MAGNANI, D. F.; OVIDIO, L.; AUGUSTO, L. **Semina: Ciências agrárias**. Londrina. v.28. n. 4, p. 665-667, Disponível em: http://www.uel.br/proppg/portal/pages/arquivos/pesquisa/semina/pdf/semina_28_4_19_15.pdf. Acesso em: 27 de maio de 2010.

MURPHY, B. P.; MAHONY, E. O.; BUCKLEY, J. F.; O'BRIEN, S.; FANNING, S. Characterization of *Staphylococcus aureus* isolated from Dairy Animals in Ireland. **Zoonoses Public Health**, v. 57, p. 249-257, Ireland. 2010.

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

NELSON, R. W.; COUTO, C. G. **Medicina Interna de Pequenos Animais**. 2.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001. Cap. 97, p. 974-984.

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

NETTO, D.P.; ZANLUCHI, A.T.; SASSAHARA, M.; YANAKA, E.K. Micotoxinas em alimentação animal no período de maio/1997 a março/2001 no Laboratório de Toxicologia Veterinária da Universidade Estadual de Londrina – Londrina – PR. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v.23, n.1, p.79-85, 2002.

NOVICK, R. Plasmids. **Scientific American**.v.24, p. 77-90, 1980.

OLIVEIRA, A. A.; CARNEIRO, A. L. **Ciência do Leite**. (1998). Disponível em:<<http://www.cienciadoleite.com.br>>. Acesso em: 20 de janeiro de 2011.

PASCHOA, M. F. A importância de se ferver o leite pasteurizado tipo “C”, processado por algumas mini e micro usinas de beneficiamento do estado de São Paulo. **Hig Aliment**. V. 11, n. 50, p. 24-8, 1997.

PATRICK, G. L. **An Introduction to Medicinal Chemistry**.Oxford University Press.New York, 2005, cap.16.

PAULA, J. T.; MESQUITA, E. T.; FILHO, J. A. C.; OLIVEIRA, A. E.; SOUZA, W. M. A.; MOURA, A. P. B. L.; COELHO, M. C. O. C.; SANTOS, S. M. L. G.; ANDRADE, L. S. S.; Identificação de Antimicrobianos no leite Caprino através do Teste de Elisa. **Anais...V Seminário de Resistência Bacteriana e IV Seminário de Resistência Microbiana**. (Sessão Pôster), Salvador, Bahia, 2010.

PELCZAR, M. J., CHAN, E. C. S., KRIEG, N. R. **Microbiologia**. São Paulo: Makron Books, 1996. v.2, p.22-40.

PEREIRA, A. L.; PITA, J. R. Alexandre Fleming, da descoberta da penicilina ao prêmio nobel. **Revista da Faculdade de letras**. História. Porto, III Série, v. 6, p. 129-151, 2005.

PEREIRA, M. L.; PEREIRA, J. L.; SERRANO, A. M.; BERGDOLL, M. S. Estafilococos: Até onde sua importância em alimentos? **Higiene Alimentar**, v. 44, n. 66-69, p. 32-40, 2000.

PILON, L. e DUARTE, K. M. R. Técnicas para detectar resíduos de antibiótico em leite bovino. **PUBVET (Publicações em Medicina Veterinária e Zootecnia)**, Londrina, v. 4, n. 42, Ed. 147, Art. 988, 2010.

POSANO, E. H. G. Avaliação da qualidade de amostras de leite cru comercializado no município de Araçatuba e potenciais de risco decorrentes de seu consumo. **Revista Higiene Alimentar**, v.15, p.31-38, 2001.

PUPO, M. T.; GUIMARÃES, D. O.; FURTADO, N. A. J. C.; BORGES, W. S. **Modern Biotechnology in Medicinal Chemistry and Industry**. Taft, C. A., ed.; Research Signpost: Kerala, 2006, cap. 4.

QUINN, P. J.; MARKEY, B. K.; CARTER, M. E. et al. **Microbiologia Veterinária e Doenças Infecciosas**. Porto Alegre: ARTMED, 2005, 79p.

- RAIA JUNIOR, R. B. **Influência da mastite na ocorrência de resíduos deantimicrobianos no leite**. 2001. 78 f. Dissertação (Mestrado em Toxicologia e Análises Toxicológicas) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2001.
- ROSSI, F. S.; CECCON, M. E. J. R.; KREBS, V. L. J. Infecções estafilocócicas adquiridas nas unidades de terapia intensiva neonatais. **Pediatria**, São Paulo, v. 27, n. 1, p. 38-47, 2005.
- ROZZA, L.S.D.B.; WOLFFENBÜTTEL, A.N.; MEIRELLES, A.E.W.B.; PEDROSO, P.M.O.; OLIVEIRA, E.C.; DRIEMEIER, D. Intoxicação por veneno de sapo em um canino. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 38, n. 6, p. 1786-1789, 2008.
- RUIZ, R. L. Manual Prático de Microbiologia Básica. São Paulo: **EDUSP**, p. 129, 2000.
- SALDANHA, T.; MAZALLI, M.R.; BRAGAGNOLO, N. Avaliação comparativa entre dois métodos para determinação do colesterol em carnes e leite. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.24, n.1, p. 109-113, 2004.
- SANTOS, M. V.; FONSECA, L. F. L. Importância e efeito de bactérias psicotróficas sobre a qualidade do leite. **Revista Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 15, n. 82, p. 13-19, 2001.
- SAUNDERS, J. R. Genetics and evolution of antibiotic resistance. **British Medical Bulletin**.v. 40, p. 54-60, 1984.
- SEARS, P. M.; GONZÁLEZ, R. N.; WILSON, D. J.; HAN, H. R. Update on Bovine Mastitis-Procedures for Mastitis Diagnosis and Control. **Vet. Clin. North Am. Food An. Pract.** v. 9, p. 445-468. 1993.
- SILVA, N.; JUNQUEIRA, V. C. A.; SILVEIRA, N. F. A. **Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos**. São Paulo: Livraria Varela, 1997.
- SILVA, W. P. **Caracterização fenotípica e genotípica de cepas de *Staplylococcus aureus* isoladas de leite de vacas com mastite subclínica e de outras fontes em propriedades produtoras de leite**. [Tese de Doutorado] – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo, São Paulo, 1998.
- SILVEIRA, G. P.; NOME, S.; GESSER, J. C.; SÁ, M. M. Estratégias utilizadas no combate a resistência bacteriana. **Quim. Nova**, v. 29, n. 4, 844-855, 2006.
- Sindicato Nacional da Indústria de Produtos para Saúde Animal (**Sindan**), 2007. Disponível em:<<http://www.sindan.org.br>>. Acesso em: 20/03/2011.
- SKOOG, D. A.; HOLLER, J.; NIEMAN, T. **Princípios de Análise Instrumental**. 5ª ed. Porto Alegre: Bookman, 2002. 836p.
- SNEATH, P. H. ed. **Bergey's manual of systematic bacteriology**. Baltimore: Wiliams & Wilkim, v. 2, p. 999-1013, 1986.
- SNYDER, L. R.; KIRKLAND, J. J.; GLAJCH, J. L.; **Practical HPLC Method Development**, 2nd ed., Wiley: New York, 1997, cap. 15.

