

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

INSTITUTO DE QUÍMICA

MATEUS PIRES SCHNEIDER

TÍTULO DO PROJETO: Avaliação do impacto do tratamento térmico em Leite sobre a
concentração de antibiótico da classe dos β – Lactâmicos

Porto Alegre

2016

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

INSTITUTO DE QUÍMICA

MATEUS PIRES SCHNEIDER

TÍTULO DO PROJETO: Avaliação do impacto do tratamento térmico em Leite sobre a concentração de antibiótico da classe dos β – Lactâmicos

Trabalho de conclusão apresentado junto à atividade de ensino “Trabalho de Conclusão de Curso – QUI” do Curso de Química, como requisito parcial para a obtenção do grau de Bacharel em Química Industrial.

Prof.^a Dr.^a Tânia Mara Pizzolato

Orientadora

Dr. Fabiano Barreto

Coorientador

Porto Alegre

2016

AGRADECIMENTOS

Sou um cara de sorte. Não tenho certeza de quão longe eu poderia chegar se não pudesse contar com a ajuda do meu avô Lyrio e dos meus pais. Muito obrigado por ajudar um sonho a se tornar realidade.

Muito obrigado Paola, pela tua amizade, ouvidos e risadas. Obrigado estar comigo justamente nos momentos mais intensos desses meus anos de Liberato e UFRGS.

Obrigado a família Pires, Schneider, Schuh e Viana, pelo lar e pelo afeto.

Agradeço aos professores e professoras, Dr. Diogo Pompéu de Moraes, Dr.^a Dirce Pozebon, Dr.^a Sandra Maia, Dr. Celso Camilo Moro e, em especial, à Prof.^a Dr.^a Tania Mara Pizzolato. A todos esses e essas, sou profundamente agradecido por terem me ensinado Química e por terem acreditado em mim, mesmo nos dias em que eu mesmo não acreditava. Muito obrigado por fazer descobrir em mim o meu potencial.

RESUMO

O Leite é um dos alimentos mais consumidos no mundo e o controle da qualidade do produto que chega ao consumidor é de suma importância. Para que a qualidade do leite seja adequada, é importante cuidar da saúde do sistema produtivo, no caso as vacas leiteiras e tudo que tem relação com o bem-estar e higiene das mesmas. Neste contexto aparecem os antibióticos que são empregados com frequência no controle e prevenção da mastite que é um processo infeccioso que pode comprometer a qualidade e a produção do leite. Portanto, o monitoramento de resíduos de antibióticos é fundamental, pois estes podem estar presentes no leite, em nível de traços, podendo expor seus consumidores a riscos de saúde, e comprometendo o processo produtivo dos derivados de leite.

O processamento do leite se faz pelo tratamento térmico que visa a proteção da saúde do consumidor e o aumento da vida de prateleira do alimento. É sabido que o calor empregado causa a desnaturação de proteínas dos microrganismos patogênicos e esse processo é utilizado a um nível chamado de esterilidade comercial. A potencial presença de resíduos de antibióticos pode favorecer o aumento da resistência bacteriana aos antibióticos que fazem parte da flora intestinal humana. Além disso, a exposição a certos antimicrobianos pode provocar urticárias, dermatites, asma e renite em pessoas susceptíveis a essa hipersensibilidade.

Neste trabalho foram realizados experimentos com leite cru para avaliar o comportamento da amoxicilina (AMX), quando presente, por meio de processamento térmico. Testes de bancada com diferente ordem de adição do antibiótico mostraram que a pasteurização ($T= 72^{\circ}\text{C}$ e $15 \leq t \leq 20$ segundos) reduz em aproximadamente 12% com relação a concentração inicial da AMX. Os mesmos experimentos mostraram que concentração de AMX no leite não pasteurizado pode reduzir devido à presença natural de enzimas de β -lactamase. Outros testes foram realizados para comparar diferentes temperaturas e tempos de aquecimento. A amostra que teve a menor variação de concentração de amoxicilina foi aquela que passou por processo térmico a 90°C por 15 minutos. Também, variou-se a temperatura e o tempo de processo para obter a cinética de degradação da amoxicilina. Os experimentos realizados com temperaturas de 60°C e 80°C mostraram uma lenta degradação da amoxicilina a temperaturas características do processo de pasteurização. A AMX residual, em todas as amostras, foi quantificada por extração líquido-líquido seguida de análise em LC-MS/MS. Observou-se que o aumento dos tempos de processo em altas temperaturas não são mudanças atrativas no processo térmico, uma vez que há a alteração do conteúdo proteico, aumento de custo energético e não há degradação significativa da amoxicilina.

Palavras chave: LC-MS/MS; Amoxicilina; Leite Cru; Pasteurização; Amoxicilina em leite, antibióticos em leite, cinética de primeira ordem.

ABSTRACT

Milk is a product worldwide consumed and its quality control is of an extreme importance. In order to have the wanted quality of the final product, it is important to give the due attention to the production system, in other words, the cattle, and everything that relates to the animal wellbeing. On this context, antibiotics are commonly used to control and prevent mastitis, an infectious disease that compromises both the production and the quality of milk. Therefore, antibiotics residues monitoring is fundamental, once traces of those chemicals may be worrisome to milk consumers' health, as well as they compromise derivatives dairy products production.

Production processes, that apply temperature changes, are used to protect the costumer's health, as well to extend food shelf life. Though heating, proteins of enzymes and pathogenic microorganisms are denatured, and the level aimed is called Commercial Sterilization. The presence of antibiotic residues in milk may allow bacterial resistance to these medicines. Moreover, exposition to certain antibiotics may cause hives, dermatitis, asthma and rhinitis on people who are susceptible to hypersensitivity.

On the present work, experiments were done with raw milk in order to evaluate amoxicillin behavior, if present, through thermal procedures. Laboratory scale tests, which were realized by varying procedure steps, showed that pasteurization ($T= 72^{\circ}\text{C}$ e $15 \leq t \leq 20$ s) might reduce 12% of the initial AMX content. The same experiments showed that AMX concentration in non-pasteurized raw milk might reduce due to the natural presence of β -lactamase enzymes. More tests were carried out to compare heating systems differences. The $90^{\circ}\text{C}/15$ min procedure sample was the one with smallest concentration reduction of AMX. Moreover, through changing temperature and time of process, it was possible to obtain AMX kinetics of degradation. Experiments at 60°C e 80°C , milk pasteurization temperatures, showed a slow amoxicillin degradation. After a liquid-liquid extraction procedure, the residual AMX was quantified by LC-MS/MS analysis. It was observed that changing of temperature and time process should not be an attractive variation, once at high temperatures, there is a huge protein content alteration, increased energetic cost and there is no significant degradation on amoxicillin concentration.

Keywords: LC-MS/MS; Amoxicillin; Raw Milk; Pasteurization; amoxicillin and milk; antibiotics and milk; First order Kinetics reaction.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Produção brasileira de leite e participação das regiões do país na produção 15

Tabela 2 – Especificação das amostras processadas. 29

Tabela 3. HPLC – Programa do Gradiente da Fase Móvel. 30

Tabela 4. Parâmetros de análise no Espectrômetro de Massas para Amoxicilina no modo *Eletrospray* Positivo. 30

Tabela 5. Valores de LMR e parâmetros analíticos obtidos para β -lactâmicos em leite bovino. 30

Tabela 6. Relação de ensaios com suas respectivas equações de reta e coeficientes de correlação. 33

Tabela 7 – Variação da concentração de AMX adicionada em diferentes tratamentos do leite.34

Tabela 8 – Concentrações médias obtidas de cada experimento entre os grupos I a VIII 34

Tabela 9 - Resultados obtidos na avaliação da variação da concentração da amoxicilina em diferentes processos de aquecimento do Leite, do grupo IV a VIII 35

Tabela – 10 Concentrações de AMX em amostras de leite fortificado obtidas em avaliação em diferentes tempos de armazenamento a 4°C 37

Tabela 11 – Variação da concentração de AMX a temperatura e o tempo. 38

Tabela 12 – Degradação da amoxicilina em termos de tempo de meia vida. 39

Tabela 13 – Comparação de gastos energéticos entre dois processos de Pasteurização 41

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 – Formula estrutural da amoxicilina anidra 18
- Figura 2 – Relação entre tempo e temperatura para a pasteurização. P.J Fellows. 22
- Figura 3 – Esquema simplificado para experimento de avaliação da concentração de AMX conforme a ordem de adição no processo. 25
- Figura 4 – Esquema simplificado das etapas do experimento para avaliação variação da concentração da amoxicilina em diferentes processos de aquecimento do Leite. 26
- Figura 5 – Esquema simplificado do ensaio sobre a variação da concentração de AMX em leite cru em diferentes tempos de armazenamento a 4°C 27
- Figura 6 – Preparo da amostra de leite e AMX para testes com variação da temperatura e tempo 28
- Figura 7 – Cromatograma no modo MRM de uma amostra de leite fortificada com 10 µg L⁻¹ de AMX 31
- Figura 8 – Curva Analítica I; Variação na Ordem de Adição de AMX 31
- Figura 9 – Curva Analítica II; Avaliação da variação da concentração da amoxicilina em diferentes processos de aquecimento do Leite 32
- Figura 10 – Curva Analítica III; Avaliação da variação da concentração da Amoxicilina em leite cru em diferentes tempos de armazenamento a 4°C 32
- Figura 11 – Curva Analítica IV; Avaliação da variação da concentração de amoxicilina com a temperatura e o tempo 33
- Figura 12 – Resultados obtidos da avaliação da variação da concentração da amoxicilina em diferentes processos de aquecimento.36
- Figura 13 – Variação da concentração de AMX com a temperatura e o tempo. 39

LISTA DE SIGLAS

AMX – Amoxicilina

APPCC - Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle

LANAGRO - Laboratório Nacional Agropecuário

LC-MS/MS – Cromatografia líquida acoplado a triplo quadrupolo

LMR – Limite Máximo de Resíduos

MAPA – Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento

MRM – *Multiple Reaction Mode*

PCRBL – Programa de Controle de Resíduos Biológicos em Leite

RIISPOA - Regulamento de Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal

UHT – *Ultra High Temperature*

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	10
2. OBJETIVO GERAL	12
2.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	12
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	13
3.1. PRODUÇÃO LEITEIRA: ASPECTOS NORMATIVOS.....	13
3.2. A PRODUÇÃO DE LEITE NO BRASIL	14
3.3. ESTABELECIMENTOS PRODUTORES DE LEITE	15
3.3.1. Tipos de produção no Brasil	15
3.4. SISTEMA DE CONFINAMENTO OU A PASTO.....	15
3.4.1. Perfil dos produtores de leite no Brasil.....	15
3.5. MASTITE E O GADO LEITEIRO	16
3.6. O USO DE ANTIBIÓTICOS NO GADO LEITEIRO.....	16
3.6.1. Tratamento da Mastite bovina.....	17
3.6.1.1. Amoxicilina e Mastite	17
3.7. RESÍDUO DE ANTIBIÓTICOS EM LEITE.....	18
3.8. CONTROLE DE QUALIDADE.....	18
3.9. TRATAMENTO TÉRMICO DO LEITE.....	19
3.9.1. A Pasteurização	20
3.9.1.1. Pasteurização Lenta – LTLT	20
3.9.1.2. Pasteurização Rápida – HTST	21
3.9.2. Fosfatase Alcalina e Peroxidase	21
3.9.3. Tratamento térmico e a decomposição de antibióticos β-lactâmicos.	22
4. MATERIAIS E MÉTODOS	23
4.1. MATERIAIS	23
4.1.1. Reagentes e Soluções	23

4.1.2.	Equipamentos.....	23
4.1.3.	Amostras	24
4.2.	MÉTODOS	24
4.2.1.	Ensaio de Temperatura.....	24
4.2.1.1.	Planejamento dos experimentos	24
4.2.1.2.	Avaliação da variação da concentração da amoxicilina em diferentes processos de aquecimento do Leite	25
4.2.1.3.	Avaliação da variação da concentração da Amoxicilina em leite cru em diferentes tempos de armazenamento a 4°C.....	26
4.2.1.4.	Avaliação da variação da concentração de amoxicilina com a temperatura e o tempo	27
4.2.2.	Preparo das amostras para determinação de Amoxicilina em leite bovino por LC-MS/MS.....	28
4.2.3.	Curva Analítica	29
4.2.4.	Condições de análise por LC-MS/MS	29
5.	RESULTADOS E DISCUSSÕES	31
6.	AVALIAÇÃO DE CUSTOS ENVOLVIDOS NO PROCESSO DE PASTEURIZAÇÃO	40
7.	CONCLUSÃO.....	42

1. INTRODUÇÃO

O leite é um alimento nutritivo que movimenta a economia do mundo. A cadeia produtiva do leite e seus derivados destinados para consumo humano é um sistema bastante complexo que envolve múltiplos estágios, alguns desses visando uma maior, ou mais rentável, produção do produto.

Em 1532, os primeiros bois e vacas foram trazidos para onde hoje é o litoral paulista. A tecnologia de processamento do leite não sofreu grandes mudanças mesmo após a entrada, a partir de 1950, na era moderna da pecuária leiteira. Nessa década, a produção leiteira teve seu primeiro marco de organização e passou a buscar pela qualidade de produção devido a aprovação do Regulamento de Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal (Riispoa). Pelo então presidente, Getúlio Vargas, tal regulamento torna obrigatória à pasteurização do leite nos estabelecimentos que realizam comércio interestadual ou internacional. Foram estipuladas definições quanto a finalidade, espécie produtora, teor de gordura do produto final e tipos de tratamento. O decreto trouxe as classificações e normas quanto a métodos de tratamento térmico empregado no leite. Também classificou o produto final baseando-se nas condições sanitárias de obtenção, processamento, comercialização, durabilidade e contagem microbiana.

