

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE
ALIMENTOS

**Avaliação da ocorrência de resíduos de antibióticos em leite cru produzido em
propriedades rurais no Rio Grande do Sul**

Juliane Webster de Carvalho Galvani

Porto Alegre

2016

Juliane Webster de Carvalho Galvani

**AVALIAÇÃO DA OCORRÊNCIA DE RESÍDUOS DE ANTIBIÓTICOS EM LEITE
CRU PRODUZIDO EM PROPRIEDADES RURAIS NO RIO GRANDE DO SUL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos (Área de concentração: Ciência e Tecnologia de Alimentos) como requisito para a obtenção ao grau de Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

Orientador: Adriano Brandelli
Coorientador: Eduardo César Tondo

Porto Alegre

2016

CIP - Catalogação na Publicação

Galvani, Juliane Webster de Carvalho

Avaliação da ocorrência de resíduos de antibióticos em leite cru produzido em propriedades rurais no Rio Grande do Sul / Juliane Webster de Carvalho Galvani.

-- 2016.

102 f.

Orientador: Adriano Brandelli.

Coorientador: Eduardo César Tondo.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Porto Alegre, BR-RS, 2016.

1. Leite. 2. Resíduos de antibióticos. 3. Rio Grande do Sul. I. Brandelli, Adriano, orient. II. Tondo, Eduardo César, coorient. III. Título.

Dissertação de Mestrado

Avaliação da ocorrência de resíduos de antibióticos em leite cru produzido em propriedades rurais no Rio Grande do Sul

Juliane Webster de Carvalho Galvani

Aprovada em: ___/___/___

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos (Área de Concentração: Ciência e Tecnologia de Alimentos) como requisito para a obtenção ao grau de mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

Adriano Brandelli (Orientador)
Doutor em Ciências Químicas
ICTA/UFRGS

Rosane Rech (Coord. do PPGCTA)
Doutora em Biologia Celular e Molecular
ICTA/UFRGS

Marisa Ribeiro de Itapema Cardoso
Doutora em Medicina Veterinária
FAVET/UFRGS - Banca

Florencia Cladera Oliveira
Doutora em Engenharia Química
ICTA/UFRGS - Banca

Felipe Lopes Campos
Doutor em Ciências Veterinárias
SEAPI/RS - Banca

Dedico este trabalho ao meu marido, Cassius, pelo apoio, pela paciência, pelo constante estímulo, amor e companheirismo.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me conceder serenidade e a persistência necessárias para a conclusão deste trabalho;

Aos meus pais, Julio e Rejane, que sempre estiveram ao meu lado, me ensinaram valores éticos, bem como a importância dos estudos e da perseverança para que eu pudesse alcançar os meus objetivos. Em homenagem a eles, repito uma das frases de meu pai: *“Filha, o melhor legado que eu poderei te deixar, é o teu estudo, pois o que aprenderes, o teu conhecimento, ninguém nunca poderá te tirar”*;

Ao meu amado marido Cassius, que durante a execução deste trabalho foi solidário e se privou das festas, dos finais de semana, dos feriados, reclamou bem pouquinho naqueles dias em que eu escrevia até a madrugada e foi meu amparo no cansaço. Para ele que fez do meu sonho, o nosso sonho: *“Amor, EU TE AMO!”*;

Ao meu orientador, Dr. Adriano Brandelli, pela confiança e a oportunidade de ser sua orientada, pela paciência e cortesia que sempre me deixaram tranquila e à vontade, pelo vasto conhecimento transmitido, pelas excelentes sugestões para atingir o melhor resultado possível, por sua dedicação ao ensino ao me orientar ainda que nos períodos de férias, por seres um exemplo como profissional, presto-lhe o meu mais profundo e carinhoso agradecimento;

Ao meu coorientador, Dr. Eduardo César Tondo, que me incentivou a investir neste projeto para o mestrado, que contribuiu desde o início com valiosas sugestões e ensinamentos, que sempre manteve as portas abertas para me auxiliar, que é, também, um profissional exemplar e dedicado ao ensino, seja nas férias ou em convalescença, agradeço-lhe muito e de coração;

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, pela seriedade e ensinamentos transmitidos;

Aos meus amigos, aos quais não preciso nomeá-los, pois sabem de coração quem são, agradeço pelo carinho, pelo apoio, pela constância nos bons e nos maus momentos e por terem me abençoado de tê-los na minha vida.

RESUMO

O leite é um alimento muito importante na alimentação humana, mas, quando contaminado com resíduos de antibióticos, pode ser considerado adulterado e constituir risco à saúde pública. Desta forma, é importante que este alimento apresente condições sanitárias adequadas e risco à saúde minimizado ou inexistente. O presente estudo teve como objetivos identificar os resíduos de antibióticos comumente encontrados em leite cru produzido em propriedades rurais no Rio Grande do Sul (RS), avaliar a presença de resíduos de antibióticos nas amostras analisadas quanto ao limite máximo de resíduos (LMR) descrito no Programa Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes (PNCRC), averiguar o conhecimento dos responsáveis pela ordenha do leite quanto aos medicamentos utilizados em seu rebanho, bem como, identificar os resíduos de antibióticos comumente avaliados, na rotina, e a motivação para a escolha destes, em plataformas de recebimento de leite cru em estabelecimentos industriais, inspecionados pelo serviço oficial do RS. Para tanto, foram realizados dois estudos exploratório-descritivos. No primeiro, em 2013, foi realizada coleta de dados a campo, mediante aplicação de questionário referente à administração de medicamentos veterinários, bem como, da análise, no Laboratório Nacional Agropecuário, de 388 amostras de leite cru, oriundas de propriedades rurais distribuídas no Estado. No segundo estudo, que ocorreu de 2014 a 2015, foi aplicado questionário referente aos testes de detecção de resíduos de antibióticos em 36 estabelecimentos industriais, sob inspeção estadual. Os resultados do primeiro estudo demonstraram que 96 (24,7%) amostras apresentaram algum resíduo de antibiótico dos 45 analitos pesquisados. Destas, 91 (23,5%) estavam conformes, segundo a legislação vigente e, apenas, 5 (1,3%) foram suspeitas de violação do LMR descrito no PNCRC. Dos resíduos de antibióticos identificados, os da classe dos macrolídeos (n=51; 13,1%), seguidos das quinolonas (n=49; 12,6%) e das tetraciclina (n=18; 4,6%) foram os comumente encontrados em leite cru produzido no RS. Quanto ao conhecimento dos responsáveis pela ordenha, infere-se que 22,6% não registraram ou controlaram a administração de medicamentos ao rebanho leiteiro, embora, 87,4% (n=339) tenha assegurado descartar o leite durante o período residual. Ainda, apenas 3,4% (n=13) dos entrevistados consideraram a bula do medicamento ou a orientação de veterinário (n=12; 3,1%), para o descarte do leite, guiando-se, principalmente, pela indicação da cooperativa a qual estiverem associados (55,9%; n=217). No segundo estudo, dos 36 estabelecimentos participantes, 83% foram classificados como fábrica de laticínios, sendo os antibióticos dos grupos dos betalactâmicos (100%) e das tetraciclina (69%) os comumente pesquisados. Quanto à

escolha do teste para a pesquisa de resíduos de antibióticos, esta foi influenciada pela praticidade e rapidez na execução do mesmo (67%) e não no conhecimento, especificamente, dos antibióticos utilizados pelos fornecedores de leite à indústria (22%). Conclui-se que o leite consumido no RS, quanto à presença de resíduos de antibióticos, no período da coleta, apresentou resultados compatíveis com aqueles identificados no PNCRC, oferecendo baixo risco à saúde pública. Mesmo assim, esforços devem ser direcionados quanto à melhoria das boas práticas agropecuárias nas propriedades rurais e às empresas quanto aos critérios de escolha dos testes de detecção de resíduos de antibióticos.

Palavras-chave: Leite. Resíduos de Antibióticos. Rio Grande do Sul.

ABSTRACT

Milk is an important food for human consumption, but when contaminated with antibiotic residues may be considered adulterated and risk to public health. Thus, it is important that this food presents sanitary conditions and minimized or zero risk to the public health. This study aimed to identify the commonly antibiotic residues found in raw milk produced in rural properties in Rio Grande do Sul (RS), to evaluate the conformity of samples regarding the maximum residue limit (MRL) established by the National Plan for Control of Residues and Contaminants in Animal in milk (PNCRC), to verify the knowledge level of people responsible for the milking process, in regard to the medications used in the herd and the withdrawal period, as well to identify the antibiotic residues commonly screened during the dairy processing routine, and the reasons for selecting them, at raw milk receiving points in the dairy plant, inspected by official services in the RS. Therefore, it held two exploratory and descriptive studies. In the first one, the milk samples collection occurred in 2013. At the moment of collection, a questionnaire was employed in order to evaluate the use of veterinary medicines by people responsible for milking. The 388 samples of raw milk, from rural properties distributed along the state were analyzed at the National Agricultural Laboratory. The second one, was from 2014 to 2015, which was administered questionnaire regarding the testing of antibiotic residues in 36 industrial establishments under state inspection. In the first study, 388 samples were analyzed in which 96 (24.7%) contained some antibiotic residue from the 45 analytes searched; 91 of these samples (23.5%), were in conformance with the current legislation. Only a total of five samples (1.3%) were suspected of violating the MRL described in the PNCRC. The antibiotic residues commonly found in the raw milk produced in RS were the macrolides (n=51; 13.1%), followed by quinolones (n=49; 12.6%) and the tetracyclines (n=18; 4.6%). The analysis of degree of knowledge of those responsible for milking demonstrates that 22.6% do not record or control the drug administration to the dairy herd. However, 87.4% (n=339) of the producers ensured to perform the discharge of the milk during the residual period, although, only 3.4% (n=13) of them consider the instructions present in the medicine bottle or the veterinary instructions (n=12; 3.1%) for this procedure, being guided by the cooperative in which they are associated (n=217; 55.9%). In the second study, the results showed that from the 36 participating facilities, 83% were classified as dairy plants, in which it was observed that the most commonly screened antibiotics were those belonging to the beta lactam group (100%) and tetracyclines (69%), whereas the selection of which antibiotic residues to screen, at the milk receiving point of the plant, was influenced by

the practicality and quickness in performing the screening (67%) rather than by specific knowledge on which antibiotics were used by milk suppliers (22%). It was concluded that the milk consumed in RS was in accordance with the previously results obtained by the PNCRC in terms of the presence of antibiotic residues during the collection period, offering negligible health risk. However, efforts should be directed to farmers on good agricultural practices and to industries in regard to criteria for choice of tests for antibiotic residue detection.

Keywords: Milk. Antibiotic residues. Rio Grande do Sul.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Amostragem para a pesquisa de resíduos de antibióticos, em leite, pelo PNCRC, no período de 2002 a 2015.	43
---	----

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Principais riscos e benefícios à saúde humana em consequência à ingestão de leite.	20
Tabela 2- Princípios dos testes de triagem para a detecção de resíduos de antibióticos em leite.	32
Tabela 3- Comparativo dos resultados obtidos para resíduos de antibióticos nos testes de triagem e nos testes confirmatórios, no PAMvet, no período de 2002 a 2007.....	34
Tabela 4- Limites de detecção dos testes de triagem para pesquisa de resíduos de antibióticos em leite.	35
Tabela 5- Limite Máximo de Resíduos para antibióticos, em leite, aplicados em diferentes países e os indicados pelo <i>Codex Alimentarius</i>	41
Tabela 6- Resultados dos estudos referentes à pesquisa de resíduos de antibióticos em leite comercializado no Brasil, no período de 2004 a 2012.	84

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANVISA: Agência Nacional de Vigilância Sanitária

DCV: Doença cardiovascular

FAO/WHO: *Food and Agriculture Organization of the United Nations/World Health Organization*

FDA/USA: *Food and Drug Administration/ United States of America*

IGF-1: Fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1

Kg: Quilograma

L: Litro

LDL: *Low density lipoproteins* – Lipoproteínas de baixa densidade

LMR: Limite máximo de resíduos

µg: Microgramas

MAPA: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

MERCOSUL: Mercado Comum do Sul

n: Número de amostras

PAMvet: Programa de análise de resíduos de medicamentos veterinários em alimentos de origem animal

PNCRC: Programa Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes

ppb: Partes por bilhão

Q-TOF: *Quadropole Time of Flight Mass Spectrometry*

RS: Rio Grande do Sul

SFA: *Saturated fatty acids* – Ácidos graxos saturados

UHT: *Ultra High Temperature* – Temperatura Ultra Alta

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	18
2.1 IMPORTÂNCIA DO LEITE NA ALIMENTAÇÃO HUMANA	18
2.2 RESÍDUOS DE ANTIBIÓTICOS NO LEITE	24
2.2.1 Causas indiretas de resíduos de antibióticos no leite	26
2.2.2 Causas diretas de resíduos de antibióticos no leite	28
2.2.3 Consequências à saúde humana da presença de resíduos de antibióticos no leite ..	29
2.2.4 Consequências à produção de derivados lácteos, devido à presença de resíduos de antibióticos no leite	30
2.3 MÉTODOS DE DETECÇÃO DE RESÍDUOS DE ANTIBIÓTICOS NO LEITE	31
2.4 LEGISLAÇÃO RELACIONADA A RESÍDUOS DE ANTIBIÓTICOS NO LEITE	38
3 ARTIGOS CIENTÍFICOS	44
3.1 ARTIGO CIENTÍFICO 1	45
3.2 ARTIGO CIENTÍFICO 2	63
4 DISCUSSÃO GERAL	83
5 CONCLUSÃO	87
6 REFERÊNCIAS	88
APÊNDICE A – Questionário de avaliação da pesquisa de resíduos de antibióticos, na plataforma de recebimento de leite cru, em estabelecimentos sob inspeção sanitária oficial do Rio Grande do Sul (utilizado para a elaboração do Artigo 1).	101
ANEXO A – Questionário de avaliação do conhecimento dos responsáveis pela ordenha, quanto à aplicação de medicamentos e controle de resíduos (utilizado para elaboração do Artigo 2).	102

1 INTRODUÇÃO

O leite é, reconhecidamente, um dos alimentos mais completos disponíveis à alimentação humana, possuindo uma composição nutricional balanceada, tanto para recém-nascidos e crianças quanto para o indivíduo adulto (Park e Haenlein, 2013).

Com o aumento da renda da população e o aumento da produção, o leite e os produtos lácteos se tornaram uma parte importante da dieta em determinadas regiões do mundo, onde pouco ou nenhum leite foi consumido em décadas anteriores. Entre as áreas que tiveram crescimento rápido no consumo destes alimentos, encontra-se a América Latina (Muehlhoff *et al.*, 2013).

O Brasil, atualmente, é o quinto maior produtor de leite mundial (USDA, 2015) e a região sul ocupa a segunda posição na produção de leite fluido, tendo o Estado do Rio Grande do Sul como o seu maior representante, sendo este responsável por 15% da produção de leite nacional (IBGE, 2014; USDA 2015). Em 2015, estima-se que o aumento da produtividade do leite, no país, seja em torno de 2% em comparação a 2014. E, embora o país esteja enfrentando problemas econômicos, tais como as taxas de inflação, as indústrias de laticínios brasileiras apresentam-se otimistas sobre o ligeiro crescimento da produção de leite e o aumento das exportações de produtos lácteos (USDA, 2015). Sendo assim, o leite é um alimento que além de figurar na dieta do brasileiro, é uma importante *commoditie* para o agronegócio do Brasil (Feijo *et al.*, 2013).

Segundo Park e Haenlein (2013), o leite e os seus derivados, dependendo do comportamento sociocultural e dos hábitos alimentares da população, apresentam consumo destacado em determinadas áreas geográficas do mundo. Neste sentido, conforme a ANVISA (2006), o leite é o alimento de origem animal mais consumido pela população brasileira e a região sul do Brasil, no que se refere ao consumo de laticínios, apresenta média acima da nacional e de outras regiões. Sendo assim, é natural que haja uma pressão por parte dos consumidores para que esses alimentos, quando oferecidos, sejam sanitariamente seguros para o consumo (Forsythe, 2010). Com este propósito, é importante que os estabelecimentos de beneficiamento ou industrialização do leite, realizem na plataforma de recepção, os controles necessários para a avaliação da qualidade microbiológica e físico-química do leite cru recebido, visando identificar perigos, sejam eles biológicos, físicos ou químicos (Forsythe, 2010; Tronco, 2010). Entre as possíveis contaminações químicas do leite estão às ocasionadas

pela presença dos resíduos de medicamentos veterinários, destacando-se, neste caso, os resíduos de antibióticos (Schrenk, 2012). A presença destes pode ser considerada bastante comum e é, frequentemente, consequência da terapia da mastite em vacas em lactação, devido ao uso incorreto do medicamento ou, ainda, quando não foi observado o devido prazo de carência (Schrenk, 2012; Baynes e Riviere, 2014). Além disso, Furtado (2005) também ressalta, que os antibióticos podem ser encontrados, no leite, pela adição voluntária fraudulenta com a intenção de prolongar a vida útil, deste produto, até que ocorra a entrega do mesmo ao laticínio. Esta hipótese, tendo em vista o custo deste procedimento e a maior probabilidade de ser detectado, é pouco provável, porém não é descartável (Tronco, 2010). Sendo assim, vários são os estudos que apontam a ocorrência de resíduos de antibióticos no leite, tanto no Brasil quanto em outros países, sendo que os índices de contaminação apresentam grande variação (Nero *et al.*, 2007; Bilandžić *et al.*, 2011; Martin, 2011; Darwish *et al.*, 2013; Trombete, Santos e Souza, 2014).

A presença de resíduos de antibióticos no leite, acima do LMR estabelecido na legislação vigente, torna-o impróprio tanto para o consumo quanto para a industrialização, tendo em vista o risco à saúde pública e os problemas tecnológicos na elaboração de produtos lácteos fermentados (Tronco, 2010; Martins e Andrade, 2012). No que se refere à saúde pública, a presença de resíduos de antibióticos ou seus metabólitos, no leite, podem implicar em efeitos diretos ou indiretos. Os primeiros seriam aqueles que ocasionam toxicidade ou reações graves em indivíduos sensíveis, enquanto que os indiretos estariam relacionados ao desenvolvimento da resistência aos antibióticos por microrganismos patogênicos causadores de doenças nos animais e no homem (Lawley, Curtis e Davis, 2012). Na industrialização, os efeitos dos resíduos de antibióticos no leite, ainda que em traços mínimos, se manifestam pela inibição parcial ou total das bactérias lácticas utilizadas para a elaboração de produtos fermentados (queijos, iogurtes, manteigas), tendo em vista a alta sensibilidade destas a estes medicamentos. Como consequência, as indústrias obtêm prejuízos, os quais não são minimizados pelos tratamentos térmicos aos quais o leite cru é submetido (Furtado, 1999; 2005; Tronco, 2010).

Em função do exposto, considerando-se tanto a importância em saúde pública quanto os efeitos negativos à produção de derivados do leite advindos da presença dessas substâncias, o presente trabalho tem por objetivo geral avaliar a ocorrência de resíduos de antibióticos em leite cru produzido em propriedades rurais no Estado do Rio Grande do Sul, através de

cromatografia líquida de alta eficiência, visando nortear as ações de controle sanitário e políticas públicas de fiscalização dos alimentos.

Quanto aos objetivos específicos, estes foram:

- a) Identificar os resíduos de antibióticos comumente encontrados em leite cru produzido em propriedades rurais no Rio Grande do Sul;
- b) Avaliar a presença de resíduos de antibióticos nas amostras analisadas quanto ao Limite Máximo de Resíduos descrito no Programa Nacional de Controle de Resíduos – MAPA;
- c) Averiguar o conhecimento dos responsáveis pela ordenha do leite, quanto aos medicamentos utilizados em seu rebanho e à observância aos prazos de carência;
- d) Identificar quais são os resíduos de antibióticos comumente pesquisados, na rotina, e a motivação para a escolha destes em plataformas de recebimento de leite cru em estabelecimentos industriais, sob inspeção estadual, no Estado do Rio Grande do Sul.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 IMPORTÂNCIA DO LEITE NA ALIMENTAÇÃO HUMANA

Segundo Kanekanian (2014), o leite faz parte da dieta humana, há milhares de anos, em várias culturas ao redor do mundo, principalmente, pela sua rica composição nutricional e a sua versatilidade em ser transformado em uma variedade de produtos igualmente nutritivos (Park e Haenlein, 2013). Este é o primeiro alimento dos mamíferos e correlaciona-se a inúmeros benefícios à saúde (Pereira, 2014), os quais não se restringem apenas aos lactantes ou às crianças em fase de crescimento, tendo em vista, que o leite, por se tratar de um alimento completo, equilibrado e que proporciona elevado aporte de nutrientes em relação ao conteúdo calórico (Fernández *et al.*, 2014), também, desempenha importante papel nutricional na dieta de adultos (Park e Haenlein, 2013).

Em média, o leite bovino é composto de 87% de água, 4% a 5% de lactose, 3% de proteínas, 3% a 4% de gordura, 0,8% de minerais e 0,1% de vitaminas (Pereira, 2014). Destes nutrientes, destacam-se as proteínas com sua gama completa de aminoácidos essenciais; a gordura, com presença de ácidos graxos saturados e insaturados; minerais como cálcio, magnésio e fósforo; as vitaminas lipossolúveis A, D, E e K, bem como, as solúveis em água, tais como B12, riboflavina e C, além da presença da lactose e outros oligossacarídeos, que são reconhecidas fontes de energia (Kanekanian, 2014). Ressalta-se, ainda, que o leite possui inúmeros compostos biologicamente ativos que apresentam efeitos imunomoduladores, antimicrobianos, anti-hipertensivos, antidiabéticos, anticolesterol, anticarcinogênicos, anticariogênicos e antiobesidade no organismo humano (Park e Haenlein, 2013, Brandelli *et al.*, 2015). Além disso, este alimento colabora para a saúde nas várias faixas etárias e nas diversificadas condições metabólicas do organismo. Na infância e na adolescência, o leite, assim como seus derivados, é uma rica fonte de cálcio, sendo esse um mineral importante para a integridade e o desenvolvimento dos ossos, bem como, para a prevenção da obesidade e do sobrepeso infanto-juvenil. Na terceira idade, além dos benefícios da prevenção contra osteoporose, o leite, quando consumido nas versões semi-desnatado ou desnatado, também contribui para a proteção do sistema cardiovascular, devido à presença de minerais (cálcio, magnésio e potássio) e de peptídeos com efeitos anti-hipertensivos (Fernández *et al.*, 2014; Pereira, 2014). Bem como, em condições metabólicas diferenciadas, como na prática desportiva, o leite fornece hidratação, aporte energético e aumenta a síntese de proteínas

musculares, através da água, da lactose, dos ácidos graxos essenciais e das proteínas lácteas presentes nesse (Fernández *et al.*, 2014).