SORIANO, A.; MARCO, F.; MARTÍNEZ, J. A.; PISOS, E.; ALMELA, M.; DIMOVA, V. P.; ALAMO, D.; ORTEGA, M.; LOPEZ, J.; MENSA, J. Influence of Vancomycin Minimum Inhibitory Concentration on the Treatment of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Bacteremia. Departments of Infectious Diseases and Microbiology, Hospital Clinic of Barcelona, Barcelona, Spain. **MIC of Vancomycin and MRSA Bacteremia**. n. 46, 2008.

SOUSA, F. C.; OLIVEIRA, E. N. A.; SANTOS, D. C.; SILVA, E. F. M. Ocorrência de resíduos de antibióticos em leites pasteurizados comercializados no estado do Ceará-Brasil. **Revista Verde**. v.5, n. 4, p. 10 – 14, 2010.

SPINOSA, H. S. Considerações gerais sobre os antimicrobianos. In: SPINOSA, H. GÓRNIAC, S. L.; BERNARDI, M. M. **Farmacologia aplicada à medicina veterinária**. 3ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 379-385, 2002.

STINGHEN, A. E. M.; ALBINI, C. A.; SOUZA H. A. P. H. M. Coloração de Gram: Como fazer, Interpretar e Padronizar. Curitiba: **Microscience**, p. 70, 2002.

STRASSER, A.; DIETRICH, R.; USLEBER, E.; MARTLBAUER, E. Immunochemical rapid test for multiresidue analysis of antimicrobial drugs in milk using monoclonal antibodies and hapten-glucose oxidase conjugates. **Anal Chim Acta**, v.495, p.11-19, 2003.

SUASSUNA, I. Noções gerais e incidência da resistência bacteriana. In: Gomes AJ (Ed.) Simpósio Internacional sobre Resistência Bacteriana e Infecções Mistas, São Paulo, 1982. **Anais...** São Paulo, Unipress, 1983.

TAVARES, W. **Manual de antibióticos e quimioterápicos antiinfeciosos**. São Paulo: Atheneu; 2001.

TEIXEIRA, M. C. F. Extração, purificação e avaliação da atividade de glucosiltransferases de *Streptococcus* spp. em salivas artificiais. Repositório da Universidade de Lisboa. Relatórios de Projecto. Lisboa. 2010.

TRABULSI, L. R. Aspectos médicos da resistência bacteriana a drogas. **Revista de Microbiologia**. (São Paulo) (suplespec): p. 1-30, 1973.

TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F. **Microbiologia**. 5. ed. Rio de Janeiro: Atheneu, 718p, 2008.

VANDERZANT, C.; SPLITTSTOESSER, D. F. **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. 4ed. Washington: APHA, 1992. 219p.

VIÇOSA, G. N.; MORAES, P. M.; YAMAZI, A. K.; NERO, L. A. Enumeration of coagulase and thermonuclease-positive *Staphylococcus* spp. in raw milk and fresh soft cheese: An evaluation of baird-Parker agar, rabbit plasma fibrinogen TM agar and the Petrifilm staph express count system. **Food Microbiology**, v. 27, p. 447-452, 2010.

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

WALSH, C.; **Antibiotics: Actions, Origins, Resistance**. ASM Press: Washington, 2003. LIVRO DISPONÍVEL NO GOOLGE BOOKS: <http://books.google.com.br/books>. Acesso em: 03 de dezembro de 2011.

WANG, S.; ZHANG, H. Y.; WANG, L.; DUAN, Z. J. KENNEDY, I. Analysis of sulphonamide residues in edible animal products: A review. **Food additives and contaminants**, v. 23, n. 4, p. 362-384, 2006.

ZULIANI M. E.; TRABULSI, L. R. Resistência microbiana a drogas. **Ars Curandi**. n.5, p. 50-72, 1972. Acesso em: <http://www.portaleducacao.com.br/odontologia/artigos/2835/resistencia-bacteriana>

5. ARTIGO CIENTÍFICO

PESQUISA MICROBIOLÓGICA E DE RESÍDUOS ANTIMICROBIANOS EM AMOSTRAS DE LEITE COMERCIALIZADAS NO MUNICÍPIO DE BREJÃO-PE

Pesquisa microbiológica e de resíduos antimicrobianos em amostras de leite comercializadas no município de Brejão-PE

Search microbiology and antimicrobial residues in milk sold in the municipality Brejão-PE

Resumo

Antibióticos são substâncias químicas inespecíficas ou específicas que atuam sobre os microrganismos em geral, sejam estes patogênicos ou não. Sua utilização indiscriminada ocasiona grandes riscos à saúde, além de favorecer a resistência bacteriana. Objetivou-se com este trabalho avaliar a presença de *Staphylococcus* spp. e de antimicrobianos em 42 amostras de leite bovino *in natura* provenientes de propriedades do município de Brejão-PE. As amostras foram submetidas à detecção de resíduos microbianos através do teste de inibição microbiana (ECLIPSE-50[®]), à cultura microbiana para identificação de *Staphylococcus* spp. e realização do antibiograma frente à Penicilina, Amoxicilina, Tetraciclina, Estreptomicina e Gentamicina. Obtendo-se os seguintes resultados: 45,24% das amostras foram positivas para a presença de antimicrobianos acima dos limites permitidos e em 88,09% ocorreu crescimento de *Staphylococcus* spp. Em relação à resistência aos fármacos, 76,19% das cepas isoladas do leite demonstrou resistência à Gentamicina, 83,33% foram resistentes à Estreptomicina, 80,95% à Tetraciclina, 33,33% à Amoxicilina e 47,62% à Penicilina. Concluindo-se que as amostras do leite comercializadas no município de Brejão apresentaram contaminação química e biológica.

Palavras chave: antibióticos, resíduos medicamentosos, contaminação, *Staphylococcus*.

Abstract

Antibiotics are no specific or specific chemical substances that act against microorganisms in general, even if they are pathogenic or not. Its indiscriminate use can cause major health risks, and still lead to bacterial resistance. This study aimed to evaluate the presence of *Staphylococcus* spp. and of antimicrobial agents in 42 samples of fresh bovine milk from properties located in the district of Brejão-PE. The samples were submitted to detection of microbial residue through microbial inhibition test (ECLIPSE-50[®]), microbial culture to identify *Staphylococcus* spp. and realization of antibiogram with Penicillin, Amoxicillin, Tetracycline, Streptomycin and Gentamicin.

Obtaining the following results: 45.24 % of the samples were positive for presence of antimicrobial agents above the limits allowed and in 88.09 % occurred growth of *Staphylococcus* spp. With regard to resistance against the drugs, 76.19 % of strains isolated from the milk showed resistance to Gentamicin, 83.33 % were resistant to Streptomycin, 80.95 % to Tetracycline, 33.33 % to Amoxicillin and 47.62 % to Penicillin. Concluding that the samples of milk commercialized in Brejão showed chemical and biological contamination.

Key Words: antibiotics, medical residue, contamination, *Staphylococcus*.