Com o decreto, a produção nacional de leite pasteurizado teve grande expansão em meados da década de 1960. Mesmo assim, como reconhece o presidente da Associação Brasileira dos Produtores de Leite, Jorge Rubez, foi nas duas décadas posteriores a 1980 que o setor de laticínios apresentou dinamismo e surpreendentes progressos industrial e econômicos. Tais avanços foram justificados por alguns ciclos históricos como: o apelo da mídia em prol do consumo de Leite Longa Vida – UHT, a mudança para uma política econômica de Livre Mercado e, por fim, a Coleta a Granel. (2003)

Em 1987, a empresa Parmalat utilizou Nelson Piquet como garoto propaganda para tornar visível um dos seus produtos, o leite longa vida – UHT. Mesmo que a qualidade nutritiva de um leite do tipo UHT (130°C a 150°C, 2 a 4 segundos) seja inferior quando comparado com o leite pasteurizado a temperaturas inferiores, a ausência total do leite pasteurizado na mídia deixou o caminho livre para o crescimento em vendas do leite Longa Vida.

A política de Livre Mercado foi uma medida que prejudicou o pequeno produtor ao passo que favoreceu a Indústria e que, segundo Jorge Rubez, foi “necessária e reivindicada” pelos agentes de mercado, pois deixou a determinação dos preços como uma responsabilidade

do próprio Mercado e não mais do Estado. Se por um lado essa política pode dar um maior controle econômico para uma classe minoritária e elitizada do país, ela pode assegurar ao próprio mercado, entendedor do setor industrial, a autonomia de investimentos em melhorias de processuais. Por seguir tendências tecnológicas e de mercado globais, a abertura econômica provocou grande desnacionalização das empresas brasileiras além da invasão de produtos estrangeiros em nosso mercado.

A legislação de 1952 impulsionou algumas mudanças iniciais de um sistema de distribuição primitivo que utilizava os antigos latões de ferro e também dependia do perfeito andamento de uma logística precária que era disponível no país. A inovação na coleta do leite, corroborando com o argumento sobre a competitividade gerada pela nova política econômica de 1990, foi outro ciclo importante que impulsionou a produção leiteira no Brasil, e proporcionou uma nova regra de qualidade. A inovação da coleta a granel, com o desenvolvimento dos tanques de expansão nos caminhões de coleta, assim como uma relativa melhora nas estradas do país, gerou uma redução de custos executada através de melhorias operacionais do que especulativas.

Além dos já citados, múltiplos estágios que passam tanto o leite quando seus derivados, são desenvolvidos com o objetivo na melhoria em rentabilidade produtiva. Cada operação pode contribuir ou comprometer a qualidade do alimento. Sendo assim, o monitoramento de resíduos de antibióticos é muito importante, pois estes podem estar presentes no leite, em nível de traços, podendo expor seus consumidores a riscos de saúde, e comprometendo o processo produtivo dos derivados de leite.

O tratamento térmico do leite é um método que visa à proteção da saúde do consumidor e o aumento da vida de prateleira do alimento. É sabido que o calor empregado causa a desnaturação de proteínas dos microrganismos patogênicos e esse processo é utilizado a um nível chamado de esterilidade comercial. Todavia, na literatura são restritos os trabalhos avaliando a estabilidade de antibióticos frente ao tratamento térmico.

Em 2010, o Brasil conseguiu alcançar a posição de quinto maior produtor de leite do mundo, segundo dados da Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação (FAO). O país respondeu por 5,1% da produção mundial.

2. OBJETIVO GERAL

Avaliar a estabilidade da amoxicilina, antibiótico da classe dos β – Lactâmicos frente ao tratamento térmico, em amostras de leite bovino.

2.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Estabelecer procedimento de bancada para mimetizar a pasteurização de leite cru;
- Realizar pasteurização nas amostras de leite, com e sem a presença de Amoxicilina;
- Avaliar a degradação da Amoxicilina através de técnicas cromatográficas acopladas a espectrometria de massas;
- Realizar avaliação crítica sobre a técnica de pasteurização quando há presença de resíduo de Amoxicilina;
- Avaliar os custos envolvidos nos processos de pasteurização utilizados na indústria leiteira correlacionando com os benefícios ao consumidor;

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. PRODUÇÃO LEITEIRA: ASPECTOS NORMATIVOS

A produção leiteira, no Brasil, teve seu primeiro marco de organização e busca pela qualidade de produção em 1952, a partir do Decreto 30.691. Passou a ser obrigatória então, a pasteurização do leite nos estabelecimentos de comércio interestadual ou internacional. Também foi criado o Regulamento de Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal – RIISPOA. Nesse decreto, foram definidas as classificações a seguir:

1. Finalidade: o leite pode ser de consumo em espécie, para fins industriais e leite destinado para sorveterias, padarias, entre outros.
2. Espécie produtora: leite de vaca, de cabra, de ovelha, de búfala e de outras espécies domésticas.
3. Teor de gordura: integral, padronizado com teor a 3%, semidesnatado e desnatado.
4. Tratamento: O decreto trouxe as classificações e normas quanto ao tratamento térmico empregado no leite. Entre outros, para aquele produto que foi ou não submetido em parte às operações de filtração, refrigeração, congelamento ou preaquecimento, dá-se o nome de Leite Cru. Leite Pasteurizado é o leite submetido às operações específicas de filtração e aquecimento.

Por fim, surgindo depois da publicação do decreto, o leite que é mais conhecido pela sua sigla em inglês, UHT, em alusão ao processo de tratamento a temperaturas elevadas, que caracterizam um processo de esterilização, por um curto período de tempo.

Além das citadas classificações do leite, o decreto de 1952 estipulava classes produto final a ser comercializado usando como base a as condições sanitárias de sua obtenção, processamento, comercialização, durabilidade e contagem microbiana.

1. Leite tipo A: é o leite produzido com as mais altas exigências sanitárias. Assim, todo o processo é construído para que o contato humano seja o menor possível, resultando em uma menor probabilidade de contaminação.
2. Leite B: tem uma durabilidade reduzida frente ao tipo A, dado que o primeiro não é pasteurizado e envasado na mesma fazenda da ordenha.
3. Leite do tipo C: há a possibilidade de que a ordenha seja manual. Mesmo que a ordenha venha a ser manual, uma série de outras regras precisam ser cumpridas para assegurar a qualidade do produto a ser comercializado.

Em função da adesão do Brasil ao Mercosul, o RIISPOA teve uma de suas mais importantes modificações desde a sua publicação.

3.2. A PRODUÇÃO DE LEITE NO BRASIL

Segundo dados fornecidos por Maia e colaboradores, no artigo “Produção leiteira no Brasil”, a produção de leite mais do que quadruplicou desde 1974, somando um crescimento de 350% no período, ou seja, alcançando o patamar de 32,1 bilhões de litros de leite em 2011.

Em 2014, a produção de leite foi de 35,17 bilhões de litros, representando um aumento de 2,7% em relação à registrada no ano anterior. Mais ainda, o Brasil ocupou a quinta posição no ranking mundial de produção de leite, atrás da União Europeia, Índia, Estados Unidos e China. (IBGE, 2014)

No ano de 2014, a região Centro-Oeste participou com 14,1% da produção nacional, com o Estado de Goiás na quarta posição nacional. O Estado de Minas Gerais permaneceu como o principal produtor de leite no mesmo ano, com 9,37 bilhões de litros, o que corresponde a 77,0% de toda a produção da Região Sudeste e a 26,6% do total da produção nacional. A região Sul, que já apresentou um salto de produção na década de 2000, fechou com 32% da produção nacional em 2011. Mais ainda, foi a maior produtora de leite do país, com 12,2 bilhões de litros produzidos, o equivalente a 34,7% do total nacional. Em termos de produção nacional, na segunda colocação está o Estado do Rio Grande do Sul, seguido pelo Estado do Paraná.

A produção de leite teve um notável crescimento ao longo das últimas décadas, e esse fenômeno pode ser dado pelo aumento da capacidade produtiva e pelo desempenho da produtividade dos animais brasileiros. Em tempos que o rebanho não cresceu, ou até diminuiu, o ganho de produtividade do setor foi o fator que sustentou o crescimento da produção. Em 1974, por exemplo, o rebanho brasileiro era de 10,8 milhões de vacas. De 1992 até 1996, as vacas ordenhadas passaram de 20,47 milhões para 16,27 milhões. De uma vaca ordenhada em 1974, produzia-se uma média de 655 litros de leite ao ano, ao passo que em 2011, a produção anual passou a ser de 1381 de litros. Em 2014, a produção anual brasileira média foi de 1525 litros por vaca, correspondendo a um crescimento de 2,2% em relação à observada em 2013 (1492 litros/vaca/ano). De todas as regiões brasileiras, a Região Sul é a que mais investiu nessa área tecnológica, o que, segundo Maia, ajudaria a explicar a posição da região quanto a sua alta produtividade na produção de leite. O Estado do Rio Grande do Sul destaca-se com a maior produtividade nacional (3034 litros/vaca/ano), seguido pelos Estados de Santa Catarina e Paraná (2694 e 2629 litros/vaca/ano). (MAIA, 2016)

Tabela 1. Produção brasileira de leite e participação das regiões do país na produção

Ano	Produção de leite anual (bilhões de litros)	Norte (%)	Nordeste (%)	Sudeste (%)	Sul (%)	Centro- Oeste (%)
1974	7,1	1	13	54	23	9
1980	11,2	1	14	51	23	11
1990	14,5	4	14	48	23	12
1995	16,5	4,3	11,5	45,8	24,9	13,6
2000	19,8	5	11	43	25	16
2005	24,6	7,1	12,1	38,8	26,6	15,4
2010	30,7	6	13	36	31	14
2014	35,17	5,5	11,1	34,6	34,7	14,1

Fonte: o Autor, com base em dados da Pesquisa Pecuária Municipal do IBGE.

3.3. ESTABELECIMENTOS PRODUTORES DE LEITE

3.3.1. Tipos de produção no Brasil

Ao analisar a produção de leite no Brasil, pode-se dividir os sistemas de produção existentes em quatro tipos: produção de subsistência, produção semiextensiva, produção especializada e produção intensiva. Cada classificação apresenta o tamanho do rebanho, tipo de alimentação e produtividade por vaca.

3.4. SISTEMA DE CONFINAMENTO OU A PASTO

A produção de leite é considerada como sendo a pasto quando esse é o principal, senão o único alimento para os animais. No confinamento, as vacas são alimentadas no cocho. Em virtude dos custos, alguns produtores brasileiros utilizam um sistema misto, ou seja, à pasto no período do ano em que há abundância de forragens suplementando as vacas de alta produção com alimentos concentrados e, durante os períodos de seca, alimentando-as no cocho com silagem, cana-ureia e concentrados.

3.4.1. Perfil dos produtores de leite no Brasil

A produção de leite está dispersa em estabelecimentos agropecuários bastante heterogêneos. Levantamento do IBGE indicou que no Brasil existem, aproximadamente 5,2 milhões de estabelecimentos rurais e em 25% deles ocorreu produção de leite, ou seja, quase um milhão e meio de unidades produtivas. O levantamento também indicou que em 45% dos

estabelecimentos da pesquisa são caracterizados por uma produção de subsistência, alimentação do gado baseada em pasto, e que representam apenas 5% da produção de leite no Brasil. Entre os maiores produtores de leite no Brasil, com uma produção diária média de 27,5 litros por vaca, o sistema de maior ocorrência foi de confinamento total dos animais. Em segunda posição está o sistema de semiconfinamento, seguido pelo sistema baseado em pastagens, com média diária de 20,4 e 16,8 litros de leite por animal.

3.5. MASTITE E O GADO LEITEIRO

A mastite é uma inflamação da glândula mamária causada por contágio de outros animais ou por contaminação do ambiente. O primeiro passo para o processo infeccioso é a contaminação com microrganismos da extremidade da teta de uma glândula susceptível. A composição do leite favorece a instalação e a multiplicação do microrganismo na glândula mamária. Ao passo que os microrganismos atingem um número elevado, toxinas e substâncias estranhas são liberadas e reagem com o meio, inflamando a mama. Como resposta fisiológica, as infecções atraem os leucócitos para as zonas afetadas. Ocorre também a dilatação das paredes dos vasos sanguíneos, facilitando assim que substâncias sejam liberadas para o leite e acabem por alterar a qualidade do mesmo. Em casos mais graves, a vaca pode ter uma drástica redução das funções de produção de leite.

A inflamação é dividida entre casos chamados de mastite clínica e subclínica. Apresentando uma baixa incidência, a primeira pode ser identificada pela presença de aspecto aquoso do leite, grumos ou flocos nas secreções da glândula mamária da vaca. As tetas e o úbere da vaca contaminada apresentam vermelhidão, ficam mais duros, inchados, doloridos e quentes. Em alguns casos o animal tem febre e perda de apetite e, em casos extremos, a morte. A mastite subclínica apresenta uma alta incidência e é o tipo de mastite que mais causa prejuízos na cadeia produtiva do leite. O diagnóstico da mastite subclínica é feito através de testes específicos uma vez que os sintomas não são visíveis a olho nu ou não estão presentes.