Quanto ao consumo, a maioria dos países recomenda a ingesta de leite e possuem diretrizes dietéticas com as recomendações de consumo diário. Essas levam em consideração as necessidades nutricionais de cada faixa etária, porém, apresentam grande variabilidade, conforme o país, sendo muito reduzidas em Oman, no qual há a indicação do consumo diário de 0,3 copos de leite às crianças de 01 a 05 anos e 0,5 copos aos grupos das demais faixas etárias. Em contraste, as recomendações no Canadá sugerem o consumo diário de 750 a 1000 ml aos adolescentes entre 14 a 18 anos (Muehlhoff *et al.*, 2013). Segundo Haug, Høstmark e Harstad (2007), a ingesta diária de 0,5 litro de leite já seria capaz de fornecer uma parcela significativa dos nutrientes necessários às exigências metabólicas do organismo. No entanto, no caso de crianças, adolescentes e mulheres grávidas ou em amamentação, as porções indicadas de leite e derivados, geralmente, são maiores (Muehlhoff *et al.*, 2013). No Brasil, atualmente, as diretrizes alimentares omitem as quantidades absolutas de cada alimento, pois levam em consideração que as necessidades nutricionais de cada indivíduo, particularmente de calorias, são muito variáveis, dependendo da idade, sexo, tamanho (peso, altura) e nível de atividade física (Brasil, 2014). Contudo, em estudo na região sul do país, Muniz, Madruga e Araújo (2013), observaram que a prevalência do consumo diário de leite foi de 45,9% (n=2732), destacando-se a ingesta entre indivíduos com 60 anos ou mais (64,4%) e entre aqueles de maior escolaridade (62,9%). Dos indivíduos que informaram consumir algum tipo de leite (n = 2015), 12,3% relataram que o faziam na frequência de 4 a 6 vezes por semana. Ainda, conforme os dados apresentados pelo IBGE/POF (2008/2009), a região sul apresenta média de consumo de leite e produtos lácteos superior ao restante do país, levando-se em consideração que a aquisição alimentar de laticínios, *per capita*, comparativamente, no mesmo período, foi de 67,4Kg para esta região, enquanto que a média nacional encontrava-se em 43,7Kg.

Convém salientar que o leite é um alimento complexo contendo numerosos nutrientes. Estes, em sua maioria, não agem isoladamente, mas, sim, interagem com outros componentes, estando, frequentemente, envolvidos em mais do que um processo biológico. Desta forma, é possível que, por vezes, tais processos estejam em conflito com os efeitos benéficos à saúde proporcionados por este produto (Muehlhoff *et al.*, 2013). De forma a exemplificar a dualidade entre os riscos e benefícios do consumo do leite, Haug, Høstmark e Harstad (2007) relatam que, embora ainda existam discussões quanto aos efeitos nocivos à saúde ocasionados

pela gordura presente neste alimento, o consumo moderado desta, na verdade, devido a alguns de seus componentes, tais como os ácidos palmítico, mirístico e láurico, tem sido associado a benefícios ao organismo, motivo pelo qual o consumo deste produto deve ser estimulado. Na tabela 1, estão descritos, resumidamente, os principais riscos e benefícios à saúde provocados pela ingestão do leite.

Tabela 1- Principais riscos e benefícios à saúde humana em consequência à ingestão de leite.

Benefícios	Riscos
<i>Como fonte de macro e micronutrientes</i>	
Leite e derivados são uma fonte de energia e proteína de alta qualidade e contribuem significativamente com os requisitos de cálcio, magnésio, selênio, riboflavina, vitamina B12 e ácido pantotênico.	Leite de vaca não contém quantidades apreciáveis de ferro e pode sobrecarregar os rins de crianças em comparação com o leite materno, devido aos seus maiores teores de minerais e proteínas. De acordo com as orientações da Organização Mundial da Saúde (OMS), leite puro não deve ser fornecido a bebês menores de 12 meses de idade, exceto quando acompanhados de suplementos de ferro/ alimentos fortificados com ferro, enquanto que o queijo e o iogurte podem ser administrados após os 6 meses de idade.
<i>No crescimento e desenvolvimento</i>	
O leite de vaca está associado com o aumento do crescimento linear e pode ajudar a prevenir a desnutrição, especialmente, durante os dois primeiros anos de vida. Em crianças mal nutridas, o leite é capaz de fornecer os nutrientes que são importantes para o crescimento e que se encontram deficientes na dieta. Em crianças bem nutridas, o efeito do leite no crescimento linear é, provavelmente, através da	Maior estatura adulta nem sempre está associada com melhor saúde. Os fatores que levam a um adulto atingir uma maior altura, ou as suas consequências, aumentam o risco dos tumores de mama e os colorretais (pós-menopausa), e, provavelmente, aumentam o risco de tumores de pâncreas, mama (pré-menopausa) e ovários. A altura também é, geralmente, considerada um fator de risco para fraturas osteoporóticas.

(continuação)

Benefícios	Riscos
<p>estimulação do fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1 (IGF-1).</p>	
<p>A gordura proveniente do leite é importante na dieta de lactantes e crianças jovens, especialmente, em populações com um consumo muito baixo de gordura. Podendo auxiliar no tratamento de desnutrição (desnutrição moderada).</p>	<p>Cerca de 60% da gordura do leite consiste de ácidos graxos saturados (SFA), incluindo ácido láurico (C12: 0), ácido mirístico (C14: 0) e ácido palmítico (C16: 0).</p>
<p><i>Saúde Óssea</i></p>	<p>O leite é um contribuinte de ácidos graxos trans, proveniente de ruminantes, na dieta.</p>
<p>O leite contém cálcio e proteína, importantes para a saúde óssea, bem como, alguns derivados lácteos fornecem outros nutrientes que, também, favorecem a saúde óssea, como potássio, zinco, vitamina A, e, se fortificado, vitamina D.</p>	<p>As necessidades de cálcio variam de acordo com fatores dietéticos tais como a ingestão de vitamina D, proteínas de origem animal, sódio e de outros fatores, tais como, a atividade física e a exposição ao sol. Isto pode explicar o "paradoxo do cálcio", ou seja, que as taxas de fratura de quadril são mais elevadas nos países desenvolvidos, onde a ingestão de cálcio é maior do que em países em desenvolvimento, onde a ingestão de cálcio é menor.</p>
<p>O impacto dos lácteos da dieta sobre a saúde óssea depende da fase de vida.</p>	
<p>O não consumo de leite, possivelmente, está associado com o aumento do risco de fratura em crianças.</p>	
<p>O consumo de leite na infância pode proteger contra o risco de fraturas osteoporóticas em mulheres na</p>	

(continuação)

Benefícios	Riscos
<p>pós-menopausa.</p> <p>Para as pessoas idosas, nos países com alto risco de fratura, há evidências convincentes da redução do risco de fratura osteoporótica com a ingestão suficiente de vitamina D e cálcio, em conjunto, especialmente, em pessoas que têm ingesta muito baixa de cálcio, vitamina D ou ambos.</p> <p>Laticínios podem reduzir o risco de raquitismo por deficiência de cálcio.</p>	

Saúde Oral

O leite possui propriedades anticariogênicas

Ganho de peso e obesidade

Evidências observacionais não suportam a hipótese de que a gordura do leite contribui para a obesidade.

Pode existir um efeito protetor do leite e dos produtos lácteos sobre o peso, devido a componentes, tais como, as proteínas. No entanto, se tal efeito existe, a magnitude é, provavelmente, pequena.

Laticínios são uma fonte de energia densa e o balanço energético é fundamental para manter o peso corporal saudável. Estudos epidemiológicos transversais indicam que a elevada ingesta de laticínios pode contribuir para a manutenção do peso. Porém, estudos prospectivos e estudos randomizados de intervenção controlados produziram resultados inconsistentes.

Se o consumo de laticínios, na infância, tem papel etiológico no desenvolvimento de obesidade, nas próximas fases da vida, é uma área aberta à discussão.

Síndrome metabólica e Diabetes tipo 2

Há moderada evidência demonstrando uma

(continuação)

Benefícios	Riscos
<p>associação entre o consumo de leite e produtos lácteos a uma menor incidência de diabetes mellitus tipo 2 em adultos.</p> <p>Alguns estudos sugerem que o consumo de alimentos lácteos pode ter um impacto benéfico sobre alguns componentes da síndrome metabólica.</p>	
<p><i>Doenças cardiovasculares</i></p>	
<p>Embora os alimentos lácteos contribuam para o conteúdo do SFA na dieta, outros componentes do leite, tais como, o cálcio e os ácidos graxos polinsaturados podem reduzir fatores de risco para doença coronariana.</p> <p>A maioria dos estudos concluíram que o leite, com pouca gordura, e o consumo de produtos lácteos não é, geralmente, associado com o risco de doença cardiovascular (DCV), e pode, na verdade, contribuir para uma redução desta doença.</p>	<p>Os produtos lácteos contêm SFA. SFA pode aumentar LDL colesterol e risco de DCV.</p> <p>Ácidos graxos trans provenientes da hidrogenação industrial estão associados com um aumento do risco de doença arterioesclerótica do coração. A evidência a respeito de gorduras trans provenientes da bio-hidrogenação, na qual ácidos graxos são parcialmente hidrogenados por sistemas enzimáticos da flora microbiana de ruminantes, e o risco de DCV é inconclusiva.</p>
<p><i>Câncer</i></p>	
<p>Alguns componentes no leite e produtos lácteos, tais como, o cálcio, vitamina D (leite fortificado), esfingolípido, proteínas lácteas e o ácido butírico podem ter efeito protetor contra o câncer.</p> <p>O leite e o cálcio, provavelmente, protegem contra o câncer colorretal.</p>	<p>Consumo de leite, na infância, pode ter um efeito, subsequente, sobre cânceres na idade adulta, através do eixo de IGF-1.</p> <p>Evidências limitadas sugerem que o queijo é uma das causas de câncer colorretal.</p> <p>As dietas ricas em cálcio e elevado consumo de leite e laticínios podem ser uma causa de</p>

(final)

Benefícios	Riscos
Evidências limitadas sugerem que o leite protege contra o câncer de bexiga	câncer de próstata.

Hipersensibilidade ao leite

A lactose é o principal carboidrato no leite. Má absorção (ou má digestão) da lactose ocorre devido aos baixos níveis de lactase, manifestando-se, assim, a intolerância à lactose. Conforme algumas estimativas, cerca de 70% da população mundial possui deficiência primária de lactase.

Incidência de alergia ao leite é relatada entre 2% a 6% em todo o mundo. O leite a partir de outras espécies animais, tais como cabra, ovelha, búfala, também, deve ser evitado por aqueles com este tipo de reação alérgica.

Fonte: Muehlhoff et al. (2013).

Com base no exposto, ainda que existam discussões, é inegável o papel nutricional que o leite e seus derivados representam na alimentação humana. Por esta razão e pelo fato de estarem sujeitos a adulterações, estes produtos estão entre os alimentos mais testados e avaliados em relação à qualidade e segurança no Brasil (Maluf, 2012; Corrêa, De Sousa Campos e Pinto, 2015).

2.2 RESÍDUOS DE ANTIBIÓTICOS NO LEITE

Resíduo de uma droga veterinária é a fração da droga, seus metabólitos, produtos de conversão ou reação e impurezas que permanecem no alimento originário de animais tratados (Brasil, 1999). Estes são considerados perigos à saúde pública, tendo em vista o seu potencial risco toxicológico (Feijo *et al.*, 2013).

Em alimentos, diversos são os contaminantes químicos e resíduos que podem ser encontrados, entre eles, estão as toxinas naturais (micotoxinas), os pesticidas, os contaminantes ambientais e/ou industriais (dioxinas, bisfenol) e os medicamentos veterinários (Schrenk, 2012). Neste último grupo, é onde se concentra a atenção das indústrias de laticínios (Baynes e Riviere, 2014), tendo em vista que a utilização destes é comum na atividade pecuária, com destaque para a prescrição dos agentes antibióticos (Regitano e Leal, 2010).

Os antibióticos são substâncias químicas produzidas pelo metabolismo de determinadas cepas bacterianas, fungos e actinomicetos. Em soluções diluídas, podem impedir temporariamente ou definitivamente as funções vitais de outras bactérias, determinando os conhecidos efeitos bacteriostático e/ou bactericida (BRASIL, 1999). Segundo Gualerzi (2014), desde a descoberta dos antibióticos, a indústria farmacêutica tem se empenhado em desenvolver novas drogas sejam elas de origem natural ou derivados semi-sintéticos.

Os antimicrobianos referem-se a qualquer substância, de origem natural, semissintética ou sintética, que mata ou inibe o desenvolvimento de um microrganismo, provocando pouca ou nenhuma lesão ao hospedeiro (Giguère, Prescott e Dowling, 2013).

Contudo, apesar de conceitualmente o termo antibiótico se referir àquelas substâncias produzidas por microrganismos e o termo antimicrobiano estar associado a qualquer substância de origem natural, sintética ou semissintética, ambos possuem a capacidade de inibir ou matar microrganismos e, atualmente, estes termos são utilizados indistintamente (Wang, Macneil e Kay, 2012). Sendo assim, os compostos sintéticos, tais como as sulfonamidas e as quinolonas, embora reconhecidas como antimicrobianos, podem ser referidas como antibióticos (Garrido Frenich, 2010).

Desta forma, convém ressaltar que as legislações brasileiras vigentes, as quais se referem à qualidade e identidade do leite, bem como, ao controle de resíduos em produtos de origem animal, utilizam o termo antibióticos ao se referirem às substâncias que devem ser pesquisadas no leite cru, independentemente se o resíduo se classifica na verdade como um antimicrobiano (BRASIL, 1999; BRASIL 2011).

Quanto à identificação de resíduos de antibióticos no leite, vários são os países que desenvolveram estudos com este objetivo. Na China, Zhang *et al.* (2014), ao analisarem 26

amostras de leite pasteurizado, observaram que o percentual de amostras contendo níveis detectáveis de tetraciclina, sulfonamidas, sulfametazina e quinolonas foram, respectivamente, 0%, 20.2%, 7.4% e 95.7%. No Iran, Mokhtari, Hosseini e Panahi (2013) identificaram a contaminação por resíduos de betalactâmicos em 32,9% das amostras de leite analisadas (n=79). Bem como, na Romênia, Pogurschi *et al.* (2015) constataram que do total de 210 amostras de leite cru, 12 estavam contaminadas por resíduos de betalactâmicos e 30 por resíduos de tetraciclina.

No Brasil, nos últimos anos, estudos apontam a ocorrência de resíduos de antibióticos, tanto em leite cru quanto industrializado, em várias regiões e Estados produtores de leite do país, estimando-se que cerca de 8% deste alimento é comercializado com níveis de resíduos acima do permitido pela legislação vigente (Trombete, Santos e Souza, 2014). Tal fato merece atenção, pois é preocupante tanto do ponto de vista de saúde pública quanto do ponto de vista tecnológico.

2.2.1 Causas indiretas de resíduos de antibióticos no leite

Conforme Laxminarayan *et al.* (2013), ainda que estimativas precisas sejam escassas, aproximadamente 100.000 a 200.000 toneladas de antibióticos são produzidos anualmente no mundo. Esses, em sua maioria, são destinados aos setores da agricultura e veterinária. Neste sentido, na África, assim como na União Europeia, estima-se que 50% da produção anual total de antibióticos seja empregada na produção animal (Garrido Frenich, 2010; Darwish *et al.*, 2013). No Brasil, não existem dados estatísticos abrangentes acerca da quantidade desses medicamentos utilizados na pecuária (Regitano e Leal, 2010). A dificuldade em estimar estatisticamente esta utilização em muitos países decorre da possibilidade da aquisição destes medicamentos, em agropecuárias, cooperativas, entre outros, sem o registro desta comercialização (National Research *et al.*, 1999).

Nos animais de produção, os antibióticos podem ser administrados na prevenção ou na terapia de doenças no rebanho, bem como, em baixas dosagens, como promotores de crescimento (Guardabassi *et al.*, 2010). Esta última opção, é amplamente empregada em animais voltados para a produção de carne, entretanto, não é a prática comum em rebanhos leiteiros (Baynes e Riviere, 2014).

Durante anos, tem ocorrido uma pressão para o aumento da produtividade do leite, o que resulta, frequentemente, em infecções, tais como a mastite, aumentando a utilização de antibióticos para combatê-las (Movassagh, 2012). Segundo Redding *et al.* (2014), em estudo realizado no Peru, foi constatado que a mastite era a doença que mais afetava os rebanhos leiteiros avaliados, seguida dos casos de diarreia, infecções respiratórias e infecções pós-parto, para os quais a escolha da terapia, pelos produtores rurais, consistia predominantemente no uso de antibióticos. As vantagens da utilização destes medicamentos são percebidas através da promoção de saúde animal e da diminuição das perdas financeiras ocasionadas pela manutenção das doenças (Redding *et al.*, 2014), no entanto, o uso inadequado destes produtos pode ocasionar a presença de resíduos no leite, acima dos limites máximos estabelecidos pela legislação vigente. Neste sentido, Schrenk (2012), bem como, Baynes e Riviere (2014), descrevem que as violações no LMR de resíduos de antibióticos, em leite, podem ocorrer pelos seguintes motivos:

- (i) antibioticoterapia na forma e/ou dosagem diferentes do indicado na bula,
- (ii) não observância do período de carência,
- (iii) ausência de registro dos antibióticos utilizados no rebanho,
- (iv) inadequada identificação dos animais tratados,
- (v) uso de drogas ilegais (ex. medicamento não aprovado para o gado leiteiro)
- (vi) adição accidental do leite de vacas tratadas ao tanque da ordenha de conjunto,
- (vii) descarte, nas infusões intra-mamárias, apenas do quarto tratado,
- (viii) equipamento de ordenha contaminado,
- (ix) uso da terapia de vacas secas, nos animais em lactação

Além dos itens elencados, há de se considerar que o desconhecimento dos produtores rurais sobre o que são, para que servem e como devem ser utilizados os antibióticos pode favorecer para que resíduos sejam detectados no leite destinado ao consumo humano. Conforme National Research *et al.* (1999), um número substancial de produtores adquirem medicamentos por conta própria, baseados em sua experiência em reconhecer as doenças que acometem seus rebanhos. No entanto, no Peru, dos 22,4% (35/156) dos fazendeiros, de pequenas propriedades leiteiras, que responderam saber o que são antibióticos, apenas um, descreveu que a finalidade desses era matar bactérias (Redding *et al.*, 2014). Ainda que a correta identificação do animal tratado, o registro das drogas utilizadas e os períodos de tratamento sejam importantes para o adequado manejo das vacas em lactação, de modo a evitar que o leite de animais tratados seja misturado ao leite destinado à industrialização,

constatou-se que o registro do tratamento com antibióticos em rebanhos leiteiros, era prática que ocorria em 50% das propriedades (n=113) num estudo conduzido na Pensilvânia, (Sawant, Sordillo e Jarayarao, 2005). Além disso, não é incomum que os produtores rurais, ao administrarem medicamentos aos animais, por não possuírem os equipamentos necessários para a pesagem destes, estimem a quantidade de droga a ser utilizada. Assim, Kromer (2015), em estudo realizado na Inglaterra, identificou que na administração de medicamentos, através da estimativa visual do peso dos bovinos em fazendas leiteiras, a probabilidade de que vacas menos pesadas, em tratamento, recebessem baixas doses de antibióticos era alta e, em vacas mais pesadas, o grau de subdosagem era ainda mais substancial. Tal situação propicia, não somente a ineficácia do tratamento, como também, o desenvolvimento da resistência bacteriana.

Com base no exposto, a implantação de boas práticas do uso de medicamentos veterinários torna-se importante para minimizar os riscos da presença de resíduos de antibióticos, acima do LMR, no leite destinado ao consumo humano (Muehlhoff *et al.*, 2013). Desta forma, segundo FAO e IDF (2013), entre as boas práticas agropecuárias na pecuária leiteira, visando prevenir a ocorrência de resíduos químicos no leite, pode-se citar:

- (i) a utilização de medicamentos veterinários aprovados nos termos da legislação vigente;
- (ii) a utilização de medicamentos veterinários de acordo com a orientação técnica, o cálculo das doses de forma cuidadosa e a observação dos períodos de carência;
- (iii) acondicionamento de produtos químicos e medicamentos veterinários de forma segura, bem como, adequado descarte;
- (iv) separação do leite dos animais doentes e em tratamento e
- (v) manutenção de registros escritos de todos os tratamentos e identificação adequada dos animais sob o uso de drogas veterinárias.

2.2.2 Causas diretas de resíduos de antibióticos no leite

De acordo com Corrêa, De Sousa Campos e Pinto (2015), o leite é um alimento sujeito a sofrer alterações e contaminações através da adição de substâncias, como os conservantes, objetivando-se mascarar a real qualidade do produto e/ou elevar a sua vida útil, o qual já pode estar em fase de deterioração ou com elevada contaminação por microrganismos. Nestes

casos, os antibióticos são utilizados de forma ilegal como agentes na preservação e redução da carga microbiana (Nero *et al.*, 2007), principalmente, em países tropicais, devido à falta de refrigeração deste alimento (Muehlhoff *et al.*, 2013). Este procedimento pode ser enquadrado, na legislação vigente, como falsificação, adulteração ou fraude, sendo o leite, nestas condições, considerado impróprio para o consumo humano (Brasil, 1952). Convém salientar, que a adição de antibióticos, diretamente no leite, é considerada uma fraude menos provável, tendo em vista a relação custo/benefício deste método, o qual é oneroso ao produtor, contudo, a sua possibilidade de ocorrência não deve ser descartada (Tronco, 2010).

2.2.3 Consequências à saúde humana da presença de resíduos de antibióticos no leite

Antibióticos são utilizados tanto na medicina humana quanto na medicina veterinária e esses, segundo Diarra e Malouin (2014), frequentemente, pertencem às mesmas classes, possuem modos similares de ação e as mesmas células bacterianas alvos. Sendo assim, ainda que sejam escassos os dados que relacionem a resistência cruzada dos microrganismos, decorrente da semelhança entre os antibióticos utilizados em humanos e em animais (Korb *et al.*, 2011), é possível inferir que o uso indiscriminado, sem precificação, e/ou incorreto destas substâncias, bem como, a utilização dessas em baixas doses por longo período pode induzir à resistência bacteriana (Maron, Smith e Nachman, 2013).

O desenvolvimento da resistência aos antibióticos, pelas bactérias, tem sido uma preocupação de órgãos governamentais ao redor do mundo, levando-se em consideração a redução da eficácia da antibioticoterapia no tratamento de doenças, tanto em humanos quanto em animais (Wang, Macneil e Kay, 2012). Ainda, a presença de resíduos de antibióticos no leite, pode acarretar uma variedade de efeitos nocivos à saúde dos consumidores, dependendo da dosagem e da droga ingerida. Wang, Macneil e Kay (2014) relataram que entre estes efeitos estão as alterações na microflora intestinal humana e, também, a toxicidade, que pode ser fatal. Vieira *et al.* (2012), descreveram que as reações de hipersensibilidade, estão frequentemente associadas à ingesta das penicilinas (betalactâmicos) e das estreptomicinas; a indução de resistência bacteriana, associada às tetraciclina; as lesões óticas, hepáticas e renais associadas à gentamicina, além da possibilidade de genotoxicidade e anemia aplásica associadas ao cloranfenicol. Este último, inclusive, embora seja eficaz no tratamento de uma gama considerável de doenças, teve o seu uso proibido na pecuária brasileira, tendo em vista a

sua alta toxicidade e os efeitos em indivíduos hipersensíveis (BRASIL, 1999). Além disso, pelo potencial teratogênico de alguns grupos, o leite contaminado não deve ser consumido por gestantes (Fava e Pinto, 2010).

Com base no exposto e levando-se em consideração que a tolerância aos resíduos de antibióticos, presentes no leite, variam de um indivíduo para outro, é fundamental que em toda a cadeia do leite sejam adotados cuidados, visando evitar que esses cheguem à mesa do consumidor (Fonseca *et al.*, 2009).