Introdução

O leite é um dos alimentos mais utilizados na dieta humana em todas as etapas da vida, principalmente por ser tão completo do ponto de vista nutricional (PASCHOA, 1997; GARCIA et al.,2000). Por isso sua qualidade tem sido muito discutida atualmente dentro do cenário nacional de produção leiteira (GUERREIRO et al., 2005), principalmente sob o ponto de vista de saúde pública, pois ocupa lugar de destaque em nutrição humana (POSANO et al.,2001).

O leite deve apresentar condições sanitárias adequadas, sendo sua qualidade higiênica influenciada principalmente, pelo estado sanitário do rebanho, manejo dos animais e dos equipamentos durante a ordenha, além da presença de microrganismos, resíduos de medicamentos e odores estranhos (BRITO, 1997).

Infecções no úbere, mesmo que subclínicas, influenciam grandemente a composição do leite, sendo que o principal efeito é o abaixamento da concentração de gordura, lactose e caseína, e aumento no conteúdo de proteínas do soro e cloretos. Estados mais avançados de infecção resultam em um leite com composição química diferente da normal. A mastite bovina é uma doença multifatorial, de etiologia complexa e variada, e se encontra disseminada em todas as regiões produtoras de leite. A maioria das infecções tem origem bacteriana, predominando o *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus agalactiae* (PELCZAR,CHAN e KRIEG, 1996).

Em função dessas infecções, os antimicrobianos têm sido bastante utilizados nas fazendas e até em muitos casos, de maneira indiscriminada, seja para fins terapêuticos, principalmente visando a cura de mamites, ou ainda incorporados à alimentação animal como suplemento dietético (MINIUSSI, 1992).

O uso indiscriminado de antibióticos e a não obediência do período de carência indicado após a última aplicação do medicamento ao animal, para a utilização do leite

para consumo humano, tem sido relatado há décadas por pesquisadores. A importância deste fato está relacionada, principalmente, ao aspecto da saúde pública, em que o consumo sistemático de leite contendo resíduos pode acarretar sérios riscos à saúde humana, além da possibilidade de favorecer o desenvolvimento de formação de resistência de microrganismos patogênicos (DENOBILE e NASCIMENTO, 2004).

As culturas bacterianas podem ser associadas ao antibiograma no intuito de determinar a melhor opção terapêutica. O antibiograma é um teste laboratorial *in vitro* utilizado para determinar a suscetibilidade ou a resistência do patógeno frente aos medicamentos antimicrobianos (HENDRIX, 2005). O método mais comumente utilizado para realização do antibiograma é o de disco-difusão em ágar, que usa discos de papel impregnados com antimicrobianos. É um teste qualitativo, onde é realizada medição de tamanhos de zona para dar uma estimativa de suscetibilidade antimicrobiana (MIMICA et al., 2005). A concentração do fármaco no disco é escolhida para se correlacionar com os níveis séricos e teciduais do medicamento no animal tratado (HENDRIX, 2005).

A popularização do uso de antibióticos fez com que as bactérias também desenvolvessem defesas relativas aos agentes antibacterianos, com o consequente aparecimento da resistência (SILVEIRA et al., 2006).

Segundo os resultados de Pilon e Duarte (2010), os produtores devem ter melhores informações técnicas sobre como tratar seus animais, evitando assim certos tipos de doenças, que possam vir a prejudicá-los, bem como a população que irá consumir produtos de origem animal.

Inúmeros testes qualitativos e quantitativos para detectar resíduos de antimicrobianos e drogas no leite e em derivados lácteos têm sido desenvolvidos, desde a década de 40 (BRITO, 2000).

O kit Eclipse 50[®], do laboratório Cap Lab, é um teste de inibição de crescimento microbiano, qualitativo na detecção de substâncias inibidoras no leite, permitindo comprovar se o leite contém antibióticos acima do limite máximo de resíduos. O teste se baseia na inibição do crescimento microbiano. A apresentação do kit é em formato de placa “microtiter”, onde cada recipiente contém um meio de cultivo específico com esporos de *Geobacillus stearo thermophilus* e um indicador ácido-base. O resultado do teste é negativo quando os esporos germinam e se multiplicam, acidificando o meio e provocando a modificação do indicador de uma coloração azul para amarelo esverdeado. Em resultados positivos (onde a concentração de antibiótico é superior ao

limite de detecção do teste), o crescimento do microrganismo é inibido, sendo assim, não há produção do ácido e a coloração do meio permanece inalterada (SOUSA et al., 2010).

Dentre os riscos à saúde humana, associados à presença de resíduos antimicrobianos, destacam-se reações alérgicas em indivíduos sensíveis, desequilíbrio na flora intestinal, discrasias sanguíneas, ação teratogênica, além de propiciar a seleção de populações de bactérias resistentes (BRANDY e KATZ, 1992; BRANDY e KATZ, 1993; HONKANEN-BUZALSKI e REYBROECK, 1997; MITCHELL et al. 1998).

Neste contexto, a preocupação com a qualidade do produto que é afetada tanto pela manipulação inadequada de utensílios e do próprio alimento nas etapas de tratamento e beneficiamento, como pelo manejo inadequado dos animais levando a problemas sanitários (PINHEIRODE SÁ et al., 2000) e, conseqüentemente, a utilização constante de antibióticos dentro dos pequenos, médios e grandes estratos de produção leiteira do Brasil e do mundo (FREITAS et al., 2005).

Objetivou-se com este trabalho avaliar a presença de *Staphylococcus* spp. e a presença de antimicrobianos em 42 amostras de leite bovino *in natura* provenientes de propriedades no município de Brejão-PE.

Material e Métodos

O projeto foi desenvolvido em propriedades produtoras de leite bovino, localizadas no município de Brejão, Agreste Meridional do estado de Pernambuco. O município tem um total de 203 propriedades produtoras de leite e na obtenção das amostras foi utilizado um processo de amostragem aleatório onde qualquer propriedade possuía a mesma chance de ser escolhida, assim, foi coletado um total de 42 amostras (uma com 15 ml, por propriedade), quantidade significativa já que representa porção superior a 20% da população de propriedades produtoras de leite da região. Para o estudo amostral foi utilizada a fórmula de Levine, Bereson e Stephan, (2000) baseada no cálculo do erro de amostragem para uma população finita e determinada com uma estimativa confiável da proporção populacional. Onde o grau de confiança utilizado foi de 95%.

Inicialmente, foram aplicadas junto aos 42 produtores uma entrevista semi-estruturada a fim de identificar quais os medicamentos mais utilizados para as doenças ocorridas na propriedade, bem como seus conhecimentos em relação aos mesmos

mediante as recomendações de bula e período de descarte. Durante as visitas foram fornecidas orientações aos proprietários sobre a utilização racional dos medicamentos, bem como a importância da prescrição médico-veterinária e sobre os riscos de resíduos de medicamentos à saúde do animal e do homem.

As coletas das amostras de leite foram realizadas nas propriedades logo após a ordenha e acondicionamento diretamente dos vasilhames de acondicionamento para o transporte até o resfriador, sendo esta a “pool” da ordenha de cada propriedade. Cada amostra colhida foi transferida para frascos estéreis de 15 ml, com tampa (tipo falcon), mantidas resfriadas por no máximo 12 horas em refrigerador doméstico (aproximadamente 8°C) e encaminhadas em caixas isotérmicas contendo gelo reciclável, sendo um frasco encaminhado até o Laboratório de Pesquisas de Inspeção de Carne e Saúde Pública (CASP) do Departamento de Medicina Veterinária da UFRPE, para análise microbiológica e de resíduos de antimicrobianos.