3.6. O USO DE ANTIBIÓTICOS NO GADO LEITEIRO

Antibióticos são drogas medicinais com fins terapêuticos ou preventivos a ação de bactérias a serem usadas em humanos ou animais. Podem ser administrados em animais por meio de injeções subcutâneas ou musculares, normalmente usados no gado quando este já estiver doente, resultando em uma maior concentração no corpo por um período relativamente

menor. A aplicação requer atenção para preservar a segurança de quem aplica a injeção e não estressar ainda mais o animal. Injetar antibióticos no animal.

Alguns antibióticos podem ser administrados os misturando à ração ou a água. Segundo *South Dakota State University*, tais medicamentos são de livre escolha de cada criador, visto seu objetivo não terapêutico.

3.6.1. Tratamento da Mastite bovina

Ao ocorrer, uma das alternativas para a eliminação da infecção dá-se por tratamento com antibióticos durante a lactação. Por não existir um protocolo para o tratamento, o primeiro passo é a identificação das bactérias causadoras mais frequentes no rebanho para, então escolher antibióticos de ação mais restrita, o que proporciona um tratamento mais eficaz além da prevenção da resistência bacteriana.

Os antibióticos podem ser administrados pelas vias intramuscular ou intramamária. O primeiro apresenta uma distribuição mais uniforme do antibiótico pela glândula mamária e não oferece o risco de contaminação entre tetos. Com o segundo, tem-se maior concentração local de aplicação por menor quantidade aplicada e assegura-se um melhor tratamento contra bactérias que não penetram no tecido da glândula mamária. (SANTOS, 2000)

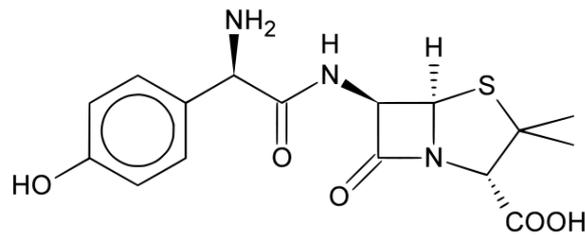
Em virtude dos sintomas causados nas situações de mastite clínica, e quando não é possível aguardar o resultado dos testes de sensibilidade antimicrobiana, comumente indica-se o tratamento do animal com um antibiótico de amplo-espectro. Somente após o fim do tratamento e do intervalo de segurança que o leite a ordenhar poderá ser comercializado.

3.6.1.1. Amoxicilina e Mastite

A amoxicilina é uma penicilina semissintética de amplo espectro de ação, utilizada em vacas leiteiras no combate a mastite. Pertence ao grupo dos β -lactâmicos, pois possui em sua estrutura o anel β -lactâmico. Tais drogas impedem a síntese da parede bacteriana, provocando a destruição do patógeno. Possui ação contra muitos organismos Gram-positivos e Gram-negativos, exceto contra organismos que produzem enzimas do tipo β -lactamase.

Comumente administrada via intramuscular em casos urgentes e críticos. Todavia, Langoni *et al* demonstrou a eficiência e viabilidade da infusão intramamária de amoxicilina em casos de mastites clínicas e subclínicas. Fabricantes sugerem o descarte do leite produzido pelo animal até o completar de 96 horas depois do último tratamento.

Figura 1 – Formula estrutural da amoxicilina anidra



3.7. RESÍDUO DE ANTIBIÓTICOS EM LEITE

O uso impróprio de antibióticos no tratamento da mastite bovina acaba por aumentar as chances de contaminação do leite, como é o caso do não cumprimento do tempo de carência. A presença de resíduos de antibióticos em leite pode acarretar sérias consequências toxicológicas e tecnológicas e, por isso, é um problema de carácter econômico e de saúde pública. (JUNZA et al., 2014; RAIÁ, 2006; ROCA et al., 2010)

A presença de resíduos de antibióticos pode favorecer o aumento da resistência bacteriana aos antibióticos que fazem parte da flora intestinal humana. Além disso, a exposição a certos antimicrobianos pode provocar urticárias, dermatites, asma e rinite em pessoas susceptíveis a essa hipersensibilidade. Alguns desses resíduos são potenciais teratogênicos e carcinogênicos. (SANTOS, 2014)

Industrialmente, já se sabe que antibióticos interferem nas culturas lácteas utilizadas na fabricação de derivados, afetando então os processos de fermentação no processamento de produtos lácteos como iogurte e queijo. A fabricação do iogurte é afetada na etapa de formação do coalho, pois os antibióticos causam retardo na acidificação do meio, com consequente desequilíbrio no desenvolvimento das bactérias componentes da cultura. Os queijos, por sua vez, sofrem interferência negativa dos antimicrobianos nos processos de dessoragem da coalha, fermentação e maturação, apresentando produto de coloração, sabor e textura anormais. (RAIÁ 2002, GRUNWALD 2006)

3.8. CONTROLE DE QUALIDADE

Foi para assegurar que o consumidor não será exposto a contaminantes que, desde 1991, atendendo às pressões do mercado consumidor, o comitê do *Códex Alimentarius* vem recomendando o uso do sistema de APPCC para todos os países-membros da ONU.

Em 1998, através da portaria 72, o Ministério da Agricultura, do Abastecimento e da Reforma Agrária estabeleceu o Programa de Controle de Resíduos Biológicos em Leite - PCRBL. A partir de então, seguindo tendências do *Códex Alimentarius*, da União Europeia e

da estadunidense *Food and Drug Administration*, o PCRBL estipularia os limites máximos de resíduos de antimicrobianos em leite a serem aplicados no Brasil.

Atualmente, ações de monitoramento, controle e fiscalização de alimentos, bebidas e insumos produzidos e comercializados no Brasil são executadas pelos LANAGRO. Os Laboratórios, como suas diversas unidades operando ativamente nessas áreas, fornecem informações valiosas para os serviços de inspeção e fiscalização, não só do ponto de vista analítico, mas também em cooperações, estudos e projetos de pesquisa voltados para a segurança do alimento e à detecção de fraudes econômicas. (LANAGROS, 2016)

Os parâmetros de qualidade do leite são: Contagem de células somáticas, Contagem total de bactérias e Resíduos Químicos. A contagem de células somáticas, ou CCS, é usada como ferramenta para o monitoramento da saúde do animal com relação a prevenção e controle da mastite. A contagem total de bactérias, ou CTB, indica as condições gerais de higiene de ordenha e dos utensílios utilizados bem como a refrigeração do leite. Por fim, a análise dos resíduos químicos como antibióticos, carrapaticidas, pesticidas, entre outros mostra a possível negligência do produtor ou fraude na produção leiteira quando tratamento do animal. (DUARTE VILELA, 2011)

Evidenciando a necessidade de maior rigor na fiscalização do uso de antimicrobianos em produções da indústria alimentícia, estudos realizados em 2009 nas propriedades de São Paulo apontaram que 2,7% das amostras analisadas apresentam resíduos de antimicrobianos. Da mesma forma, porém através de testes qualitativos, pesquisadores detectaram presença de resíduos de antimicrobianos em 8,5%, 11,4%, 8,0% e 6,0% das amostras avaliadas em Viçosa (MG), Londrina (PR), Pelotas (RS) e Botucatu (SP), respectivamente. (TOSCAN, 2016)

3.9. TRATAMENTO TÉRMICO DO LEITE

Através de processos térmicos no alimento, seu tempo de prateleira passa a ser maior devido a desnaturação de proteínas e a desativação de metabolismos controlados por enzimas nos microrganismos. A uma dada temperatura, uma taxa constante de microrganismos é destruída por tempo de permanência no processo. Esse comportamento configura reações com taxa de primeira ordem, chamado também de ordem logarítmica de morte, de onde estimar-se o tempo necessário para destruir 90% dos microrganismos (valor D) e o tempo para se atingir uma esterilidade comercial. É de costume industrial selecionar combinações de tempo mais curtos e temperaturas mais elevadas a título de otimizar o processo, atingindo o mesmo nível de destruição enzimática ou microbiana e preservando as qualidades sensoriais desejadas. (FELLOWS, 2006; SANTANA, 2015)

A produção brasileira de leite atual é deficiente em dados estatísticos sobre o destino do leite cru na produção de derivados. Do leite industrializado no Brasil em estabelecimentos sob inspeção federal, o Serviço de Inspeção Federal – SIF do ano de 2005 e 2007 aponta que 4,9 bilhões (26%) são para produção de leite longa vida e 1,3 bilhão (7%) para leite pasteurizado. O leite pasteurizado é produzido em 22 estados com destaque para São Paulo como primeiro produtor, respondendo por 31% da produção nacional. Ao mesmo tempo, o estado do Rio Grande do Sul se apresentava em quinto lugar, com 6% da produção nacional de leite pasteurizado. (RAIA, 2001)

3.9.1. A Pasteurização

De acordo com a legislação vigente hoje no Brasil, o processo térmico de pasteurização deve ser realizado no leite cru quando este for destinado ao consumo humano direto na forma fluida. Basicamente, tem como objetivo eliminar os microrganismos patogênicos não esporulados e reduzir significativamente a microbiota deteriorante de baixa resistência térmica do leite, garantido a segurança do consumidor e a conservação das suas características sensoriais e nutricionais. Resfria-se o leite pasteurizado para que se iniba a multiplicação dos microrganismos sobreviventes. (SANTANA, 2015).

A Pasteurização é uma operação unitária que possui pouco ou nenhum efeito na qualidade nutricional dos alimentos. O processo é um tratamento térmico brando, no qual o alimento é aquecido a temperaturas menores que 100°C, onde objetiva-se minimizar contaminação por patogênicos e aumentar o tempo de prateleira. A extensão do tratamento térmico necessário para estabilizar um alimento é determinada pelo tempo de redução decimal da enzima, microrganismo e patógenos não esporulados mais termorresistente, que possivelmente esteja presente no alimento. (FELLOWS, 2006)

Segundo Santana, na pasteurização do leite, “os binômios tempo/temperatura aplicados hoje são eficientes para garantir [a eliminação] de *Mycobacterium tuberculosis*, *Listeria monocytogenes* e a riquetsia *Coxiella burnetti*. ” (2015)

3.9.1.1. Pasteurização Lenta – LTLT

Pasteurização Lenta, ou *Long Time Low Temperatures*, é o processo de pasteurização de leite a temperaturas mais baixas por um período de tempo mais longo. Submete-se o leite a uma temperatura de 63°C durante 30 minutos. No Brasil, é permitido em empresas de laticínios de pequeno porte para o abastecimento público ou para a produção de derivados lácteos. Mesmo

assim, é um processo utilizado com “menor frequência” por causar “maiores mudanças no sabor e uma perda levemente maior de vitaminas” do que a pasteurização rápida. (FELLOWS, 2006; SANTANA, 2015)

3.9.1.2. Pasteurização Rápida – HTST

Também conhecida como HTST (*High Temperatures, Short Time*), refere-se a um tratamento térmico na faixa de temperatura de 71,8° durante 15 segundos. No Brasil, é estipulado que o processo deva ocorrer em equipamento de pasteurização a placas, com temperaturas entre 72° a 75°C e durante o período de 15 a 20 segundos. (FELLOWS, 2006; SANTANA, 2015)

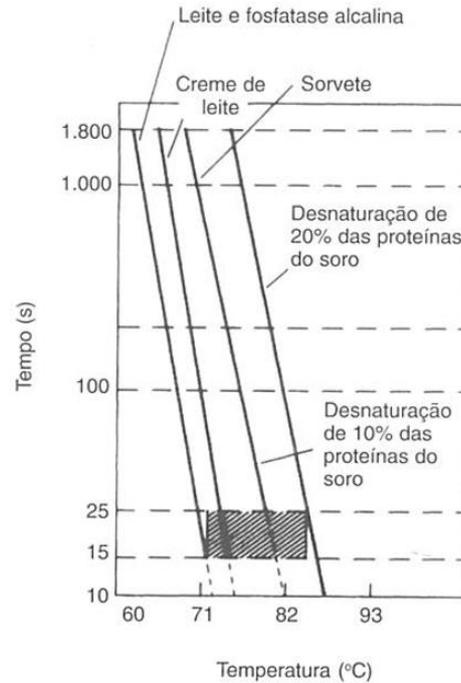
3.9.2. Fosfatase Alcalina e Peroxidase

Após a etapa de aquecimento de ambos os processos citados cima, resfria-se o leite pasteurizado para que se iniba a multiplicação dos microrganismos sobreviventes. Posteriormente, o leite pasteurizado pode ser envasado através de um circuito fechado, evitando assim o contato com meios contaminados.

Entre outros testes, uma pasteurização devidamente executada deve apresentar teste negativo para uma enzima em específico, que está presente naturalmente no leite cru, as enzimas de fosfatase alcalina. Esta enzima tem um tempo de redução decimal similar ao dos patógenos termorresistentes. Logo, por questões de tempo, custo e praticidade, a determinação direta de patógenos por testes microbiológicos é substituída pela determinação de fosfatase alcalina. Na figura 2, a área hachurada mostra as faixas de tempo e de temperatura utilizadas na pasteurização comercial do leite, assim como a sua influência na desnaturação de proteínas do soro e enzimas como a Fosfatase Alcalina. (FELLOWS, 2006)

Por outro lado, o leite pasteurizado deve apresentar teste positivo para peroxidase. Também encontrada naturalmente no leite cru, esta enzima é “a mais termorresistente” pois decompõe somente quando submetida a 85°C por 20 segundos. Por consequência, o leite que tiver inativado o seu conteúdo de fosfatase alcalina e ainda apresentar peroxidase, atingiu a temperatura que garante a morte dos microrganismos patogênicos sem detrimento das propriedades físico-químicas, sensoriais e nutricionais. (SANTANA, 2015)

Figura 2 Relação entre tempo e temperatura para a pasteurização.