2.2.4 Consequências à produção de derivados lácteos, devido à presença de resíduos de antibióticos no leite

Resíduos de antibióticos no leite podem afetar a produção de derivados, mediante a inibição parcial ou completa das bactérias lácticas em produtos fermentados (Muehlhoff *et al.*, 2013). Segundo Furtado (2005), no Brasil, esta é principal causa de inibição da fermentação láctica em queijos. Mesmo quando a inibição das culturas ocorre parcialmente, pode-se perceber a inadequada maturação desses, alterações em seu sabor e textura, além do risco do desenvolvimento de coliformes, quando presentes, tendo em vista que esses apresentam maior resistência aos antibióticos do que as culturas fermentadoras.

Convém ressaltar, que além dos traços mínimos de antibióticos serem suficientes para a completa inibição das cepas de bactérias constituintes dos fermentos lácticos (Tronco, 2010), os métodos convencionalmente utilizados para o tratamento térmico do leite, bem como, os processos tecnológicos de fabricação de derivados não degradam por completo os resíduos de antibióticos na matéria-prima e esses acabam interferindo nos processos fermentativos de manteigas, iogurtes e queijos, além de permanecerem no produto final.

Kellnerová, Navrátilová e Borkovcá (2014), ao avaliarem os efeitos da pasteurização em resíduos de tetraciclina e oxitetraciclina no leite, constataram que os analitos de uma mesma classe possuíam diferenças quanto à termoestabilidade, mas não atingiam a completa degradação, motivo pelo qual, após o processamento, continuavam sendo detectados no leite. Adetunji (2011), na Nigéria, observou que durante o processo tecnológico de produção, amostras de queijos e iogurtes avaliados para a presença de resíduos de estreptomicina, penicilina G e tetraciclina, obtiveram redução nos níveis destes resíduos, mas, assim como no

estudo descrito anteriormente, também não obtiveram a sua completa eliminação. Além disso, houve amostras de queijos e iogurtes que, apesar do tratamento térmico, apresentaram resíduos de penicilina G acima do LMR. Convém salientar, que os efeitos à saúde causados pelos produtos da degradação dos antibióticos, em alimentos, são incertos, sendo provável que, em certos casos, estes produtos possam ser mais tóxicos do que o antibiótico que os originou (Lawley, Curtis e Davis, 2012). Ainda, o leite contaminado, quando processado para a comercialização em pó ou evaporado, além de não ter os resíduos completamente degradados, pode apresentá-los de forma concentrada (Ghanavi, Mollayi e Eslami, 2013).

Assim, é importante para as fábricas de laticínios, visando evitar prejuízos na produção de lácteos, bem como, objetivando a preservação da saúde dos consumidores, que seja realizada a correta identificação dos resíduos de antibióticos, nas plataformas de recepção do leite cru.

2.3 MÉTODOS DE DETECÇÃO DE RESÍDUOS DE ANTIBIÓTICOS NO LEITE

Para a pesquisa de resíduos de antibióticos no leite podem ser utilizados testes de detecção qualitativos, semi-quantitativos ou quantitativos. Os primeiros são comumente utilizados como testes de triagem e são amplamente utilizados em laticínios. Esses indicam, mediante resultados positivos ou negativos, se determinada droga está, ou não, acima do limite de detecção do teste empregado para análise do leite, porém não permite quantificá-la (Tronco, 2010). Nos testes de detecção semi-quantitativos, os resultados são expressos em faixas de concentração, sendo eficientes e com um custo menor do que os sofisticados métodos cromatográficos. Contudo, frente a resultados suspeitos ou positivos, métodos confirmatórios são necessários (Watson, 2004). Já o último, refere-se aos métodos nos quais é possível identificar e quantificar os resíduos de antibióticos presentes na amostra, sendo utilizados como testes confirmatórios (Magnavita, 2012).

Entre os testes de triagem estão aqueles cujo princípio envolve a inibição microbiana, bem como, os que empregam métodos imunológicos ou enzimáticos como os utilizados nos *kits* rápidos de detecção (Wang, Macneil e Kay, 2012).

Os testes confirmatórios abrangem os métodos cromatográficos, sejam esses gasosos ou líquidos associados a métodos de detecção, como por exemplo, a espectrometria (Wang, Macneil e Kay, 2012).

Na tabela 2, é possível observar alguns dos princípios em que se baseiam comumente os testes de triagem empregados para a detecção de resíduos de antibióticos em leite e a descrição destes.

Tabela 2- Princípios dos testes de triagem para a detecção de resíduos de antibióticos em leite.

Princípio do teste	Descrição
<i>Inibição do crescimento microbiano</i>	Utilizam microrganismos sensíveis a baixas concentrações de antibióticos ou substâncias inibidoras, como os <i>Streptococcus thermophilus</i> , <i>Bacillus stearothermophilus var. calidolactis</i> , <i>Bacillus subtilis</i> , entre outros. Mediante a incubação da amostra de leite inoculada com um microrganismo conhecido, caso haja uma concentração de antibióticos suficiente, o crescimento deste será reduzido ou nem ocorrerá. A maioria dos testes utilizados contém um meio de cultura com um indicador de pH, como o púrpura de bromocresol, que auxilia na leitura dos resultados. Quando há a multiplicação dos microrganismos, ocorre a acidificação do meio e a cor do indicador de pH muda, no entanto, se esta multiplicação não acontece, a cor do indicador de pH continua a mesma.
<i>Receptores</i>	Baseia-se na competição por sítios de ligação em receptores de células bacterianas que são específicos para determinada classe de antibióticos. A concentração de resíduos na

(final)

Princípio do teste	Descrição
<i>Elisa</i>	<p>amostra pode ser avaliada, por exemplo, por colorimetria, sendo diretamente proporcional ao número de receptores ocupados pelo antibiótico não marcado.</p> <p>Um antígeno desconhecido (antibiótico) é depositado sobre a superfície do orifício da placa contendo o anticorpo específico, de modo a ligar-se ao antígeno. Uma vez ligado o anticorpo à enzima, estes formarão um complexo de antígeno/anticorpo, que quando adicionado o substrato cromógeno, este irá fluorescer de modo que, a quantidade de antígeno na amostra pode ser inferida por meio da fluorescência.</p>
<i>Enzimático</i>	<p>Nos testes enzimáticos o antibiótico é capturado por uma proteína ligante em uma matriz com suporte sólido absorvente localizado em uma unidade plástica moldada. A presença de antibióticos na amostra resulta no desenvolvimento de um <i>spot</i> colorido, que é comparado a um <i>spot</i> controle, este último oriundo de uma concentração conhecida do antibiótico a ser detectado, podendo assim se determinar o nível de antibiótico da amostra. A comparação entre as cores dos <i>spots</i> pode ser feita visualmente, ou por meio de instrumentos para fornecer interpretações numéricas dos resultados visuais.</p>

Os métodos de triagem são importantes ferramentas na identificação de resíduos de antibióticos em leite, ainda que exijam confirmação quando os resultados são suspeitos ou positivos, pois reduzem significativamente o custo e o tempo de realização das análises (ANVISA, 2009). Contudo, cabe salientar que estudos apontam diferenças nos resultados encontrados nesses métodos quando comparados aos métodos confirmatórios. Na tabela 3, estão relacionados os resultados obtidos no programa de análise de resíduos de medicamentos veterinários em alimentos de origem animal (PAMvet), no período de 2002 a 2007, permitindo avaliar as diferenças nos resultados das amostras avaliadas na triagem e na confirmação.

Tabela 3- Comparativo dos resultados obtidos para resíduos de antibióticos nos testes de triagem e nos testes confirmatórios, no PAMvet, no período de 2002 a 2007.

Ano	Antibiótico	Nº de amostras com detecção de resíduos na triagem	Nº de amostras acima do LMR pelos métodos confirmatórios	Referência
2002	Tetraciclinas	6	0	(ANVISA, 2005)
2003	Tetraciclinas	14	0	(ANVISA, 2005)
2003	Betalactâmicos	8	0	(ANVISA, 2005)
2004	Tetraciclinas	21	0	(ANVISA, 2006)
2006-2007	Betalactâmicos	6	6	(ANVISA, 2009)
2006-2007	Tetraciclinas	30	27	(ANVISA, 2009)
2006-2007	Cloranfenicol	62	5	(ANVISA, 2009)
Total		147	38	

Fonte: ANVISA (2005), ANVISA (2006) e ANVISA (2009).

Segundo Ferreira *et al.* (2012), a não confirmação de analitos em amostras que apresentaram resultados positivos na triagem pode ser explicada pelo fato de que os limites de detecção destes métodos são, na maioria das vezes, iguais ou menores do que o LMR. Já nos métodos confirmatórios, tendo em vista que é possível quantificar o resíduo da droga encontrada, pode-se estabelecer se houve, realmente ou não, a violação do limite máximo de resíduos estabelecido na legislação vigente.

A detecção de concentrações abaixo do LMR, pelos testes de triagem, do ponto de vista de saúde pública é interessante, pois minimiza o risco de que os resíduos de antibióticos cheguem ao consumidor através do leite contaminado, contudo, do ponto de vista comercial, há a possibilidade de que os produtores sejam penalizados e o leite descartado, ainda que nas amostras analisadas as concentrações destes antibióticos estejam dentro dos LMR permitidos nas normativas legais (Tenório *et al.*, 2009). Assim, justifica-se a necessidade da análise das amostras suspeitas e positivas mediante o emprego de métodos confirmatórios.

Os limites de detecção de alguns dos testes de triagem disponíveis, no mercado, para a utilização na pesquisa de resíduos de antibióticos em leite estão descritos na tabela 4.

Tabela 4- Limites de detecção dos testes de triagem para pesquisa de resíduos de antibióticos em leite.

Antibiótico	LMR (ppb) µg/L ou µg/Kg Brasil	Testes de triagem (ppb)				
		<i>Delvotest</i> <i>SP</i>	<i>SNAP</i> <i>Duo</i> <i>BetaTetra</i> <i>ST</i>	<i>BetaStar</i>	<i>Twinsensor</i> <i>BT</i>	<i>Eclipse 50</i>
<i>Betalactâmicos</i>						
Ceftiofur	100	50	50-80	75-150	10-15	100
Cefquinoma	20	-	18	-	20 – 30	150
Cefalônio	20	5-10	20	7-15	3-5	-
Cefacetila	-	20	-	-	30 - 40	-
Cefapirina	60	5	35	8-16	6-8	-
Cefazolina	-	-	40	-	18 - 22	35
Cefalexina	100	40-60	-	-	> 750	75
Cefaperazona	50	40	35	5-8	3-4	-
Cloxacilina	30	15	6	5-10	6-8	35
Dicloxacilina	30	10	6	5-10	6-8	-

(continuação)	LMR (ppb) µg/L ou µg/Kg Brasil	Testes de triagem (ppb)				
		<i>Delvotest</i> <i>SP</i>	<i>SNAP</i> <i>Duo</i> <i>BetaTetra</i> <i>ST</i>	<i>BetaStar</i>	<i>Twinsensor</i> <i>BT</i>	<i>Eclipse 50</i>
Nafcilina	30	5	4	8-20	30-50	-
Ampicilina	4	2-3	4	2-5	3-4	4-5
Amoxicilina	4	2	4	2-4	3-4	4
Oxacilina	30	5	5	5-10	12-18	25
Penicilina G	4	2	3	2-4	2-3	3-4
<i>Tetraciclinas</i>						
Oxitetraciclina ^a		100	35-50	-	50-60	50
Clortetraciclina ^a	^a Soma igual a	100-150	35-50	-	30-40	-
Doxicilina ^a	100	-	-	-	10-15	100
Tetraciclina ^a		100	35-50	-	80-100	100
<i>Macrolídeos</i>						
Eritromicina	40	50	-	-	-	400-800
Espiramicina	200	200	-	-	-	>400
Tilmicosina	50		-	-	-	-
Tilosina	100	10-20	-	-	-	80-100
<i>Aminoglicosídeos</i>						
Gentamicina	200 (Codex)	100-300	-	-	-	>1000
Kanamicina	-	2500	-	-	-	2000

(final)	LMR (ppb) µg/L ou µg/Kg Brasil	Testes de triagem (ppb)				
		<i>Delvotest</i> <i>SP</i>	<i>SNAP</i> <i>Duo</i> <i>BetaTetra</i> <i>ST</i>	<i>BetaStar</i>	<i>Twinsensor</i> <i>BT</i>	<i>Eclipse 50</i>
Diidroestreptomicina	200 (<i>Codex</i>)	300-500	-	-	-	-
Neomicina	1500 (<i>Codex</i>)	100-200	-	-	-	1500
<i>Quinolonas/Fluorquinolonas</i>						
Enrofloxacina	20	-	-	-	-	-
<i>Sulfonamidas</i>						
Sulfadiazina ^b		50	-	-	-	-
Sulfametazina ^b	^b Soma	25	-	-	-	150
Sulfadimetoxina ^b	igual a	50	-	-	-	-
Sulfanilamida ^b	100	-	-	-	-	600
Sulfatiazol ^b		50	-	-	-	100
<i>Anfenicóis</i>						
Cloranfenicol	0,3	2500	-	-	-	-
<i>Outros</i>						
Lincomicina	150	100	-	-	-	150

Fonte: DFSV (2013), Brasil (2015), *Codex* (2015) e Cap-lab (2016).

Os testes de triagem, quando de amplo espectro, possuem a capacidade de detectar a maioria das principais classes de antibióticos utilizadas na medicina veterinária. Contudo, os LMR podem variar entre os países e, assim, os referidos testes não estariam aptos a detectar todos os compostos antibióticos nas concentrações específicas requeridas (Wang, Macneil e

Kay, 2012). Desta forma, observa-se que em determinados testes, há a descrição em seu escopo da detecção das concentrações de alguns analitos acima do permitido pela legislação, o que pode gerar resultados falso-negativos para essas drogas e, portanto, esses não podem ser considerados adequados para a finalidade de detecção destas (Tenório *et al.*, 2009).

Quanto aos testes confirmatórios, a utilização de técnicas cromatográficas acopladas a detectores permitem, simultaneamente, a separação e identificação de vários analitos. Atualmente, a cromatografia líquida de alta eficiência é uma técnica de referência para a separação de resíduos de antibióticos na matriz leite e quando associada à espectrometria de massas, fornece uma identificação e confirmação mais confiável dos analitos do que quando associada a outros detectores convencionais. Neste sentido, a utilização do analisador quadruplo-tempo de voo (Q-TOF) tem sido emergente para a medição de massa precisa e identificação inequívoca de resíduos de medicamentos veterinários e seus metabólitos (Garrido Frenich, 2010).

2.4 LEGISLAÇÃO RELACIONADA A RESÍDUOS DE ANTIBIÓTICOS NO LEITE

A fiscalização e o controle, em alimentos, de resíduos de pesticidas, contaminantes ambientais e medicamentos veterinários, tais como, os antibióticos, são fundamentais para a preservação da saúde pública.

O leite é um dos produtos alimentares mais fortemente regulamentados do mundo e isso se deve, principalmente, à preocupação em proteger os consumidores dos efeitos diretos da ingestão de resíduos de antibióticos, bem como, para prevenir a resistência bacteriana (Baynes e Riviere, 2014). Segundo Muehlhoff *et al.*(2013), os riscos relacionados à presença desses resíduos, em leite, parecem ser maiores nos países que possuem políticas nacionais fracas, inadequadas ou inexistentes, no que tange à regulamentação de programas de vigilância e monitoramento do uso de drogas antimicrobianas em animais de produção.

No Brasil, no que se refere à presença de resíduos de medicamentos veterinários em alimentos de origem animal, observa-se uma atuação conjunta entre o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) e a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) para a fiscalização e regulamentação deste tema, objetivando a proteção da saúde pública.

O MAPA é o órgão responsável pelo registro e a fiscalização da indústria, do comércio e do emprego de produtos de uso veterinário, em todo o território nacional (Brasil, 1969). Contudo, considerando-se que esses medicamentos podem ser empregados em animais de produção, resultando em efeitos adversos à saúde humana, antes de efetuar o registro, este órgão leva em consideração a avaliação do setor responsável na área de saúde (Brasil, 2004). Assim, cabe à Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), pertencente ao Ministério da Saúde, regulamentar, controlar e fiscalizar os produtos e serviços que envolvam risco à saúde pública, submetendo ao seu escopo os alimentos, bem como, os limites de contaminantes orgânicos, resíduos de agrotóxicos e de medicamentos veterinários (Brasil,1999). Segundo Watson (2004), os produtos veterinários com fins terapêuticos, geralmente, para a sua aprovação, devem obedecer a critérios de segurança relacionados ao consumidor, ao operador e ao animal tratado.

Quanto à presença de resíduos de antibióticos no leite, desde a publicação do Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal, já estava prevista a proibição do emprego de substâncias químicas na conservação deste produto (Brasil, 1952).

Posteriormente, com a aprovação dos regulamentos técnicos de produção, identidade e qualidade do leite, ficou explícita a proibição do envio deste alimento aos postos de refrigeração ou aos estabelecimentos industriais, quando proveniente de animais que estivessem submetidos a tratamentos com drogas e medicamentos de uso veterinário, passíveis de eliminação através da glândula mamária. Nestes casos, visando assegurar que os resíduos da droga utilizada não violassem os níveis fixados em normas específicas, os animais em tratamento deveriam ser afastados da produção leiteira, durante o período de carência, conforme indicado pelo fabricante do medicamento veterinário utilizado. Além disso, o referido regulamento também determina a pesquisa de resíduos de antibióticos e outros inibidores do crescimento microbiano, cujas concentrações no alimento não devem violar os limites máximos previstos no Programa Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes (PNCRC) do MAPA. Ainda, para a produção de leite tipo A, na mesma norma, há a exigência de, pelo menos, uma análise mensal, em unidade operacional da rede brasileira de laboratórios para controle da qualidade do leite, independentemente, das análises realizadas na frequência estipulada pelo programa de controle de qualidade interno da granja leiteira (Brasil,2011).

O PNCRC foi instituído, no Brasil, em 1986, visando à identificação do potencial risco de exposição da população aos resíduos nocivos à saúde do consumidor, de modo a subsidiar informações para a adoção de políticas nacionais de saúde animal e fiscalização sanitária. Suas ações buscam conhecer e evitar a violação dos níveis de segurança ou dos LMR de substâncias autorizadas, bem como, a ocorrência de quaisquer níveis de resíduos de compostos de uso proibido no Brasil. No caso do subprograma de monitoramento do leite, para a coleta de amostras descritas no Plano, é realizado um sorteio aleatório, pela coordenação do PNCRC, dos estabelecimentos sob inspeção federal, que recebam o leite cru (Brasil, 1999).

Os limites máximos de resíduos, que podem ser definidos como a máxima concentração de resíduos de uma substância farmacologicamente ativa permitida em alimentos de origem animal (Baynes e Riviere, 2014), no Brasil, são estabelecidos pelo Ministério da Saúde, no entanto, na falta de definição pelo referido órgão, utilizam-se os internalizados no MERCOSUL, os recomendados pelo *Codex Alimentarius*, os constantes nas Diretivas da União Européia e os utilizados pelo FDA/USA (Brasil, 1999). Conforme Watson (2004), as autoridades reguladoras precisam estar convencidas de que as drogas veterinárias, passíveis de serem excretadas no leite, não resultarão em toxicidade ou outros efeitos não desejáveis nos consumidores. Neste sentido, convém esclarecer que nem todos os medicamentos veterinários e compostos químicos aos quais os animais ficam expostos, deixam resíduos perigosos à saúde humana e animal, e mesmo aqueles reconhecidos como potencialmente nocivos, somente permitem tal condição, quando ultrapassam o LMR. Estes limites são determinados em centros de comprovada idoneidade científica, a partir de apurados estudos toxicológicos, de curto e médio prazo, realizados por renomados pesquisadores, em animais de laboratórios, microrganismos e genomas celulares (Brasil, 1999). Entre os estudos realizados estão os de toxicidade da dose repetida, de toxicidade reprodutiva crônica, de genotoxicidade, de carcinogenicidade, os efeitos sobre a flora intestinal humana e, quando relevante para a substância em consideração, outros efeitos, como por exemplo, neurológicos ou imunológicos, são avaliados (Baynes e Riviere, 2014). Após a conclusão destes estudos, organizações internacionais envolvidas com a saúde pública analisam os resultados e, posteriormente, recomendam os LMR dos diferentes compostos aprovados, à consideração dos países membros do *Codex Alimentarius*, Programa das Nações Unidas Sobre Harmonização de Normas Alimentares, gerenciado pela FAO/WHO (Brasil, 1999). Contudo, conforme Schrenk (2012), frequentemente, são observadas diferenças entre

os LMR estipulados nos diversos países, o que afeta a comercialização internacional de produtos de origem animal, tendo em vista que o país exportador deve se adequar às exigências de seu importador, mesmo que essas sejam mais severas do que as aplicadas internamente em âmbito nacional. Os LMR, para alguns dos resíduos de antibióticos em leite, estipulados no Brasil, no Mercosul, na União Européia e no *Codex Alimentarius* estão descritos na tabela 5.

Tabela 5- Limite Máximo de Resíduos para antibióticos, em leite, aplicados em diferentes países e os indicados pelo *Codex Alimentarius*.

Antibiótico	LMR permitidos (µg/Kg)			
	<i>Brasil</i>	<i>Mercosul</i>	<i>União Européia</i>	<i>Codex</i>
Clortetraciclina (a)	(a) soma igual a 100	(a) soma igual a 100	100	100
Oxitetraciclina (a)			100	
Tetraciclina (a)			100	
Doxiciclina (a)			(**)	
Sulfatiazol (b)				
Sulfametazina (b)				
Sulfadimetoxina (b)				
Sulfaclorpiridazina (b)	(b) soma igual a 100	(b) soma igual a 100	(b) soma igual a 100	
Sulfadiazina (b)				
Sulfadoxina (b)				
Sulfamerazina (b)				
Sulfametoxazol (b)				
Sulfaquinoxalina (b)				
Ácido Oxonílico	20		(**)	
Ácido Nalidíxico	20			
Flumequina	50			
Ceftiofur	100		100	
Cefquinoma	20		20	
Cefalônio	20		20	
Cefapirina	60		60	
Cefalexina	100		100	
Cefaperazona	50		50	
Eritromicina	40	40	40	(NI)
Espiramicina	200		200	200
Lincomicina	150		150	150
Tilosina	100		50	100
Clindamicina	10			

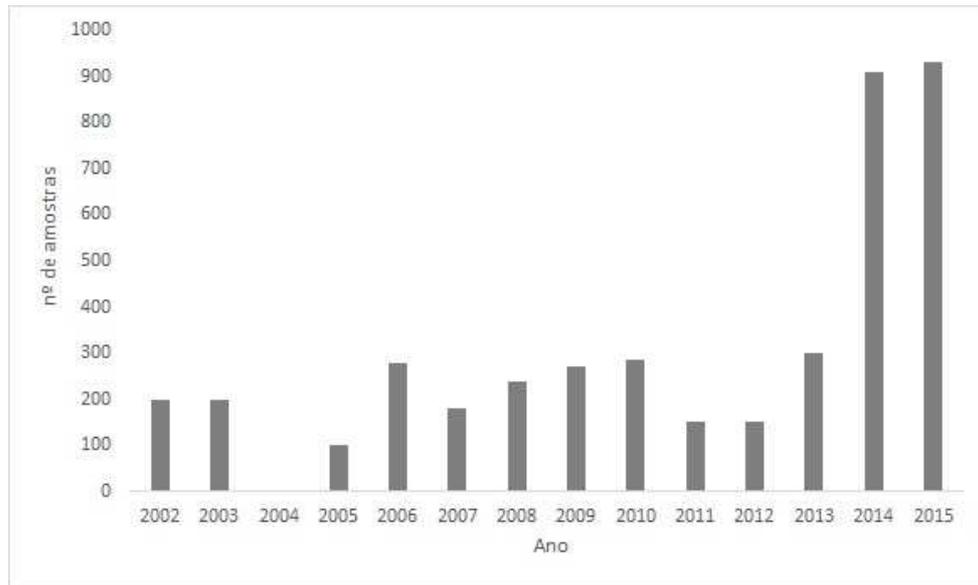
(final) Antibiótico	LMR permitidos (µg/Kg)			
	<i>Brasil</i>	<i>Mercosul</i>	<i>União Européia</i>	<i>Codex</i>
Tilmicosina	50		50	(NI)
Cloxacilina	30		30	
Dicloxacilina	30		30	
Nafcilina	30		30	
Ampicilina	4		4	
Amoxicilina	4		4	4
Trimetropim	50			
Bromexina	50			
Oxacilina	30		30	
Penicilina G	4			
Penicilina V	4			
Ciprofloxacina (c)	(c) soma igual a 100			
Enrofloxacina (c)			100	
Sarafloxacina	20		(NI)	(NI)
Danofloxacina	30		30	(NI)
Difloxacina	100		(**)	
Norfloxacino	10			
Cloranfenicol	0,30 ⁽¹⁾	0	(*)	(*)
Tianfenicol	10			
Florfenicol	10		(**)	

Fonte: *Codex Alimentarius* (2015), Brasil (2015), UE (2010) e Mercosul (2000). ⁽¹⁾ Considera o Limite de Detecção, (*) Sem LMR seguro estabelecido, (**) Não usar em bovinos leiteiros, (NI) a substância consta na listagem descrevendo o LMR para outras matrizes, mas não para o leite.