As análises microbiológicas foram realizadas de acordo com as normas preconizadas pelo Ministério da Agricultura e Abastecimento - MAPA (BRASIL, 2003), e os resultados foram interpretados segundo a resolução da Diretoria Colegiada da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (RDC) (BRASIL, 2001).

A lactocultura foi realizada em placas contendo Ágar Baird-Parker enriquecido com emulsão de gema de ovo e telurito de potássio. As placas foram incubadas em aerobiose a 36°C +/- 1°C por 48 horas, sendo analisadas a cada 24h. Observando-se características de crescimento das colônias em placa, como presença ou ausência de halos negros brilhantes ou cinzentos.

As cepas de *Staphylococcus* identificadas nas placas, foram submetidas a prova de coagulase. Foi utilizado o caldo Brain Heart Infusion (BHI) ou caldo cérebro-coração, acrescidos de Coágulo Plasma (plasma de coelho) em cada tubo de vidro para então serem semeados. Foram utilizadas colônias típicas das respectivas placas. Em seguida os tubos eram tampados e levados para a estufa a 30°C e realizadas as leituras com 1, 3 e 6 horas após.

Para a prova de catalase, foi retirada com auxílio de uma micropipeta uma gota dos tubos da prova de coagulase e a mesma era colocada em uma placa e homogeneizada com uma gota de peróxido de hidrogênio a 3%, e foi observada a formação de bolhas ou não. Na presença de bolhas a amostra é considerada catalase positiva, confirmando ser *Staphylococcus* spp.

Para o teste de Gram, foram confeccionadas lâminas a partir de uma gota de água destilada e uma colônia retirada do meio BP da primeira prova. Onde estas foram homogeneizadas, espalhadas em lâminas de vidro e coloradas pelo método de Gram; na seguinte sequência: Cristal violeta-30 segundos – lugol-1 minuto-álcool para lavar-Fucsina fenicada-30segundos- água para lavar e secar.

Os parâmetros seguidos para esta prova foram: Características morfotintoriais das bactérias. Coloração rosa são Gram positivo. Coloração roxa são Gram positivo. Observando que resultado Gram positivo é indicativo da presença de *Staphylococcus aureus*.

Após todos os testes confirmatórios da presença de *Staphylococcus* spp. foi realizado o antibiograma em discos.As amostras inoculadas nos tubos com BHI após 24hs foram semeadas em placas de Petri contendo ágar Muller-Hinton, esfregando-se com o auxílio de alça estéril, em várias direções sobre o ágar para se obter uma distribuição uniforme da bactéria. Depois, com auxílio de uma pinça, os discos impregnados com antibióticos eram depositados e levemente pressionados sobre a superfície do meio inoculado, mantendo-se, entre um disco e outro, a distância de, aproximadamente, três centímetros. As placas eram incubadas a 37°C por 24hs, a leitura dos halos de inibição foi realizada 48h após, com uma régua específica (ARAÚJO, 1998). Os resultados eram interpretados como resistente (R) e sensível (S), de acordo com tabela fornecida pelo fabricante dos discos de sensibilidade. Foram utilizados os seguintes antibióticos: Penicilina, Gentamicina, Estreptomicina, Tetraciclina e Amoxicilina.

A pesquisa de resíduos antimicrobianos foi realizada através da utilização do kit Eclipse 50[®], do laboratório Cap Lab, um teste qualitativo para detecção de resíduos, que utiliza como base a inibição microbiana, avaliando-se a presença de resíduos em níveis superiores ao limite máximo de resíduos (LMR) de Penicilina G, Ampicilina, Amoxicilina, Oxacilina, Clorxacilina, Cefalexina, Cefapirina, Sulfatiazol, Sulfametazina, Sulfanilamida, Oxitetraciclina, Tetraciclina, Eritromicina, Tilosina, Neomicina e Estreptomicina.

Utilizou-se 50µL de leite para cada poço da placa “microtiter”, os quais continham um meio de cultivo específico com esporos de *Geobacillus stearo thermophilus* e um indicador ácido-base, sendo a placa incubada a 65°C, por duas horas e meia em banho térmico tipo bloco seco para antibiótico, conforme instruções do fabricante.

A interpretação dos resultados ocorreu mediante a observação da coloração das amostras, sendo as azuis consideradas positivas e as amarelas negativas.

Resultados e Discussão

No presente estudo, observou-se que as propriedades analisadas produzem juntas aproximadamente 2.500 litros por dia e que mesmo após, coletado pelo atravessador é resfriado e encaminhado para o município de Garanhuns-PE, onde é destinado a indústria de laticínios da região, a uma queijaria (de pequeno porte) e uma fábrica de sorvetes.

Na entrevista semi-estruturada realizada com os produtores verificou-se que há prática de emprego empírico e indiscriminado no uso de medicamentos, não havendo consulta ao médico veterinário. Dentre as afecções mais frequentes destacaram-se a mastite e a tristeza parasitária. Como os animais eram criados em semi-intensivo e as ordenhas eram realizadas no próprio curral, manualmente, sem pré e pós-dipping justifica-se a prevalência de mastite em 33,33% das propriedades.

Dentre os medicamentos mais utilizados, destacaram-se as tetraciclina, sulfonamidas, penicilinas (antimicrobianos) e avermectinas (endectocida). Foram fornecidas orientações aos produtores na tentativa de conscientizá-los sobre a prescrição do antimicrobiano pelo médico-veterinário, alertando-os dos riscos que os resíduos dos mesmos podem acarretar quando presente no leite, quer interferindo na qualidade do produto, como na saúde de quem o consome. Procurou-se também, orientá-los sobre os padrões higiênico-sanitários do leite.

Quanto às análises microbiológicas, em 88,09% (37/42) houve crescimento de *Staphylococcus* spp. (Figura 1), sendo todos catalase positiva. O teste confirmatório da coloração de Gram foi realizado, obtendo-se 85,71% (36/42) de cepas positivas. Foram encontradas 30,95% (13/42) coagulase positivas.

Chapavalet al. (2009), analisaram 60 amostras de leite caprino no município de Sobral-CE, e os resultados obtidos mostraram que 100% das cepas de *Staphylococcus* eram catalase positivas, corroborando com o número alto de amostras catalase positivo nos leites analisado. Resultados diferentes do encontrado por Leite et al. (2002), onde analisando 20 amostras de leite tipo C em Salvador-BA, os autores observaram ausência de *Staphylococcus* coagulase positivo nas amostras.

Provavelmente, o número elevado de amostras contaminadas no presente estudo, ocorreram devido aos baixos padrões higiênicos-sanitários observados tanto nos

rebanhos, como na ordenha e acondicionamento do leite, o qual fica exposto ao sol dentro do vasilhame a espera do transporte, susceptível a contaminação microbiana.