Fonte: P. J. Fellows.

3.9.3. Tratamento térmico e a decomposição de antibióticos β -lactâmicos.

A temperatura é um dos fatores mais importantes, pois ela influencia diretamente a cinética das reações de degradação das moléculas dos antibióticos. Baseando-se em algumas equações cinéticas pode-se estimar o decréscimo em concentrações de compostos antibióticos em termos de tempo e temperatura. (ROCA *et al.*, 2010)

Pouco é discutido sobre a cinética de degradação dessas moléculas. Roca *et al* propôs analisar o efeito de diferentes temperaturas e tempos na degradação das moléculas de 10 antibióticos beta-lactâmicos (penicilinas e cefalosporinas) em leite com métodos cromatográficos para determinar a cinética de reação e subsequentemente calcular as perdas de concentração através de processos convencionais de tratamento térmico. (2010; JUNZA *et al.*, 2014)

Uma possível inativação de resíduos de beta-lactâmicos via processos de aquecimento do leite com o propósito de segurança no consumo, indica a necessidade de definir os efeitos que o aquecimento causa nas moléculas de antibióticos. A temperatura de tratamento nos processos prévios a adição das culturas de iogurte é um dos fatores que diminuem a concentração residual dessas penicilinas. (GRUNWALD; PETZ, 2002)

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. MATERIAIS

4.1.1. Reagentes e Soluções

No preparo das soluções utilizou-se padrão de Amoxicilina Triidratada da Fluka Sigma-Aldrich, pureza 99,3%. No processo de extração o solvente empregado foi a Acetonitrila – grau cromatografia (Suprasolv® Merck KGaA. Darmstadt, Germany). Na etapa de *clean-up* utilizou-se C18 (LiChroprep® RP – 18 (25 – 40 µm) para cromatografia a líquido. Merck KGaA. Darmstadt, Germany). A água ultrapura utilizada em todas as etapas foi obtida com purificador de água Gehaka, equipado com filtro de registro, carbon block, membrana de osmose, deionizador e filtro microbiológico.

Os solventes para a fase móvel utilizada na separação cromatográfica foram Metanol com grau de pureza para análise de resíduos ou HPLC, ácido fórmico de grau de pureza para análise de resíduos ou HPLC.

A solução padrão estoque de Amoxicilina, foi preparada pensando-se quantitativamente o padrão e transferindo para um valão volumétrico de 50 mL. O volume foi completado com água ultrapura.

As soluções de trabalho e a subsequente fortificação das amostras de leite cru, foram preparadas por diluição da solução estoque utilizando micropipetas reguláveis, Nichiryo e Thermo Scientific, dependendo do volume das alíquotas, sendo que cada micropipeta coleta e dispensa em uma diferente faixa de volumes. As micropipetas reguláveis da Thermo Scientific, modelo Finnpiptette F2, dispensam entre 100 e 1000 µL (RPM/P/45), e a outra entre 500 e 5000 µL (RPM/P/54). As micropipetas da Nichiryo, modelo nichipet, dispensam na faixa de 10 e 100 µL (RPM/P/12).

4.1.2. Equipamentos

As homogeneizações foram realizadas em mesa agitadora (Thermo Scientific – MAXQ3000) ou agitador do tipo vortex (THERMO SCIENTIFIC MAXI MIX II). A etapa de redução de volume da amostra de leite com acetonitrila ocorreu em um concentrador de amostras (Concentrator TecVap – TECNAL), onde o fluxo era ou de ar comprimido, ou proveniente de gerador de Nitrogênio (Peak Scientific).

As pesagens foram realizadas em uma balança eletrônica do tipo analítica marca Sartorius (RPM/B/10).

A análise foi realizada em HPLC (Agilent 110 Series ou similar) equipado com uma coluna cromatográfica Agella Phenyl-Hexyl 3 μm (100 \times 2.1 mm), acoplado a Espectrômetro de Massas (API 5000 – Applied Biosystems). Com fonte de ionização *Electrospray* operando no modo positivo (ESI+).

4.1.3. Amostras

Todas as amostras de leite cru utilizadas nos ensaios realizados neste trabalho foram previamente analisadas e testadas negativamente quanto a presença de antibióticos β -lactâmicos. Essas amostras fizeram parte dos testes de rotina, sendo analisadas através de técnicas de cromatografia a líquido. Finalmente, as análises foram executadas pelos técnicos da LANAGRO/RS.

4.2. MÉTODOS

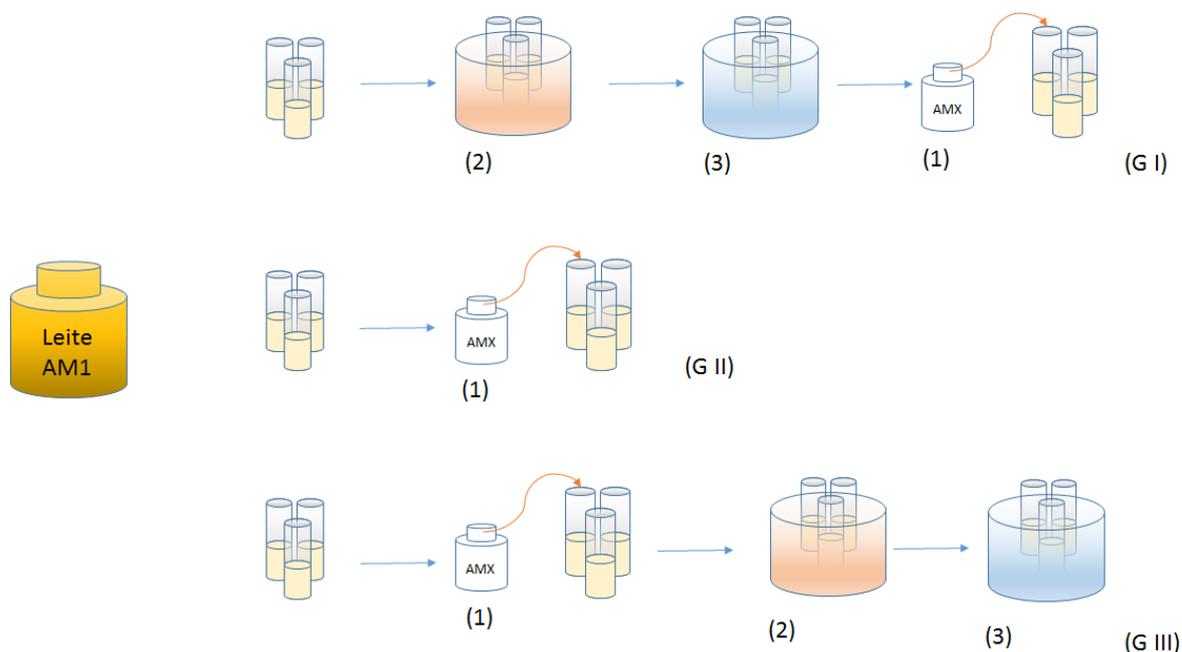
4.2.1. Ensaio de Temperatura

4.2.1.1. Planejamento dos experimentos

A amostra de leite (AM1) desta etapa foi dividida entre três grupos e para cada grupo repetiu-se o processo em triplicata. Estão descritos a seguir os processos aos quais cada grupo de triplicata foi submetido:

- (1) Adição de uma alíquota de solução de trabalho de Amoxicilina para que a concentração final na amostra fosse de 200 $\mu\text{g L}^{-1}$;
- (2) Pasteurização de bancada realizada pela imersão dos tubos em banho-maria, aquecimento com um bico de Bunsen, aumento da temperatura até 72°C. Fechou-se o fornecimento de gás e manteve-se o conjunto de amostras no banho-maria a essa temperatura por 15 a 20 segundos;
- (3) Imersão das amostras em banho de gelo para resfriamento rápido até próximo de 4°C.

Figura 3 Esquema simplificado para experimento de avaliação da concentração de AMX conforme a ordem de adição no processo.



Fonte: o Autor

O Grupo I, são as amostras de leite que foram submetidas a um processo de pasteurização de bancada. Em triplicata, as amostras foram levadas a banho-maria e lá permaneceram até 15 ou 20 segundos após atingirem 72°C. Depois de resfriadas, adicionou-se uma quantidade suficiente de solução de trabalho do antibiótico para deixar cada triplicata com uma concentração de 200 $\mu\text{g L}^{-1}$. O leite cru das amostras do Grupo II não sofreu processo de aquecimento, porém foi adicionado à solução de amoxicilina para elevar à concentração de 200 $\mu\text{g L}^{-1}$. Já no Grupo III, adicionou-se solução de amoxicilina ao leite previamente a pasteurização.

Ao final de cada tratamento, alíquotas das amostras geradas foram armazenadas em freezer até o processo de extração e análise no LC-MS/MS.

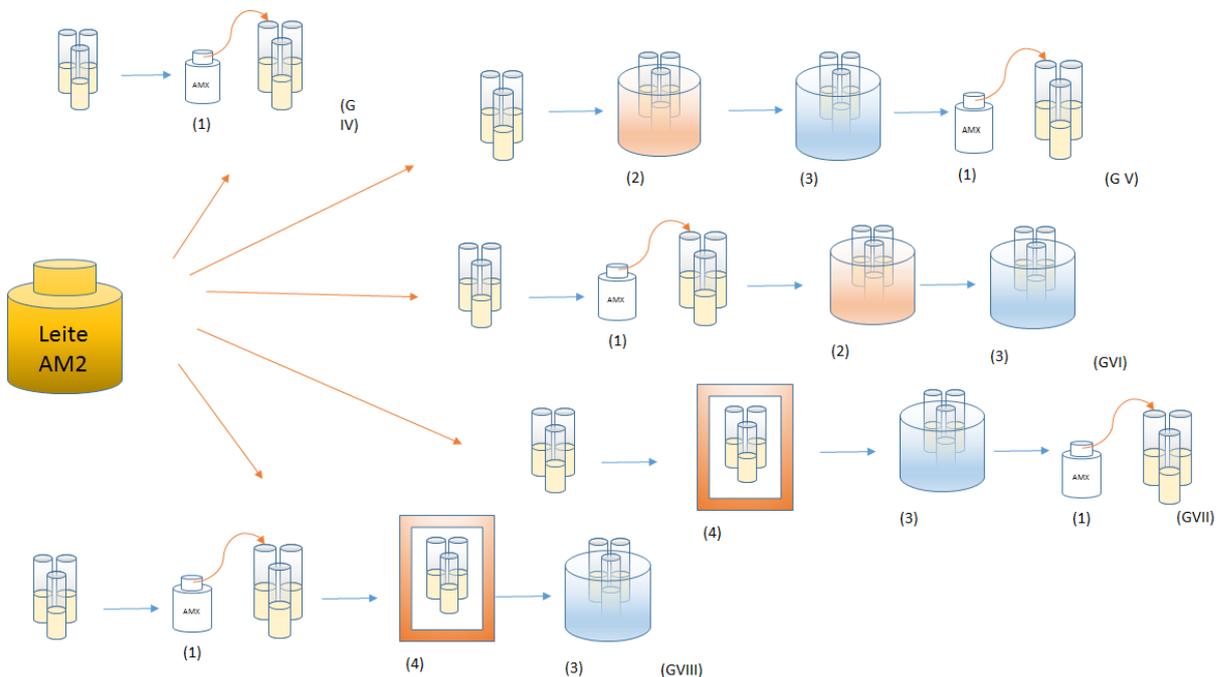
4.2.1.2. Avaliação da variação da concentração da amoxicilina em diferentes processos de aquecimento do Leite

A amostra de leite (AM2) desta etapa foi dividida entre cinco grupos (GIV a GVIII) e para cada grupo repetiu-se o processo em triplicata. Estão descritos a seguir os processos aos quais cada grupo de triplicata foi submetido:

- (1) Em cada tubo adicionou-se uma alíquota de solução de trabalho de Amoxicilina para que a concentração final, na amostra, fosse de $200 \mu\text{g L}^{-1}$;
- (2) Pasteurização de bancada: imersão dos tubos em banho-maria, aquecido por um bico de Bunsen. Elevou-se a temperatura do sistema até que uma das amostras atingiu 72°C . Fechou-se o fornecimento de gás e manteve-se o conjunto de amostras no banho-maria a essa temperatura por 15 a 20 segundos;
- (3) Imersão das amostras em banho de gelo para resfriamento rápido até próximo de 4°C .
- (4) As amostras de leite cru ficaram sob a temperatura de 90°C durante o período de 15 minutos em um forno de cromatografia à gás para o controle da temperatura.

Ao final de cada tratamento, alíquotas das amostras geradas foram armazenadas em freezer até o processo de extração e análise no LC-MS/MS.

Figura 4 Esquema simplificado das etapas do experimento para avaliação variação da concentração da amoxicilina em diferentes processos de aquecimento do Leite.