O *Codex Alimentarius* cita, ao todo, o LMR para 25 antimicrobianos, contudo, apenas 15 fazem referência à matriz leite e, destes, apenas 5 fazem correspondência aos descritos no PNCRC.

Na Figura 1, observa-se as variações na amostragem para a pesquisa de resíduos de antibióticos, em leite, através do PNCRC, no período de 2002 a 2015. O plano de amostragem utilizado baseia-se na coleta e análise de amostras representativas da matriz de interesse, tendo como referência a metodologia recomendada pelo *Codex Alimentarius*. Desta forma, anualmente, o MAPA publica mediante Instrução Normativa, o plano de amostragem do PNCRC necessário para que se reúnam informações seguras sobre a existência ou ausência de resíduos em produtos de origem animal face a capacidade laboratorial disponível (Brasil, 1999).

Figura 1- Amostragem para a pesquisa de resíduos de antibióticos, em leite, pelo PNCRC, no período de 2002 a 2015.



Fonte: Brasil (2002) a Brasil (2015).

Ainda, convém ressaltar a atuação da ANVISA, que possui a competência legal de controlar e fiscalizar resíduos de medicamentos veterinários em alimentos (Brasil, 1999). Esta, através do programa de análise de resíduos de medicamentos veterinários em alimentos de origem animal (PAMvet), iniciado em 2002, complementou as ações desenvolvidas pelo MAPA, pois avaliou o leite que já estava disponível, no comércio, para o consumo.

Em âmbito estadual, no que se refere à qualidade do leite, o RS, segue o descrito na Instrução Normativa nº62/2011 do MAPA (Rio Grande do Sul, 2013), bem como, exige o cumprimento do cronograma de análises físico-químicas, no qual está incluída a pesquisa de resíduos de antibióticos, no leite cru, diariamente, nas plataformas de recepção, além da pesquisa, destes, em laboratório oficial ou credenciado a cada dois meses (Rio Grande do Sul, 2015).

Entretanto, convém salientar, que por falta de definição nos referidos instrumentos legais, fica a critério das empresas a escolha dos grupos de antibióticos que serão testados no recebimento do leite cru, nas plataformas de recepção, durante a rotina de avaliação diária. Deste modo, podem ocorrer falhas na identificação destes resíduos, com o conseqüente envio do leite contaminado com antibióticos para a industrialização de derivados e para o consumo humano.

3 ARTIGOS CIENTÍFICOS

Os materiais e métodos, bem como, os resultados deste estudo estão apresentados sob a forma de artigos científicos, conforme Artigo 1º, § 2º da Resolução nº 03/2015 – PPGCTA ICTA, de 08 de maio de 2015.

A formatação dos referidos artigos segue as normas dos periódicos aos quais os mesmos foram submetidos.

3.1 ARTIGO CIENTÍFICO 1

Artigo submetido ao periódico Food Control em 22 de janeiro de 2016.

1 Commonly screened antibiotic residues in raw milk at dairy plants under State
2 Inspection in Rio Grande do Sul, Brazil

3

4 Juliane Webster de Carvalho Galvani¹, Eduardo César Tondo², Adriano Brandelli^{2,*}

5

6 ¹ Secretaria da Agricultura, Pecuária e Irrigação (SEAPI), Av. Getúlio Vargas 1384, Sala 12,
7 90150-004 Porto Alegre, Brazil

8 ² Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal do Rio Grande do Sul,
9 Av. Bento Gonçalves 9500, 91501-970 Porto Alegre, Brazil

10

11 * Corresponding author: Dr. A. Brandelli, ICTA-UFRGS, Av. Bento Gonçalves 9500, 91501-
12 970 Porto Alegre, Brazil; fax: +5551 3308 7048; e-mail: abrand@ufrgs.br

13

14 **Abstract**

15 Screening for antibiotic residues and other microbial growth inhibitors should be daily
16 performed in refrigerated raw milk in dairy plants, according to Brazilian regulatory
17 standards. However, the group of antibiotics to be tested remains at liberty of the dairy
18 companies. Therefore, this study aimed to identify the antibiotic residues commonly screened
19 during the dairy processing routine, and the reasons for selecting them, at raw milk receiving
20 points in plants inspected by official services in the State of Rio Grande do Sul (RS), from
21 January 2014 to February 2015. For this purpose, a descriptive study was carried out in order
22 to analyze data obtained through a structured questionnaire given to the legal representatives
23 of the companies under study. The results showed that among the 36 participating industries,
24 83% were classified as dairy plants, in which the most commonly screened antibiotics were
25 those belonging to the beta lactam group (100%) and tetracyclines (69%). The selection of
26 which antibiotic residues to screen at the milk receiving point was influenced by the
27 practicality and quickness in performing the screening (67%) rather than by specific
28 knowledge on which antibiotics were used by milk suppliers (22%). Thus, internal control
29 programs in the dairy industry should be encouraged to perform the effective screening of
30 antibiotics used by dairy farmers that supply the raw milk.

31

32 **Keywords:** antibiotic residues; dairy industry; detection tests; food contaminants; milk

33

34 **1. Introduction**

35 Milk and dairy products are very important worldwide, mainly due to their socio-economic
36 and nutritional role (Kanekanian, 2014). Regarding the latter, it is worth mentioning not only
37 the complete and balanced composition of its nutrients of high biological value, but also the
38 countless health benefits as a consequence of milk consumption, which is recommended for a
39 wide range of age groups (Pereira, 2014). For this reason, it is important to minimize the
40 contamination risk of these products, including those that may occur as a consequence of
41 using veterinary drugs in animal production, such as antibiotics.

42 Brazil is currently the fifth world milk producer and Rio Grande do Sul, the
43 southernmost State of Brazil, reaches about 15% of national production (USDA, 2015). In Rio
44 Grande do Sul, the Secretariat of Agriculture, Livestock and Irrigation (SEAPI), through the
45 Department of Inspection of Products of Animal Origin (DIPOA) is competent to perform
46 official sanitary surveillance in industrial facilities that perform inter-municipal trade (Brasil,
47 1989). DIPOA operates under the scope of the Federal Normative Ruling No. 62 - MAPA
48 (Brasil, 2011) and the State Resolution No. 0001/15 (Rio Grande do Sul, 2015), which predict
49 the daily quality control of refrigerated raw milk at industrial facilities, through screening for
50 antibiotic residues and other microbial growth inhibitors, according to the maximum limits
51 recommended by the Brazilian National Plan for Control of Residues, of the Ministry of
52 Agriculture, Livestock and Food Supply (Brasil, 2011; Rio Grande do Sul, 2013).
53 Nevertheless, due to lack of specific guidelines from the above mentioned legislation, it
54 remains at the discretion of the companies to select which antibiotic groups will be tested at
55 reception of the raw milk in the industrial plants, during the daily evaluation routine. In view
56 of these facts, synchrony between production farms and industrial plants should occur, so that
57 the antimicrobials used in animal production should be at a minimum the same as those
58 screened at the industry level, in the milk received for human consumption.

59 Thus, this work aimed to identify which antibiotic residues are commonly screened in
60 daily routines, and the reason why these are the selected antimicrobials tested at raw milk
61 receiving points in industrial plants, under State inspection, in Rio Grande do Sul (RS), from
62 January 2014 to February 2015.

63

64 **2. Materials and methods**

65 An exploratory descriptive study was performed, from January 2014 to February 2015, and
66 the data collection was performed through a questionnaire, comprising 4 questions: (1)
67 Classification of the plant; (2) Group of antibiotic residues screened at the raw milk reception
68 point; (3) Reason for the selection of specific test for the detection of antibiotic residues, by
69 the company; and (4) how long does the company has performed the antibiotic residue
70 screening described above in item (2). This questionnaire was applied to 36 dairy companies,
71 which agreed to participate in this work, of the 57 plants in activity and registered in the
72 DIPOA, distributed among the 7 meso-regions of the State of Rio Grande do Sul, representing
73 a 63% response rate from the searched plants.

74 The data obtained were tabulated in a structured spreadsheet, being quantified and
75 analyzed according to the number of mentions for each response. Figure 1 shows the
76 distribution of the companies under inspection by the Official State Veterinary Services and
77 those that participated in this study, within the 7 meso-regions.

78

79 **3. Results and discussion**

80 The analysis was based on the classification of the 36 dairy plants, which were under
81 inspection by the Official State Veterinary Services in the State of Rio Grande do Sul,
82 participating in this survey, and subsequently, considerations were analyzed from the data
83 obtained using the questionnaire.

84 The classification of the participating facilities is depicted in Figure 2. It was observed
85 that dairy plants (83%) are predominant among the interviewed industrial plants. This type of
86 plants have authorization to receive the milk and perform dairy food processing such as
87 fermented dairy products (Rio Grande do Sul, 1999). In this case, the presence of antibiotic
88 residues in milk, used as raw material to produce cheese, yoghurt, among others, is absolutely
89 unwanted, taking into account the risk of heightened losses to the industry due to
90 technological problems caused by the inhibition of lactic acid bacteria involved in the
91 fermentation process (Lawley, Curtis, & Davis, 2012).

92 Thus, it was asked to the participating companies which group of antibiotic residues
93 were screened at the raw milk receiving points, from six possible options (beta-lactams,
94 tetracyclines, sulphonamides, aminoglycosides, macrolides, others), offering the option of
95 multiple choice responses and including groups not cited using the open field. The results are
96 presented in Figure 3. In Figure 3A, data was quantified by repetition, i.e., how many times
97 each group was cited, and in Figure 3B, responses were grouped according to multiple-choice
98 responses from the participating companies.

99 It can be observed that the beta-lactams and tetracyclines, by repetition or
100 simultaneity, were the most frequently screened antibiotics in the raw milk evaluation routine
101 at the dairy plants under official sanitary surveillance in Rio Grande do Sul. The simultaneous
102 screening of both these antibiotic groups was reported by 17 (47%) of the interviewees. On
103 the other hand, when considering repeated citation, beta-lactams were screened by 36 (100%)
104 of the plants, from which 11 (31%) screened exclusively residues from this antibiotic,
105 whereas tetracyclines were screened by 25 (69%) of the plants. Among the pathologies that
106 can affect dairy herds, mastitis stands out, and is a common cause for veterinary drugs
107 utilization in farms, with consequent presence of antibiotic residues in milk (Wyder, Boss,
108 Naskova, Kaufmann, Steiner, & Graber, 2011). In mastitis treatment, beta-lactams comprise

109 the first choice antimicrobials used against streptococci and staphylococci susceptible to
110 penicillin (Pyörälä, 2009). Tetracyclines are used in systemic therapy, including treatment
111 against coliform infection (Chopra, & Roberts, 2001), which has a high incidence in cows
112 with clinical mastitis in Brazil (Oliveira, Hogeveen, Botelho, Maia, Coelho, & Haddad,
113 2015). Therefore, concerns regarding these residues in milk by the dairy plants are justified.

114 In addition, Netto et al. (2005) observed that among the main antimicrobials used in
115 dairy herds in the State of Paraná, in particular the beta-lactams, followed by the
116 aminoglycosides and tetracyclines, were the most frequently used in dairy farms, and
117 presence of tetracycline residues was detected in samples of pasteurized milk (Prado, Ferreira,
118 Bando, & Machinski, 2015). Furthermore, Spisso et al.(2010), in a study performed in the
119 metropolitan region of Rio de Janeiro, observed that oxytetracycline, belonging to the
120 tetracyclines group, was most commonly used in lactation herds by the farmers of that region.
121 In an international context, concerns regarding the beta-lactams and tetracyclines are the same
122 as in Brazil. For example, in the USA, the Pasteurized Milk Ordinance (PMO) emphasizes the
123 test for the presence of antibiotic residues from the beta-lactam group, and requires samples
124 collection directly in farms or in industrial facilities for the presence of at least six
125 antimicrobials belonging to this group (specifically penicillins, ampicillin, amoxicillin,
126 cloxacillin, cephapirin and ceftiofur) (Food and Drug Administration, 2015). In Bosnia,
127 Fejzic, Begagic, Seric-Haracic, & Samjlovic (2014) observed that 95% of the detection tests
128 used in dairy plants were for screening beta-lactams, considering the broad use of this group
129 of antibiotics to treat mastitis in the herds. On the other hand, tetracyclines comprise the most
130 used antimicrobials in Africa and consequently, those antibiotics were the most commonly
131 found in foods of animal origin (Darwish, Eldaly, El-Abbasy, Ykenaka, Nakayama, &
132 Ishizuka, 2013). Both beta-lactams and tetracyclines are frequently reported as drugs of

133 choice for the treatment of infections affecting dairy herds and, probably, for this reason,
134 these antimicrobials receive more attention from the dairy plants.

135 Moreover, it was investigated the reason and perception of the dairy industry in
136 choosing the test used routinely for screening antibiotic residues in raw milk received at the
137 dairy plant. Four alternatives were offered, based on the observations made by official
138 inspection service: price of the detection test, knowledge on the antibiotics used in the farms
139 from their milk suppliers, guidance by the technician responsible for the dairy plant, and
140 others; allowing for multiple choice responses and the addition of other reasons not cited
141 using the open field description. Figure 4A depicts the answers that were individually
142 quantified according to how many times each reason was cited, and other reasons that were
143 not listed in the items offered in the questionnaire. Furthermore, in Figure 4B, the responses
144 were grouped according to the multiple choice responses of each participating plant.

145 It was found that for 24 (67%) of the plants, the reasons for the selection of the test for
146 antibiotic residue detection is based on factors other than those listed in the survey (Figure 4A
147 and 4B). Practicality and quickness in performing the test was the desirable characteristics for
148 the acquisition of the test (Figure 4A). Depending on the test used, there is a significant
149 variation between the analysis time, since it may vary from few minutes to hours. Thus, the
150 use of simplified and quick tests for antibiotic residue detection is of extreme importance for
151 the plants, and are those which are preferred, since they allow the plant to quickly define the
152 destination of the milk batches (Nero, Mattos, Beloti, Barros, & Franco, 2007). Furthermore,
153 for 14 (39%) of the plants interviewed, the guidance given by the technical responsible for the
154 plant, followed by the price of detection (36%), which may vary by more than 1000%
155 according to the test used, are the reasons for the use of tests in the plants (Figure 4A). In
156 addition, it was shown that knowledge, in particular, on the antibiotics used by the milk

157 suppliers, represents a concern by only 8 (22%) of the interviewees, demonstrating a lack of
158 synchrony between these two points of the milk processing chain.

159 Furthermore, the period in which the screening for a specific antibiotic was carried out
160 in each company was also assessed. The results are demonstrated in Figure 5, with the
161 screening of the same antibiotic groups for a period greater than 3 years being performed in
162 21 (58%) of the plants. This information suggests that there is no intention on screening of
163 substances other than those commonly screened.

164

165 **4. Conclusion**

166 According to the data obtained in the present study, it was concluded that the antibiotic
167 groups beta-lactams and tetracyclines were commonly screened at raw milk receiving points
168 in dairy plants under state inspection in Rio Grande do Sul, Brazil. However, the choice of
169 screening these antimicrobials was not associated, in the majority of industries, with prior
170 knowledge about which antimicrobials were used in the milk supplier farms. Therefore, it is
171 of utmost importance to encourage the internal control programs in the dairy plants, to
172 organize the antimicrobials used in dairy herds that supply the raw milk, thus preventing
173 failures in the identification of residues, with consequent losses to the dairy industry and risk
174 to public health.

175

176 **Acknowledgments**

177 The authors thank all of the officials from the Secretariat of Agriculture, Livestock and
178 Irrigation (SEAPI) for their outstanding work and contributions that made the data collection
179 and generation of information possible. Authors also thanks the State agriculture inspectors
180 Karla Prestes Pivato Oliz, Ana Cláudia Silveira Netto, Valéria Cristina da Rocha Campos and

181 Felipe Lopes Campos for the constant support and important collaboration in the construction
182 of this work.

183

184 **Authors' disclaimer**

185 The authors are staff members from different organizations, however they alone are
186 responsible for the views expressed in this article and do not necessarily represent the
187 decisions or the stated policy of their organizations.

188

189 **References**

190 Brasil, 1989. Lei n° 7.889, de 23 de novembro de 1989. Dispõe sobre a Inspeção Sanitária e
191 Industrial dos Produtos de Origem Animal, e dá outras Providências. Diário Oficial União.
192 Brasília, 24 de novembro de 1989.

193 Brasil, 2011. Instrução Normativa n° 62 de 29 de dezembro de 2011. Aprova o Regulamento
194 Técnico de Produção, Identidade e Qualidade do Leite tipo A, o Regulamento Técnico de
195 Identidade e Qualidade de Leite Cru Refrigerado, o Regulamento Técnico de Identidade e
196 Qualidade de Leite Pasteurizado e o Regulamento Técnico da Coleta de Leite Cru
197 Refrigerado e seu Transporte a Granel. Diário Oficial da União. Brasília, 30 de dezembro
198 de 2011, seção 1.

199 Chopra, I., & Roberts, M., 2001. Tetracycline antibiotics: mode of action, applications,
200 molecular biology, and epidemiology of bacterial resistance. *Microbiology and Molecular
201 Biology Review*, 65, 232-260.

202 Darwish, W.S., Eldaly, E.A., El-Abbasy, M.T., Ykenaka, Y., Nakayama, S., & Ishizuka, M.
203 2013. Antibiotic residues in food: the African scenario. *Japanese Journal of Veterinary
204 Research*, 61, S13-S22.

- 205 Fejzic, N., Begagic, M, Seric-Haracic, S., & Samjlovic M., 2014. Beta lactam antibiotics
206 residues in cow's milk: comparison of efficacy of three screening tests used in Bosnia and
207 Herzegovina. *Bosnian Journal of Basic Medical Sciences*, 14, 155-159.
- 208 Kanekanian, A., 2014. *Milk and dairy products as functional foods*. John Wiley & Sons,
209 Chichester, UK.
- 210 Lawley, R., Curtis, L., & Davis, J., 2012. *The food safety hazard guidebook*. Royal Society of
211 Chemistry, Cambridge, UK.
- 212 Nero, L.A., Mattos, M.R., Beloti, V., Barros, M.A.F., & Franco, B.D.G.M., 2007.
213 Antimicrobial residues in raw milk from four Brazilian milk-producing regions. *Food
214 Science and Technology (Campinas)*, 27, 391-393.
- 215 Netto, D.P., Lopes M.O., Oliveira, M.C.S., Nunes, M.P., Machinski M., Bosquiroli, S.L., et
216 al. 2005. Survey on the main veterinary medicines used in dairy cattle in the state of
217 Paraná. *Acta Scientiarum Animal Sciences*, 27, 145-151.
- 218 Oliveira, C.S.F., Hogeveen, H., Botelho, A.M., Maia, P.V., Coelho, S.G., Haddad, J.P., 2015.
219 Cow-specific risk factors for clinical mastitis in Brazilian dairy cattle. *Preventive
220 Veterinary Medicine*, 121, 297-305.
- 221 Pereira, P.C., 2014. Milk nutritional composition and its role in human health. *Nutrition*, 30,
222 619-627.
- 223 Prado, C.K., Ferreira, F.D., Bando, E., & Machinski, M., 2015. Oxytetracycline, tetracycline,
224 chlortetracycline and doxycycline in pasteurised cow's milk commercialised in Brazil.
225 *Food Additives & Contaminants B*, 8, 81-84.
- 226 Pyörälä, S., 2009. Treatment of mastitis during lactation. *Irish Veterinary Journal*, 62, S40-
227 S44.
- 228 Rio Grande do Sul. Decreto n° 39.688, de 30 de agosto de 1999. Regulamenta a Lei n°
229 10.691, 09 de janeiro de 1996, que dispõe sobre a inspeção e fiscalização dos produtos de

230 origem animal no Estado do Rio Grande do Sul. Diário Oficial Estadual. Porto Alegre, RS.
231 31 de agosto de 1999.

232 Rio Grande do Sul, 2013. Portaria n° 090, de 16 de maio de 2013. Determina a adoção no
233 âmbito Estadual da IN 62 do MAPA de 29 de dezembro 2011. Diário Oficial Estadual.
234 Porto Alegre, RS. 22 de maio de 2013.

235 Rio Grande do Sul, 2015. Resolução n° 0001, de 11 de novembro de 2015. Estabelece a
236 obrigatoriedade do cumprimento do cronograma de análises físico-química e
237 microbiológica da água de abastecimento interno e produtos de origem animal pelos
238 estabelecimentos registrados na DIPOA. Diário Oficial Estadual. Porto Alegre, RS. 12 de
239 novembro de 2015.

240 Spisso, B.F., Monteiro, M.A., Pereira, M.U., Ferreira, R.G., Costa, R.P., Cruz, T.A., &
241 Nobrega, A.W., 2010. Pilot survey of commercial pasteurized milk consumed in the
242 metropolitan area of Rio de Janeiro, Brazil, for tetracyclines residues, including the 4-
243 epimers of oxytetracycline, tetracycline and chlortetracycline. Food Additives &
244 Contaminants B, 3, 220-227.

245 USDA, 2015. Dairy: world market and trade. United States Department of Agriculture.
246 Available at <http://www.fas.usda.gov>

247 Wyder, A.B., Boss, R., Naskova, J., Kaufmann, T., Steiner, A., & Graber, H.U., 2011.
248 *Streptococcus* spp. and related bacteria: their identification and their pathogenic potential
249 for chronic mastitis - A molecular approach. Research in Veterinary Science, 91, 349-357.