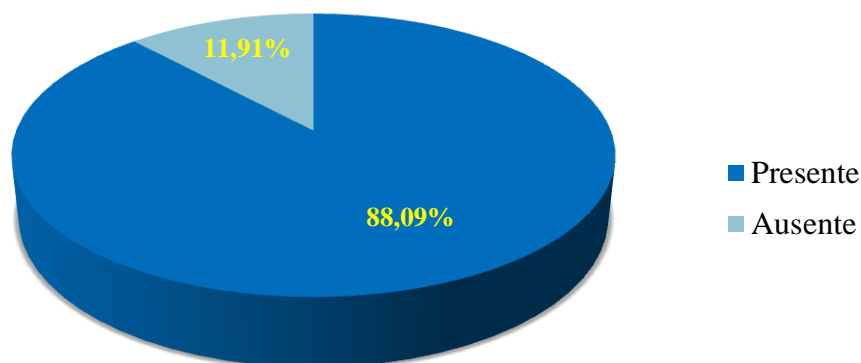


Figura 1. Percentual da contaminação de *Staphylococcus* spp. nas amostras de leite analisadas.

Das cepas analisadas, 97,62% (41/42) apresentaram resistência a algum dos antimicrobianos analisados, semelhante aos resultados de Nader et al. (2007), que encontraram resistência em 100% das cepas de *Staphylococcus aureus* isoladas em leite bovino. Esta resistência pode ser devido a diversos fatores, como uso indiscriminado de antimicrobianos no rebanho para as diversas enfermidades, desrespeito às indicações de uso e descumprimento ao período de carência recomendado, como foi observado durante a realização da entrevista semi-estruturada, corroborando com o descrito por Nero et al. (2007). Destas amostras, 83,33% (35/42) foram resistentes para estreptomicina, 80,95% (34/42) eram resistentes para a tetraciclina, 76,19% (32/42) para a gentamicina, 47,62% (20/42) para a penicilina, e 33,33% (14/42) para a amoxicilina (Figura 2).

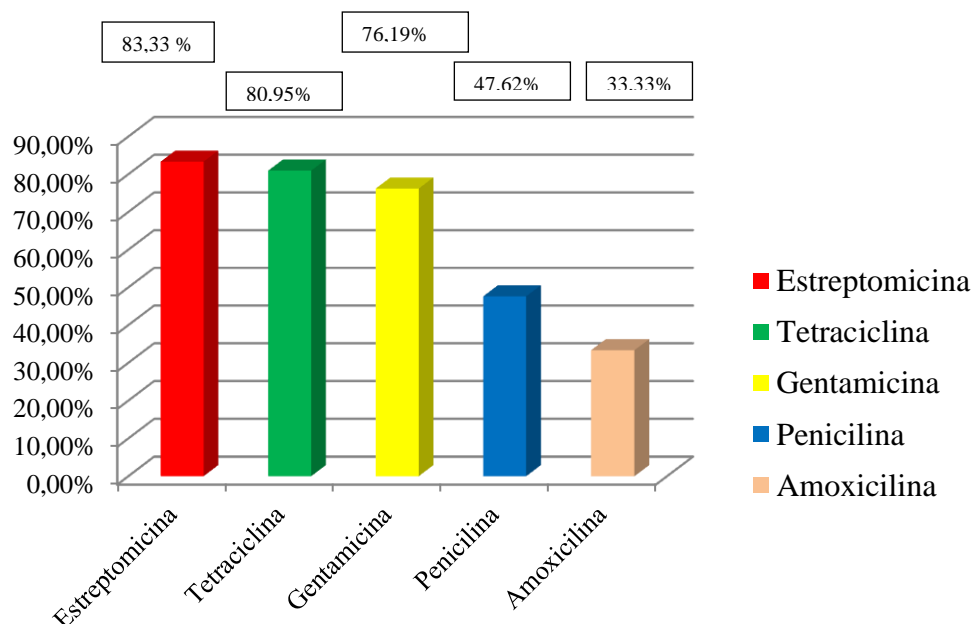


Figura 2. Percentual de resistência das amostras de *Staphylococcus* spp. frente aos antimicrobianos pesquisados.

Em estudo realizado por Araújo (1998), no estado de São Paulo 43,8% das amostras apresentaram resistência para a penicilina indo de acordo com os resultados desta pesquisa e divergindo de Andrade et al. (2000) e Freitas et al. (2005) nos quais a maior resistência esteve relacionada à penicilina, observando resistência em 76,29% e 80%, respectivamente. Ainda no estudo supracitado de Araújo (1998), 19,9% das amostras foram resistentes para a tetraciclina diferente dos resultados obtidos em Brejão, nas quais mais de 80% das amostras se apresentaram resistentes para tal antibiótico, isso pode ser explicado pela fácil aquisição deste fármaco e pela prescrição realizada por leigos em casa de rações sem conhecimento do médico veterinário. Outro fármaco que apresentou valores expressivos de resistência neste estudo foi a gentamicina, cuja alta resistência ocorre provavelmente pelo uso constante de medicações para o tratamento tópico das mastites nas quais este é o princípio ativo mais utilizado; conforme informações obtidas dos proprietários na entrevista semi-estruturada.

Durante as entrevistas, apenas 30,95% dos proprietários relataram estar utilizando algum tipo de medicação, no entanto na análise do leite quanto à presença de resíduos antimicrobianos 45,24% (19/42) foram positivas (Figura 3), demonstrando realidade diferente da exposta pelos criadores, ressaltando também que no exposto incluía-se anti-parasitários e antimicrobianos.

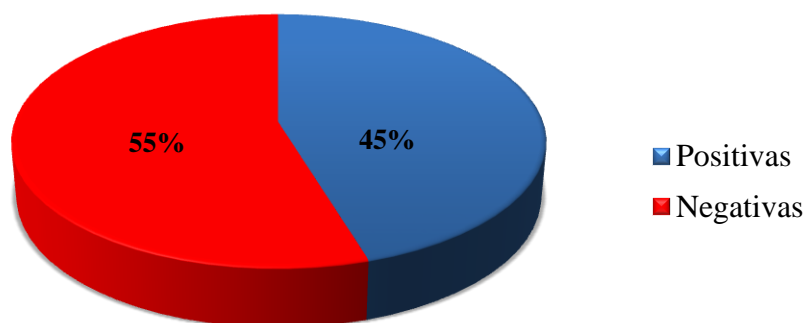


Figura 3. Percentual de amostras positivas e negativas para a presença de resíduos de antimicrobianos.