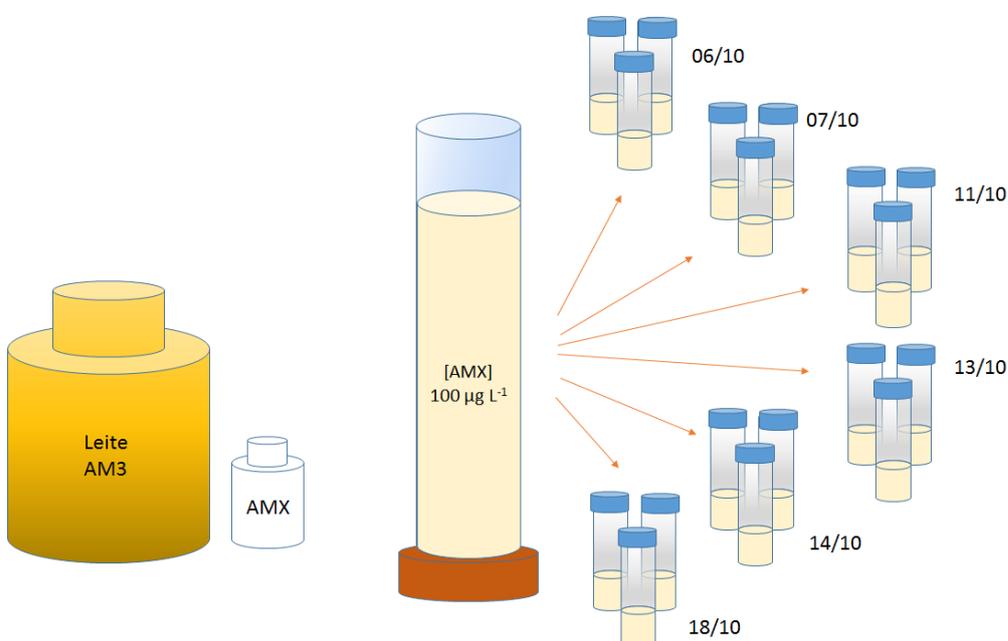
Fonte: o Autor

4.2.1.3. Avaliação da variação da concentração da Amoxicilina em leite cru em diferentes tempos de armazenamento a 4°C

A 100 mL de leite adicionou-se volume de solução estoque de AMX para que a concentração final desta fosse de $100 \mu\text{g L}^{-1}$. Esta amostra foi dividida em vários tubos, cada

um contendo 2 mL do leite com AMX. Os tubos foram levados ao freezer, onde permaneceram por uma semana. O mesmo procedimento foi repetido com água no lugar do leite. Da mesma forma, a solução foi dividida em vários tubos, cada um com 2 mL e também levados ao freezer (-10°C). No intervalo de treze dias, entre seis datas diferentes, os tubos de leite foram retirados do freezer e deixados na geladeira na temperatura entre 0°C e 4°C. Para comparação, os tubos de água como matriz foram retirados em no meio deste intervalo. As datas são especificadas na Figura 5 e Tabela 10.

Figura 5 Esquema simplificado do ensaio sobre a variação da concentração de AMX em leite cru em diferentes tempos de armazenamento a 4°C



Fonte: o Autor

4.2.1.4. Avaliação da variação da concentração de amoxicilina com a temperatura e o tempo

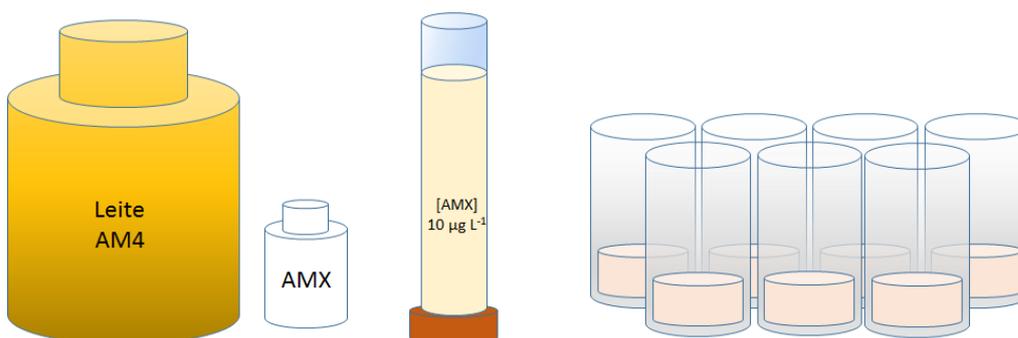
A uma amostra de 450 mL de leite cru, adicionou-se volume de solução de AMX suficiente para que a concentração final fosse de $10 \mu\text{g L}^{-1}$. A amostra de leite contendo $10 \mu\text{g L}^{-1}$ foi dividida e transferida igualmente em 7 copos de Becker, cada qual com a identificação referente ao tempo de ensaio em minutos: 0, 60, 120, 180, 240, 300, 360.

Os beckers foram colocados dentro do forno de cromatografia a gás na temperatura de 60°C. Retirou-se cada um dos copos de Becker de dentro do forno assim que o tempo cronometrado atingiu o tempo estabelecido. Ao retirar as amostras do forno, deixou-se o sistema resfriar dentro da capela, até a temperatura ambiente. De cada amostra foram retiradas

duas alíquotas de 2 mL. As alíquotas foram transferidas para os tubos Falcon e reservadas em freezer, a uma temperatura aproximada de -10°C , até o dia da extração.

Repetiu-se o ensaio supracitado, porém com alterações na temperatura do forno. As temperaturas utilizadas para os ensaios foram de 70°C e 80°C . Da mesma forma como no ensaio anterior, todas as amostras foram guardadas em freezer até o dia da extração em solvente.

Figura 6 Preparo da amostra de leite e AMX para testes com variação da temperatura e tempo



Fonte: o Autor

4.2.2. Preparo das amostras para determinação de Amoxicilina em leite bovino por LC-MS/MS

A metodologia para a determinação de antibióticos β -lactâmicos (entre eles a AMX) em leite bovino utilizada neste trabalho foi desenvolvida e validada por Louise Jank. Para esta metodologia, 2 mL de leite são transferidos para um tubo de polipropileno, aos quais são adicionados 4 mL de acetonitrila, seguida de agitação manual. Segue para agitador de bancada a 180 rpm por 10 minutos. Posteriormente, a amostra é centrifugada a 4000 rpm por 5 minutos em centrífuga refrigerada. Após a centrifugação a amostra é transferida para tubos Falcon de 50 mL contendo 100 mg de C18 bulk e agitado em agitador do tipo vortex.

A amostra é novamente centrifugada por mais 5 minutos a 4000 rpm. O sobrenadante é transferido para tubo de 15 mL e guardado em freezer por 20 minutos. Posteriormente, a amostra é novamente centrifugada por 10 minutos em centrífuga refrigerada e o sobrenadante fora transferido para outro tubo de 50 mL. A amostra é transferida para o concentrador a temperatura de 45°C , sob fluxo de nitrogênio para redução do volume para entre 200 a 500 μL . O resíduo é transferido para um vial e o volume ajustado para 1 mL.

Com as amostras de leite, cedidas pelo LANAGRO/RS, foram produzidas as amostras dos testes citados acima, construiu-se pontos de curva, e fez-se a análise de recuperação e *Tissue*

Standard. O preparo da amostra de *Tissue Standard* seguiu o mesmo processo que o ponto de concentração zero da curva, porém, ao fim da extração é adicionada uma alíquota de solução fortificante. Diferentemente, os pontos da curva analítica e as amostras para análise de recuperação foram fortificadas no início de todo o processo de extração.

4.2.3. Curva Analítica

As soluções das curvas analíticas para a quantificação da amoxicilina foram preparadas em matriz. Duas curvas analíticas com diferentes faixas de concentração foram construídas a fim de atender as duas concentrações utilizadas nas fortificações, ou seja, 10 e 200 $\mu\text{g L}^{-1}$. Os testes realizados, os grupos de amostras, a concentração do leite após a adição de solução de amoxicilina e os pontos da curva analítica estão discriminados na tabela a seguir.

Tabela 2 – Especificação das amostras processadas.

Teste	Grupos	[AMX]	Curva Analítica
Variação na Ordem de Adição de AMX	GI a GIII	200 ppb	0;5;10;25;50;100;200;300
Avaliação da variação da concentração da amoxicilina em diferentes processos de aquecimento do Leite	GIV a GVIII	200 ppb	0;5;10;25;50;100;200;300
Avaliação da variação da concentração da Amoxicilina em leite cru em diferentes tempos de armazenamento a 4°C	GIX	100 ppb	0;25;50;75;100;125
Avaliação da variação da concentração de amoxicilina com a temperatura e o tempo	GX a GXII	10 ppb	0;2,5;5;7,5;10;12,5

4.2.4. Condições de análise por LC–MS/MS

A eluição cromatográfica foi realizada empregando fase móvel em modo de gradiente. O tempo de equilíbrio da coluna é de 3 minutos ao final de cada análise; o volume de injeção foi de 10 μL ; o fluxo de fase móvel foi de 200 $\mu\text{L min}^{-1}$ e o gradiente da FM está representado na Tabela 3

Tabela 3. HPLC – Programa do Gradiente da Fase Móvel.

Tempo (min)	A (%)	B (%)
3,00	98,0	2,0
2,00	98,0	2,0
5,00	5,0	95,0
8,00	5,0	95,0
10,00	95,0	5,0
11,00	98,0	2,0
15,00	98,0	2,0

A: água 0,1% ácido fórmico

B: metanol 0,1% ácido fórmico

As condições utilizadas no espectrômetro de massas estão listadas na tabela 4.

Tabela 4. Parâmetros de análise no Espectrômetro de Massas para Amoxicilina no modo *Eletrospray* Positivo.

Analito	[M+H ⁺]	Fragmento	Tempo (msec)	DP	EP	CE	CXP	t _R
AMX	366,1	114,0	75	46	10	27	8	9,81
		207,9	75	46	10	17	12	

DP – Declustering Potential; EP – Entrance Potential; CE – Collision Energy; CXP – Cell Exit Potential.

Tabela 5. Valores de LMR e parâmetros analíticos obtidos para β-lactâmicos em leite bovino.

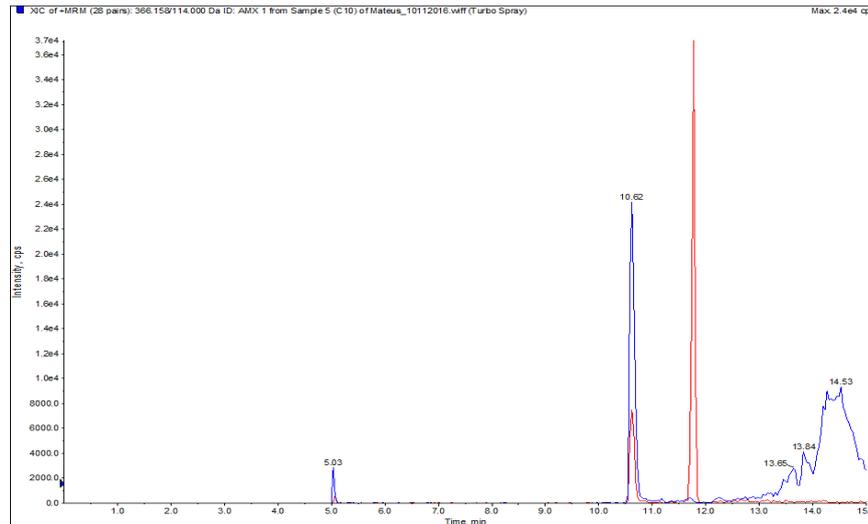
	LMR (µg.L ⁻¹)	LD (µg.L ⁻¹)	LQ (µg.L ⁻¹)	CCα (µg L ⁻¹)	CCβ (µg.L ⁻¹)
AMX	4,0	0,4	1,0	4,6	5,1

CCα (Limite de Decisão); CCβ (Capacidade de Detecção); LMR – Limite máximo de resíduo.

5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

Na Figura 7, tem-se o cromatograma no modo MRM de uma amostra de leite fortificada com $10 \mu\text{g L}^{-1}$ de Amoxicilina.

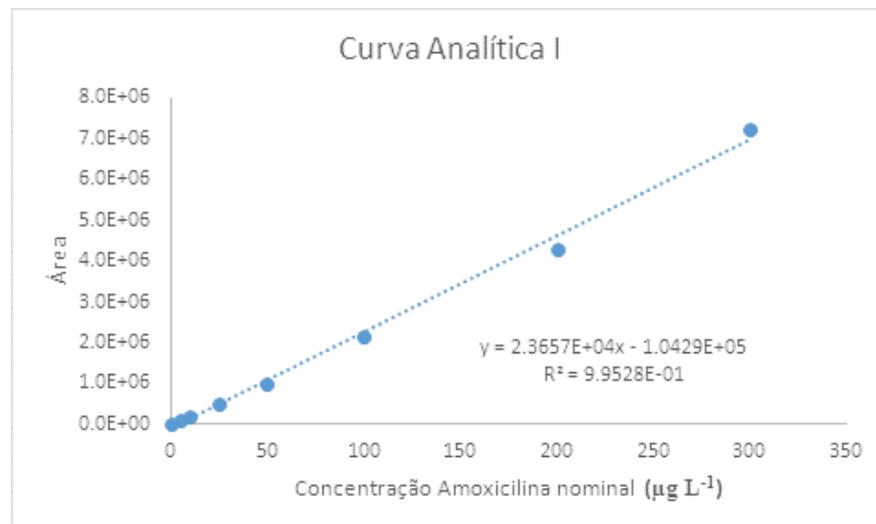
Figura 7 - Cromatograma no modo MRM de uma amostra de leite fortificada com $10 \mu\text{g L}^{-1}$ de AMX



Fonte: Obtido pelo software do equipamento Agilent 1100 Series. LANAGRO/RS

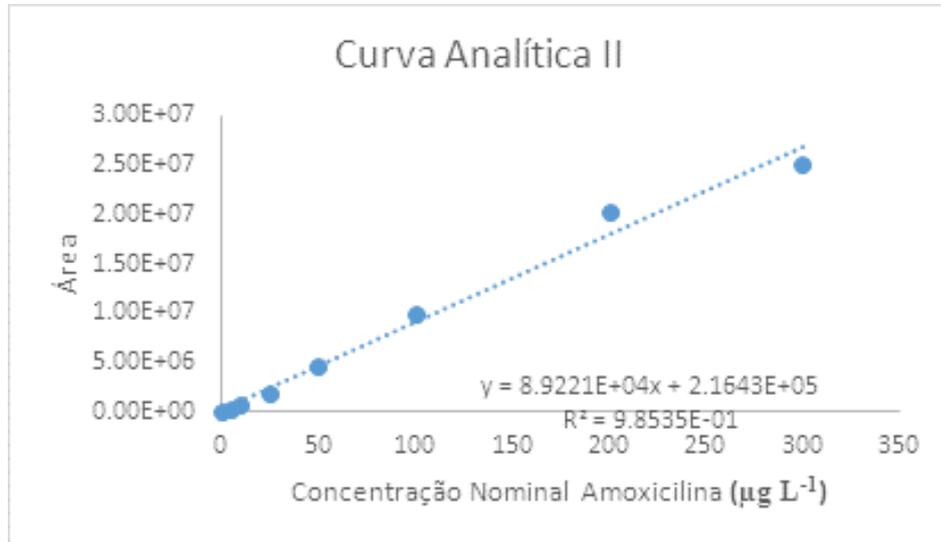
As curvas analíticas são representadas nas Figuras 8, 9, 10 e 11. Os respectivos coeficientes de correlação e ensaios são apresentados na Tabela 6.

Figura 8 – Curva Analítica I; Variação na Ordem de Adição de AMX



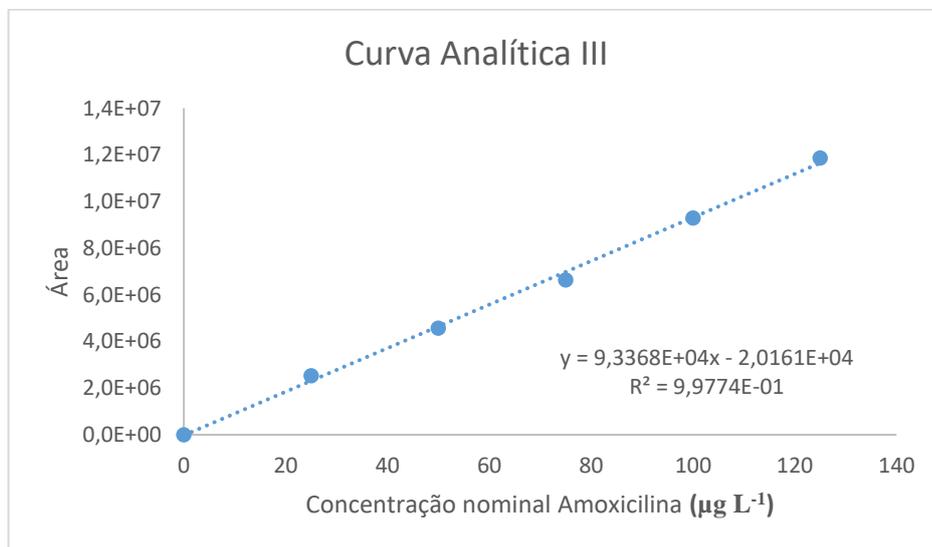
Fonte: o Autor

Figura 9 – Curva Analítica II; Avaliação da variação da concentração da amoxicilina em diferentes processos de aquecimento do Leite



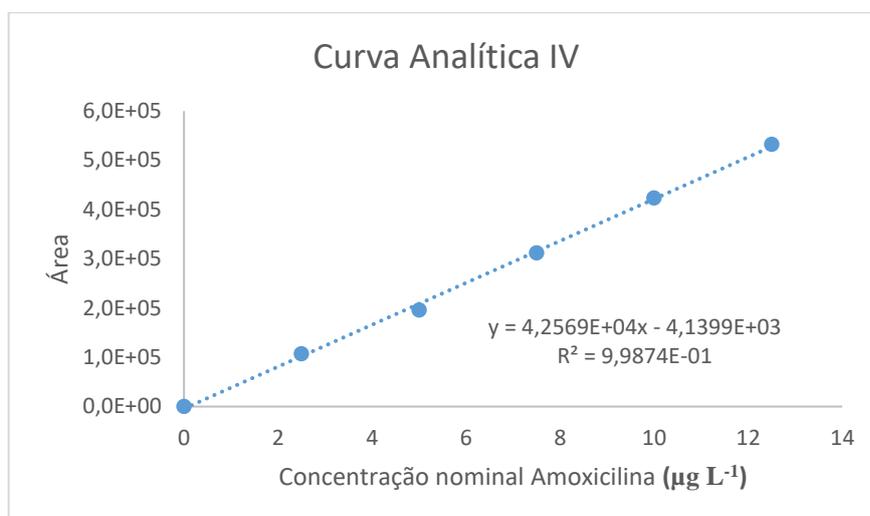
Fonte: o Autor

Figura 10 – Curva Analítica III; Avaliação da variação da concentração da Amoxicilina em leite cru em diferentes tempos de armazenamento a 4°C



Fonte: o Autor.

Figura 11 - Curva Analítica IV; Avaliação da variação da concentração de amoxicilina com a temperatura e o tempo



Fonte: o Autor

Tabela 6. Relação de ensaios com suas respectivas equações de reta e coeficientes de correlação.

Ensaio	Curva	Equação da Reta	Coefficiente de Correlação
Varição na Ordem de Adição de AMX	I	$y = 2,37 \cdot 10^4 x - 1,043 \cdot 10^5$	0,9976
Avaliação da variação da concentração da amoxicilina em diferentes processos de aquecimento do Leite	II	$y = 8,92 \cdot 10^4 x + 2,164 \cdot 10^5$	0,9926
Avaliação da variação da concentração da Amoxicilina em leite cru em diferentes tempos de armazenamento a 4°C	III	$y = 9,37 \cdot 10^4 x - 2,016 \cdot 10^4$	0,9989
Avaliação da variação da concentração de amoxicilina com a temperatura e o tempo	IV	$y = 4,26 \cdot 10^4 x - 4,139 \cdot 10^3$	0,9994

O objetivo dos primeiros testes realizados foi analisar a variação da concentração de amoxicilina em amostras de leite cru, em relação ao tratamento térmico.

Das amostras em que a concentração de amoxicilina foi de $200 \mu\text{g L}^{-1}$, a maior redução em termos de AMX foi para o Grupo III.

Tabela 7 – Variação da concentração de AMX adicionada em diferentes tratamentos do leite. (**Variação na Ordem de Adição de AMX**)

Grupo	Procedimento	Concentração ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Redução (%)
I	Pasteurização e Adição Spike	197,84	1,08
II	Adição Spike	181,30	9,35
III	Adição Spike e Pasteurização	177,04	11,48

Fonte: o Autor

A partir dos resultados do grupo II, pode-se ter uma estimativa de como o processo de pasteurização do leite cru, prévio a adição de amoxicilina, pode afetar a concentração do antibiótico, uma vez que é possível que a amostra apresente enzima β -lactamase que decompõe os antibióticos β -lactâmicos. Por ser uma enzima, a β -lactamase é sensível a temperatura, logo, independente da sua concentração, espera-se que qualquer processamento térmico poderá inativar a enzima, conseqüentemente diminuindo uma variável causadora de degradação da amoxicilina adicionada posteriormente ao aquecimento.

Similarmente, as amostras do grupo III apresentaram um decréscimo na concentração de $200 \mu\text{g L}^{-1}$ devido a presença de enzimas β -lactamase e ao aquecimento até 72°C com permanência por 20 segundos. A temperatura pode ter provocado não somente a degradação da enzima como pode ter auxiliado na redução da concentração de amoxicilina.

Tabela 8 – Concentrações médias obtidas de cada experimento entre os grupos I a VIII

Grupo	Adição AMX	Pasteurização		Amostra de Leite	[AMX] experimental $\mu\text{g L}^{-1}$	Degradação (%)
		Tempo	Temperatura			
G-I	Após Pasteurização	15 s	72°C	AM1	197,84	1,08
G-II	OK	XXXXXXXXXX		AM1	181,30	9,35
G-III	Antes da Pasteurização	15 s	72°C	AM1	177,04	11,48

Continuação Tabela 8						
G-IV	OK			AM2	80,17	59,92
G-V	Depois da Pasteurização	15 s	72°C	AM2	123,83	38,09
G-VI	Antes da Pasteurização	15 s	72°C	AM2	132,69	33,65
G-VII	Depois da “Pasteurização”	15 min	90°C	AM2	136,87	31,57
G-VIII	Antes da “Pasteurização”	15 min	90°C	AM2	94,77	52,62

Fonte: o Autor

Quanto a avaliação do comportamento da concentração de amoxicilina frente ao método de aquecimento utilizado, uma amostra nova amostra de leite cru (AM2), previamente analisada pelo LANAGRO/RS, foi dividida em cinco diferentes grupos. Cada grupo foi composto de uma triplicata de amostras e os ensaios foram repetidos em três dias diferentes. Por fim, a extração em solvente, com a posterior análise via HPLC, foram realizadas num quarto dia.

Tabela 9 - Resultados obtidos na avaliação da variação da concentração da amoxicilina em diferentes processos de aquecimento do Leite (vide Tabela 8), do grupo IV a VIII

Procedimento	Concentração após tratamento ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Redução (%)
Adição Spike ($200 \mu\text{g L}^{-1}$)	80,17	59,92
Pasteurização e Adição de Spike ($200 \mu\text{g L}^{-1}$)	123,83	38,09
Adição de Spike ($200 \mu\text{g L}^{-1}$) e Pasteurização	132,69	33,65
Forno e Adição de Spike ($200 \mu\text{g L}^{-1}$)	136,87	31,57
Adição de Spike ($200 \mu\text{g L}^{-1}$) e Forno	94,77	52,62

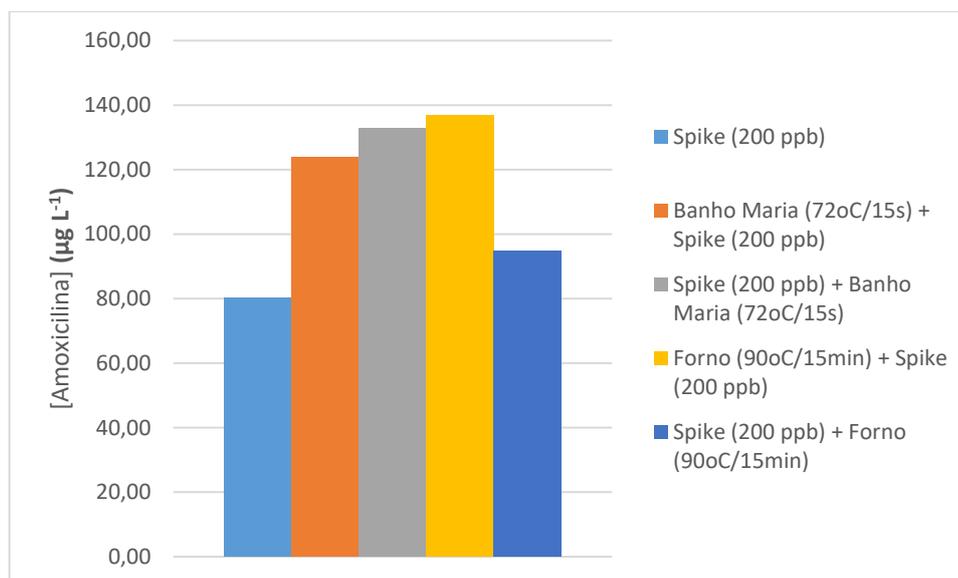
Fonte: o Autor

As amostras que receberam a adição de solução de amoxicilina apresentaram média de concentração de aproximadamente $80 \mu\text{g L}^{-1}$, o que representa uma redução de quase 60% na concentração inicial de $200 \mu\text{g L}^{-1}$. Concordando com a tendência apresentada nas concentrações de amoxicilina obtidas nos primeiros experimentos com amostras fortificadas e pasteurizadas (Grupo III). As amostras com segunda maior redução na concentração de

amoxicilina, às quais adicionou-se *spike* seguido de aquecimento em forno a 90°C por 15 minutos, apresentaram uma média de 94,77 $\mu\text{g L}^{-1}$ de amoxicilina após extração.

Processos térmicos seguidos de adição de amoxicilina apresentaram as medidas de concentração mais similares a concentração inicial. Amostras do grupo de Pasteurização e Adição têm uma concentração média de 123,83 $\mu\text{g L}^{-1}$ de amoxicilina. Similarmente, ao submeter as amostras a sequência forno a 90°C por 15 minutos seguida de adição de *spike*, houve uma redução de 31,57% com relação à concentração inicial de 200 $\mu\text{g L}^{-1}$ de amoxicilina. Entre as amostras testadas nesse dia, esse grupo apresentou a maior concentração pós processamento do leite e extração do antibiótico, 136,87 $\mu\text{g L}^{-1}$. Também, mostrou mais uma vez que um processamento térmico menos brando, prévio a adição de antibióticos β -lactâmicos, pode desativar as enzimas que degradam a β -lactamase, possibilitando uma relativa conservação de concentração da amoxicilina.

Figura 12 – Resultados obtidos da avaliação da variação da concentração da amoxicilina em diferentes processos de aquecimento.



Fonte: o Autor.

Para analisar a estabilidade do antibiótico no leite cru com relação ao tempo a uma temperatura de resfriamento controlada, preparou-se uma nova amostra com concentração final de 100 $\mu\text{g L}^{-1}$ de AMX. Com exceção da primeira triplicata, as alíquotas, previamente separadas em tubos de polipropileno, foram reservadas em freezer a uma temperatura de -10°C. Em datas específicas, transferiu-se os tubos do freezer para a geladeira, esta, a aproximadamente 4°C. O

intervalo de tempo de refrigeração entre a primeira amostra transferida do freezer para a geladeira e a análise de resíduos por LC-MS/MS completou 15 dias.

Para comparação de concentrações, uma amostra de solução de amoxicilina $100 \mu\text{g L}^{-1}$ em água foi preparada. A concentração média dessas amostras, analisadas na mesma rotina, foi de $265,30 \mu\text{g L}^{-1}$. Sugerindo efeito de matriz nas amostras de leite.

Tabela – 10 Concentrações de AMX em amostras de leite fortificado obtidas em avaliação em diferentes tempos de armazenamento a 4°C

Matriz	Data transferência	Concentração Amoxicilina ($\mu\text{g L}^{-1}$)
	Recuperação	98,11
	<i>Tissue Standard</i>	137,84
Leite Cru	06/10/2016	
	07/10/2016	
	11/10/2016	<LQ
	13/10/2016	
	14/10/2016	
	18/10/2016	25,87
Água	13/10/2016	297,96
	14/10/2016	232,63

Fonte: o Autor

O ensaio para estudar o comportamento da amoxicilina com relação a temperatura foi aliado a variação de tempo de permanência nessas condições. Em uma amostra de leite cru e isenta de antibióticos adicionou-se amoxicilina, elevando sua concentração à $10 \mu\text{g L}^{-1}$. Dividiu-se o volume total entre 7 copos de Becker. Os copos de Becker foram colocados no forno a uma dada temperatura (60°C , 70°C ou 80°C), com exceção de um. De hora em hora, um copo de Becker era retirado do forno e deixado resfriar na temperatura ambiente e circulação forçada de ar. Ao fim das 6 horas de ensaio, e com todas as amostras a temperatura ambiente, alíquotas dessas amostras foram transferidas para tubos de polipropileno. Reservou-se todas as amostras em freezer até o dia da extração em solvente.

Os ensaios foram realizados a 60°C , 70°C e 80°C . As amostras obtidas nos ensaios de 70°C foram guardadas em freezer (-10°C) por, no mínimo, uma semana até o processo de extração em solvente. As amostras obtidas do ensaio a 60°C e 80°C ficaram em freezer (-10°C) por dois dias até a sua extração.

Após tratamento dos resultados obtidos, constatou-se que as amostras dos ensaios a 70°C tiveram concentração de amoxicilina abaixo do Limite de Quantificação. As amostras do ensaio a 60°C e 80°C apresentaram concentrações acima do limite de quantificação e os valores estarão dispostos na tabela 11.

Em seus experimentos com esta enzima, Castillo *et al.* identificou que a β -lactamase pode ser inativada a temperaturas superiores a 60°C mas permanece ativa quando mantida a baixas temperaturas (4°C, -30°C, -70°C), por um período de 2 meses.(1998) Assim, uma provável explicação para os resultados obtidos com as amostras de 70°C é que estas ficaram no freezer por mais tempo que as amostras do ensaio de 60°C e 80°C, e existe a provável ação das enzimas de beta-lactamase mesmo a temperaturas negativas de armazenamento, repetiu-se o ensaio a 60°C. Os resultados obtidos estão na tabela a seguir.

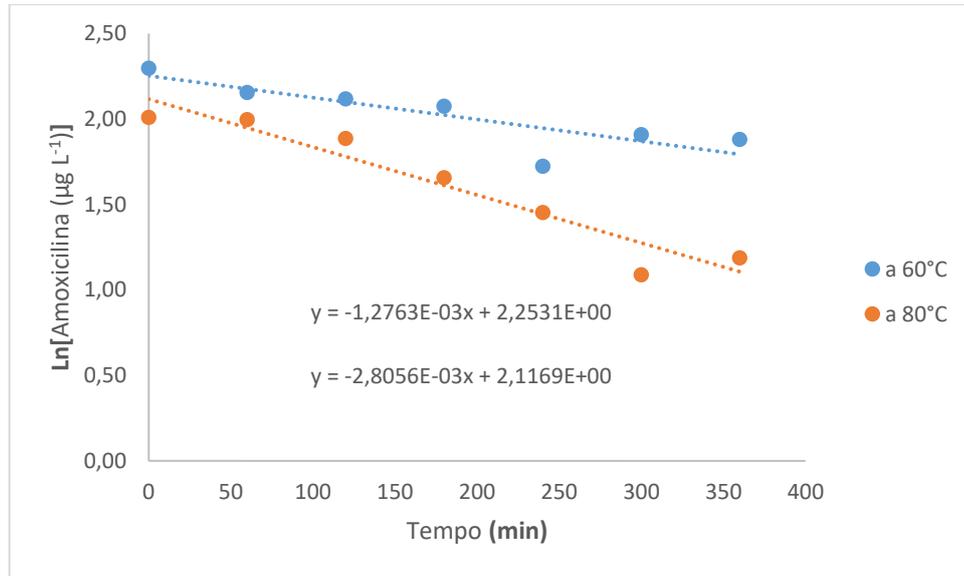
Tabela 11 – Variação da concentração de AMX a temperatura e o tempo.

Temperatura	Tempo (min)	[Amoxicilina] ($\mu\text{g L}^{-1}$)
60°C	0	9,9559
	60	8,6448
	120	8,3237
	180	7,9759
	240	5,6053
	300	6,7451
	360	6,5578
	0	7,4618
80°C	60	7,3678
	120	6,6043
	180	5,2418
	240	4,2787
	300	2,9749
	360	3,2803

Fonte: o Autor. Concentração inicial de AMX 10 $\mu\text{g L}^{-1}$

Para análise comparativa entre os dois ensaios, transformou-se os resultados obtidos acima nos seus respectivos Logaritmos Naturais, visto que a decomposição térmica de amoxicilina em leite segue um comportamento cinético de reação de primeira ordem.

Figura 13 - Variação da concentração de AMX com a temperatura e o tempo.



Fonte: o Autor.

Com os dados obtidos no ensaio e aplicando-os as equações cinéticas pertinentes a reações de primeira ordem, citadas abaixo, estima-se o tempo de meia vida para as temperaturas de 60°C e 80°C.

$$\ln[C] = \ln[C_0] - k_1 \cdot t$$

$$t_{\frac{1}{2}} = \frac{\ln 2}{k}$$

Tabela 12 – Degradação da amoxicilina em termos de tempo de meia vida.

Temperatura	k (h ⁻¹)	t _{1/2} (horas)	Dias
60°C	1,3E-03	543,1	23
80°C	2,8E-03	247,1	10

Fonte: o Autor

6. AVALIAÇÃO DE CUSTOS ENVOLVIDOS NO PROCESSO DE PASTEURIZAÇÃO

Independentemente do tipo e do sistema de intensificação da produção de leite a produção leiteira é diretamente afetada caso o rebanho não esteja saudável. A principal doença que afeta os rebanhos leiteiros de todo o mundo, e a que provoca as maiores perdas econômicas na exploração do bovino é a mastite. Estima-se que haja um prejuízo anual de cerca de 1,8 bilhão de Dólares nos EUA. No Brasil, a mastite é a causa mais provável para a perda produtiva de 12% a 15%, o que significa um total de 2,8 bilhões de litros ao ano. (MAIA, 2016)

Uma vez que a mastite pode ser transmitida através de equipamentos de ordenha contaminados ou infraestrutura pobre em manutenção de higiene, o seu controle, através da prevenção de novas infecções, tem se tornado rotina indispensável em qualquer propriedade onde haja exploração leiteira. Apesar de controversa, a utilização de antibióticos é uma ferramenta para tratamento de patogenicias como a mastite (*GMO Inside*).

Por exemplo, em uma propriedade produtora de leite no estado do Rio Grande do Sul (8,31 litros/vaca/dia) anualmente três a cada dez vacas leiteiras apresentam sintomas da mastite. (PERES NETO; ZAPPA, 2011). Considerando que sua produção seja vendida ao preço médio brasileiro, R\$ 0,480 por litro de leite, e que o prazo de segurança após a utilização de antibióticos seja respeitado, tal empresa perde cerca de R\$ 17.500,00 ao ano, devido aos resíduos de antibióticos presentes no leite.

Pasteurização a altas temperaturas e tempos mais prolongados que os previstos nas normas atuais poderia ser uma boa alternativa para a redução da concentração de resíduos de amoxicilina. Porém, como citado na seção 3.9.1, ao submeter uma amostra de leite cru a temperaturas elevadas por muito tempo, independentemente da presença de antibióticos, alteraria bruscamente as qualidades nutritivas e sensoriais do alimento (redução do conteúdo proteico como representado na Figura 2).

Em seu artigo, Roca *et al.* avaliou a cinética de degradação de vários antibióticos em leite a concentração de 5000 $\mu\text{g L}^{-1}$. Esta concentração é 1250 vezes maior que o limite máximo de resíduo para se considerar uma amostra como violada. Assim, os ensaios realizados presente trabalho buscaram avaliar uma possibilidade mais condizente com a produção leiteira e as normas Brasileiras.

O processo de Pasteurização adaptado a bancada de laboratório seguiu as especificações de norma quanto a temperaturas e tempo de processo. Mesmo assim, pode-se perceber a cada ensaio realizado ao longo deste trabalho que a pasteurização não é um bom método para redução da concentração de amoxicilina no leite cru.

Tanto nos ensaios em que se variou a ordem de adição de amoxicilina ao leite cru, quanto nos ensaios em que tempo e temperatura foram os parâmetros de avaliação de processo, foi possível verificar uma redução da concentração inicial do antibiótico. Porém, a redução se deu a tal taxa, que o produto final da pasteurização convencional apresentará elevadas concentrações de amoxicilina, ou seja, o processo de pasteurização tal como é, não reduz resíduos de Amoxicilina.

Em estudos realizados sobre o consumo de energia elétrica na produção de leite pasteurizado, a soma energética das etapas do processamento de 4000 litros de leite ao dia equivale a 766,55 kWh (BALDASSIN Junior, 2004). Ao simular a mesma produção de leite diária, porém considerando uma temperatura de 80°C, pode-se chegar aos gastos energéticos da Tabela 13.

Tabela 13 – Comparação de gastos energéticos entre dois processos de Pasteurização

Processo	Etapas	Atual (kWh)	Modificação (kWh)
Refrigeração Banco	Pós-ordenha	137,36	137,36
de Gelo	Pós-pasteurização	305,74	336,75
Sistema de	Pré-Aquecimento	217,12	217,12
aquecimento água	Pasteurização	97,48	119,64
Total		766,55 kWh	810,86 kWh

Fonte: o Autor

Considerando um laticínio de mesmas proporções e produtividade, a soma energética de todas as etapas de um processo de pasteurização a 80°C é de 810,86 kWh, um acréscimo de 44,31 kWh à pasteurização convencional. Com base nos valores de energia tabelados pela Companhia Estadual de Energia Elétrica do Rio Grande do Sul – CEEE, uma empresa gaúcha que processa leite através do método convencional de pasteurização, trabalhando 4 horas por dia, tem o gasto de 2277,60 Reais mensais com energia elétrica. Ao modificar o processo para temperatura igual a 80°C, há um acréscimo de R\$ 310,00.

7. CONCLUSÃO

A partir dos estudos realizados neste trabalho, constatou-se que:

- ✓ O procedimento de bancada utilizado mostrou-se adequado para o estudo realizado, visto que foi possível realizar tanto a cinética de degradação da AMX, bem como avaliar as implicações quando da variação da temperatura e do tempo.
- ✓ A reação de degradação da amoxicilina é dependente de temperatura e do tempo de processos.
- ✓ Testes realizados em leite cru a 60°C e a 80°C mostraram que o tempo de meia vida da AMX em leite é de, respectivamente, 23 e 10 dias. Sendo assim, qualquer variação no processo de pasteurização não é atrativo pelo fato de que a amoxicilina, para ser reduzida, precisaria de condições que alterariam o conteúdo proteico do leite além da descaracterização sensorial do mesmo.
- ✓ Uma alteração de processo a 80°C necessitaria de um investimento de R\$ 310,00 a uma empresa característica gaúcha.

Em suma, a cadeia produtiva do Leite é um sistema bastante complexo, totalmente dependente das condições sanitárias de infraestrutura. A mastite ocorre em vacas justamente devido ao descuido no quesito da higiene. Antibióticos, como a amoxicilina, são utilizados para o combate das bactérias da mastite. Sua utilização acarreta na perda de aproximadamente 36.458 litros de leite por ano, em uma propriedade produtora média gaúcha.

É necessário investir em infraestrutura adequada para o confinamento saudável das vacas e em um melhor preparo dos operadores de produção, além de um melhor critério para a utilização de antibióticos para casos diversos a tratamento de doenças. Esses fatores podem reduzir as ocorrências de mastite no rebanho leiteiro e, conseqüentemente, a presença de resíduos de antibióticos no leite.

REFERÊNCIAS

- BALDASSIN JUNIOR, Ricardo, CORTEZ, Luís Augusto Barbosa, JORDAN, Rodrigo Aparecido et al. Consumo de energia elétrica de um laticínio tipo "A" e estudo de racionalização do uso de energia elétrica nos processos de resfriamento de leite e aquecimento de água: um estudo de caso.. In: **ENCONTRO DE ENERGIA NO MEIO RURAL**, 5., 2004, Campinas. Proceedings online Available from: <http://www.proceedings.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=MSC0000000022004000100041&lng=en&nrm=abn>. Access on: 24 Nov. 2016.
- BEEF Procedures: Antibiotic Use. 2016. Elaborado por South Dakota State University. Disponível em: <<http://www.sdstate.edu/beef-procedures-antibiotic-use>>. Acesso em: 03 nov. 2016.
- BRASÍLIA. Maria Aparecida Pinto. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. **Controle da Mastite.** Disponível em: <http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/Agencia8/AG01/arvore/AG01_198_21720039247.html>. Acesso em: 03 nov. 2016.
- BRASÍLIA. Maria Aparecida Brito. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. **Mastite.** 2009. Disponível em: <http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/Agencia8/AG01/arvore/AG01_202_21720039247.html>. Acesso em: 03 nov. 2016.
- CASTILLO, Marta C de et al. Properties of β -lactamase from *Neisseria gonorrhoeae*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. Rio de Janeiro, p. 237-241. 15 jan. 1998. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/mioc/v93n2/3424.pdf>>. Acesso em: 23 nov. 2016.
- DUARTE VILELA (Juiz de Fora). Embrapa Gado de Leite (Org.). **Sistemas de produção de leite para diferentes regiões do Brasil:** Parâmetros de qualidade do leite. 2011. Disponível em: <<http://www.cnpgl.embrapa.br/sistemaproducao/4723-residuos-quimicos>>. Acesso em: 15 dez. 2016.
- ELVIRA APARECIDA CENTEIO (São Paulo). Médica Veterinária. **Clamoxyl® LA:** Amoxicilina. 2016. Disponível em: <<http://www.shoppingdocampo.com.br/clamoxyl-la-amoxicilina-50ml-p180>>. Acesso em: 03 nov. 2016.

EUA. Anna. Gmo Inside. **What you Need to Know About Antibiotics in the Dairy Industry**. 2012. Disponível em: <<http://gmoinside.org/antibiotics-dairy-industry/>>. Acesso em: 03 nov. 2016.

FELLOWS, P. J. et al. **Tecnologia do Processamento de Alimentos: Princípios e Prática**. 2. ed. Porto Alegre: Artmed, 2006. 602 p. Tradução: Florencia Cladera Oliveira, Jane Maria Rubensan, Julio Alberto Nitzke, Roberta Cruz Silveira Thys. Consultoria, supervisão e revisão técnica desta edição: Julio Alberto Nitzke.

GRUNWALD, Ludger; PETZ, Michael. Food processing effects on residues: Penicillins in milk and yoghurt. **Analytica Chimica Acta**. Wuppertal, p. 73-79. 25 out. 2002.

IBGE: produção de leite cresceu 2,7% em 2014; Sul tornou-se a maior região produtora. 2015. Disponível em: <<http://www.milkpoint.com.br/cadeia-do-leite/giro-lacteo/ibge-producao-de-leite-cresceu-27-em-2014-sul-tornouse-a-maior-regiao-produtora-97326n.aspx>>. Acesso em: 03 nov. 2016.

JUNZA, A. et al. High resolution mass spectrometry in the identification of transformation products and metabolites from β -lactam antibiotics in thermally treated milk. *Journal Of Chromatography A*. Barcelona, p. 89-99. 2 out. 2014.

LANAGROS. 2016. Ministério da Agricultura. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/laboratorios/lanagros>>. Acesso em: 15 nov. 2016.

LANGONI, H. et al. Tratamento da Mastite Bovina com Amoxicilina e Enrofloxacina bem como com sua associação. **Arquivo do Instituto de Biologia**, Botucatu, v. 67, n. 2, p.177-180, dez. 2000. Disponível em: <<http://revistas.bvs-vet.org.br/arqib/article/view/25742/26604>>. Acesso em: 03 nov. 2016.

LOPES, Luis Oliveira; LACERDA, Moacir Santos de; RONDA, Juliano Bérghamo. **Uso de antibióticos na cura e controle de mastite clínica e subclínica causada por principais microrganismos contagiosos em bovinos leiteiros: Revisão de Literatura**. Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária, Uberaba, v. 11, n. 21, p.1-15, jun. 2013. Semestral. Disponível em: <http://faef.revista.inf.br/imagens_arquivos/arquivos_destaque/RyKnT9CEMC8Q2de_2013-8-13-18-19-12.pdf>. Acesso em: 03 nov. 2016.

MAIA, Guilherme Baptista da Silva et al. Produção leiteira no Brasil. **BNDES Setorial: Agropecuária**, Rio de Janeiro, v. 1, n. 37, p.371-398, mar. 2013. Disponível em: <<https://web.bndes.gov.br/bib/jspui/handle/1408/1514?mode=full>>. Acesso em: 03 nov. 2016.

MIYASAKA, Daniela. **Como controlar a Mastite Bovina**. 2014. Disponível em: <<http://www.milkpoint.com.br/anuncie/novidades-dos-parceiros/como-controlar-a-mastite-bovina-88520n.aspx>>. Acesso em: 03 nov. 2016.

NERO, Luís Augusto et al. **Resíduos de antibióticos em leite cru de quatro regiões leiteiras no Brasil**. Ciência e Tecnologia de Alimentos, Campinas, v. 2, n. 27, p.391-393, jun. 2007. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/cta/v27n2/30.pdf>>. Acesso em: 03 nov. 2016.

OUROFINO (São Paulo). **Mastite Bovina**. 2012. Disponível em: <<http://www.ourofinosaudeanimal.com/blog/mastite-bovina/>>. Acesso em: 02 nov. 2016.

PERES NETO, Floriano; ZAPPA, Vanessa. **MASTITE EM VACAS LEITEIRAS: REVISÃO DE LITERATURA**. Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária, Garça, v. IX , n. 16, p.1-28, jan. 2011. Semestral. ISSN: 1679-7353. Disponível em: <http://faef.revista.inf.br/imagens_arquivos/arquivos_destaque/5birfPwQOBxdHFp_2013-6-26-11-19-44.pdf>. Acesso em: 03 nov. 2016.

PORCIONATO, Marco Aurélio de Felício; SANTOS, Marcos Veiga. **A anatomia do úbere e tetos pode afetar a CCS e ocorrência de mastites**. 2009. Disponível em: <<http://www.milkpoint.com.br/radar-tecnico/qualidade-do-leite/a-anatomia-do-ubere-e-tetos-pode-afetar-a-ccs-e-ocorrencia-de-mastites-58860n.aspx>>. Acesso em: 03 nov. 2016.

RAIA JÚNIOR, Roberto Bellizia. **Fatores Fisiológicos, clínicos e farmacológicos, determinantes de resíduos de antimicrobiano no leite, avaliados em protocolos terapêuticos de mastite em bovinos leiteiros**. 2006. 85 f. Tese (Doutorado) - Curso de Farmácia, Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006. Disponível em: <<http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/9/9141/tde-31072006-141628/pt-br.php>>. Acesso em: 03 nov. 2016.

RAIA JÚNIOR, Roberto Bellizia. **Influência da Mastite na ocorrência de Resíduos de Antimicrobianos no leite**. 2001. 106 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Farmácia, Toxicologia A Análises Toxicológicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2001. Disponível em: <www.teses.usp.br/teses/disponiveis/9/9137/tde-25042006-143156/.../RobertoRaia.pdf>. Acesso em: 03 nov. 2016.

REZENDE, Geisiane Gonçalves. **Antibióticos intramamários na lactação: pequenas medidas gerando grandes resultados.** 2009. Disponível em: <<http://www.agrolink.com.br/saudeanimal/NoticiaDetalhe.aspx?codNoticia=84293>>. Acesso em: 03 nov. 2016.

ROCA, M. et al. Effect of heat treatments on stability of β -lactams in milk. **Journal Of Dairy Science.** Espanha, p. 1155-1164. 11 nov. 2010.

RUBEZ, Jorge. **O Leite nos últimos 10 anos.** 2003. Presidente da Leite Brasil - Associação Brasileira dos Produtores de Leite. Disponível em: <http://www.leitebrasil.org.br/artigos/jrubez_093.htm>. Acesso em: 03 nov. 2016.

RUEGG, Pamela L.. **Improving Treatments of Subclinical Mastitis.** 2015. Disponível em: <<http://milkquality.wisc.edu/whats-new/treatment-of-subclinical-mastitis/>>. Acesso em: 03 nov. 2016.

RUEGG, Pamela L.. **Responsible Use of Antibiotics for Treatment of Clinical Mastitis.** 2015. Disponível em: <<http://articles.extension.org/pages/72958/responsible-use-of-antibiotics-for-treatment-of-clinical-mastitis>>. Acesso em: 03 nov. 2016.

SANTANA, Elsa Helena Walter de. **Pasteurização: qual a importância deste processo para o leite?** 2015. Disponível em: <<http://www.milkpoint.com.br/industria/radar-tecnico/microbiologia/pasteurizacao-qual-a-importancia-deste-processo-para-o-leite-94246n.aspx>>. Acesso em: 04 nov. 2016.

SANTOS, Marcos Veiga. **Causas da presença de resíduos de antibióticos no leite.** 2000. Disponível em: <<http://www.milkpoint.com.br/radar-tecnico/qualidade-do-leite/causas-da-presenca-de-residuos-de-antibioticos-no-leite-16164n.aspx>>. Acesso em: 03 nov. 2016.

SANTOS, Marcos Veiga. **Como evitar a presença de resíduos de antibióticos no leite?** 2000. Disponível em: <<http://www.milkpoint.com.br/radar-tecnico/qualidade-do-leite/como-evitar-a-presenca-de-residuos-de-antibioticos-no-leite-16166n.aspx>>. Acesso em: 03 nov. 2016.

SANTOS, Marcos Veiga. **Resíduos de antibióticos no leite: por que evitá-los?** 2000. Disponível em: <<http://www.milkpoint.com.br/radar-tecnico/qualidade-do-leite/residuos-de-antibioticos-no-leite-por-que-evitalos-16163n.aspx>>. Acesso em: 03 nov. 2016.

SANTOS, Marcos Veiga. **Tratamento Intramamário ou Intramuscular: qual a melhor opção para vacas com mastite?** 2014. Disponível em:

<http://www.milkpoint.com.br/mypoint/6239/p_tratamento_intramamario_ou_intramuscular_qual_a_melhor_opcao_para_vacas_com_mastite_5555.aspx>. Acesso em: 03 nov. 2016.

SUL torna-se a maior região produtora de leite; região Nordeste lidera crescimento na produção. 2015. Disponível em: <<http://www.milkpoint.com.br/cadeia-do-leite/giro-lacteo/sul-tornase-a-maior-regiao-produtora-de-leite-regiao-nordeste-lidera-crescimento-na-producao-97403n.aspx>>. Acesso em: 03 nov. 2016.

TEIXEIRA, Ana et al. **Medicamentos de uso Veterinário**. 2013. Blog elaborado no âmbito da Unidade Curricular Farmacoterapia I, integrada no 3º ano da Licenciatura em Farmácia da Escola Superior de Saúde do Instituto Politécnico de Bragança. Disponível em: <<http://medicamentodeusoveterinario.blogspot.com.br/p/bovinos.html>>. Acesso em: 03 nov. 2016.

TOSCAN, Angelisa. **Espectroscopia no Infravermelho e Método Quimiométrico para a pesquisa de Antimicrobianos em leite da Microrregião de Pato Branco - PR**. 2016. 107 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos, Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos, Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Pato Branco, 2016. Disponível em: <http://www.utfpr.edu.br/patobranco/estrutura-universitaria/diretorias/dirppg/pos-graduacao/mestrados/ppgtp/discentes/PB_PPGTP_M_ToscanAngelisa_2016.pdf>. Acesso em: 15 dez. 2016.

WHAT'S the Problem with Antibiotics in Dairy Production? 2014. Elaborado por Traders Point Creamery. Disponível em: <<http://traderspointcreamery.com/whats-the-problem-with-antibiotics-in-dairy/>>. Acesso em: 03 nov. 2016.

ZOCCAL, Rosangela; DUSI, Geraldo Alvim. **Modelo ideal para produção de leite no Brasil**. Animal Business: Brasil, Brasil, v. 9, p.34-37, 30 abr. 2013. Sociedade Nacional de Agricultura. Disponível em: <https://issuu.com/sociedadenedacionaldeagricultura/docs/abb_09>. Acesso em: 03 nov. 2016.