250

251

252 **Figure legends**

253

254 **Figure 1.** (A) Distribution of registered and active dairy plants at the DIPOA/SEAPI, from
255 January 2014 to February 2015, among the 7 meso-regions of the Rio Grande do Sul state.
256 Black bars correspond to the participating plants and grey bars all the existing plants. (B)
257 Region under study in Brazil, which includes the state of Rio Grande do Sul (in black, inset
258 map). Subdivision of the above mentioned meso-regions defined by the Brazilian Institute of
259 Geography and Statistics: (1) Southwest, (2) Central West, (3) Northwest, (4) Northeast, (5)
260 Central East, (6) Metropolitan region of Porto Alegre, and (7) Southeast.

261

262 **Figure 2.** Distribution of the dairy plants, under state inspection by the DIPOA/SEAPI,
263 participating in the study, according their industrial classification.

264

265 **Figure 3.** Antibiotic groups screened in raw milk in dairy plants under state inspection by the
266 DIPOA/SEAPI. Data was quantified (A) by repetition of citation, (B) according to
267 simultaneity of residue screening by the antibiotic residue detection test.

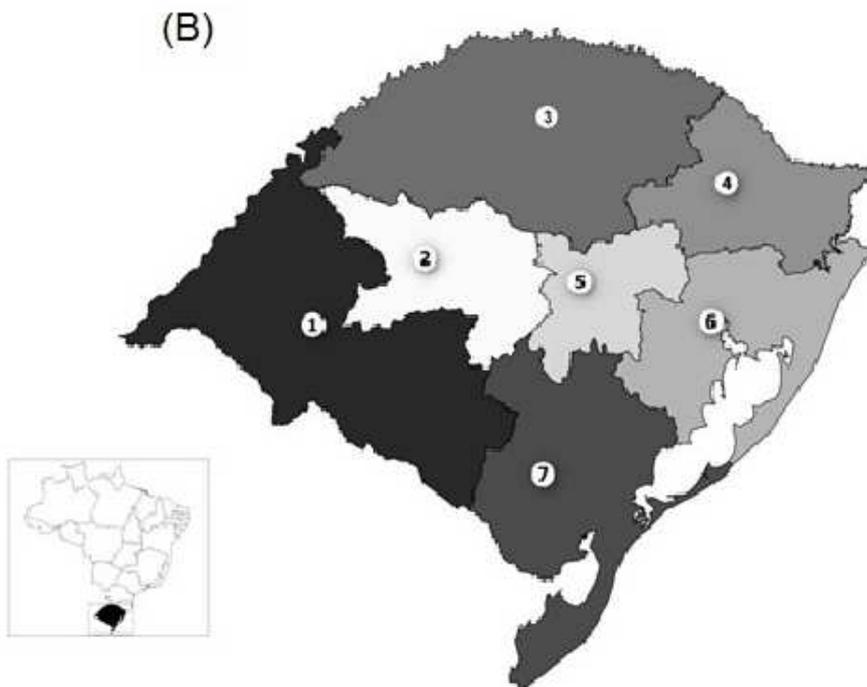
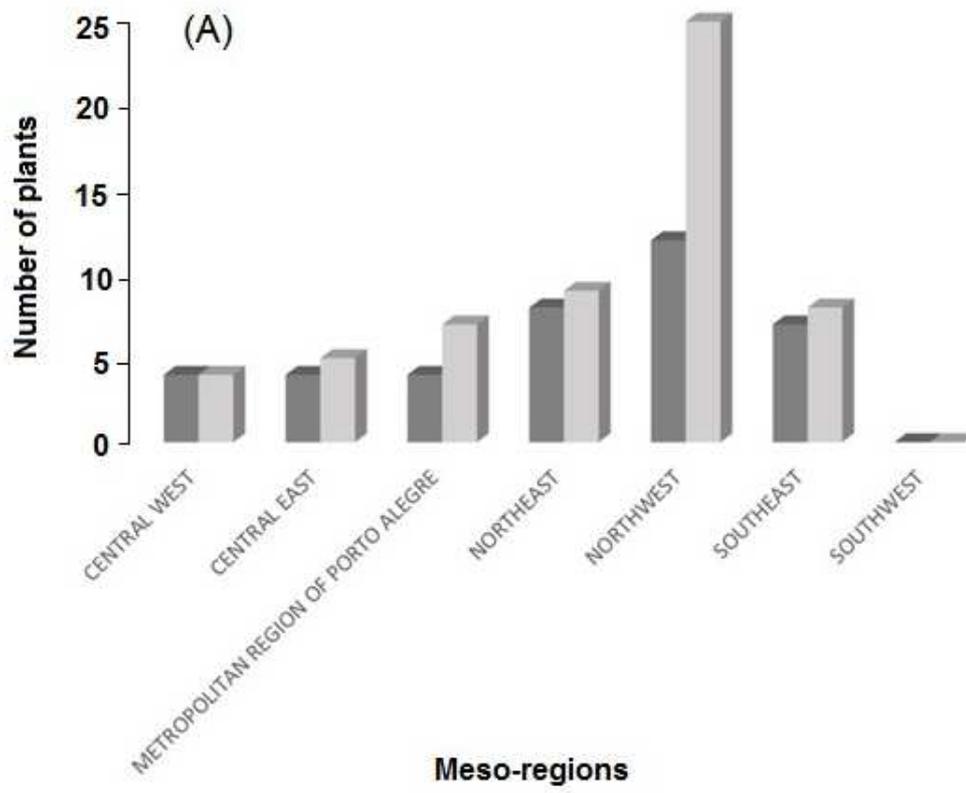
268

269 **Figure 4.** Reasons for the selection of the tests for the detection of antibiotic residues in raw
270 milk in dairy plants under the state inspection by the DIPOA/SEAPI. Data was quantified (A)
271 by repetition of citation, (B) according to multiple-choice responses from each company
272 participating in the study; (C) detailing the other options described, according to the open
273 field.

274

275 **Figure 5.** Period in which the same group of antibiotic residues were screened in raw milk by
276 the dairy plants, under state inspection by the DIPOA/SEAPI.

277



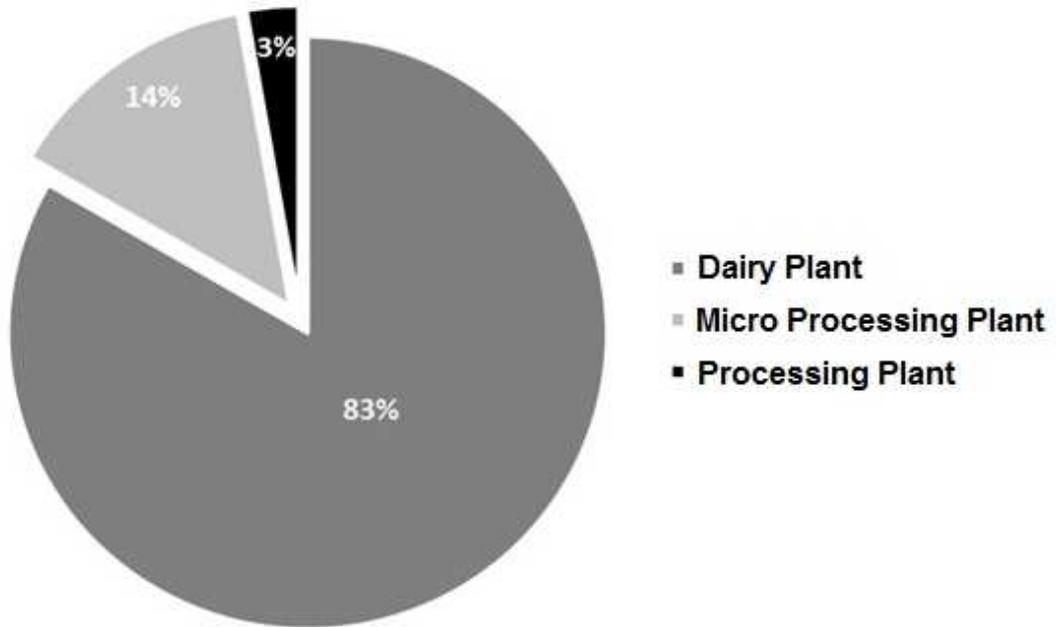
278

279

280 Galvani et al., Fig. 1

281

282



283

284

285 Galvani et al., Fig. 2

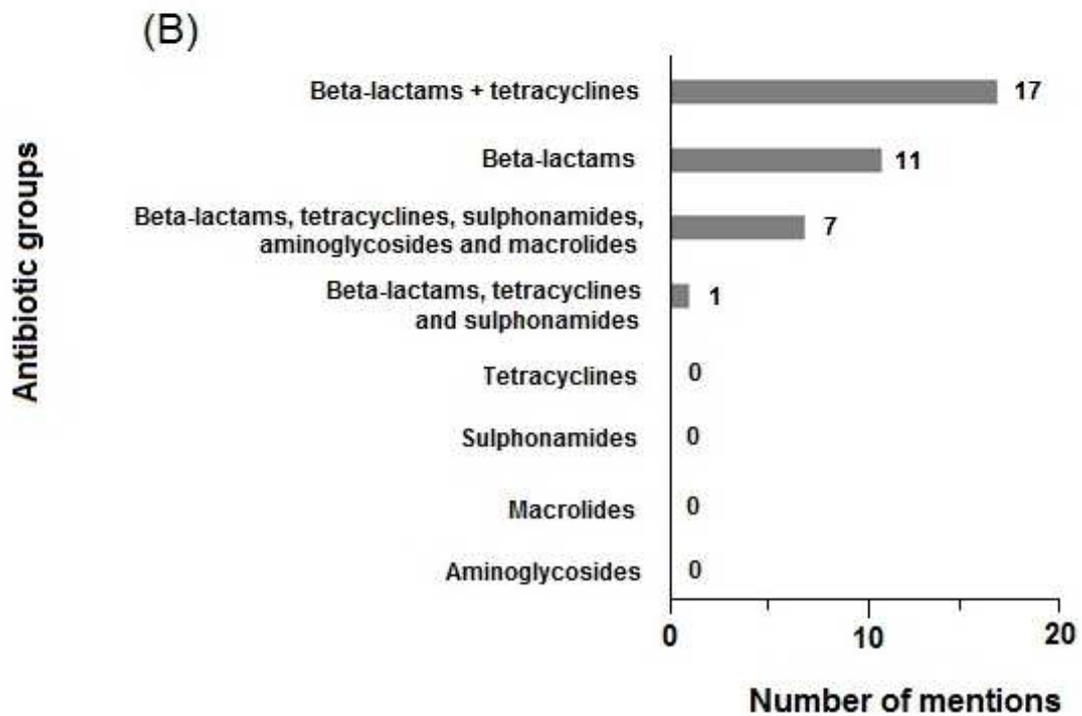
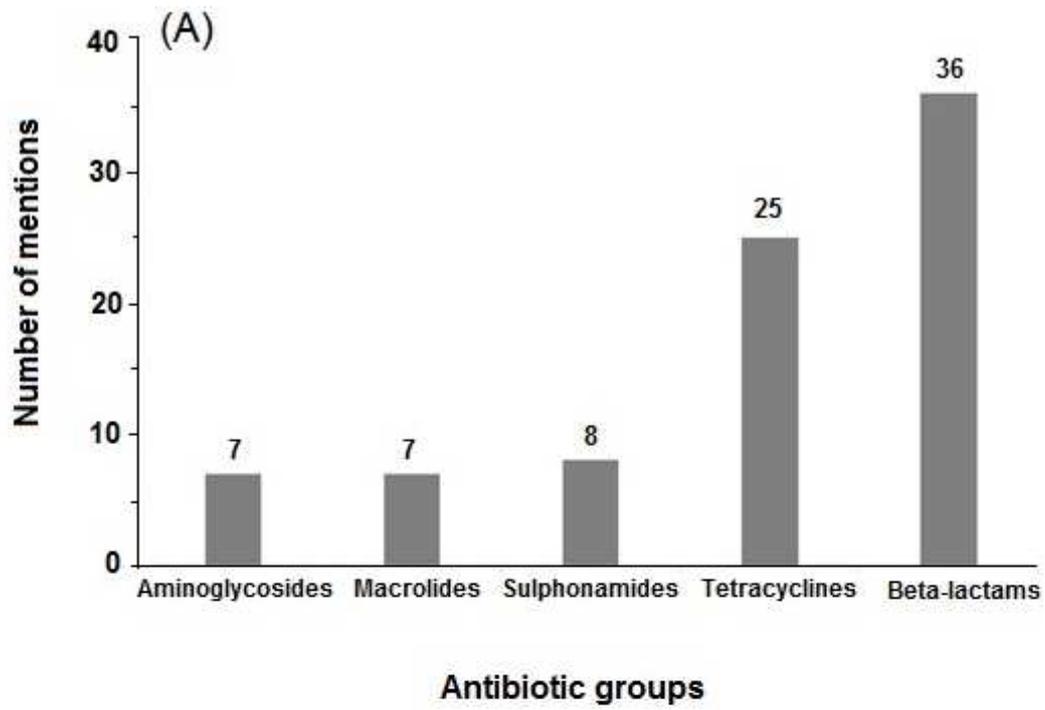
286

287

288

289

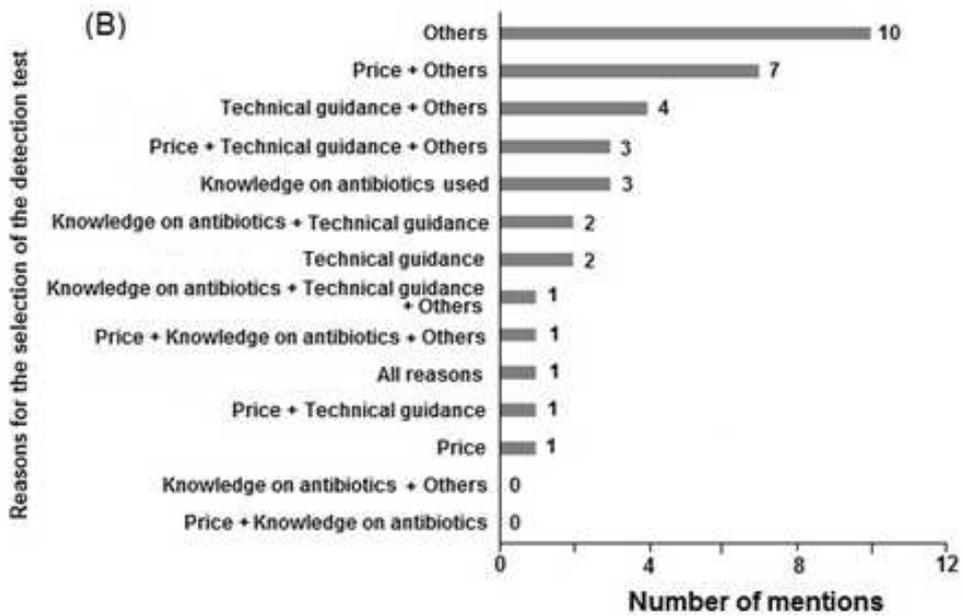
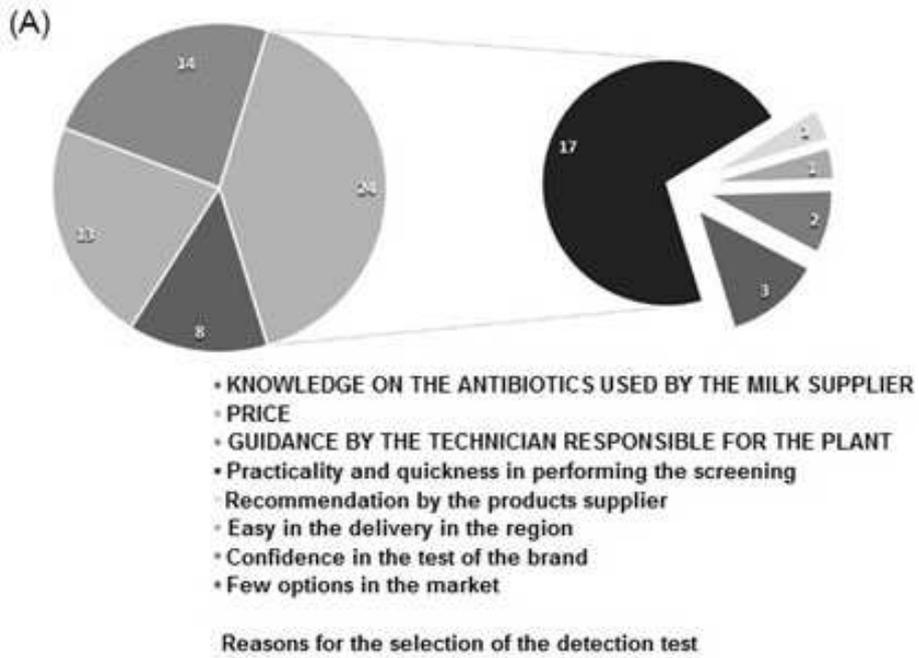
290



291

292

293 Galvani et al., Fig. 3



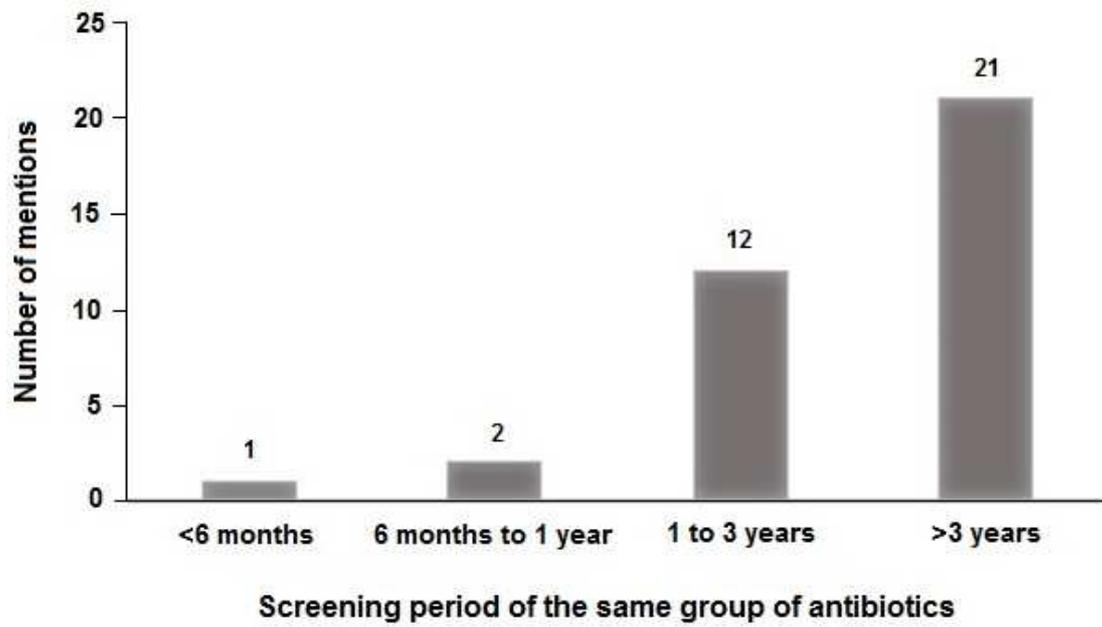
294

295

296 Galvani et al., Fig. 4

297

298



299

300

301 Galvani et al., Fig. 5

3.2 ARTIGO CIENTÍFICO 2

Artigo a ser submetido ao periódico Food Additives & Contaminants.

Presence of antibiotic residues in raw milk produced in dairy farms in Rio Grande do Sul, Brazil

Juliane Webster de Carvalho Galvani^{a,b}, Gustavo Machado^c, Luís Gustavo Corbellini^c, Louise Jank^d, Magda Targa Martins^d, Fabiano Barreto^d, Eduardo César Tondo^b, Adriano Brandelli^{b*}

^aSecretariat of Agriculture, Livestock and Irrigation (SEAPI), Av. Getúlio Vargas 1.384, Menino Deus, Sala 12, CEP: 90150-004, Porto Alegre, RS, Brazil

^bInstitute of Food Science and Technology, Federal University of Rio Grande do Sul (ICTA/UFRGS), Av. Bento Gonçalves 9.500, Campus do Vale, Agronomia, CEP: 91501-970, Porto Alegre, RS, Brazil

^cFaculty of Veterinary, University of Rio Grande do Sul (FAVET/UFRGS), Av. Bento Gonçalves 9.090, Agronomia, CEP: 91540-000, Porto Alegre/RS, Brazil

^dNational Agricultural Laboratory, Ministry of Agriculture, Livestock and Supply (LANAGRO/MAPA), Estrada da Ponta Grossa 3.036, Serraria, CEP: 91780-580, Porto Alegre/RS, Brazil

*Corresponding author: Dr. A. Brandelli, ICTA-UFRGS, Av. Bento Gonçalves 9500, 91501-970 Porto Alegre, Brazil; fax: +5551 3308 7048; e-mail: abrand@ufrgs.br

(Word count: 2905 tables: 3; figures: 1; references: 29)

Presence of antibiotic residues in raw milk produced in dairy farms in Rio Grande do Sul, Brazil

ABSTRACT

Milk is an important food for human consumption. However, contamination of milk with antibiotic residues may be a public health concern. Thus, it is essential that milk meets sanitation requirements to minimize the risk of contamination. Here, we analysed the presence of antibiotic residues by liquid chromatography (LC) quadrupole time-of flight mass spectrometry (MS) and LC tandem MS at the National Agricultural Laboratory, State of Rio Grande do Sul, using a total of 388 raw milk samples obtained during 2013 from farms distributed along Rio Grande do Sul State, Brazil. The farms from which the samples were collected were selected from 81,307 dairy farms registered in the database of the Agricultural and Livestock Service of Rio Grande do Sul. Of the 388 samples, 96 (24.7%) contained antibiotic residues from the 45 analytes investigated. Five (1.3%) of these samples were suspected of violating the maximum residue limit described in the National Plan for Control of Residues and Contaminants in Animal Products (PNCRC). The other 91 samples (23.5%) were in conformance with the current legislation. The antibiotic residues most commonly found in the raw milk produced in Rio Grande do Sul were macrolides (n = 51; 13.1%), followed by quinolones (n = 49; 12.6%) and tetracyclines (n = 18; 4.6%). We concluded that the milk consumed in Rio Grande do Sul, Brazil was in accordance with the previously results obtained in the PNCRC in terms of the presence of antibiotic residues during the collection period, offering negligible health risk.

Keywords: milk; antibiotic residues; Rio Grande do Sul

Introduction

Milk and its derivatives are high-nutrition foods that are widely consumed by individuals of all ages (Kanekanian 2014). Rio Grande do Sul is the second biggest national producer of milk in Brazil and, according to a survey of families' budgets carried out by the Brazilian Institute of Geography and Statistics (IBGE/POF 2008/2009), inhabitants of the southern region of Brazil consume more dairy products than the national average. Therefore, milk destined for human consumptions should be suitably hygienic, and contamination risks, such as physical, chemical, and microbial contamination, should be minimised.