Em estudo utilizando o mesmo kit (Eclipse 50[®]) realizado por Torres e Clipes (2011) no município de Alegre-ES, observou-se que em 20% das amostras de leite cru analisadas havia resíduos de antimicrobianos. Em estudo recente realizado nos municípios de Pedra e Venturosa – PE, utilizando-se leite caprino de propriedades produtores de leite foi observado que 86% das amostras analisadas apresentaram resíduos de antimicrobianos acima do permitido (PAULA et al., 2010). Nero et al. (2007), estudando a presença de resíduos de antibióticos em amostras de leite cru, coletadas em quatro regiões produtoras de leite no Brasil, detectaram a presença desses resíduos em 11,43% das amostras, utilizando um teste semelhante para detecção de antibióticos chamado kit Charm-testTM. Tais resultados observados nos estudos supracitados ressaltam a importância da realização de testes para pesquisas de antimicrobianos uma vez que demonstram dados relevantes de contaminação química no leite. Inúmeros testes qualitativos e quantitativos para detectar resíduos de antimicrobianos e drogas no leite e em derivados lácteos têm sido desenvolvidos, desde a década de 40. Os métodos mais usados são os de inibição do crescimento microbiano, ou microbiológicos, e se baseiam no princípio geral de que todos os antimicrobianos inibem bactérias sensíveis (BRITO, 2000) sendo o kit utilizado nesta pesquisa indicado para detecção de resíduos por ser prático, rápido, podendo ser analisadas 24 amostras a cada duas horas e meia, e ainda apresentar custo acessível.

Pesquisas relacionadas à presença de antimicrobianos são de extrema relevância, uma vez que não há tratamento tecnológico que consiga inativá-las, sendo esta presença um fator de desclassificação do leite, tornando a matéria-prima inadequada para uso na

indústria e para o consumo humano (SANTOS, 2009) nos trabalhos de Sousa et al. (2010) no estado do Ceará e Nascimento et al. (2001) em São Paulo com amostras de leite pasteurizado, os pesquisadores observaram a presença de resíduos de antibióticos em 76,67% e 50%, respectivamente. Os altos percentuais provavelmente se devem ao uso indiscriminado destes fármacos por parte dos criadores.

O uso indiscriminado de antibióticos e a não obediência do período de carência indicado após a última aplicação do medicamento no animal, para a utilização do leite destinado ao consumo humano, tem sido relatado há décadas por pesquisadores e a importância deste fato está relacionada, principalmente, ao aspecto da saúde pública, em que o consumo sistemático de leite contendo resíduos pode acarretar sérios riscos à saúde humana, além da possibilidade de favorecer o desenvolvimento de formação de resistência de microrganismos patogênicos (DENOBILO e NASCIMENTO, 2004).

Se faz necessário a implementação de programas de monitoramentos eficiente no controle de resíduos de antimicrobianos no leite bovino, uma vez que resíduos de antibióticos são perigos químicos presentes no leite utilizado para o consumo humano e medidas que visem boas práticas de higiene no manejo dos animais e processamento de leite para evitar a contaminação do produto.

Conclusão

As amostras do leite *in natura* provenientes de propriedades do município de Brejão-PE apresentaram contaminação química e biológica.

Referências

ALVES, A.R.; MARINHO, C.M.; BARROS, K.M.; ABREU, V. Bovinocultura leiteira. *Boletim setorial do agronegócio*, n.03, maio, 2010, SEBRAE/PE. Disponível em: <http://www.pe.sebrae.com.br/uf/pernambuco>. Acessado em: 20 jan. 2011.

ANDRADE, M.A; DIASFILHO F.C; MESQUITA, A.J; ROCHA, P.T. Sensibilidade *in vitro* de *Staphylococcus aureus* isolados de amostras de leite de vacas com mastite subclínica. *Ciênc. Anim. Bras.*, v. 1, n. 1, p. 53-57, 2000.

ARAÚJO, W. P. Fagotipagem de cepas de *Staphylococcus aureus* resistentes a antibióticos, isoladas de leite. *Braz. J. vet. Res. anim. Sci.*, v. 35, n. 4, p. 161-165, 1998.

BELL, C.; RHOADES, J.R.; NEAVES, D.; SCANELLA, D. An evaluation of IDDEXSNAP test for the detection of b-lactams antibiotics in farm milks. *Nether lands Milk Journal*, v. 49, p. 15-25, 1995.

BRADY, M. S.; KATZ, S. E. *In vitro* effect of multiple antibiotic/antimicrobial residues on the selection for resistance en bacteria. *J. Assoc. Off. Anal.Chem.*, v.75, n.4, p.738-742, 1992.

BRADY, M. S.; WHITE, N.; KATZ, S. E. Resistance development potencial of antibiotic/antimicrobial residues levels designated as “safe level”. *J. Food Prot.*, v. 56, n. 3, p. 229-233, 1993.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária – Programa Nacional de Análise de Resíduos de Medicamentos Veterinários em Alimentos Expostos ao Consumo. Novembro, 2003. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br>. Acesso em: 08 jul. 2009.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretária Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução nº 12, de 2 de janeiro de 2001. Dispõe sobre padrões microbiológicos. Diário Oficial. Brasília (DF), 10 jan. 2001. Seção I, p. 48.

BRASIL. Ministério da saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Alimentos. Comissões. Resíduos. Histórico. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/alimentos/alimentos/comissoes/residuos.html>. Acesso em: 08 de set. de 2010.

BRITO, M.A.V.P. Perigos dos resíduos antimicrobianos. *Leite Brasil*. n.2, out, 1997.

BRITO, M.A.V.P. Resíduos de antimicrobianos no leite. Juiz de Fora: Embrapa Gado de Leite. *Circular Técnica*, n. 60, 20p, 2000.

CHAPAVAL, L.; VIANA, G. A.; SOUSA, A. P. B.; AGUIAR, V. M. P.; MIRANDA, K.; MORORÓ, A. M. Detecção de *Staphylococcus* spp. em leite de

cabra com e sem a utilização de boas práticas de ordenha. In: 4º Simpósio Internacional Sobre Caprinos e Ovinos de Corte. Feira Nacional do Agronegócio da Caprino-Ovinocultura de Corte. João Pessoa, 2009.

DENOBILO, M.; NASCIMENTO, E.S. Validação de método para determinação de resíduos de antibióticos, tetraciclina, clortetraciclina e doxiciclina em leite, por cromatografia líquida de alta eficiência. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, v. 40, n.2, p.211-218, 2004.

FAGUNDES, C.M. *Inibidores e controle de qualidade do leite*. Pelotas: UFPEL, 1997.

FONSECA, L.F.L.; SANTOS, M.V. *Qualidade do leite e controle de mastite*. São Paulo: Lemos Editorial, 2000. 176 p.

FREITAS, M.F.L; PINHEIRO JÚNIOR, J.W.; STAMFORD, T.L.M.; RABELO, S.S.A.; SILVA, D.R.; SILVEIRA FILHO, V.M.; SANTOS, F.G.B.; SENA, M.J.; MOTA, R.A. Perfil de sensibilidade antimicrobiana *in vitro* de *Staphylococcus coagulase positivos* isolados de leite de vacas com mastite no agreste do Estado de Pernambuco. *Arq. Inst. Biol.*, v.72, n.2, p.171-177, 2005.

GARCIA, C. A.; SILVA, N. R.; LUQUETTI, B. C.; SILVA, R. T.; MARTINS, I. P.; VIEIRA, R. C. Influência do ozônio sobre a microbiota do leite “*in natura*”. *Hig Aliment.* v.14, n. 70, p. 36-50, 2000.

GUERREIRO, P.K.; MACHADO, M.R.F.; BRAGA, G.C.; GASPARINO, E.; FRANZENER, A.S.M. Qualidade microbiológica de leite em função de técnicas profiláticas no manejo de produção. *Ciênc. agrotec.*, v. 29, n. 1, p. 216-222, jan./fev. 2005.