Due to the use of veterinary medications for herd management, the control of antibiotic residues has become critical, and many studies aimed to identify residues from various classes of antibiotic and antiparasitic agents (Schrenk 2012). For antibiotics, residues may be present in the raw material as a consequence of disease treatment in the lactating herd or through deliberate use as preservatives, aiming to extend the shelf life of milk due to inappropriate cooling procedures (Muehlhoff et al. 2013). Within the last few years, antibiotic residues have been frequently detected in milk from Brazil, potentially representing a public health risk (Trombete et al. 2014). These risks are associated with hypersensitivity manifestation; anaphylactic shock; increased antibiotic resistance; lesions of the eyes, liver, and kidney; genotoxicity; aplastic anaemia; intestinal flora imbalance; and secondary collateral effects, depending on the specific residues present in milk (Vieira et al. 2012). In many situations, the reactions caused by exposure to antibiotic residues are difficult to characterise and may be under-reported. Moreover, pasteurisation and manufacturing processes may not completely degrade antibacterial residues in milk, and their presence may be disadvantageous to the industrial sector and consumer health because these substances interfere with the fermentation of yogurts, butters, and cheeses and may remain in the finished product (Adetunji 2011; Kellnerová et al. 2014).

Therefore, in this study, we aimed to identify antibacterial residues in raw milk produced in rural properties in Rio Grande do Sul State, Brazil, evaluate the conformity of samples to the maximum residue limit (MRL) established by the National Plan for Control of Residues and Contaminants in milk, and verify the knowledge of individuals responsible for the milking process with regard to the medications used in the herd and the withdrawal period.

Materials and methods

Samples

A total of 388 samples collected from farms in Rio Grande do Sul State, Brazil were analysed. The farms from which the samples were collected were selected from 81,307 dairy farms registered in the database of the Agricultural and Livestock Service of Rio Grande do Sul as previously reported by Machado et al. (2015). The period of collection was from July 2013 to November 2013, and samples were collected by seven teams located in each mesoregion (Figure 1). At the time of collection, a questionnaire was employed in order to evaluate the knowledge of individuals responsible for milking with regard to the medications used in the herd and the withdrawal period.

Samples were collected from milk in bulk tanks at each farm, representing the milk of all lactating cows at the time of collection. The collected raw milk samples were stored in 14-mL plastic bottles with screw caps and were kept under cooling in isothermal boxes with recyclable ice for transport, followed by freezing at -20°C and shipment to the National Agricultural Laboratory Services (LANAGRO/RS) to assess the occurrence of antibiotic residues. Forty-five analytes were evaluated using high-performance liquid chromatography (HPLC).

Reagents, standards, and equipment

HPLC grade acetonitrile and formic acid were purchased from J.T. Baker (Phillipsburg, NJ, USA). High-purity water was obtained from a Milli-Q water system (Millipore, Billerica, MA, USA). Methanol was purchased from Merck (Darmstadt, Germany). Disodium ethylenediaminetetracetate (Na₂EDTA) was obtained by Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA).

Veterinary drug reference standards, including tetracycline (TC), oxytetracycline (OTC), chlortetracycline (CTC), doxycycline (DOXI), sulfadiazine (SDZ), sulfathiazole (STZ), sulfamethazine (SMZ), sulfamethoxazole (SMA), sulfaquinoxaline (SQX) sulfadimethoxin (SDMX), sulfadoxine (SDX), sulfachloropyridazine (SCP), sulfamerazine (SMR), sulfizoxazol (SFX), nalidixic acid (NALID), oxolinic acid (OXO), flumequine (FLU), ciprofloxacin (CIPRO), enrofloxacin (ENRO), difloxacin (DIFLO), sarafloxacin (SARA), danofloxacin (DANO), norfloxacin (NOR), penicillin G (PNG), penicillin V (PNV), ampicillin (AMP), amoxicillin (AMX), oxacillin (OXA), cloxacillin (CLX), dicloxacillin

(DCX), ceftiofur (CFT), cephapirin (CFAP), cefoperazone (CFOP), nafcilina (NAFC), cequinome (CFQ), cefalonium (CFN), cephalixin (CFX), erythromycin (ERT), spiramycin (SPR), tilmicosin (TLM), azithromycin (AZT), tylosin (TIL), lincomycin (LNC), clindamycin (CLN), and trimethoprim (TMP), and the internal standards deuterated enrofloxacin (ENRO-D₅), sulfapyridine (SPY), and demeclocycline (DTC) were purchased from Riedel-de-Haen (Buchs, Switzerland) or Sigma-Aldrich.

Liquid chromatography (LC)-electrospray ionisation (ESI)-tandem mass spectrometry (MS/MS) measurements for β -lactams were carried out using an Agilent 1100 Series chromatographic system (Santa Clara, CA, USA) coupled to an AB Sciex API 5000 triple quadrupole mass spectrometer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) with an electrospray source in positive ionisation mode. Instrument control and data processing were carried out using Analyst 1.6.1 software. For the remaining analytes, the measurements were carried out using an Agilent 1260 Series chromatographic system coupled to an AB Sciex qTOF 5600. Instrument control and data processing were carried out using MultiQuant 2.1.1 software.

The antimicrobial multiresidual analysis methodology used to analyse samples was developed and validated by the National Agricultural Laboratory Services (LANAGRO, Porto Alegre, Brazil) and is the current methodology used in the analysis conducted for the National Plan for Control of Residues and Contaminants in Animal Products (PNCRC). The samples sent to LANAGRO-RS were subjected to semiquantitative analysis using LC-MS/MS and LC-quadrupole time-of-flight (QTOF) MS, as previously reported (Jank *et al.* 2013), to determine the occurrence of antibacterial residues. This method is based on liquid-liquid extraction, followed by centrifugation and evaporation to concentrate the samples, primarily because β -lactams exhibit small MRLs. This method is suitable for detection of 45 different analytes from different classes, including tetracyclines, sulfonamides, quinolones, fluoroquinolones, β -lactams, macrolides, lincosamides, trimethoprim, and bromhexine.

The MRL for each analyte and the CCbeta value for each compound are listed in Table 1. The CCbeta is the lowest level at which the presence of a compound can be detected with 95% of reliability.

Results and discussion

The analysis of 388 milk samples was stratified according to the mesoregion (Table 2, Figure 2). From all samples, 96 (24.7%; IC 95%: 20.4–29.0%) contained antimicrobial residues from some of the 45 analytes examined; in 91 of these samples (23.5%; IC 95%: 19.2–27.7%), the residues were detected at less than half the MRLs described in the National Plan for Control of Residues and Contaminants in Animal Products of the Ministry of Agriculture, Livestock and Food Supply. Only a total of five samples (1.3%; IC 95%: 0.17–2.41%) were suspected of violating the MRL established by the current legislation. A study conducted by Nero et al. (2007) found that 6% (3/50) of the samples collected in Pelotas, a city located in the southeast region of Rio Grande do Sul, were contaminated with antibacterial residues at concentrations higher than the MRLs. Additionally, the results obtained in the Vale do Taquari (central eastern mesoregion of Rio Grande do Sul), revealed that within a 16-month period, a total of 1.54% (31,973 of 2,078,495 L) of produced milk was discarded due to the presence of antibacterial residues (Fava and Pinto 2010). It is important to highlight that the differences in the present study in comparison with those previous studies could be a consequence of the methodology used to screening antibiotic residues or the sample size. In the previous studies, qualitative tests were used to screen for antibiotic residues in milk.

Considering all residues, even those below the MRLs, this study shows that antibiotic residues belonging to the macrolide class, followed by quinolones and tetracyclines, were the most common residues found in raw milk produced at farms in Rio Grande do Sul State, Brazil. Cerqueira (2014) also identified the presence of quinolone (2.86%) and tetracycline (11.43%) residues by analysing 70 samples of raw milk in Minas Gerais; however, these samples violated the MRL established by the current legislation. The individual antibiotics for which residues were identified at a higher frequency were spiramycin (37 samples; 9.5%), enrofloxacin (29 samples; 7.5%), and tetracycline (12 samples; 3.1%). Detailed data are presented in Table 3.

Macrolides have great advantages in the treatment of bacterial diseases owing to their wide distribution in tissues, high intracellular concentrations, and prolonged half-life (Giguère et al. 2013). Within the macrolide class, spiramycin is indicated for the systemic treatment of clinical mastitis in bovines, caused by *Streptococcus* and *Staphylococcus* (Guardabassi et al. 2008). The antimicrobial susceptibility of these microorganisms to this antibiotic may reach 89.9% (Beuron et al. 2014). However, due to its high tissue concentration, the residues of this antibiotic remain in milk for a longer time, which may make this antibiotic inconvenient for the treatment of mastitis in lactating cows. Another macrolide, tylosin, is indicated for the

treatment of mammary gland infections caused by the presence of *Mycoplasma*, anaerobic bacteria, and gram-positive bacteria; however, this type of antibiotic is not as effective against most bacteria as erythromycin (Giguère et al. 2013). Erythromycin is the most beneficial alternative among macrolides and is used for intramammary infusion in the treatment of mastitis in lactating and dry cows owing to its short withdrawal period. However, this antibiotic is widely used in humans, and resistance to erythromycin may result from the consumption of food containing erythromycin residues (Aarestrup et al. 2001; Watson 2004).

Within the quinolones identified in this study, enrofloxacin and norfloxacin were the most common. Quinolones are indicated, among other purposes, for the treatment of mastitis and metritis in bovines. In Brazil, enrofloxacin is approved for use in lactating cows. However, in United States of America, this medication is exclusively approved for the treatment of acute pneumonia in beef cattle (Giguère et al., 2013), even though this drug has high effectiveness against bacterial agents associated with the occurrence of bovine clinical mastitis (Soujala et al., 2010). Based on concerns for public health, Forsythe (2010) stated that the veterinary use of enrofloxacin may be a cause of resistance to quinolones in humans, as observed in the treatment of infections caused by *Campylobacter jejuni* (Takahashi et al. 2005).

We also found that tetracycline was commonly identified in the milk samples in this study. Tetracyclines are indicated for metritis therapy and for the treatment of bovine mastitis, reaching concentrations in the milk similar to that observed in the blood after intravenous administration. Therefore, this type of antibiotic is considered a parenteral second choice treatment against severe infections of the udder caused by gram-positive bacteria and coliforms (Guardabassi et al. 2008; Giguère et al. 2013). Several studies have shown the occurrence of these residues in milk, although in contrast to our study, tetracycline residues have previously been observed at levels higher than the MRL indicated in the current legislation. De Albuquerque Fernandes et al. (2014) found that among 252 pasteurised milk samples from 21 different marketed brands in Brazil, a total of 20 (8%) were considered positive, and 25 (10%) were considered suspect for the presence of antibacterial residues of tetracyclines.

Notably, antibacterial residues of the β -lactam class unexpectedly were not identified at a higher frequency in the analysed samples of raw milk. Therefore, although these antibiotics are less stable than antibiotics within the other evaluated groups, the results of this

study showing the absence of concentrations higher than the MRL were consistent with those obtained by Portz et al. (2014), Robim et al. (2012), and Becker et al. (2010), who found residues of antibiotics of the β -lactam group at concentrations lower than the MRL in milk samples.

Furthermore, in unique raw milk samples, it was possible to identify the presence of more than one analyte; 75 (19.3%) of the analysed samples of milk harboured only one type of antibiotic, whereas 18 (4.6%) of the samples contained residues of two different antibiotics, and three (0.8%) of the samples contained residues of three different antibiotics. Among the 21 samples in which more than one analyte was detected, 38.1% ($n = 8$) contained both macrolides and quinolones, i.e., the classes that were found with the highest frequencies in this study.

In addition to the laboratory analysis conducted with the raw milk samples, a questionnaire about medication administration and residue control was applied to farmers from where the samples were collected in order to evaluate the knowledge of individuals responsible for milking. From these results, we found that 53.6% ($n = 208$) of the respondents stated they had not given any medications to the lactating animals within the last 60 days before sample collection. However, the presence of antibacterial residues was identified in 22.6% ($n = 47$) of the samples from these farms. These data indicated that it is necessary to register the medications administered to dairy herds. Furthermore, we observed that the veterinary medicines were administered by rural producers in 91.5% ($n = 355$) of the cases in this study. In a study conducted in Pennsylvania, USA, Sawant and colleagues (2005) found that registration of the treatment of dairy herds with antibiotics occurred in 50% of the studied properties ($n = 113$), despite that antibiotics were administered by rural producers at most of the properties (93%).

In Brazil, with regard to the incentive to produce high-quality milk, certain dairy companies establish different reward programs, characterised by penalties or bonuses for rural producers based on the quality of the milk delivered to the company, with the goal of improving raw milk quality (Botaro et al. 2013). A total of 57.5% ($n = 223$) of the rural producers stated that they had been rewarded according to the quality of the milk they produced, and 84.5% ($n = 328$) of producers were aware that the company to which they sell their milk conducts tests for detecting residues of medications in the product. Moreover, 88.7% ($n = 344$) of producers stated that they had never had medication residues detected in the milk of their herd by the company that receives the raw material. This could be explained

by the fact that 90.7% (n = 352) of the producers were already informed of the possibility that these residues remain in the milk after administration. Thus, 87.4% (n = 339) of the producers attempted to discard milk produced during the residual period. However, only 3.4% (n = 13) of producers indicated that they considered the instructions on the medicine bottle or from the veterinarian (n = 12; 3.1%), choosing instead to seek guidance from the cooperative with which they were associated (n = 217; 55.9%). Importantly, prescription of drugs for therapeutic use, diagnosis, or production auxiliaries in animals must be performed by a veterinarian, not technicians, students, or sellers, owing to the risks that may result from the incorrect use of these medications. Moreover, it is essential that antibiotics are administered according to the recommended dosage in order to minimise therapeutic failure, explore the drug effectiveness potential, and meet the recommended treatment duration to avoid contamination of milk with antibiotic residues (Rico et al. 2010; Guardabassi et al. 2008).

Conclusion

The samples evaluated in this study were in conformance with the previously results obtained in the National Plan for Control of Residues and Contaminants in milk. However, even though the results indicated that the milk consumed in Rio Grande do Sul State was offering a negligible risk to public health, directed efforts concerning good practices of veterinary medication use by farmers should be promoted. Farmers should be able to register the medications used in lactating herds and respect the withdrawal period according to veterinary and medication guidelines, thereby minimising the risk of residues being present in milk intended for human consumption. These data provide information about the actual status of milk contamination in Rio Grande do Sul and regarding the procedures used by farmers in dairy herds. Based on these results, it is possible to evaluate and outline a regular program in Rio Grande do Sul to monitor veterinary medication residues in milk, further those covered by screening tests in the dairy industry.

Acknowledgements

The authors would like to thank the staff of the Secretariat of Agriculture, Livestock and Irrigation, the staff of the National Agricultural Laboratory, Ministry of Agriculture, Livestock and Supply, and the field team who carried out all the bulk milk tank sampling and

questionnaire interviews for their outstanding work and contributions that made the data collection and generation of information possible. The authors are also grateful to the federal agriculture inspector Diego Viali dos Santos for support and valuable collaboration on this project. We would like to thank Editage (www.editage.com.br) for English language editing.

Authors' disclaimer

The authors are staff members from different organizations; however, they alone are responsible for the views expressed in this article and they do not necessarily represent the decisions or the stated policy of their respective organizations.

References

- Aarestrup FM, Seyfarth AM, Emborg HD, Pedersen K, Hendriksen RS, Bager F. 2001. Effect of abolishment of the use of antimicrobial agents for growth promotion on occurrence of antimicrobial resistance in fecal enterococci from food animals in Denmark. *Antimicrob Agents Chemother.* 45:2054–2059.
- Brazil, Ministry of Agriculture, Livestock and Supply. Normative Instruction n. 42, of 20 December 1999. Changes the National Residues Control Plan in Animal Products. *Union Official Journal, Brasília, DF, December 22. 1999. Section 1, page 13.*
- Brasil, Ministry of Agriculture, Livestock and Supply. Normative Instruction n. 62, of 29 December 2011. Approves the Technical Regulation of Identity and Quality of Milk type A, Technical Regulation of Identity and Quality of Raw Refrigerated Milk, Technical Regulation of Identity and Quality of Pasteurized Milk and the Technical Regulation of Raw Milk Collection and its Transport. *Union Official Journal. Brasília, DF, December 30. 2011. Section 1.*
- Adetunji VO. 2011. Effects of processing on antibiotic residues (streptomycin, Penicillin-G and tetracycline) in soft cheese and yoghurt processing lines. *Pakistan J Nutr.* 10:792–795.

Becker TA, Negrelo IF, Racoulte F, Drunkler DA. 2010. Evaluation of the sanitary quality of integral milk in nature, pasteurized, UHT and powder commercialized in Medianeira and Serranópolis do Iguaçu – Paraná. *Semina Agric Sci.* 31:707–716.

Beuron DC, Cortinhas CS, Botaro BG, Macedo SN, Gonçalves JL, Brito VAPM, Santos MV. 2014. Risk factors associated with the antimicrobial resistance of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis. *Pesq Agropec Bras.* 34:947-952.

Botaro BG, Gameiro AH, Santos MVD. 2013. Quality based payment program and milk quality in dairy cooperatives of Southern Brazil: an econometric analysis. *Sci Agr.* 70:21–26.

Cerqueira MMOP, Souza FN, Cunha AF, Picinin LCA, Leite MO, Penna CFAM, Souza MR, Fonseca LM. 2014. Detection of antimicrobial and anthelmintic residues in bulk tank milk from four different mesoregions of Minas Gerais State - Brazil. *Braz J Vet Anim Sci.* 66:621–625.

De Albuquerque Fernandes SA, Magnavita AP, Ferrao SP, Gualberto SA, Faleiro AS, Figueiredo AJ, Matarazzo SV. 2014. Daily ingestion of tetracycline residue present in pasteurized milk: a public health problem. *Environ Sci Pollut Res.* 21:3427–3434.

Fava LW, Pinto AT. 2010. Occurrence of acidity and antimicrobial residues in raw milk delivered at a dairy plant in Vale do Taquari, RS, Brazil. *Acta Sci Vet.* 38:419-423.

Forsythe SJ. 2010. *The microbiology of safe food.* 2nd Edition. Wiley-Blackwell: Chichester, UK.

Giguère S, Prescott JF, Dowling PM. 2013. *Antimicrobial therapy in veterinary medicine.* John Wiley & Sons: Chichester, UK.

Guardabassi L, Jensen LB, Kruse H. 2008. *Guide to antimicrobial use in animals.* Blackwell Publishers: Oxford, UK.

Jank L, Martins MT, Arsand JB, Barreto F, Hoff RB, Pizzolato TM. 2013. Determinação de antimicrobianos em leite pertencentes a diferentes classes por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas por tempo de voo. In: *Congresso Brasileiro de Toxicologia.* Porto Alegre, RS.

Kanekanian A. 2014. *Milk and dairy products as functional foods.* Milk and dairy products as functional foods. John Wiley & Sons: Chichester, UK.

- Kellnerová E, Navrátilová P, Borkovcová I. 2014. Effect of pasteurization on the residues of tetracyclines in milk. *Acta Vet Brno*. 83:S21–S26.
- Machado, G., Mendoza, M. R., & Corbellini, L. G. (2015). What variables are important in predicting bovine viral diarrhea virus? A random forest approach. *Vet Res*. 46:1-15.
- Muehlhoff E, Bennett A, McMahon D. 2013. Milk and dairy products in human nutrition. Food and Agriculture Organisation of the United Nations (FAO), Rome.
- Nero LA, Mattos MR, Beloti V, Barros MAF, Franco BDGM. 2007. Antimicrobial residues in raw milk from four Brazilian milk-producing regions. *Food Sci Technol. (Campinas)*. 27:391–393.
- Portz AJ, Couto EP, De Aguiar Ferreira M. 2014. Residues of antibiotics and microbiological quality of raw and benefited milk. *Revista do Instituto Adolfo Lutz*. 73:345–350.
- Rico SL, Ferraro DG. 2010. Residuos de medicamentos de uso veterinário. *APROCAL: Buenos Aires, Argentina*.
- Robim MS, Cortez MAS, Silva ACO, Filho RAT, Gemal NH, Nogueira EB 2012. Research fraud in UHT whole milk marketed in the state of Rio de Janeiro and comparison between the methods of physicochemical officers and the method of ultrasound. *Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes*. 67:43–50.
- Sawant AA, Sordillo LM, Jayarao BM. 2005. A survey on antibiotic usage in dairy herds in Pennsylvania. *J Dairy Sci*. 88:2991–2999.
- Schrenk D. 2012. Chemical contaminants and residues in food. Woodhead Publishing: Cambridge, UK.
- Soujala L, Simojoki H, Mostonen K, Kaartinen L, Pyörälä S. 2010. Efficacy of enrofloxacin in the treatment of naturally occurring acute clinical *Escherichia coli* mastitis. *J Dairy Sci*. 93:1960-1969.
- Takahashi T, Ishihara K, Kojima A, Asai T, Harada K, Tamura Y. 2005. Emergence of fluoroquinolone resistance in *Campylobacter jejuni* in chickens exposed to enrofloxacin treatment at the inherent dosage licensed in Japan. *J Vet Med B*. 52:460-464.
- Trombete FM, Santos RRD, Souza ALR. 2014. Antibiotic residues in Brazilian milk: a review of studies published in recent years. *Revista Chilena de Nutrición*. 41:191–197.

Vieira TSWJ, Ribeiro MR, Nunes MP, Júnior MM, Netto DP. 2012. Detection of antibiotic residues in pasteurized milk samples from Paraná State, Brazil. *Semina Agric Sci.* 33:791-796.

Watson DH. 2004. *Pesticide, veterinary and other residues in food.* Woodhead Publishing: Cambridge, UK.

Tables

Table 1. Maximum Residue Limit and CC β values for different antibacterials in milk.

Analyte	LMR	CC β	Analyte	LMR	CC β	Analyte	LMR	CC β
ERT	40	10	SMZ	100	25	OTC	100	25
SPR	200	50	NOR	10	2.5	PNG	4	1
LNC	150	37.5	DIFLO	100	25	PNV	4	1
TIL	50	12.5	CIPRO	50	12.5	AMP	4	1
AZT	100	25	ENRO	50	12.5	AMX	4	1
CLN	150	12.5	SARA	20	5	OXA	30	7.5
TLM	50	12.5	NALID	20	5	CLX	30	7.5
SMA	100	25	FLU	50	12.5	DCX	30	7.5
SDMX	100	25	OXO	20	5	NAFC	30	7.5
SQX	100	25	DANO	30	7.5	CFN	20	5
SDX	100	25	TMP	50	12.5	CFQ	20	5
SFX	100	25	CFT	100	25	CFAP	60	15
STZ	100	25	TC	100	25	CFOP	50	12.5
SCP	100	25	CTC	100	25			
SDZ	100	25	DOXI	100	25			
SMR	100	25	CFX	100	25			

Tetracycline (TC), Oxytetracycline (OTC), Chlortetracycline (CTC), Doxycycline (DOXI), Sulfadiazine (SDZ), Sulfathiazole (STZ), Sulfamethazine (SMZ), Sulfamethoxazole (SMA), Sulfafloxacin (SFX), Sulfadimethoxin (SDMX), Sulfadoxine (SDX), Sulfachloropyridazine (SCP), Sulfamerazine (SMR), Sulfizoxazol (SFX), Nalidixic Acid (NALID), Oxolinic Acid (OXO), Fumequine (FLU), Ciprofloxacin (CIPRO), Enrofloxacin (ENRO), Difloxacin (DIFLO), Sarafloxacin (SARA), Danofloxacin (DANO), Norfloxacin (NOR), Penicillin G (PNG), Penicillin V (PNV), Ampicillin (AMP), Amoxicillin (AMX), Oxacillin (OXA), Cloxacillin (CLX), Dicloxacillin (DCX), Ceftiofur (CFT), Cephapirin (CFAP), Cefoperazone (CFOP), Naficilina (NAFC), Cefquinome (CFQ), Cefalonium (CFN), Cephalexin (CFX), Erythromycin (ERT), Spiramycin (SPR), Tilmicosin (TLM), Azithromycin (AZT), Tylosin (TIL), Lincomycin (LNC), Clindamycin (CLN), and Trimethoprim (TMP).

Table 2. Frequency of antibacterial residues in raw milk collected from farms distributed along seven mesoregions of Rio Grande do Sul State, from July 2013 to November 2013.

Mesoregion	Samples (n)	Presence	
		n	%
Central West	6	0	0
Southwest	9	0	0
Metropolitan Region of Porto Alegre	12	2	16.7
Southeast	16	3	18.8
Central East	27	3	11.1
Northeast	41	22	53.7
Northwest	277	66	23.8
Total	388	96	24.7

Table 3. Individual frequencies of antibiotic residues in raw milk from farms distributed along seven mesoregions of Rio Grande do Sul State, from July 2013 to November 2013.

Antibiotics	Samples with residues	
	n	%
Macrolides	51	13.1
Spiramycin (SPR)	37	9.5
Tylosin (TIL)	9	2.3
Erythromycin (ERT)	3	0.8
Tilmicosin (TLM)	2	0.5
Lincosamide	1	0.3
Clindamycin (CLN)	1	0.3
Quinolones	49	12.6
Enrofloxacin (ENRO)	29	7.5
Norfloxacin (NORF)	12	3.1
Oxolinic Acid (OXO)	4	1.0
Ciprofloxacin (CIPRO)	4	1.0
Tetracyclines	18	4.6
Tetracycline (TC)	12	3.1
Doxycycline (DOXI)	2	0.5
Chlortetracycline (CTC)	2	0.5
Oxytetracycline (OXI)	2	0.5
Beta-lactams	1	0.3
Penicillin G (PNG)	1	0.3

Figure Legends

Figure 1. Map of the region under study in Brazil, which includes the state of Rio Grande do Sul (in black, inset map). Subdivision of the above-mentioned state according to the mesoregions defined by the Brazilian Institute of Geography and Statistics: 1- Southwest of Rio Grande do Sul, 2- Central West of Rio Grande do Sul, 3- Northwest of Rio Grande do Sul, 4- Northeast of Rio Grande do Sul, 5- Central East of Rio Grande do Sul, 6- Metropolitan region of Porto Alegre, and 7- Southeast of Rio Grande do Sul.

Figure 2. Frequency of antibiotic residues classes in raw milk from farms distributed along seven mesoregions of Rio Grande do Sul State, from July 2013 to November 2013.

Figures

Figure 1

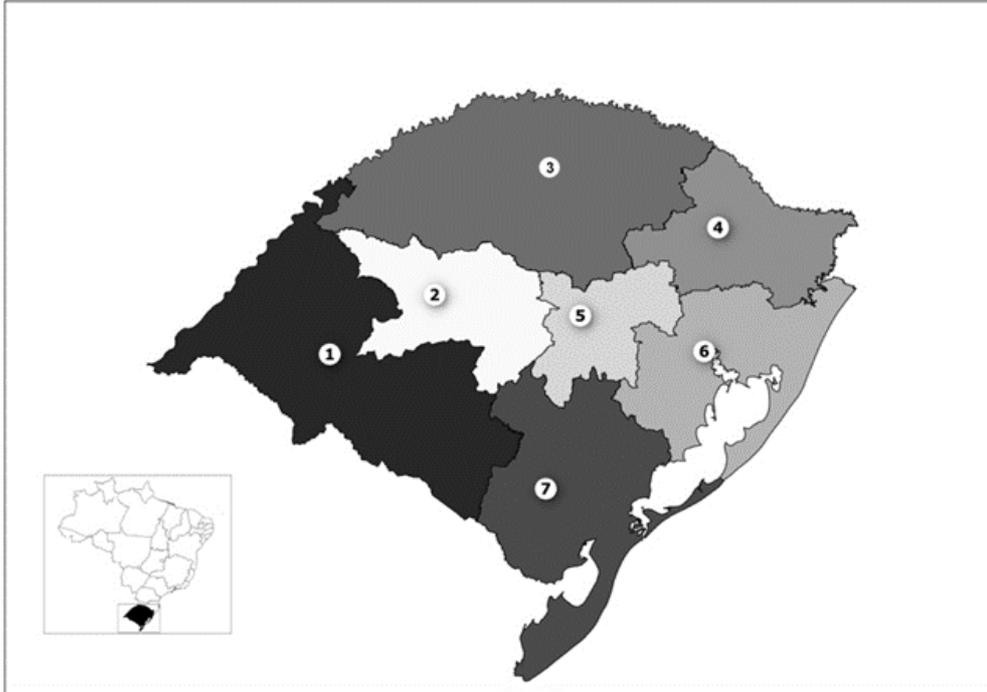
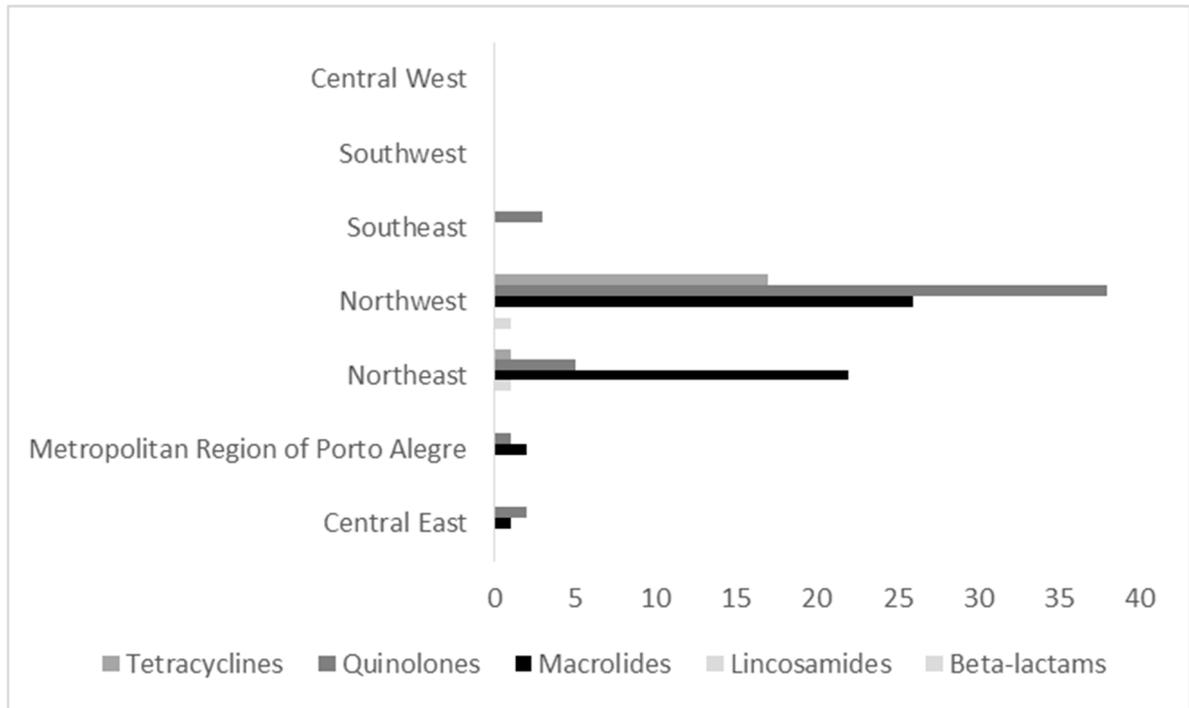


Figure 2



4 DISCUSSÃO GERAL

No primeiro artigo, obteve-se a informação referente às classes de antibióticos, comumente pesquisados, na rotina diária, nas plataformas de recepção do leite cru, em estabelecimentos industriais sob a inspeção do serviço veterinário oficial no Estado do Rio Grande do Sul. Com base nos resultados obtidos, constatou-se que os testes de detecção para as classes dos antibióticos betalactâmicos (n=36; 100%) e o das tetraciclinas (n=25; 69%) foram, frequentemente, utilizados pelos laticínios, visando o cumprimento da pesquisa de resíduos de antibióticos, em leite cru, prevista na legislação vigente. Contudo, poucas foram as plantas industriais (n=8; 22%) que consideraram o conhecimento prévio dos antibióticos utilizados, nas propriedades rurais fornecedoras de leite, para a tomada de decisão na escolha do referido teste de detecção. Ainda, observou-se que o período de pesquisa dos mesmos grupos de resíduos de antibióticos era superior ao período de três anos na maioria das empresas avaliadas (n=21; 58%).

No segundo artigo, que objetivou a) identificar os resíduos de antibióticos, frequentemente encontrados em leite cru produzido em propriedades rurais no Rio Grande do Sul, b) avaliar a presença de resíduos de antibióticos nas amostras analisadas quanto ao LMR descrito no Programa Nacional de Controle de Resíduos – MAPA e c) verificar o conhecimento dos responsáveis pela ordenha do leite, quanto aos medicamentos utilizados em seu rebanho e à observância dos prazos de carência destes, constatou-se que dos resíduos de antibióticos identificados, os do grupo dos macrolídeos (n=51; 13,1%), seguidos das quinolonas (n=49; 12,6%) e das tetraciclinas (n=18; 4,6%) foram os comumente encontrados em leite cru produzido em propriedades rurais no RS. Bem como, verificou-se que há a necessidade de trabalhos, junto aos produtores rurais, no que se refere às boas práticas agropecuárias do uso de medicamentos veterinários, tendo em vista a constatação de que a determinação do período de carência não levava em consideração, na maioria das vezes (n=363; 93,6%), o constante na bula do medicamento utilizado ou as recomendações de médicos veterinários.

Assim, observa-se que há uma falta de sincronia entre estes dois elos da cadeia, ou seja, as propriedades rurais leiteiras e as indústrias de laticínios. Conforme os resultados obtidos, a pesquisa de resíduos de antibióticos nas empresas, provavelmente, não seria capaz de detectar os resíduos, realmente utilizados nos animais em lactação, exceto para os resíduos

da classe das tetraciclinas. Consequentemente, o leite contaminado com resíduos de antibióticos não seria refutado na plataforma de recepção, sendo destinado para o beneficiamento ou a produção de derivados lácteos e, finalmente, para o consumo humano. Tal fato é comprovado mediante estudos realizados em leite pronto para o consumo, tanto pasteurizado quanto UHT, no Brasil, nos quais tem sido constatada a presença de resíduos de antibióticos em vários Estados e com variada frequência, conforme tabela 6 (Trombete, Santos e Souza, 2014) .

Tabela 6- Resultados dos estudos referentes à pesquisa de resíduos de antibióticos em leite comercializado no Brasil, no período de 2004 a 2012.

Amostra	Estado	Método de detecção	Amostras (n)	Amostra Positiva
Leite Pasteurizado	Paraná	Imunoenzimático	79	19% (15)
Leite Pasteurizado	Bahia	HPLC	240	7.9% (19)
Leite Pasteurizado	Paraná	Imunoenzimático	260	31% (80)
Leite Pasteurizado	Rio de Janeiro	Imunoenzimático	57	65% (37)
Leite Pasteurizado	Paraná	Imunoenzimático	151	2.6% (4)
Leite Pasteurizado	Rio de Janeiro	HPLC	43	37.21% (16)
Leite UHT	Vários	Inibição microbiana	100	4% (4)

Fonte: Adaptado de Trombete, Santos e Souza (2014).

Ainda, conforme o artigo 1 do presente trabalho, nas empresas entrevistadas, constatou-se que em 58% destas, os mesmos grupos de antibióticos foram pesquisados por período superior a 3 anos. Além disso, apenas 22% das plantas industriais consideravam o conhecimento prévio dos antibióticos utilizados, nas propriedades rurais fornecedoras de leite, para a tomada de decisão na escolha dos testes de detecção. No entanto, seria interessante, de modo a ampliar as chances de detecção de resíduos, que a procura de diferentes classes ocorresse a partir da identificação dos medicamentos utilizados nas propriedades rurais e/ou variasse conforme o histórico de dados já obtidos na rotina de avaliação diária. Nos Estados Unidos, a Portaria do Leite Pasteurizado tipo A prioriza a pesquisa para os resíduos dos antibióticos do grupo dos betalactâmicos, no entanto, adicionalmente, outras classes podem ser avaliadas, empregando-se um programa de amostragem randomizada (Baynes e Riviere, 2014)

Além do exposto, considerando que a detecção de resíduos de antibióticos no leite, na plataforma de recepção das indústrias, implica na condenação e descarte do produto, uma vez que o mesmo é considerado impróprio para o consumo, deve-se ressaltar que, devido a erros

de manejo nas propriedades rurais, ocorre, nestes casos, a perda de um alimento de alto valor nutricional e com grande importância na alimentação da população. Bem como, convém esclarecer que o descarte, devido à mistura nos compartimentos do caminhão de recolhimento, não ocorrerá apenas do leite daquela propriedade que não seguiu as boas práticas do uso de medicamentos veterinários, mas sim, de todo o leite que já estava ou que será adicionado ao mesmo tanque, ainda que, originalmente, não possuísse resíduos. Além disso, não deve ser esquecido, que o descarte do leite com resíduos de antibióticos também traz impactos ao meio ambiente.

Desta forma, é importante que ações sejam direcionadas às propriedades rurais fornecedoras de leite, no que refere ao uso de medicamentos veterinários, em especial aos antibióticos. Segundo Baynes (2014), o meio mais efetivo de minimizar a presença de resíduos de medicamentos no leite, é através da mudança de comportamento do produtor rural, mediante a assistência veterinária. Através desta, o produtor rural pode receber orientações em relação às doenças que acometem seu rebanho, bem como, receber protocolos de tratamento adequados para esta finalidade. Além disso, as orientações abrangem o armazenamento adequado dos medicamentos, a administração correta destes, a identificação dos animais tratados, como manter e entender os registros de tratamento, além do esclarecimento quanto ao correto período de carência. Em relação a este último item, conforme exposto no artigo 2 desta dissertação, apenas 3,4% (n=13) dos produtores rurais entrevistados consideraram a informação existente na bula do medicamento ou a orientação de médico veterinário (3,1%; n=12), guiando-se, na maioria dos casos, pela indicação da cooperativa a qual estiverem associados (55,9%; n=217). Para Borsanelli *et al.* (2015), as práticas inadequadas dos produtores rurais são reflexo do processo tradicional de fomento à produção animal, da carência da assistência técnica e da ausência de políticas públicas de educação sanitária. Embora as indústrias tenham programas de incentivo à qualidade do leite, dos quais 57,5% (n=223) dos entrevistados no artigo 2 relataram fazer parte, as questões sanitárias relacionadas a administração de drogas de uso veterinário e o manejo dos animais em tratamento são de exclusiva responsabilidade dos produtores rurais.

Adicionalmente, além dos esforços, nas propriedades leiteiras, quanto à melhoria das boas práticas no uso de medicamentos veterinários e, nas indústrias, visando aumentar a capacidade de detecção de resíduos de antibióticos no leite, alterações no compartilhamento de informações entre estes dois elos, a exemplo do que ocorre em outras cadeias da produção agropecuária, poderiam contribuir para minimizar os riscos da presença de resíduos de

antibióticos neste alimento. No caso de aves destinadas ao abate, o regulamento técnico da inspeção tecnológica e higiênico-sanitária de carne de aves prevê a apresentação de boletim sanitário para avaliação, prévia ao abate, das informações relativas às enfermidades ocorridas naquele lote de animais, bem como, permite avaliar o registro de medicamentos utilizados, possibilitando a identificação de lotes de aves que tenham sido tratados com antibióticos para efeito de sequestro, objetivando a realização de análises laboratoriais, com vistas a possível presença de resíduos na carne (Brasil, 1998). Da mesma forma, para o abate de suínos, o boletim sanitário que descreve as enfermidades do lote, bem como, as drogas utilizadas neste e o atendimento ao período de carência, é exigido pelo serviço veterinário de inspeção sanitária oficial, de modo a fornecer informações para compor a avaliação *ante mortem* (Brasil, 2009).

Quanto aos resultados laboratoriais descritos no artigo 2, verificou-se que das 388 amostras de leite analisadas, 96 (24,7%) apresentaram algum resíduo de antibiótico, dos 45 analitos pesquisados e, destas, apenas 5 (1,3%) foram consideradas suspeitas para a violação do LMR estipulado na legislação vigente (Brasil, 2015). Nas demais 91 amostras (23,5%), observou-se que a detecção de resíduos não ultrapassou a metade da concentração do LMR descrito no PNCRC. Assim, embora não tenha sido possível confirmar os resultados das 5 amostras suspeitas, devido a escassez da amostra para a quantificação destas, quanto à presença de resíduos de antibióticos, no período da coleta, obteve-se 98,7% das amostras em conformidade com a legislação vigente. Por conseguinte, os resultados encontrados eram compatíveis com aqueles identificados no PNCRC, o qual, nos anos de 2012, 2013 e 2014 identificou índices de conformidade, para a presença de resíduos de antibióticos em amostras de leite analisadas, de 98,7% (1/75), 99,6% (1/226) e 99,7% (1/309), respectivamente (Brasil, 2013b; Brasil 2014b; Brasil, 2015b).

Das classes de antibióticos detectadas, constatou-se que os macrolídeos (n=51; 13,1%), seguidos das quinolonas (n=49; 12,6%) e das tetraciclina (n=18; 4,6%) eram os mais comumente encontrados em leite cru produzido em propriedades rurais no RS e, inclusive, das 5 (1,3%) amostras consideradas suspeitas para a violação do LMR, todas referiam-se à classe dos macrolídeos. Ainda, diferentemente do que se esperava, os resíduos de antibióticos da classe dos betalactâmicos (n=1; 0,3%) não obtiveram expressiva presença nas amostras de leite cru analisadas. A justificativa para esses resultados pode estar no fato de que o principal agente causador da mastite, *Staphylococcus aureus*, atualmente, conforme vários trabalhos realizados no Brasil, já demonstra resistência aos betalactâmicos, enquanto que os antibióticos

da classe dos macrolídeos, destacando-se a eritromicina, surgem como opção terapêutica para a mastite estafilocócica (Silva *et al.*, 2012).

5 CONCLUSÃO

Conclui-se que 98,7% das amostras avaliadas, neste estudo, se encontravam de acordo com os padrões previstos no Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade do Leite e no Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes - MAPA. Portanto, o leite consumido no Estado Rio Grande do Sul, no que se refere à presença de resíduos de antibióticos, no período da coleta, apresentou resultados compatíveis com aqueles identificados no PNCRC, oferecendo baixo risco à saúde pública.

Contudo, observou-se que é necessário envidar esforços na educação sanitária, no incentivo da utilização de assistência técnica e na implementação das boas práticas do uso de medicamentos veterinários nas propriedades rurais fornecedoras de leite.

Da mesma forma, os estabelecimentos beneficiadores e/ou industrializadores, deste alimento, necessitam reavaliar os pré-requisitos para a escolha dos testes de detecção utilizados na plataforma de recepção do leite cru, de modo que os grupos de antibióticos avaliados sejam, no mínimo, os mesmos utilizados nas propriedades rurais leiteiras.

Assim, os cuidados a campo, o controle nas indústrias, a fiscalização sanitária oficial e o compartilhamento de informações entre esses importantes elos da cadeia produtiva leiteira, contribuirão para minimizar os riscos da permanência de resíduos no leite destinado ao consumo humano e as suas possíveis consequências à saúde pública.

6 REFERÊNCIAS

ADETUNJI, V. O. Effects of processing on antibiotic residues (streptomycin, Penicillin-G and tetracycline) in soft cheese and yoghurt processing lines. **Pakistan Journal of Nutrition**, v. 10, n. 8, p. 792-795, 2011. Disponível em: < <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-80054820240&partnerID=40&md5=49bffb4962915a5bd41bbedfc8837b7> >.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). Programa Nacional de Análise de Resíduos de Medicamentos Veterinários em Alimentos Expostos ao Consumo - PAMVet. Relatório 2002/2003 - Monitoramento de Resíduos em Leite Exposto ao Consumo (1º e 2º anos de atividades). Brasília (DF): ANVISA, 2005. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/alimentos/pamvet/index.htm>

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). Programa Nacional de Análise de Resíduos de Medicamentos Veterinários em Alimentos Expostos ao Consumo - PAMVet. Relatório 2004/2005 - Monitoramento de Resíduos em Leite Exposto ao Consumo (3º e 4º anos de atividades). Brasília (DF): ANVISA, 2006. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/alimentos/pamvet/index.htm>

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). Programa Nacional de Análise de Resíduos de Medicamentos Veterinários em Alimentos Expostos ao Consumo - PAMVet. Relatório 2006/2007 - Monitoramento de Resíduos em Leite Exposto ao Consumo (5º e 6º anos de atividades). Brasília (DF): ANVISA, 2009. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/alimentos/pamvet/index.htm>

BAYNES, R.; RIVIERE, J. E. Strategies for reducing drug and chemical residues in food animals : international approaches to residue avoidance, management, and testing. 2014. Disponível em:< <http://public.eblib.com/choice/publicfullrecord.aspx?p=1762790> >.

BILANDŽIĆ, N. et al. Veterinary drug residues determination in raw milk in Croatia. **Food Control**, v. 22, n. 12, p. 1941-1948, 12// 2011. ISSN 0956-7135. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0956713511001939> >.

BORSANELLI, A. C. et al. TEMPO NA ATIVIDADE E PERCEPÇÃO DE RISCO DE PRODUTORES DE LEITE NO EMPREGO DE PRODUTOS VETERINÁRIOS. **Veterinária e Zootecnia**, v. 22, n. 01, p. 54-60, 2015. ISSN 2178-3764.

BRANDELLI, A.; DAROIT, D.J.; CORREA, A.P.F. Whey as a source of peptides with remarkable activity. **Food Research International**, v. 73, p. 149-161, 2015.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Decreto n° 30.691, de 29 de março de 1952. Aprova o Novo Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 07 jul. 1952. Seção 1.

_____. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Portaria n. 210, de 10 de novembro de 1998. Aprova o Regulamento Técnico da Inspeção Tecnológica e Higiênico-Sanitária de Carnes de Aves. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 26 nov. 1998. Seção 1.

_____. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Decreto-Lei n. 467, de 13 de fevereiro de 1969. Dispõe sobre a Fiscalização de Produtos de Uso Veterinário, dos Estabelecimentos que os Fabriquem e dá outras Providências. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 14 fev. 1969. Seção 1.

_____. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa n. 42, de 20 de dezembro de 1999, que altera o Plano Nacional de Controle de Resíduos em Produtos de Origem Animal. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 22 dez. 1999. Seção 1, página 13.

_____(b). Lei 9.782 /1999. Define o Sistema Nacional de Vigilância Sanitária, cria a Agência Nacional de Vigilância Sanitária, e dá outras providências. Disponível em: http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/Leis/L9782.htm Acesso em 15 Set. 2015.

_____. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Portaria SDA n° 51, Aprova o escopo analítico do PNCRC/Animal para o ano de 2002. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 17 dez. 2001. Seção 1.

_____. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Portaria SDA n° 78, Aprova o escopo analítico do PNCRC/Animal para o ano de 2003. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 19 dez. 2002. Seção 1.

_____. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Portaria SDA n° 11, Aprova o escopo analítico do PNCRC/Animal para o ano de 2004. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 29 jan. 2004. Seção 1.

_____. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Portaria SDA n° 01, Aprova o escopo analítico do PNCRC/Animal para o ano de 2004. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 07 jan. 2005. Seção 1.