HENDRIX, C. M. *Procedimentos Laboratoriais para Técnicos Veterinários*. 4. ed. São Paulo: Roca, 2005. cap. 4, p. 109-197.

HONKANEN-BUZALSKI, T.; REYBROECK, W. Antimicrobials. In: International dairy federation. Monography on residues and contaminants in milk and milk products. Brussels. p.26-34, 1997.

IBGE. *Biblioteca virtual*. Disponível em: <http://www.biblioteca.ibge.gov.br>. Acessado em 27 de mar. 2011.

IBGE. *Censo Agropecuário 2006*. Disponível em: http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/economia/agropecuaria/censoagro/agri_familia_r_2006/familia_censoagro2006.pdf. Acessado em: 12 Agost. 2011.

LEITE, C. C.; GUIMARÃES, A. G.; ASSIS, P. N.; SILVA, M. D.; ANDRADE, C. S. O. Qualidade bacteriológica do leite integral (tipo C) comercializado em Salvador–Bahia. *Rev. Bras. Saúde Prod.* v.3, n.1, p. 21-25, 2002.

LEVINE, D. M.; BERENSON, M. L.; STEPHAN, D. Estatística: Teoria e Aplicações usando Microsoft Excel em Português. Rio de Janeiro: LTC, 2000. p. 32.

MINIUSSI, J.T. Resíduos de medicamentos veterinários em alimentos de origem animal. In: CHARLES, T. P., FURLONG, J. (Ed.). *Doenças dos bovinos de leite adultos*. Coronel Pacheco: EMBRAPA-CNPGL, 1992. p.169-174.

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

NADER, F. A.; FERREIRA, L. M.; AMARAL, L. A.; ROSSI, O. D. J.; OLIVEIRA, R.P. Sensibilidade Antimicrobiana dos *Staphylococcus aureus* isolados no leite de vaca com mastite. *Arq. Inst. Biol.*, São Paulo, v.74, n.1, p.1-4, jan./mar., 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*, v. 14, n. 2, p. 2, 2001.

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

PASCHOA, M.F.A. Importância de se ferver o leite pasteurizado tipo “C”, processado por algumas mini e micro usinas de beneficiamento do estado de São Paulo. *Hig Aliment.*, v. 11, n. 50, p. 24-8, 1997.

PAULA, J. T.; MESQUITA, E. T.; FILHO, J. A. C.; OLIVEIRA, A. E.; SOUZA, W. M. A.; MOURA, A. P. B. L.; COELHO, M. C. O. C.; SANTOS, S. M. L. G.; ANDRADE, L. S. S.; Identificação de Antimicrobianos no leite Caprino através do Teste de Elisa. In: V Seminário de Resistência Bacteriana e IV Seminário de Resistência Microbiana. *Anais...* Salvador, 2010. (Resumo).

PELCZAR, M.J.; CHAN, E.C.S.; KRIEG, N.R. *Microbiologia*. São Paulo: Makron Books, 1996. v.2, p.22-40.

PILON, L.; DUARTE, K.M.R. Técnicas para detectar resíduos de antibiótico em leite bovino. *PUBVET (Publicações em Medicina Veterinária e Zootecnia)*, Londrina, v. 4, n. 42, 2010.

PINHEIRO DE SÁ, M. E.; MOTA, R. A.; SOUZA, M. I.; OLIVEIRA, A. A. F. Etiologia da mastite subclínica em bovinos leiteiros do agreste meridional do Estado de Pernambuco. *Revista Brasileira de Ciência Veterinária*, v.7, n.2, p.100-1003, 2000.

POSANO, E.H.G. Avaliação da qualidade de amostras de leite cru comercializado no município de Araçatuba e potenciais de risco decorrentes de seu consumo. *Revista Higiene Alimentar*, v.15, p.31-38, 2001.

SANTOS, P.N. *Validação de metodologias para determinação de antimicrobianos em pescado por cromatografia líquida de alta eficiência*. 2009. Dissertação (Mestrado em Química), Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife.

SILVEIRA, G.P.; NOME, S.; GESSER, J.C.; SÁ, M.M. Estratégias utilizadas no combate a resistência bacteriana. *Quim.Nova*, v. 29, n. 4, p. 844-855, 2006.

SHITANDI, A.; KIHUMBU, G. Laboratory evaluation of the improved tube test detection limits for β -lactam residues in Kenyan milk. *African Journal of Biotechnology*, Nairobi, v. 3, n. 1, p. 82-87, jan. 2004.

SOUSA, F.C.; OLIVEIRA, E.N.A.; SANTOS, D.C.; SILVA, E.F.M. Ocorrência de resíduos de antibióticos em leites pasteurizados comercializados no estado do Ceará-Brasil. *Revista Verde*, v.5, n.4, p. 10 –14, out/dez, 2010.

TORRES, C. R.; CLIPES, R. C. Avaliação da qualidade do leite cru refrigerado no município de Alegre-ES. In: VI Jornada de Iniciação Científica, Desenvolvimento Tecnológico e Inovação. *Anais...Espírito Santo*. 2011. (Resumo).

ANEXO

ENTREVISTA SEMI-ESTRUTURADA

1. Proprietário:

2. Tipo de criação:

3. Número total de animais:

4. Números de fêmeas:

5. Número de fêmeas em lactação:

6. Doenças mais frequentes nos animais:

7. Há consulta a profissional habilitado () Sim () Não
Se negativo quem diagnostica e prescreve os medicamentos:

8. Medicções utilizadas:

9. Como foram indicadas:

10. Espaço de tempo entre a última aplicação da medicação e a coleta do material:

APÊNDICE

INSTRUÇÕES AOS AUTORES

- [Tipos de artigos aceitos para publicação](#)
- [Política editorial](#)
- [Preparação dos manuscritos para publicação](#)
- [Citações bibliográficas](#)
- [Submissão dos trabalhos](#)

Tipos de artigos aceitos para publicação

Artigo Científico. É o relato completo de um trabalho experimental. Baseia-se na premissa de que os resultados são posteriores ao planejamento da pesquisa. Seções do texto: Introdução, Material e Métodos, Resultados e Discussão e Conclusões. O número total de páginas não deve exceder a 15.

Relato de Caso. Contempla principalmente as áreas médicas, em que o resultado é anterior ao interesse de sua divulgação ou a ocorrência dos resultados não é planejada. Seções do texto: Introdução, Casuística, Discussão e Conclusões (quando pertinentes). O número total de páginas não deve exceder a 10.

Comunicação. É o relato sucinto de resultados parciais de um trabalho experimental, dignos de publicação, embora insuficientes ou inconsistentes para constituírem um artigo científico. Levantamentos de dados (ocorrência, diagnósticos, etc.) também se enquadram aqui. Deve ser compacto, com no máximo seis páginas impressas, sem distinção das seções do texto especificadas para "Artigo Científico", embora seguindo aquela ordem. Quando a comunicação for redigida em português deve conter um "Abstract" e quando redigida em inglês deve conter um "Resumo".

Política editorial

Publicar trabalhos científicos originais (artigos, relatos de casos e comunicações) que sejam de interesse para o desenvolvimento da ciência animal. Serão recomendados para publicação somente os trabalhos aprovados pelos editores, baseados na recomendação de dois revisores científicos da área pertinente e/ou do corpo editorial.

Preparação dos manuscritos para publicação

Os trabalhos devem ser redigidos em português ou inglês, na forma impessoal. Para ortografia em inglês recomenda-se o *Webster's Third New International Dictionary*. Para ortografia em português adota-se o *Vocabulário Ortográfico da Língua Portuguesa*, da Academia Brasileira de Letras. Os trabalhos submetidos em inglês deverão conter resumo em português e vice-versa.

Os trabalhos e ilustrações deverão ser apresentados em Microsoft Word, folha no formato A4, fonte Times New Roman tamanho 12, espaço entre linhas 1,5, margens de 3cm, com páginas e linhas numeradas (numeração contínua).

Seções de um trabalho

Título. Em português e em inglês. Deve ser o resumo do resumo e não ultrapassar 100 dígitos.

Autores. Os nomes dos autores virão abaixo do título, com identificação da instituição a que pertencem. Deve estar indicado o autor para correspondência com endereço completo, telefone, fax e e-mail.

Resumo e Abstract devem conter no máximo 200 palavras em um só parágrafo. Não repetir o título. Cada frase é uma informação. Atenção especial às conclusões.

Palavras-chave e Keywords. No máximo cinco.

Introdução. Explanação concisa, na qual são estabelecidos brevemente o problema, sua pertinência, relevância e os objetivos do trabalho.

Material e Métodos. Citar o desenho experimental, o material envolvido, a descrição dos métodos usados ou referenciar corretamente os métodos já publicados. Não usar subtítulos.

Nos trabalhos que envolvam animais ou organismos geneticamente modificados deverá constar o número do protocolo de aprovação do Comitê de Bioética e/ou de Biossegurança.

Resultados. Apresentar clara e objetivamente os principais resultados encontrados.

Discussão. Discutir somente os resultados obtidos no trabalho.

Obs.: As seções Resultados e Discussão poderão ser apresentadas em conjunto.

Conclusões. As conclusões devem estar apoiadas nos dados da pesquisa executada.

Ilustrações. São tabelas e figuras. Toda ilustração que já tenha sido publicada deve conter, abaixo da legenda, dados sobre a fonte (autor, data) e a correspondente referência deve figurar na lista bibliográfica final.

Tabela. Conjunto de dados alfanuméricos ordenados em linhas e colunas. Usar linhas horizontais na separação do cabeçalho e no final da tabela. A legenda recebe inicialmente a palavra Tabela, seguida pelo número de ordem em algarismo arábico e é referida no texto como Tab., mesmo quando se referir a várias tabelas.

Figura. Qualquer ilustração constituída ou que apresente linhas e pontos: desenho, fotografia, gráfico, fluxograma, esquema etc. As legendas recebem inicialmente a palavra Figura, seguida do número de ordem em algarismo arábico e é referida no texto como Fig., mesmo se referir a mais de uma figura. As figuras devem ser enviadas em arquivo separado, extensão.jpg.

Agradecimentos. Devem ser concisamente expressados.

Referências bibliográficas. As referências devem relacionadas em ordem alfabética.

Citações bibliográficas

Citações no texto deverão ser feitas de acordo com ABNT/NBR 10520 de 2002. A indicação da fonte entre parênteses sucede à citação para evitar interrupção na sequência do texto, conforme exemplos:

- autoria única: (Silva, 1971) ou Silva (1971); (Anuário..., 1987/88) ou Anuário... (1987/88)
- dois autores: (Lopes e Moreno, 1974) ou Lopes e Moreno (1974)
- mais de dois autores: (Ferguson et al., 1979) ou Ferguson et al. (1979)
- mais de um trabalho citado: Dunne (1967); Silva (1971); Ferguson et al. (1979) ou (Dunne, 1967; Silva, 1971; Ferguson et al., 1979), sempre em ordem cronológica ascendente e alfabética de autores para trabalhos do mesmo ano.

Citação de citação. Todo esforço deve ser empreendido para se consultar o documento original. Em situações excepcionais pode-se reproduzir a informação já citada por outros autores. No texto, citar o sobrenome do autor

do documento não consultado com o ano de publicação, seguido da expressão citado por e o sobrenome do autor e ano do documento consultado. Na listagem de referência, deve-se incluir apenas a fonte consultada.

Comunicação pessoal. Não fazem parte da lista de referências. Na citação coloca-se o sobrenome do autor, a data da comunicação, nome da Instituição à qual o autor é vinculado.

Referências bibliográficas

São adotadas as normas ABNT/NBR-6023 de 2002, simplificadas conforme exemplos:

Periódicos

ANUÁRIO ESTATÍSTICO DO BRASIL. v.48, p.351, 1987-88.

FERGUSON, J.A.; REEVES, W.C.; HARDY, J.L. Studies on immunity to alphaviruses in foals. *Am. J. Vet. Res.*, v.40, p.5-10, 1979.

HOLENWEGER, J.A.; TAGLE, R.; WASERMAN, A. et al. Anestesia general del canino. *Not. Med. Vet.*, n.1, p.13-20, 1984.

Publicação avulsa

DUNNE, H.W. (Ed). *Enfermedades del cerdo*. México: UTEHA, 1967. 981p.

LOPES, C.A.M.; MORENO, G. Aspectos bacteriológicos de ostras, mariscos e mexilhões. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA, 14., 1974, São Paulo. *Anais...* São Paulo: [s.n.] 1974. p.97. (Resumo).

MORRIL, C.C. Infecciones por clostridios. In: DUNNE, H.W. (Ed). *Enfermedades del cerdo*. México: UTEHA, 1967. p.400-415.

NUTRIENT requirements of swine. 6.ed. Washington: *National Academy of Sciences*, 1968. 69p.

SOUZA, C. F. A. *Produtividade, qualidade e rendimentos de carcaça e de carne em bovinos de corte*. 1999. 44f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Escola

de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais,
Belo Horizonte.

Documentos eletrônicos

QUALITY food from animals for a global market.
Washington: Association of American Veterinary Medical
College, 1995. Disponível em: <<http://www.org/critca16.htm>>. Acessado em: 27 abr. 2000.

JONHNSON, T. Indigenous people are now more
cambative, organized. *Miami Herald*, 1994. Disponível
em: <<http://www.summit.fiu.edu/MiamiHerld-Summit-Related-Articles/>>. Acessado em: 5 dez. 1994.

Submissão dos trabalhos

A submissão dos trabalhos é feita exclusivamente on-line,
no endereço eletrônico
www.abmvz.org.br

Taxas de publicação

Taxa de submissão. O pagamento, no valor de R\$30,00,
será feito por meio de boleto bancário (emitido quando da
submissão do artigo). O autor deverá informar os dados
para emissão da nota fiscal (Nome ou Razão Social, CPF
ou CNPJ, Endereço).

Taxa de publicação. A taxa de publicação de R\$55,00, por
página impressa, será cobrada do autor indicado para
correspondência, por ocasião da prova final do artigo. Se
houver necessidade de impressão em cores, as despesas
correrão por conta dos autores.