_____. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Portaria SDA n° 50, Aprova o escopo analítico do PNCRC/Animal para o ano de 2004. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 20 fev. 2006. Seção 1.

_____. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Portaria SDA n° 09, Aprova o escopo analítico do PNCRC/Animal para o ano de 2007. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 30 mar. 2007. Seção 1.

_____. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Portaria SDA n° 10, Aprova o escopo analítico do PNCRC/Animal para o ano de 2008. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 14 abr. 2008. Seção 1.

_____. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Ofício Circular n. 09/2009/DICS/CGI/DIPOA, de 06 de maio de 2009. SUÍNOS - Instruções aos SIFs para atendimento da Circular 5/2009/DICS/DIPOA. Brasília, DF, 06 mai. 2009.

_____. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Portaria SDA n° 14, Aprova o escopo analítico do PNCRC/Animal para o ano de 2009. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 25 mai. 2009. Seção 1.

_____. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Portaria SDA n° 08, Aprova o escopo analítico do PNCRC/Animal para o ano de 2010. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 29 abr. 2010. Seção 1.

_____. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Portaria SDA n° 24, Aprova o escopo analítico do PNCRC/Animal para o ano de 2011. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 09 ago. 2011. Seção 1.

_____. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Portaria SDA n° 11, Aprova o escopo analítico do PNCRC/Animal para o ano de 2012. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 22 mai. 2012. Seção 1.

_____. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Portaria SDA n° 17, Aprova o escopo analítico do PNCRC/Animal para o ano de 2013. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 31 mai. 2013. Seção 1.

_____. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa SDA n° 07, Promove a publicação dos resultados do PNCRC/Animal referentes ao exercício do ano de 2012. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 27 mar. 2013 b. Seção 1.

_____. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Portaria SDA n° 11, Aprova o escopo analítico do PNCRC/Animal para o ano de 2014. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 07 mai. 2014. Seção 1.

_____. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa SDA n° 60, Promove a publicação dos resultados do PNCRC/Animal referentes ao exercício do ano de 2013. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 07 mai. 2014 b. Seção 1.

_____. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Portaria SDA n° 13, Aprova o escopo analítico do PNCRC/Animal para o ano de 2015. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 15 jul. 2015. Seção 1.

_____. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa SDA nº 22, Promove a publicação dos resultados do PNCRC/Animal referentes ao exercício do ano de 2014. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 07 abr. 2015 b. Seção 1.

_____. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Decreto n. 5053, de 22 de abril de 2004, Aprova o Regulamento de Fiscalização de Produtos de Uso Veterinário e dos Estabelecimentos que os Fabriquem ou Comerciem, e dá outras providências. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 23 abr. 2004. Seção 1, página 10.

_____. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 62 de 29 de dezembro de 2011. Aprova o Regulamento Técnico de Produção, Identidade e Qualidade do Leite tipo A, o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leite Cru Refrigerado, o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leite Pasteurizado e o Regulamento Técnico da Coleta de Leite Cru Refrigerado e seu Transporte a Granel. **Diário Oficial da União**. Brasília, 30 de dezembro de 2011, seção 1.

_____. **Guia alimentar para a população brasileira**. 2 ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2014.

Cap-Lab. Folder Eclipse 50. Disponível em: [http://www.cap-lab.com.br/arquivos/folder Eclipse%2050_cap-lab.pdf](http://www.cap-lab.com.br/arquivos/folder_Eclipse%2050_cap-lab.pdf) . Acesso em: 01 Jan. 2016.

Cap-Lab. Folder Twinsensor BT. Disponível em: http://www.cap-lab.com.br/arquivos/folder_Twinsensor_cap-lab.pdf . Acesso em: 01 Jan. 2016.

CHENG, G. et al. Antibiotic alternatives: the substitution of antibiotics in animal husbandry? **Frontiers in Microbiology**, v. 5, p. 217, 05/1302/22/received04/25/accepted 2014. ISSN 1664-302X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4026712/> >.

CODEX ALIMENTARIUS. Veterinary Drug Maximum Residue Limits Disponível em:< http://www.codexalimentarius.net/mrls/vetdrugs/jsp/vetd_q-e.jsp>. Acesso em 01 out. 2015.

CORRÊA, F. T.; DE SOUSA CAMPOS, S. A.; PINTO, S. M. Presença de antibióticos, conservantes e reconstituintes em leite UHT e pasteurizado. **DEMETRA: Alimentação, Nutrição & Saúde**, v. 10, n. 2, p. 289-298, 2015. ISSN 2238-913X.

DARWISH, W. S. et al. Antibiotic residues in food: the African scenario. **The Japanese Journal Of Veterinary Research**, Japan, v. 61 Suppl, p. S13-S22, 2013. ISSN 0047-1917. Disponível em: <
<http://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&db=mdc&AN=23631148&pt-br&site=ehost-live&authtype=ip.cookie.uid>>.

Dairy Food Safety Victoria (DFSV). Technical Information Note. Detection limits of antibiotic residue screening test kits (2013). Disponível em: <http://www.dairysafe.vic.gov.au/resource-library/technical-information-notes>. Acesso em: 01 Jan. 2016.

DIARRA, M. S.; MALOUIN, F. Antibiotics in Canadian poultry productions and anticipated alternatives. **Frontiers in Microbiology**, v. 5, Jun 17 2014. ISSN 1664-302X. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000337537700001 >.

FAO e IDF. 2013. Guia de boas práticas na pecuária de leite. Produção e Saúde Animal Diretrizes. 8. Roma. Disponível em: < <http://www.fao.org/3/a-ba0027o.pdf>> Acesso em: 16 Ago. 2015.

FAVA, L. W.; PINTO, A. T. Ocorrência de leite ácido e de resíduos de antimicrobianos no leite cru entregue em laticínio na região do Vale do Taquari, RS, Brasil. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 38, n. 4, p. 419-423, 2010. ISSN 1678-0345.

FEIJO, L. D. et al. Identification and assessment of emerging issues associated with chemical contaminants in dairy products. **Bull. Int. Dairy Fed. Bulletin of the International Dairy Federation**, n. 463, p. 3-11, 2013. ISSN 0259-8434.

FERNÁNDEZ, E. F. et al. Documento de Consenso: importancia nutricional y metabólica de la leche. **Nutrición Hospitalaria**, v. 31, n. n01, p. 92-101, 2014. ISSN 1699-5198.

FERREIRA, R. G. et al. Panorama da ocorrência de resíduos de medicamentos veterinários em leite no Brasil. **Segurança Alimentar e Nutricional**, v. 19, n. 2, p. 30-49, 2012. ISSN 2316-297X.

FONSECA, G. P. et al. Antibiotic residues in Brazilian UHT milk: a screening study. **Food Science and Technology (Campinas)**, v. 29, p. 451-453, 2009. ISSN 0101-2061. Disponível em: < http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0101-20612009000200035&nrm=iso >.

FORSYTHE, S. J. **The microbiology of safe food**. Chichester, U.K.; Ames, Iowa: Wiley-Blackwell Pub., 2010. ISBN 9781405140058 1405140054.

FURTADO, M. M. **Principais problemas dos queijos : causas e prevenção**. Sao Paulo: Fonte Comunicacoes e Editora, 2005. 200.

GARRIDO FRENICH, A. Veterinary drugs and growth-promoting agent analyses. New York, 2010. ISSN 9781617616570 1617616575. Disponível em: < <http://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&scope=site&db=nlebk&db=nlabk&AN=340103> >.

GHANA VI, Z.; MOLLAYI, S.; ESLAMI, Z. Comparison Between the Amount of Penicillin G Residue in Raw and Pasteurized Milk in Iran. **Jundishapur J Microbiol**, v. 6, n. 7, p. e12724, 2013. ISSN 2008-4161. Disponível em: < http://jjmicrobiol.com/?page=article&article_id=12724 >.

GIGUÈRE, S.; PRESCOTT, J. F.; DOWLING, P. M. Antimicrobial therapy in veterinary medicine. Ames, Iowa, 2013. ISSN 9781118675014 1118675010 9781118675106 111867510X. Disponível em: < <http://site.ebrary.com/id/10740145> >.

GUALERZI, C. O. Antibiotics targets, mechanisms and resistance. Weinheim, Germany, 2014. ISSN 9783527659685 3527659684 1299854656 9781299854659. Disponível em: < <http://site.ebrary.com/id/10763015> >.

GUARDABASSI, L. et al. Guia de antimicrobianos em veterinária. Porto Alegre, 2010. ISSN 9788536322308 8536322306 9788536323190 8536323191. Disponível em: < <http://site.ebrary.com/id/10707081> >.

HAUG, A.; HØSTMARK, A. T.; HARSTAD, O. M. Bovine milk in human nutrition – a review. **Lipids in Health and Disease**, London, v. 6, p. 25-25, 09/25 07/01/received 09/25/accepted 2007. ISSN 1476-511X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2039733/> >.

Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE). *Pesquisa de Orçamentos Familiares 2008-2009*. Avaliação nutricional da disponibilidade domiciliar de alimentos no Brasil. Rio de Janeiro: IBGE; 2010.

_____. Indicadores IBGE - Estatística da produção da pecuária. Rio de Janeiro: IBGE; 2014. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria/producaoagropecuaria/abate-leite-couro-ovos_201403_publ_completa.pdf > Acesso em: 10 ago. 2015.

KANEKANIAN, A. Milk and dairy products as functional foods. 2014. Disponível em: <<http://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&scope=site&db=nlebk&db=nlabk&AN=761795> >.

KELLNEROVÁ, E.; NAVRÁTILOVÁ, P.; BORKOVCOVÁ, I. Effect of pasteurization on the residues of tetracyclines in milk. **Acta Veterinaria Brno**, v. 83, p. S21-S26, 2014. Disponível em: < <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-84937562517&partnerID=40&md5=289a63f80607c5fcd209ca1c247e3e0e> >.

KORB, A. et al. Riscos para a saúde humana do uso de antibióticos na cadeia produtiva leiteira. **Revista de Saúde Pública de Santa Catarina**, v. 4, n. 1, p. 21-36, 2011.

KROMER, C. Weight Estimation as a Risk Factor of the drug Under Dosing of Dairy Cattle. **Tieraerztliche Praxis Ausgabe Grosstiere Nutztiere**, v. 43, n. 4, p. 247-247, 2015. ISSN 1434-1220. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000360422700007 >.

LAWLEY, R.; CURTIS, L.; DAVIS, J. The food safety hazard guidebook. Cambridge, U.K., 2012. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1039/9781849734813> >.

LAXMINARAYAN, R. et al. Antibiotic resistance—the need for global solutions. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 13, n. 12, p. 1057-1098, 12// 2013. ISSN 1473-3099. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1473309913703189> >.

MAGNAVITA, A. **Avaliação das características físico-químicas e da presença de resíduos de antimicrobianos em leite pasteurizado nas regiões sudoeste e sul bahiano**. 2012. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos). Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, 68 p. 2012.[Links]

MALUF, R. S.; SILVA, R. C.; RIBEIRO, A. B. Resíduos de antibióticos em leite. *Revista Saúde e Biologia*, [online] v. 07, n. 1, p. 30-44, jan./abr. 2012.

MARON, D. F.; SMITH, T. J. S.; NACHMAN, K. E. Restrictions on antimicrobial use in food animal production: an international regulatory and economic survey. **Globalization and Health**, v. 9, p. 48-48, 10/16 05/03/received 08/23/accepted 2013. ISSN 1744-8603. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3853314/> >.

MARTIN, J. G. P. Resíduos de antimicrobianos em leite—uma revisão. **Segurança Alimentar e Nutricional**, v. 18, n. 2, p. 80-87, 2011. ISSN 2316-297X.

MARTINS, P.; ANDRADE, H. IDENTIFICAÇÃO DE RESÍDUOS DE ANTIBIÓTICOS NA RECEPÇÃO DE LEITE CRU PRÉ-BENEFICIADO COMO PERIGO POTENCIAL PARA IMPLANTAÇÃO DO PLANO APPCC EM LATICÍNIOS. **FAZU em Revista**, n. 08, 2012. ISSN 2236-0328.

MATOS, W. P. **Resíduos de antibióticos no leite**. 2014. Monografia (Ciências Farmacêuticas). Universidade Luterana do Brasil, 44 p. 2014.

Mercado Comum do Sul - MERCOSUL. Resolução GMC (Grupo Mercado Comum) nº 54, de 29 setembro de 2000. Regulamento Técnico Metodologias Analíticas, Ingestão Diária Admissível e Limites Máximos de Resíduos Para Medicamentos Veterinários em Alimentos

de Origem Animal. Disponível em: http://www.mercosur.int/msweb/Normas/normas_web/Resoluciones/PT/Res_054_000_RTM%20Res%C3%ADduos%20Medic%20Veterin%C3%A1rios_At%C3%A1%203_00.PDF

MOKHTARI, A.; HOSSEINI, B.; PANAHI, P. β -Lactams and Tetracyclines Antibiotic Residue Detection in Bulk Tank Milk in Iran. **Iranian Journal of Public Health**, v. 42, n. 4, p. 447-448, 04/0101/18/received 03/20/accepted 2013. ISSN 2251-60852251-6093. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3684735/> >.

MOVASSAGH, M. H Detection of antibiotics residues in cow raw milk in Bostanabad Region, Iran. **Research opinions in animal & veterinary sciences**, v. 2, n. 1, p. 1-3, 2012.

MUEHLHOFF, E. et al. **Milk and dairy products in human nutrition**. 2013. ISBN 9789251078631 9251078637.

MUNIZ, L. C.; MADRUGA, S. W.; ARAÚJO, C. L. Consumo de leite e derivados entre adultos e idosos no Sul do Brasil: um estudo de base populacional. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 18, p. 3515-3522, 2013. ISSN 1413-8123. Disponível em: < http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1413-81232013001200008&nrm=iso >.

NATIONAL RESEARCH, C. et al. The use of drugs in food animals benefits and risks. Washington, D.C., 1999. ISSN 0585038104 9780585038100 9780309054348 0309054346. Disponível em: < <http://site.ebrary.com/id/10046904> >.

NERO, L. A. et al. Resíduos de antibióticos em leite cru de quatro regiões leiteiras no Brasil. **Cienc Tecnol Aliment**, v. 27, n. 2, p. 391-393, 2007.

PARK, Y. W.; HAENLEIN, G. F. W. Milk and dairy products in human nutrition production, composition, and health. Chichester, West Sussex, UK, 2013.. Disponível em: < <http://site.ebrary.com/id/10690362> >.

PEREIRA, P. C. Milk nutritional composition and its role in human health. **Nutrition**, v. 30, n. 6, p. 619-627, 6// 2014. ISSN 0899-9007. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0899900713004607> >.

POGURSCHI, E. et al. Identification of Antibiotic Residues in Raw Milk Samples Coming from the Metropolitan Area of Bucharest. **Agriculture and Agricultural Science Procedia**, v. 6, p. 242-245, // 2015. ISSN 2210-7843. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2210784315001990> >.

REDDING, L. E. et al. The use of antibiotics on small dairy farms in rural Peru. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 113, n. 1, p. 88-95, 1/1/ 2014. ISSN 0167-5877. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0167587713003061> >.

REGITANO, J. B.; LEAL, R. M. P. Comportamento e impacto ambiental de antibióticos usados na produção animal brasileira. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 34, p. 601-616, 2010. ISSN 0100-0683. Disponível em: < http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-06832010000300002&nrm=iso >.

RIO GRANDE DO SUL. Portaria n° 090, de 16 de maio de 2013. Determina a adoção no âmbito Estadual da IN 62 do MAPA de 29 de dezembro 2011. **Diário Oficial Estadual**. Porto Alegre, RS. 22 de maio de 2013.

RIO GRANDE DO SUL. Resolução n° 0001, de 11 de novembro de 2015. Estabelece a obrigatoriedade do cumprimento do cronograma de análises físico-química e microbiológica da água de abastecimento interno e produtos de origem animal pelos estabelecimentos registrados na DIPOA. **Diário Oficial Estadual**. Porto Alegre, RS. 12 de novembro de 2015.

SAWANT, A. A.; SORDILLO, L. M.; JAYARAO, B. M. A Survey on Antibiotic Usage in Dairy Herds in Pennsylvania. **Journal of Dairy Science**, v. 88, n. 8, p. 2991-2999, 8// 2005. ISSN 0022-0302. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022030205729799> >.

SCHRENK, D. Chemical contaminants and residues in food. Oxford; Philadelphia, 2012. ISSN 2042-8049

9780857095794 085709579X. Disponível em: < <http://site.ebrary.com/id/10641440> >.

SILVA, E. R. D. et al. **Perfil de sensibilidade antimicrobiana "in vitro" de "Staphylococcus aureus" isolado de mastite subclínica bovina.** 2012. Disponível em: < <http://revistas.ufba.br/index.php/rbspa/article/view/2401> >.

TENORIO, C.G.M.S.C. et al . Eficiência dos testes COPAN (Microplate e Single) na detecção de resíduos de antimicrobianos no leite. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, Belo Horizonte , v. 61, n. 2, p. 504-510, Apr. 2009 . Available from <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-09352009000200031&lng=en&nrm=iso>. access on 10 Nov. 2015.

TROMBETE, F. M.; SANTOS, R. R. D.; SOUZA, A. L. R. Antibiotic residues in Brazilian milk: a review of studies published in recent years. **Revista chilena de nutrición**, v. 41, n. 2, p. 191-197, 2014-06 2014. ISSN 0717-7518. Disponível em: < <Go to ISI>://SCIELO:S0717-75182014000200010 >.

TRONCO, V. M. **Manual para inspeção da qualidade do leite.** 4 ed. Santa Maria: UFSM, 2010. 195 p. ISBN 978-85-7391-139-8.

UNIÃO EUROPÉIA. REGULAMENTO (UE) N.º 37/2010 relativo a substâncias farmacologicamente activas e respectiva classificação no que respeita aos limites máximos de resíduos nos alimentos de origem animal. Disponível em: <<http://eur-lex.europa.eu/legal-content/PT/TXT/HTML/?uri=CELEX:32010R0037&qid=1450819143433&from=EN>>. Acesso em 29 set. 2015.

USDA - United States Department of Agriculture. Disponível em: <<http://www.usda.gov>> Acesso em: 12/10/2015.

VIEIRA, T. S. W. J. et al. Detecção de resíduos de antibióticos em amostras de leite pasteurizado do Estado do Paraná, Brasil. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 33, n. 2, p. 791-796, 2012. ISSN 1679-0359.

WANG, J.; MACNEIL, J. D.; KAY, J. F. Chemical analysis of antibiotic residues in food. Hoboken, N.J., 2012. ISSN 9781118067208 1118067207 9781118067185 1118067185 1283332086 9781283332088. Disponível em: <
<http://lib.myilibrary.com/detail.asp?ID=333208>>.

WATSON, D. H. **Pesticide, veterinary and other residues in food.** Woodhead Publishing, 2004. ISBN 1855737345.

ZHANG, Y. D. et al. Occurrence of tetracyclines, sulfonamides, sulfamethazine and quinolones in pasteurized milk and UHT milk in China's market. **Food Control**, v. 36, n. 1, p. 238-242, 2// 2014. ISSN 0956-7135. Disponível em: <
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0956713513004040>>.

ZOETIS Indústria de Produtos Veterinários. Boletim Técnico. Resíduo de produtos antimicrobianos: Descarte zero x Resíduo zero. Disponível em: <http://187.108.194.18/~resolpec/UPLarquivos/0502201408201214.pdf>. Acesso em: 10 Nov. 2015.

APÊNDICE A – Questionário de avaliação da pesquisa de resíduos de antibióticos, na plataforma de recebimento de leite cru, em estabelecimentos sob inspeção sanitária oficial do Rio Grande do Sul (utilizado para a elaboração do Artigo 1).

AValiação da Pesquisa de Resíduos de Antibióticos na Plataforma de Recebimento de Leite Cru	
1- Classificação do estabelecimento: <input type="checkbox"/> Fábrica de Laticínios <input type="checkbox"/> Usina de Beneficiamento de Leite <input type="checkbox"/> Micro Usina de Beneficiamento de Leite	CISPOA n°
Teste de detecção de resíduos de antibióticos utilizado na empresa: Nome: _____ Marca: _____ () – Questão apenas para fins de confirmação dos antibióticos pesquisados.	
2- Grupos/classes de resíduos de antibióticos pesquisados (é possível marcar mais de uma opção): <input type="checkbox"/> Betalactâmicos <input type="checkbox"/> Tetraciclina <input type="checkbox"/> Sulfonamidas <input type="checkbox"/> Aminoglicosídeos <input type="checkbox"/> Macrolídeos Outros? Quais: _____	
3- Motivo da escolha, pela empresa, do teste de detecção para a pesquisa de resíduos de antibióticos descritos no item 2 (é possível marcar mais de uma opção): <input type="checkbox"/> Preço do teste de detecção <input type="checkbox"/> Conhecimento dos antibióticos utilizados nas propriedades rurais dos seus fornecedores de leite <input type="checkbox"/> Orientação do Responsável Técnico do laticínio Outro motivo? Qual: _____	
4- Há quanto tempo a empresa pesquisa os resíduos de antibióticos descritos no item 2 ? <input type="checkbox"/> < 6 meses <input type="checkbox"/> 6 meses a 1 ano <input type="checkbox"/> 1 a 3 anos <input type="checkbox"/> + de 3 anos	

ANEXO A – Questionário de avaliação do conhecimento dos responsáveis pela ordenha, quanto à aplicação de medicamentos e controle de resíduos (utilizado para elaboração do Artigo 2).



GOVERNO DO ESTADO
RIO GRANDE DO SUL
SECRETARIA DA AGRICULTURA,
PECUÁRIA E AGRONEGÓCIO



Parte do questionário utilizado no estudo soro epidemiológico de doenças reprodutivas em bovinos e fatores de risco associados no RS.

Aplicação de medicamentos e controle de resíduos

39.0 Quem aplica medicamentos nos animais?

- () Funcionários de lojas agropecuárias
 () Médico veterinário () Técnico agrícola
 () Leigos (vizinhos, amigos) () O próprio produtor

40.0 Nos últimos 60 dias, foi aplicado algum medicamento nos animais em lactação?

- () não
 () sim; caso sim, Qual (nome comercial)? _____

43.0 O que determina o período de descarte do leite após o uso de medicamentos?

- () Orientação de médico veterinário
 () Orientação de técnico agrícola
 () Orientação de vizinhos, amigos ou outros “leigos”
 () A bula do medicamento
 () A cooperativa

Outro: _____

44.0 O/A Sr.(a) é remunerado de acordo com a qualidade* do leite?

- () não
 () sim

*Parâmetros nutritivos (ex.: gordura) e sanitários (ex.: CCS e contagem bacteriana)

45.0 Qual empresa recolhe o leite? _____

() Não aplicável

45.1 Qual marca vende o leite? _____

() Não aplicável

46.0 O/A Sr.(a) sabe se a empresa que compra o seu leite realiza testes para detecção de resíduos de medicamentos no leite?

() não

() sim; caso sim, Quais? _____

47.0 Alguma vez já foram detectados resíduos de medicamentos no leite de seu rebanho pela empresa que realiza o recolhimento?

() não

() sim; caso sim, Quantas vezes? _____

Quais medicamentos? _____

Observações:

Identificação Funcional

Data da aplicação: / / _

Nome do médico veterinário:

Carimbo funcional do Médico Veterinário responsável pela coleta: