

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ALIMENTOS DE ORIGEM ANIMAL**

**MONITORAMENTO DA MATÉRIA-PRIMA RECEBIDA POR
ESTABELECIMENTOS DE LEITE E DERIVADOS COM INSPEÇÃO ESTADUAL
NO RIO GRANDE DO SUL, COMO SUBSÍDIO PARA A ELABORAÇÃO DO
PROGRAMA ESTADUAL DE CONTROLE DE RESÍDUOS DE
ANTIMICROBIANOS EM LEITE CRU**

KARLA PRESTES PIVATO

Porto Alegre

2019

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ALIMENTOS DE ORIGEM ANIMAL

MONITORAMENTO DA MATÉRIA-PRIMA RECEBIDA POR
ESTABELECIMENTOS DE LEITE E DERIVADOS COM INSPEÇÃO ESTADUAL
NO RIO GRANDE DO SUL, COMO SUBSÍDIO PARA A ELABORAÇÃO DO
PROGRAMA ESTADUAL DE CONTROLE DE RESÍDUOS DE
ANTIMICROBIANOS EM LEITE CRU

Autora: Karla Prestes Pivato

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Alimentos de Origem Animal, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciências Veterinárias na área de Ciência e Tecnologia de Alimentos.

Orientadora: Profa. Dra. Márcia Monks Jantzen

Co-orientadora: Profa. Dra. Saionara Araújo Wagner

Porto Alegre

2019

CIP - Catalogação na Publicação

PIVATO, KARLA PRESTES
MONITORAMENTO DA MATÉRIA-PRIMA RECEBIDA POR
ESTABELECIMENTOS DE LEITE E DERIVADOS COM INSPEÇÃO
ESTADUAL NO RIO GRANDE DO SUL, COMO SUBSÍDIO PARA A
ELABORAÇÃO DO PROGRAMA ESTADUAL DE CONTROLE DE
RESÍDUOS DE ANTIMICROBIANOS EM LEITE CRU / KARLA
PRESTES PIVATO. -- 2019.

59 f.

Orientadora: MÁRCIA MONKS JANTZEN.

Coorientadora: SAIONARA ARAÚJO WAGNER.

Dissertação (Mestrado Profissional) -- Universidade
Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de
Veterinária, Programa de Pós-Graduação em Alimentos de
Origem Animal, Porto Alegre, BR-RS, 2019.

1. CONTROLE DE RESÍDUOS DE ANTIMICROBIANOS EM LEITE
CRU. I. JANTZEN, MÁRCIA MONKS, orient. II. WAGNER,
SAIONARA ARAÚJO, coorient. III. Título.

Karla Prestes Pivato

MONITORAMENTO DA MATÉRIA-PRIMA RECEBIDA POR ESTABELECIMENTOS DE LEITE E DERIVADOS COM INSPEÇÃO ESTADUAL NO RIO GRANDE DO SUL, COMO SUBSÍDIO PARA A ELABORAÇÃO DO PROGRAMA ESTADUAL DE CONTROLE DE RESÍDUOS DE ANTIMICROBIANOS EM LEITE CRU

Aprovada em: ___/___/___

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Alimentos de Origem Animal, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciências Veterinárias na área de Ciência e Tecnologia de Alimentos.

APROVADO POR:

Prof. Dra. Márcia Monks Jantzen

Orientador e Presidente da Comissão

Prof. Dra. Amanda de Souza Motta

Membro da Comissão

Prof. Dr. César Augusto Marchionatti Avancini

Membro da Comissão

Prof. Dr. Leonardo Werlang Isolan

Membro da Comissão

RESUMO

Um dos grandes desafios a ser enfrentado pela humanidade é a segurança de alimentos. A presença de resíduos e de contaminantes em alimentos de origem animal destinados ao consumo humano é um dos resultados indesejáveis da produção. A ampla utilização de antimicrobianos na clínica veterinária de forma indiscriminada interfere na produção de derivados lácteos, tem efeitos graves na saúde dos consumidores e contribui com o aumento progressivo da resistência bacteriana. O presente estudo teve como objetivo monitorar e identificar quantitativamente resíduos de antimicrobianos em leite cru recebido nos 25 estabelecimentos de leite e derivados registrados na Divisão de Inspeção de Produtos de Origem Animal da Secretaria da Agricultura, Pecuária e Desenvolvimento Rural (SEAPDR-RS). Inicialmente foi aplicado um questionário às indústrias, com o objetivo de verificar quais grupos de antimicrobianos estavam sendo pesquisados no leite cru recebido. Todas monitoravam a matéria-prima recebida quanto a antimicrobianos das classes beta-lactâmicos e tetraciclina sendo que 8 delas monitoravam, além dos citados, as sulfonamidas, aminoglicosídeos, macrolídeos e cefalosporinas. A unidade amostral foi a rota geográfica onde estavam distribuídos os produtores de leite. Foram coletadas 103 amostras (rotas) de leite cru nos 25 estabelecimentos de leite e derivados pelos Fiscais Estaduais Agropecuários da SEAPDR-RS, responsáveis pela inspeção nos respectivos estabelecimentos. A coleta de leite cru ocorreu na plataforma de recepção, diretamente dos compartimentos do tanque de aço inoxidável do veículo de transporte. As amostras eram remetidas ao Laboratório Nacional Agropecuário (LANAGRO – RS) do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), que efetuou a pesquisa de resíduos de antimicrobianos e análise do limite máximo de resíduo (LMR) descrito no Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes (PNCRC) do MAPA. Foi utilizada a técnica de cromatografia líquida acoplada ao espectrômetro de massas. Os resultados obtidos revelaram que todas as amostras analisadas ficaram abaixo do limite de quantificação. Estes dados servem como subsídio para a elaboração de um esboço do Programa Estadual de Controle de Resíduos de Antimicrobianos em Leite Cru, visando a promover as diretrizes para o monitoramento e as ações de controle sanitário e fiscalização agropecuária da SEAPDR-RS.

Palavras-chave: leite cru, resíduos de antimicrobianos, programa estadual de controle de resíduos.

Abstract

One of the great challenges that humanity will need to face is food safety. The presence of residues and contaminants in food of animal origin for human consumption is one of the undesirable results of production. The widespread use of antimicrobials in the veterinary clinic indiscriminately interferes with the production of dairy products, has serious effects on consumers' health and contributes to the progressive increase of bacterial resistance in both animals and humans. The present study aimed to monitor and quantitatively identify antimicrobial residues in raw milk received at the 25 milk and dairy establishments registered in the Division of Inspection of Animal Origin Products of State Agriculture Secretary (SEAPDR-RS). Initially, a questionnaire was applied to the industries, in order to verify which groups of antimicrobials were researched on the raw milk received. All monitored the raw material received for beta-lactam and tetracycline antimicrobials and 8 of them also monitored sulfonamides, aminoglycosides, macrolides and cephalosporins. The sampling unit was the geographical route where the milk producers were distributed. A total of 103 raw milk samples (routes) were collected at the 25 milk and dairy establishments by the Inspectors of SEAPDR-RS, responsible for inspecting the respective establishments. Raw milk was collected at the industry platform, directly from the transport vehicle's stainless-steel tank compartments. The samples were sent to the National Agricultural Laboratory (LANAGRO – RS) of the Ministry of Agriculture (MAPA), which carried out antimicrobial residue research and analysis of the maximum residue limit (MRL) described in the National Plan for Control of Waste and Contaminants (PNCRC) of the MAPA. The technique of liquid chromatography coupled to the mass spectrometer was used. The results showed that all samples analyzed were below the limit of quantification. These data serve for the elaboration of a draft of the State Raw Milk Antimicrobial Waste Control Program, aiming to promote the guidelines for the monitoring and actions of sanitary control and agricultural inspection of SEAPDR-RS.

Keywords: raw milk, antimicrobial residues, residue control state program.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Identificação e quantidade de classes de antimicrobianos pesquisadas nos testes de triagem, em relação aos estabelecimentos industriais registrados na SEAPDR.	41
Figura 2 - Distribuição das rotas dos estabelecimentos de leite e derivados por supervisão regional da SEAPDR.....	42

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Número de rotas a serem coletadas em cada estabelecimento industrial.....	33
Tabela 2 – Limite de quantificação (LQ), limite máximo de resíduo (LMR) na matriz leite para cada analito, capacidade de detecção (CC β) e limite de quantificação (LQ).....	36
Tabela 3 - Limite de quantificação (LQ) e limite máximo de resíduo (LMR), em leite.....	37
Tabela 4 - Limite de quantificação (LQ) e limite máximo de resíduo (LMR) em matriz leite para Anfenicóis.....	42

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	10
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	13
2.1	Produção e consumo de leite	13
2.2	Agentes antimicrobianos e seus efeitos	18
2.3	Resistência bacteriana	21
2.4	Pesquisa de antimicrobianos em leite cru.....	23
2.5	Controle de resíduos no leite e legislação.....	27
3	MATERIAL E MÉTODOS	32
3.1	Identificação dos grupos de antimicrobianos pesquisados, no leite cru, pelos laticínios	32
3.2	Determinação das rotas a serem analisadas: o plano amostral	32
3.3	Coleta da matéria-prima nas indústrias participantes da pesquisa.....	34
3.4	Ensaio laboratoriais	35
3.5	Elaboração de esboço do programa estadual de controle de resíduos de antimicrobianos em leite cru	39
3.6	Análise dos resultados	39
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	40
4.1	Análise do questionário aplicado aos laticínios.....	40
4.2	Estabelecimentos industriais, rotas e amostras coletadas.....	41
4.3	Análise dos dados laboratoriais das amostras de leite	42
4.4	Confecção de esboço do programa estadual de controle de resíduos de antimicrobianos em leite cru	46
5	CONCLUSÃO.....	48
	REFERÊNCIAS	49
	ANEXO I – Questionário	55
	APÊNDICE A - Esboço de Programa Estadual de Controle de Resíduos de Antimicrobianos em Leite Cru	55
	APÊNDICE A - Esboço de Programa Estadual de Controle de Resíduos de Antimicrobianos em Leite Cru	56
	APÊNDICE B - Instrutivo de procedimento para coleta de leite	58
	APÊNDICE C – Requisição para análise	59
	APÊNDICE D – Memorando de solicitação de coleta	60

1 INTRODUÇÃO

Desde o início da década de 1990, quase todos os países em desenvolvimento têm como estratégia de crescimento a maior inserção no mercado externo, ampliando a concorrência e buscando atender demandas cada vez mais exigentes. Com relação ao mercado de produtos lácteos, as restrições por medidas técnicas que impõem padrões de qualidade sanitária e de higiene são cada vez mais rigorosas, selecionando o acesso a mercados internacionais importantes (RUBIN; RUBIN, 2010).

A qualidade e a segurança dos alimentos têm recebido cada vez mais atenção da população mundial, especialmente em relação a perigos microbiológicos e químicos presentes em alimentos. Apesar de microrganismos patogênicos serem os agentes mais comumente relacionados a enfermidades veiculadas por alimentos, a presença de resíduos de substâncias químicas também é pertinente em todo o mundo (NERO *et al.*, 2007).

Dentre os produtos mais diversos, o leite corresponde ao de maior valor nutricional. Nos sistemas de produção de gado leiteiro, a administração de drogas e de suplementos é utilizada para se alcançar bons resultados de saúde e de ganho de peso dos animais. O uso de antimicrobianos acontece no tratamento de doenças como mastite, actinobacilose, actinomicose, diarreia e pneumonia (COSTA *et al.*, 2017).

Nos últimos anos, a presença de resíduos de produtos químicos, especialmente antibióticos e pesticidas, em alimentos de origem animal tornou-se uma questão de saúde pública. A população mundial é comumente exposta a resíduos através de micro doses presentes nos alimentos, resultando em uma variedade de efeitos graves para a saúde, como hipersensibilidade, choque anafilático, anemia, desequilíbrio da flora intestinal, problemas renais, efeito teratogênico e problemas no desenvolvimento ósseo fetal, além da resistência bacteriana, que pode levar ao insucesso da antibioticoterapia (SCHLEMPER; SACHET, 2017).

Além destes problemas, a presença de resíduos químicos em leite pode causar inibição na multiplicação de sua microbiota, interferindo nos resultados de análises laboratoriais de controle de qualidade, bem como na fabricação de derivados como queijos e iogurtes, sendo responsável pela redução da produção de ácidos e sabores na manteiga e na maturação de queijos. Segundo Nero *et al.* (2007), concentrações a partir de 1 partes por bilhão (ppb) de antimicrobianos pode atrasar a atividade de culturas *starter* na produção de queijos, iogurtes e manteiga, além de danificar as características estruturais e sensoriais desses produtos (SCHLEMPER; SACHET,

2017). Como consequência, as indústrias obtêm prejuízos que não são minimizados pelos tratamentos térmicos aos quais o leite cru é submetido (GALVANI, 2016).

A presença de resíduos de antimicrobianos no leite pode ocorrer por muitas razões, como o uso indiscriminado desses medicamentos para o tratamento de doenças nos rebanhos, a utilização de doses prolongadas ou excessivas e, ainda, adição intencional para inibir o crescimento bacteriano por deficiência na qualidade higiênica do leite (SCHLEMPER; SACHET, 2017). Essas substâncias são eliminadas pelo leite durante seus períodos de carência, sendo necessário o descarte dessa produção. Sendo assim, a conscientização dos produtores é fundamental para prevenção de resíduos desses medicamentos em leite (NERO *et al.*, 2007).

Diante do exposto, o monitoramento do uso de antimicrobianos é essencial para garantir a segurança dos alimentos, assim como o fornecimento de orientação adequada aos produtores rurais sobre a utilização dessas substâncias, de forma a prevenir a presença desses resíduos químicos no leite consumido pela população (SCHLEMPER; SACHET, 2017).

No Brasil, a Instrução Normativa nº 77 (BRASIL, 2018a) exige a pesquisa periódica de resíduos de antibióticos e de outros inibidores do crescimento microbiano em leite. Vários *kits* analíticos de detecção de resíduos de antibióticos são utilizados pelos estabelecimentos industriais, para o controle da presença dessas substâncias em leite, empregando diferentes princípios de ação e detecção (NERO *et al.*, 2007).

A Instrução Normativa nº 42 (BRASIL, 1999) estabelece o Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes em Produtos de Origem Animal (PNCRC), realizado por uma rede de laboratórios do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), cujo objetivo é conhecer e evitar a violação dos níveis de segurança ou dos Limites Máximos de Resíduos (LMR's) de substâncias autorizadas, bem como a ocorrência de quaisquer níveis de resíduos de compostos químicos de uso proibido no país.

A Divisão de Inspeção de Produtos de Origem Animal (DIPOA) é o órgão da SEAPDR-RS responsável pela inspeção de produtos de origem animal no Estado, atuando em estabelecimentos de carnes e derivados, de pescado e derivados, de ovos e derivados, de leite e derivados, de produtos de abelhas e derivados, de armazenagem e de produtos não comestíveis.

Os estabelecimentos de leite e derivados são classificados em granja leiteira, posto de refrigeração, usina de beneficiamento, fábrica de laticínios, micro usina de beneficiamento e de industrialização de leite e microqueijaria.

Este trabalho tem o intuito de monitorar e identificar quantitativamente resíduos de antimicrobianos em leite cru produzido em estabelecimentos de leite e derivados registrados na DIPOA, os quais recebem entre 3.700 e 1.233.165 litros de leite cru por mês a granel para

beneficiamento e/ou industrialização. Com isso, espera-se gerar dados para subsidiar o planejamento do Programa Estadual de Controle de Resíduos de Antimicrobianos em leite cru, no Estado do Rio Grande do Sul.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Produção e consumo de leite

De acordo com a Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (CARVALHO; ROCHA; CARNEIRO, 2018), o Brasil é o 4º maior produtor de leite do mundo. Conforme o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), no 1º trimestre de 2019, a aquisição de leite cru, feita pelos estabelecimentos que atuam sob algum tipo de inspeção sanitária (Federal, Estadual ou Municipal) foi de mais de 6,0 bilhões de litros, equivalente a um aumento de 3,0% em relação ao primeiro trimestre de 2018. Em nível de Unidades da Federação, os aumentos mais relevantes, em valores absolutos, ocorreram em Goiás (+76,61 milhões de litros), Paraná (+43,71 milhões de litros), Minas Gerais (+42,80 milhões de litros) e Ceará (+13,75 milhões de litros). As reduções mais significativas ocorreram no Rio de Janeiro (-17,67 milhões de litros), São Paulo (-15,58 milhões de litros) e Rio Grande do Sul (-10,24 milhões de litros). Minas Gerais continua liderando o *ranking* nacional de aquisição de leite, com 25,3% da aquisição nacional, seguida do Rio Grande do Sul (13,1%) e do Paraná (12,8%) (BRASIL, 2019).

A maior parte da captação de leite pelos laticínios brasileiros tem sido realizada por estabelecimentos de grande porte, que receberam mais de 50 mil litros de leite/dia (14,3% do total de estabelecimentos) e foram responsáveis por 84,1% do volume de leite cru captado no 1º trimestre de 2019 (BRASIL, 2019). Conforme a Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 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 (GALVANI, 2016).

O leite é composto de 87% de água, 4% a 5% de lactose, 3% de proteínas, 3% a 4% de gorduras, 0,8% de minerais e 0,1% de vitaminas. Destes nutrientes, destacam-se as proteínas, com sua gama completa de aminoácidos essenciais; a gordura, com presença de ácidos graxos saturados e insaturados; os 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 de lactose e de outros oligossacarídeos, que são reconhecidas fontes de energia (GALVANI, 2016). Segundo Costa (2009), um litro de leite por dia supre todas as necessidades de proteína de crianças até seis anos de idade, mais de 60% das necessidades proteicas dos adolescentes e 50% das necessidades proteicas dos adultos, além de 100% das necessidades de cálcio, importante para a saúde óssea.

Outros componentes do leite possuem efeitos benéficos sobre a saúde. O ácido butírico e os esfingolipídios, na prevenção do câncer de cólon; os polipeptídios na diminuição do risco de hipertensão; o ácido linoleico conjugado, na função imunológica e na diminuição do risco de certos tipos de câncer; o ácido esteárico, no controle dos lipídios sanguíneos; a fermentação com probióticos, na absorção de lactose e de outros nutrientes, na melhoria da imunidade e na diminuição de certas doenças infecciosas (COSTA, 2009).

Dessa forma, o leite é um produto de grande importância nutricional, cujo consumo é essencial para determinados grupos da população, tanto na forma de leite quanto de seus derivados, sendo que a produção de leite, no Brasil, proporciona a geração de renda no campo e crescimento significativo na atividade. (PORTZ; COUTO; FERREIRA, 2014). Além disso, o leite é considerado como o alimento mais perfeito da natureza e é tido como o principal alimento de recém-nascidos e crianças. É avaliado pelos consumidores como exemplo de alimento nutritivo, seguro, saudável e natural (BRITO, 2000).

Devido à alta atividade produtiva, a glândula mamária dos animais de produção está mais propícia a reações inflamatórias e à instalação de agentes infecciosos, o que afeta qualitativa e quantitativa a produção de leite. Em função desse processo, opta-se pelo tratamento dos animais com antimicrobianos, o que pode causar a contaminação da matéria-prima com resíduo dessas substâncias (COSTA, 2009). 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). Segundo Galvani (2016), em alimentos, diversos são os contaminantes químicos e resíduos que podem ser encontrados, como as micotoxinas, os pesticidas, os contaminantes ambientais e/ou industriais e os medicamentos veterinários.

A presença, em níveis prejudiciais à saúde, de resíduos de medicamentos veterinários e contaminantes nos alimentos, como garantia de sua segurança, é um assunto muito discutido e exigido pelo comércio internacional. Os principais países importadores de alimentos possuem e exigem um programa de controle desses resíduos e contaminantes, com limites regulatórios bem definidos (PORTZ; COUTO; FERREIRA, 2014).

A contaminação do leite com resíduos de drogas ou de outras substâncias químicas é um componente importante da segurança alimentar e coloca o consumidor em alerta. É também motivo de preocupação para a indústria de laticínios, porque os resíduos podem interferir na tecnologia de produção dos derivados. Portanto, para que o leite possa manter a reputação de alimento seguro e nutritivo, deve estar livre de resíduos de antimicrobianos (BRITO, 2000). Os problemas relacionados à qualidade do leite e veiculados na mídia levam os consumidores a

associar o leite beneficiado pela indústria a produto adulterado, ao mesmo tempo em que consideram o leite de produção informal e sem tratamento como um produto puro e saudável, sendo que este não passa por qualquer controle de qualidade e por fiscalização e, ambos, oferecem riscos à saúde das pessoas (AMORIM, 2017).

Os fármacos veterinários incluem-se na categoria de contaminantes alimentares, pois são introduzidos de forma não intencional nos alimentos, por meio da sua administração terapêutica em animais (NUNES, 2013). O leite produzido pela glândula mamária é obtido a partir de elementos que passam da corrente sanguínea para as células especializadas desta glândula. Neste momento, medicamentos veterinários, como os antimicrobianos, que anteriormente tenham sido administrados no animal, em decorrência de tratamento de doenças, podem passar para o leite (SILVA, 2009). Dessa maneira, a população humana fica exposta a baixas concentrações desses contaminantes, uma vez que os resíduos detectados com frequência no leite originam-se de fármacos antimicrobianos. A possibilidade de estas substâncias estarem presentes no alimento representa potencial risco à saúde do consumidor e constitui um sério problema econômico para o país, ocasionando perdas financeiras ao produtor e ao fabricante de produtos lácteos (NUNES, 2013).

A presença de resíduos de antimicrobianos no leite representa o principal ponto crítico de controle de contaminação química do leite (COSTA, 2009) e pode ocorrer por muitas razões, como o uso indiscriminado desses medicamentos para o tratamento de doenças nos rebanhos, a utilização de doses prolongadas ou excessivas de drogas e, ainda, adição intencional para inibir o crescimento bacteriano por deficiência na qualidade higiênica do leite (SCHLEMPER; SACHET, 2017).

A contaminação do leite de consumo decorrente do tratamento de vacas em lactação ocorre por problemas de mastite, metrite ou outras doenças infecciosas, sendo que, após a aplicação pelas vias parenteral, oral, intrauterina e intramamária, os antimicrobianos passam do sangue para o leite. A excreção de antimicrobianos no leite varia de produto para produto. Após aplicação intravenosa, dependendo do tipo de preparação e da dose administrada, poderão aparecer resíduos por um período de 12 a 48 horas. O padrão de excreção após aplicação intramuscular é semelhante ao da aplicação intravenosa, só que o período de excreção é prolongado (entre 6 a 150 horas). Os produtos utilizados para tratamento durante a lactação, por via intramamária, geralmente apresentam um período de excreção entre 24 e 96 horas, sendo esta via considerada a principal fonte de contaminação do leite (BRITO, 2000).

Segundo Asredie e Engdaw (2015), a causa mais importante para a ocorrência de resíduos de antimicrobianos em tecidos animais é o período de tempo insuficiente para que a droga seja

eliminada dos alimentos, assim como a manutenção inadequada dos registros do tratamento, a falha em identificar adequadamente os animais tratados e uso indevido de produtos. O estado da doença de um animal e o modo como as drogas são administradas influenciam o potencial de resíduos. A doença pode afetar a farmacocinética da droga, uma vez que o metabolismo ou a presença de infecção e/ou inflamação podem fazer com que a droga se acumule nos tecidos afetados.

Há diferentes grupos de antimicrobianos disponíveis para tratamento de gado leiteiro. Os grupos mais comuns incluem beta-lactâmicos (por exemplo, penicilina), sulfonamidas (por exemplo, sulfametazina), aminoglicosídeos (por exemplo, estreptomicina) e tetraciclina (por exemplo, tetraciclina). Os animais tratados com antimicrobianos produzem leite contendo resíduos desses medicamentos por um período de tempo após o término do tratamento. Por esse motivo, as fêmeas devem ser ordenhadas, porém o leite deve ser descartado durante um período específico (indicado pelo laboratório fabricante), para assegurar que os resíduos não permaneçam no leite. Os resíduos de antimicrobianos persistem no leite quando não há respeito ao período de carência ou quando há retenção desses resíduos, pelo animal, por um período maior de tempo (BC Centre for Disease Control, 2013).

Schlemper e Sachet (2017) verificaram que, em alguns casos, mesmo depois de cumprido o período de carência informado pelo fabricante do medicamento, o leite continua a apresentar resultados positivos por mais tempo, através da realização de testes para pesquisa de antimicrobianos. Esse é um sério problema, pois além do impacto para a saúde pública, há o prejuízo para a indústria de laticínios, com despesas no processamento industrial (rejeição e descarte do leite e baixo rendimento na fabricação de derivados lácteos, por exemplo).

Um levantamento realizado no Reino Unido (Booth & Harding, 1986) demonstrou que as principais razões para o aparecimento de resíduos foram a não observação de um período de carência para a retirada do leite destinado ao consumo humano, após o tratamento; mistura acidental do leite contaminado com antibiótico ao não contaminado; excreção prolongada do antibiótico; parições antes do período esperado.

O mesmo trabalho ainda elencou como causas de verificação de resíduos de antimicrobianos, a contaminação dos equipamentos de ordenha; ordenha acidental de vacas no período seco; descarte somente do leite dos quartos tratados; deficiência ou falta de anotação dos tratamentos realizados; não identificação das vacas tratadas ou perda da identificação; falha de notificação do período de retirada do leite para consumo e uso de produtos indicados para o período seco durante a lactação (BOOTH; HARDING, 1986).

Um estudo realizado por Pugh, Hendy e Evans (1977) verificou que um volume de leite de aproximadamente 25 ml que permanece retido nas tubulações ou nos recipientes coletores é suficiente para contaminar o leite produzido por até 20 vacas. De acordo com Brito (2000), a persistência dos resíduos de antimicrobianos no leite depende de uma série de fatores, tais como o tipo da preparação que está sendo usada (substância ativa e formulação), dosagem empregada, intervalo entre o início do tratamento e a primeira ordenha, absorção pelos tecidos do úbere, quantidade de leite produzido no momento do tratamento, o estado de saúde e fatores individuais do animal.

Em uma avaliação realizada em 96 amostras de leite pasteurizado comercializado em Piracicaba, São Paulo, observou-se que 50% das amostras apresentaram resíduos de antibióticos, sendo que uma das marcas exibiu 72,5% das amostras com resíduos de penicilina (NASCIMENTO, MAESTRO E CAMPOS, 2001).

Souza *et al.* (2017) coletaram 112 amostras de leite cru oriundas de seis municípios do Estado do Rio Grande do Norte, para a pesquisa de resíduos de antimicrobianos e constataram que 6 amostras apresentaram resultado positivo para detecção de resíduos.

Um estudo preliminar foi realizado para verificar a presença de resíduos de antibióticos em amostras de leite UHT disponíveis no mercado brasileiro, nos Estados de Rio de Janeiro, Goiás, Minas Gerais, Rio Grande do Sul e São Paulo. Das 100 amostras analisadas, 4 mostraram-se positivas, sendo estas procedentes do Estado de Minas Gerais (FONSECA *et al.*, 2009).

Cerqueira *et al.* (2014) avaliaram a presença de resíduos antimicrobianos (ceftiofur, estreptomicinas, quinolonas, tetraciclina, tianfenicol e tilosina) em 70 amostras de leite cru provenientes de quatro mesorregiões (Triângulo Mineiro/Alto Paranaíba, Central Mineira, Oeste de Minas e Metropolitana de Belo Horizonte) do Estado de Minas Gerais. Este estudo demonstrou a presença de quinolonas (2,86%), estreptomicinas (2,86%) e tetraciclina (11,43%) nas amostras de leite cru analisadas.

Addo *et al.* (2011) investigaram a qualidade do leite cru e de alguns produtos lácteos produzidos e comercializados pelo setor informal da zona de savana costeira de Gana, quanto à presença de resíduos de antibióticos. Foram coletadas 224 amostras de leite cru e 26 produtos lácteos, sendo detectados resíduos de antibióticos em 3,1% das amostras de leite cru.

Araújo *et al.* (2015), verificaram que, de março de 2013 a fevereiro de 2014, houve rejeição de 235.393 litros de leite cru, por ter sido constatada a presença de antimicrobianos, na plataforma de um estabelecimento sob inspeção federal.

2.2 Agentes antimicrobianos e seus efeitos

Agentes antimicrobianos são substâncias usadas para inibir o crescimento ou inativar os microrganismos que se estabeleceram em um organismo vivo. Uma das propriedades destas substâncias, que define seu uso na terapêutica, é a toxicidade seletiva, isto é, devem ter atuação restrita aos microrganismos, sem afetar as células do organismo hospedeiro. As substâncias antimicrobianas mais usadas são os antibióticos, os quais ocorrem naturalmente e são produzidos total ou parcialmente por microrganismos. Os principais microrganismos produtores de antibióticos são os fungos. O termo quimioterápico é usado para designar os antimicrobianos produzidos totalmente por síntese química. Desse modo, a palavra antimicrobiano é usada para designar tanto os antibióticos como os quimioterápicos (BRITO, 2000).

Galvani (2016) salienta que as legislações brasileiras vigentes, as quais se referem à qualidade e à identidade do leite, bem como ao controle de resíduos em produtos de origem animal, utilizam o termo antibióticos para se referirem às substâncias que devem ser pesquisadas no leite cru, independentemente se o resíduo classifica-se como um antimicrobiano.

Os antimicrobianos são usados na produção animal para prevenção ou tratamento de doenças. Nesse processo, essas substâncias ou seus derivados metabólicos podem se acumular ou se depositar nas células, nos tecidos ou nos órgãos do animal. Quando vestígios destas substâncias são detectados posteriormente nos alimentos, são denominados de resíduos (BRITO, 2000).

Os antimicrobianos utilizados no tratamento dos animais pertencem às classes Tetraciclina (Tetraciclina, Oxitetraciclina, Clortetraciclina, Doxiciclina), Sulfonamidas (Sulfadiazina, Sulfatiazol, Sulfametazina, Sulfametoxazol, Sulfaquinoxalina, Sulfadimetoxina, Sulfadoxina, Sulfaclopiridazina, Sulfamerazina, Sulfizoxazol), Quinolonas (ácido nalidíxico, ácido oxolínico, Flumequina), Fluoroquinolonas (Ciprofloxacino, Enrofloxacino, Difloxacino, Sarafloxacino, Danofloxacino, Norfloxacino), Beta-lactâmicos (Penicilina G, Penicilina V, Ampicilina, Amoxicilin, Oxacilina, Cloxacilina, Dicloxacilina, Ceftiofur, Cefapirina, Cefoperazona, Nafcilina, Cefquinoma, Cefalônio, Cefalexina), Macrolídeos (Eritromicina, Espiramicina, Tilmicosina, Azitromicina, Tilosina), Lincosamidas (Lincomicina, Clindamicina), Inibidores da redutase (Trimetoprim) e Mucolíticos (Bromexina) (JANK *et al.*, 2017).

A Instrução Normativa nº 9 de 27 de junho de 2003 (BRASIL, 2003), proibiu a fabricação, a manipulação, o fracionamento, a comercialização, a importação e o uso dos princípios ativos

Cloranfenicol e Nitrofuranos e os produtos que contenham esses princípios ativos, para uso veterinário e suscetível de emprego na alimentação de todos os animais e insetos.

O cloranfenicol é um antibiótico de amplo espectro da classe dos anfenicóis, com atividade contra bactérias gram-positivas e gram-negativas e outros grupos de microrganismos. A proibição de seu uso em muitos países, inclusive no Brasil, deve-se aos efeitos tóxicos graves relatados em humanos, como anemia aplástica e carcinogenicidade, ainda que presente em baixos níveis de concentração. Resíduos de cloranfenicol têm sido detectados em produtos de origem animal no país, indicando o seu uso ilegal (SILVA; SOUZA; CALDAS, 2014).

Segundo Silva, Souza e Caldas (2014), os nitrofuranos são utilizados no tratamento de infecções gastrointestinais e dermatológicas, além do tratamento da salmonelose. Após sua aplicação, os nitrofuranos são rapidamente metabolizados, tornando impossível a detecção do princípio ativo, porém foi observado o acúmulo de seus metabólitos ligados a proteínas. Estes metabólitos são estáveis e podem persistir no animal por várias semanas após a administração do nitrofurano equivalente. A proibição da utilização dessas substâncias em animais produtores de alimentos, em vários países, incluindo o Brasil, deve-se aos efeitos carcinogênico e mutagênico desses compostos e de seus metabólitos.

As penicilinas, pertencentes ao grupo dos beta-lactâmicos, possuem amplo espectro de atividade antibacteriana, eficácia clínica e excelente perfil de segurança. As tetraciclina possuem um largo espectro de ação antibacteriana, sendo o grupo mais empregado no tratamento de vacas lactantes. Dentre elas, a oxitetraciclina, a tetraciclina e a clortetraciclina são as mais utilizadas em medicina humana e animal (NUNES, 2013). A tetraciclina é comumente indicada para o tratamento de mastite e de metrite bovina e para o tratamento de infecções do úbere por coliformes (GALVANI, 2016).

Os aminoglicosídeos, dentre eles a gentamicina, a neomicina e a estreptomicina são amplamente utilizados na medicina veterinária, para o tratamento de infecções bacterianas, como enterites e mastites. As sulfonamidas possuem amplo espectro contra bactérias, embora muitas estirpes bacterianas já tenham desenvolvido mecanismos de resistência (COSTA, 2009) e, de acordo com Silva, Souza e Caldas (2014), são medicamentos de baixo custo.

De acordo com Galvani (2016), os macrolídeos, dentre eles a espiramicina, a tilosina e a eritromicina possuem grandes vantagens no tratamento de doenças bacterianas, como por exemplo, mastite clínica por *Streptococcus* e *Staphylococcus* e infecções da glândula mamária por *Mycoplasma*, devido a sua grande distribuição tecidual, alta concentração intracelular e meia vida prolongada. As quinolonas são indicadas para o tratamento de mastite e de metrite em bovinos.

Segundo Silva (2009), os antimicrobianos presentes no leite têm duas origens principais: a primeira e mais importante, proveniente do tratamento de mastite, infecção da glândula mamária e, a segunda, devido à adição intencional de quimioterápicos no leite, sendo dita como fraude. Convém salientar que a adição de antibióticos diretamente no leite é considerada uma fraude menos provável, tendo em vista a relação custo/benefício desse método, oneroso ao produtor, contudo, a sua possibilidade de ocorrência não deve ser descartada (TRONCO, 2010). De acordo com Nero *et al.* (2007), antibióticos são usualmente utilizados de forma ilegal como agentes de preservação e de redução da carga microbiana do leite.

Conforme Brito (2000), o uso disseminado de antimicrobianos pode ocasionar o aparecimento de resíduos no leite ou nos produtos lácteos, o que preocupa autoridades de Saúde Pública e consumidores devido aos efeitos adversos decorrentes da exposição a esses resíduos em produtos e alimentos de origem animal. Várias classes de antimicrobianos são administradas extensivamente em animais de produção. Se boas práticas veterinárias não forem observadas, resíduos das drogas podem permanecer nos tecidos e fluidos de animais. (JANK *et al.* 2017). A presença de resíduos interfere diretamente na qualidade do leite e nos processos industriais. No que se refere à importância para a saúde pública, os aspectos toxicológico, microbiológico e o desenvolvimento de reações de hipersensibilidade devem ser considerados (BRITO, 2000).

O *Codex Alimentarius*, diante do resultado de diversos estudos científicos, identificou que há forte correlação entre a ingestão de produtos de origem animal incluindo o leite contendo resíduos de antibióticos, e a indução de resistência aos tratamentos antimicrobianos pela população e a indução de cepas de bactérias resistentes aos antibióticos de última geração (SILVA, 2009).

Os principais aspectos toxicológicos dos resíduos de antimicrobianos no leite estão relacionados às ações carcinogênica, mutagênica e teratogênica. As reações de hipersensibilidade, devido ao uso de substâncias antimicrobianas manifestam-se, geralmente, como reação de pele (urticárias e dermatites) e/ou sintomas envolvendo o sistema respiratório (rinite e asma brônquica). A ação carcinogênica está envolvida com a presença de resíduos de cloranicol, sulfometazina e nitrofuranos. O consumo de antibióticos, como, metronidazol, rifampicina, trimetropim, estreptomicina, sulfonamidas, cloranfenicol e tetraciclina por gestantes pode causar ação teratogênica com feitos tóxicos ao embrião ou feto. Com relação aos aspectos microbiológicos, os resíduos de antimicrobianos no leite podem ter ação sobre microrganismos do ambiente e da flora intestinal levando a um aumento de bactérias resistentes, devido à pressão seletiva (BRITO, 2000).

Segundo Galvani (2016), as reações de hipersensibilidade estão frequentemente associadas às penicilinas (beta-lactâmicos) e às estreptomicinas; a indução de resistência bacteriana, às tetraciclina; lesões óticas, hepáticas e renais, à gentamicina, além da possibilidade de genotoxicidade e de anemia aplástica associadas ao cloranfenicol, de uso proibido na pecuária brasileira.

Além desses problemas, a presença destas substâncias em leite pode causar inibição na multiplicação de sua microbiota, interferindo nos resultados de análises laboratoriais de controle de qualidade, bem como na fabricação de derivados como queijos e iogurtes, sendo responsáveis pela redução da produção de ácidos e sabores na manteiga e na maturação de queijos. Concentrações de 1 ppb podem atrasar a atividade de culturas *starter* na produção de queijos, iogurtes e manteiga e, segundo Schlemper e Sachet (2017), danificar as características estruturais e sensoriais desses produtos. Conforme Tronco (2010), traços mínimos de antibióticos são suficientes para a completa inibição das cepas de bactérias constituintes dos fermentos lácticos.

De acordo com Galvani (2016), resíduos de antibióticos no leite são a principal causa de inibição da fermentação láctica em queijos, levando à maturação inadequada, alterações em seu sabor e sua textura, além do risco de desenvolvimento de coliformes, quando presentes, tendo em vista que estes apresentam maior resistência aos antibióticos do que as culturas fermentadoras.

2.3 Resistência bacteriana

Nunes (2013) define como resistência bacteriana um fenômeno biológico natural, conduzido pelo princípio evolutivo da adaptação genética de organismos a mudanças no seu meio ambiente, que pode ser amplificado por uma série de fatores que aceleram a emergência e a propagação de microrganismos resistentes. As bactérias desenvolvem diferentes mecanismos de resistência, que podem ser de origem natural ou adquirida. De forma natural, a resistência decorre de um fator inerente estrutural ou funcional, associado com espécie bacteriana ou gênero. A resistência adquirida surge de alterações genéticas no genoma bacteriano.

Antibióticos são utilizados tanto na medicina humana quanto na veterinária e, frequentemente, pertencem às mesmas classes, possuem modos semelhantes de ação e as mesmas células bacterianas alvo (GALVANI, 2016). Alguns fármacos utilizados na medicina veterinária têm resistência cruzada com os utilizados na medicina humana, o que pode

contribuir com a aquisição de resistência de microrganismos patógenos humanos. A elevada taxa de resistência bacteriana aos antimicrobianos é acentuada por, no mínimo, dois fatores: o primeiro relacionado aos interesses econômicos do setor agropecuário e farmacêutico; o segundo refere-se à falta de conhecimento do produtor e do consumidor quanto à constituição e aos efeitos negativos desses fármacos à saúde humana, quando mal utilizados (NUNES, 2013).

Uma bactéria pode tornar-se resistente a um antimicrobiano por meio de mutação no seu cromossoma ou por infecção por um plasmídeo. Os plasmídeos podem ser transferidos de uma célula bacteriana para outra dentro da mesma espécie ou até mesmo entre espécies diferentes, transferindo a resistência, o que apresenta maior problema, porque é mais prevalente e pode envolver a transferência de resistência a múltiplos agentes (BRITO, 2000).

Higham *et al.* (2018), em pesquisa com criadores de vacas leiteiras, verificaram que antimicrobianos foram os medicamentos veterinários mais comumente utilizados nas propriedades rurais e classificaram a mastite como o desafio de saúde mais importante e o motivo mais comum para o uso de medicamentos.

Segundo Santiago Neto (2015) *Staphylococcus* spp tem sido relatado como o microrganismo mais prevalente em mastite bovina. Este grupo bacteriano pode transportar múltiplos elementos de resistência provenientes, inclusive, de outras populações bacterianas, tornando-se um grande problema de saúde pública, uma vez que também está envolvido em vários processos de doença em humanos, incluindo infecções da pele, septicemia e pneumonia. Conforme Zastempowska, Grajewski e Twaruzek (2016), alguns patógenos do leite abrigam genes resistentes a antimicrobianos, que podem ser transferidos para bactérias comensais, destacando-se *Staphylococcus aureus*, o que pode afetar negativamente o tratamento de infecções em humanos.

Srednik *et al.* (2017), isolaram estafilococos coagulase-negativa de vacas com mastite clínica e subclínica na Argentina, entre 2008 e 2014 e verificaram a capacidade de formação de biofilme associada à presença de genes, incluindo os genes que codificam a resistência a antimicrobianos das classes de beta-lactâmicos, macrolídeos e lincosamidas.

Os agentes antimicrobianos, portanto, não induzem resistência nas bactérias, mas atuam como agentes seletivos, inibindo as bactérias sensíveis e permitindo o crescimento e multiplicação das resistentes. Sob a pressão seletiva dos antimicrobianos, o número de bactérias resistentes aumenta, podendo tornar-se a flora dominante e até persistir por semanas após a cessação de seu uso. A ocorrência de bactérias com resistência múltipla no ambiente deve-se ao uso extensivo de antimicrobianos e à administração de quantidades subterapêuticas de antibióticos e, o risco para a saúde humana, decorre de infecções por microrganismos resistentes

ou transferência de resistência a bactérias patogênicas, podendo prejudicar o tratamento posteriormente (BRITO, 2000). Segundo Alanis (2005) as bactérias resistentes são definidas como aquelas que apresentam resistência a uma ou mais classes de antibióticos e as infecções causadas por esses microrganismos apresentam maior preocupação, devido ao reduzido arsenal terapêutico disponível para tratamento nestes casos.

Conforme Dias, Monteiro e Menezes (2010) existe um decréscimo da eficácia de drogas muito potentes, com o reaparecimento de microrganismos resistentes a todos os fármacos disponíveis, levando a infecções não tratáveis, como acontecia na era pré-antibiótico. Na Europa, o sistema de monitorização da evolução das resistências bacterianas, *The European Antimicrobial Resistance Surveillance System* existe desde 1998 e disponibiliza, em tempo real, dados validados recolhidos a partir de laboratórios públicos hospitalares, nos vários países, sobre a suscetibilidade de bactérias relevantes no continente europeu, permitindo a análise dos padrões de resistência bacteriana ao longo do tempo, entre diferentes regiões e países.

2.4 Pesquisa de antimicrobianos em leite cru

As crescentes demandas de leite e de produtos lácteos exigiram o uso de vários tipos de produtos químicos, os quais embora sejam essenciais na produção a granel de leite, podem causar sérios problemas de saúde aos animais e aos consumidores. Para identificar e quantificar os contaminantes no leite é desejável estabelecer meios confiáveis para a detecção instrumental, o que auxilia na tomada de decisões rápidas necessárias ao cumprimento da legislação (NADEEM e KI-HYUN, 2018).

De acordo com Silva (2009), o critério da pesquisa de resíduos no leite é um fator importante na sua desclassificação, visto que torna a matéria-prima inadequada para a indústria e para o consumo humano, uma vez que não existe tratamento tecnológico capaz de inativar os resíduos presentes no leite.

O leite contendo substâncias inibitórias acima dos limites legais é considerado inaceitável para utilização, podendo resultar em perda total para os produtores. Diante disso faz-se necessária a disponibilidade de testes sensíveis, rápidos e baratos para a pesquisa de resíduos de antimicrobianos no leite (TENÓRIO *et al.*, 2009). As perdas econômicas decorrentes de falhas na fermentação, a influência dos antimicrobianos em determinados exames e os riscos do desenvolvimento de reações alérgicas e tóxicas nos indivíduos levaram ao desenvolvimento de testes para a detecção de resíduos no leite (BRITO, 2000).

Existem vários *kits* comerciais para pesquisa de resíduos de antimicrobianos em leite, disponíveis no mercado, de fácil realização, sem a necessidade de instrumentos sofisticados, possibilitando a análise de várias amostras ao mesmo tempo (TENÓRIO *et al.*, 2009). Esses testes baseiam-se na inibição do crescimento bacteriano, na ligação a receptores específicos, em reações imunológicas ou enzimáticas e na separação, identificação e quantificação do antimicrobiano por meio de técnicas de cromatografia gasosa ou líquida, exibindo resultados qualitativo, quantitativo (considerado confirmatório) ou semiquantitativo. Os testes qualitativos darão resultado positivo ou negativo em relação a uma concentração determinada da droga. Os quantitativos permitem a quantificação dos resíduos, enquanto os semiquantitativos produzem resultados em relação a uma faixa de concentração da droga, por exemplo, negativo, fracamente positivo e fortemente positivo. A maioria dos testes comerciais disponíveis para aplicação no campo é qualitativa ou semiquantitativa, e classificada como teste de triagem. O teste de triagem deve fornecer uma indicação segura e confiável da ausência dos resíduos na amostra examinada (BRITO, 2000).

Os principais testes de triagem disponíveis no mercado são Charm-Test TM, Copan CH ATK, Delvotest-P e Delvotest-SP, baseados na inibição do crescimento microbiano, e Charm SL-Test TM, Cite Probe Gentamicin Test, Ridascreen chloramphenicol e Snap beta-lactam Test, cujo modo de ação é imunoenzimático, ou seja, baseado em receptor específico. Os primeiros, incluindo também o Charm SL-Test TM têm amplo espectro, isto é, detectam vários tipos de antibióticos. Os últimos são específicos para um ou mais antibióticos de uma classe (PEREIRA e SCUSSEL, 2017). Os testes de triagem, quando de amplo espectro, possuem a capacidade de detectar a maioria das principais classes de antibióticos utilizadas na medicina veterinária (GALVANI, 2016).

De acordo com Pereira e Scussel (2017), os resultados suspeitos ou positivos nos testes de triagem indicam que o limite máximo de resíduo foi superado. A Decisão da Comissão Europeia nº 657, de 12 de agosto de 2002, institui que os métodos usados para confirmação devem comprovar a estrutura do princípio ativo do analito. Esses métodos geralmente utilizam técnicas de cromatografia e espectrometria de massas, como a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada à Espectrometria de Massas (CLAE-EM).

Os testes quantitativos incluem principalmente a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), eletroforese capilar (CE) e espectrometria de massas (MS ou MS/MS). A cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (LC-MS ou LC-MS/MS) é a técnica analítica mais empregada na detecção e na quantificação de resíduos, devido à sua alta

sensibilidade e seletividade, capaz de apontar limites de quantificação para a maioria dos compostos (BITTENCOURT, 2017).

Chiaradia, Collins e Jardim (2008) explicam que a cromatografia pode ser combinada a diferentes sistemas de detecção, tratando-se de uma das técnicas analíticas mais utilizadas e de melhor desempenho. O acoplamento de um cromatógrafo a um espectrômetro de massas combina as vantagens da cromatografia (alta seletividade e eficiência de separação) com as vantagens da espectrometria de massas (obtenção de informação estrutural, massa molar e aumento adicional da seletividade). As técnicas cromatográficas mais comumente acopladas à espectrometria de massas são a cromatografia gasosa e a cromatografia líquida de alta eficiência. A combinação com outras técnicas de separação, como a eletroforese capilar é possível, mas usada com menor frequência.

Segundo Galvani (2016), 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 que o limite máximo de resíduo. Já, nos métodos confirmatórios, tendo em vista que é possível quantificar o resíduo da droga encontrada, pode-se estabelecer se houve ou não a violação do limite máximo de resíduo estabelecido na legislação vigente.

Agências governamentais e organismos internacionais, como o *Codex Alimentarius*, *European Medicines Agency*, *Food and Drug Administration* e ANVISA determinaram o limite máximo de resíduos para diversas drogas veterinárias nos alimentos incluindo várias classes de antibióticos (European Commission 2010; de Queiroz Mauricio and Lins 2012; Im 2013). A avaliação toxicológica de resíduos de antimicrobianos nos alimentos em geral segue os princípios elaborados pela Organização Mundial de Saúde (OMS) e *Food Agriculture Organization* (FAO), órgãos das Nações Unidas, definidos pela Comissão do *Codex Alimentarius* (*Joint FAO/WHO Food Standards Programme*). O risco toxicológico é avaliado determinando-se o nível de concentração da droga que não causa qualquer efeito adverso nos animais e no homem. Com este valor estima-se a concentração aceitável de ingestão diária da droga (ou dose diária aceitável, ADI). A ADI é a dose diária que, se ingerida durante toda a vida do indivíduo, não oferece risco apreciável à saúde, ou seja, não resultará em efeitos deletérios à saúde. Valores de ADI são sempre sujeitos à revisão, desde que novas informações se tornem disponíveis (BRITO, 2000).

A partir da avaliação de cada substância e baseando-se nos estudos do metabolismo e cinética de eliminação de resíduos, é determinado o limite máximo de resíduo (LMR) permitido no alimento, que deve ser sempre mais baixo do que a concentração tolerável e não deve

exceder a dose diária aceitável. A tolerância para uma droga ou resíduo químico no leite é estabelecida como a décima parte daquela da carne. Isto se deve ao fato de que o leite é o principal alimento da dieta de crianças e recém-nascidos, que são considerados mais sensíveis que os adultos. Tolerâncias são estabelecidas para compostos não carcinogênicos. Para substâncias com ação carcinogênica, a tolerância admitida é zero (BRITO, 2000).

Os LMR's, portanto, consistem na quantidade máxima de determinada substância que um alimento pode conter, sem prejuízo da integridade orgânica dos seres humanos e animais, e podem ser utilizados como medidas de detecção de não conformidades para tomada de ações regulatórias. No Brasil, o controle oficial da segurança do leite em relação à presença de resíduos é realizado por meio do Programa Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (PNCRC-MAPA), através da Instrução Normativa nº 42, de 20/12/1999, que avalia a segurança da cadeia agroalimentar quanto à presença de resíduos de medicamentos veterinários e contaminantes inorgânicos em produtos de origem animal (PORTZ; COUTO; FERREIRA, 2014).

Para garantir que os LMR's sejam respeitados, as metodologias analíticas utilizadas para a determinação de substâncias tóxicas em alimentos devem ser capazes de quantificar resíduos dessas substâncias em concentrações muito baixas, assim como identificá-los de maneira inequívoca. O emprego da cromatografia com detecção por espectrometria de massas acoplada à espectrometria de massas torna possível obter uma grande quantidade de informação estrutural acerca do analito, o que assegura sua identificação com maior exatidão (CHIARADIA; COLLINS; JARDIM, 2008).

Para as indústrias de laticínios, a presença de resíduos de antimicrobianos pode causar prejuízos consideráveis e a pasteurização tem pouco ou nenhum efeito no conteúdo de antimicrobianos do leite. Portanto, se presentes no leite cru (matéria-prima), persistirão nos produtos finais, daí a importância de sua detecção pela indústria. Quantidades pequenas podem inibir culturas lácteas sensíveis, utilizadas na fabricação de queijos, iogurtes e de outros produtos. O leite com resíduos de antimicrobianos apresenta problemas na acidificação e na textura dos queijos, acidificação e formação de odores desfavoráveis na manteiga e no creme, inibição dos cultivos de iogurte e de outros produtos fermentados (BRITO, 2000).

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 os efeitos à saúde causados pelos produtos dessa degradação são incertos, sendo provável que, em certos casos, possam ser mais tóxicos do que o antibiótico que os originou. 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 (GALVANI, 2016).

Indústrias de laticínios devem realizar testes para a pesquisa de antimicrobianos no leite recebido antes de cada processamento. Entre os métodos disponíveis para a detecção de antibióticos no leite, verificou-se que os testes qualitativos são amplamente utilizados em fábricas de laticínios (TRONCO, 2010). Entretanto, segundo Galvani (2016) há uma falta de sincronia com relação aos antimicrobianos presentes nos testes de investigação dos resíduos desses medicamentos nas empresas sob inspeção Estadual no Rio Grande do Sul e o que de fato está sendo utilizado no tratamento dos animais em lactação. A investigação de resíduos de antimicrobianos nesses estabelecimentos industriais, provavelmente, não seria capaz de detectar os antimicrobianos utilizados no tratamento dos animais em lactação, além do que a legislação vigente não determina que haja essa interação. Dessa forma, oportuniza-se que um leite impróprio (pela presença de antimicrobianos) seja aceito na plataforma de recepção industrial, ocorrendo assim seu beneficiamento ou a produção de derivados lácteos, acarretando prejuízos à saúde dos consumidores.

2.5 Controle de resíduos no leite e legislação

Segundo Nunes (2013), o diagnóstico sobre os principais fatores que determinam os desvios da qualidade do leite produzido em uma região pode ser elaborado a partir da caracterização do perfil de uso de antimicrobianos nos animais. O monitoramento do uso de antimicrobianos, da ocorrência de doenças e do perfil de resistência bacteriana aos antimicrobianos auxilia na formulação de políticas públicas e na elucidação dos fatos relacionados à ecológica microbiana e das doenças. Portanto, a elaboração de um estudo que investigue a presença de resíduos de antimicrobianos no leite cru produzido em uma região, e a utilização desses fármacos no rebanho bovino leiteiro é de grande importância para a comunidade científica e o público em geral, além de auxiliar na formulação de campanhas educativas voltadas às boas práticas de utilização de produtos de uso veterinário no campo.

A legislação brasileira estabelece os padrões de qualidade para o leite cru e proíbe a adição de qualquer substância química na sua conservação (AMORIM, 2017). Os parâmetros físico-químicos estão descritos na Instrução Normativa nº 76 (BRASIL, 2018), cujo objetivo é regulamentar a produção e fixar a identidade e as características do leite cru no país, estabelecendo, entre outras, a proibição de apresentar substâncias estranhas à sua composição,

tais como agentes inibidores do crescimento microbiano, além de resíduos de produtos de uso veterinário e contaminantes acima dos limites máximos previstos em normas complementares.

A Instrução Normativa nº 77 (BRASIL, 2018a) estabelece os critérios e procedimentos para a produção, acondicionamento, conservação, transporte, seleção e recepção do leite cru em estabelecimentos registrados no serviço de inspeção oficial. Determina que o estabelecimento deve realizar o controle para cada recebimento do leite cru refrigerado de cada compartimento do tanque do veículo transportador, contemplando, entre outras, a análise para detecção de resíduos de produtos de uso veterinário de, no mínimo, dois grupos de antimicrobianos e, em frequência determinada em seu autocontrole, análise de leite para todos os grupos de antimicrobianos para os quais existam especificações de triagem analíticas disponíveis. A Rede Brasileira de Laboratórios de Controle da Qualidade do Leite (RBQL) também está envolvida na realização de análise com frequência mínima de uma amostra mensal, para resíduos de produtos de uso veterinário, entre outros parâmetros.

Conforme a Instrução Normativa nº 77 (BRASIL, 2018a), o estabelecimento que constatar não conformidade no leite analisado na recepção deve proceder à avaliação individualizada das amostras dos produtores, para fins de rastreabilidade e de identificação de causas da não conformidade. Além disso, os estabelecimentos industriais devem realizar análise individual do leite de todos os produtores para determinação, entre outras, de substâncias conservadoras, conforme cronograma definido em seu programa de autocontrole.

Sempre que for constatada não conformidade nas análises individualizadas, devem ser realizadas, na captação subsequente, todas as análises previstas para o recebimento diário do leite cru refrigerado, no leite do produtor identificado (BRASIL, 2018a).

De acordo com o inciso IX do artigo 497, do Decreto nº 9.013, de 29 de março de 2017 (BRASIL, 2017a), consideram-se impróprios para o consumo humano, na forma em que se apresentem, no todo ou em parte, as matérias-primas ou os produtos de origem animal que contenham contaminantes, resíduos de agrotóxicos e de produtos de uso veterinário acima dos limites estabelecidos em legislação específica. O inciso II do artigo 501 do mesmo Decreto, estabelece que se considera impróprio para qualquer tipo de aproveitamento, o leite cru quando, na seleção da matéria-prima, apresente resíduos de agentes inibidores do crescimento microbiano.

O bem-estar e a saúde dos seres humanos são direitos universalizados, sendo dever do Poder Público. A garantia da inocuidade de grande parcela dos alimentos ofertada ao consumo, quanto à presença de resíduos decorrentes do emprego de drogas veterinárias, é possibilitada pelo controle de resíduos (BRASIL, 1999). Por imposição de países importadores, o governo

brasileiro criou em 1986, o Plano Nacional de Controle de Resíduos Biológicos em Produtos de Origem Animal (PNCRB), que em 1999 passou a se chamar Plano Nacional de Controle de Resíduos em Produtos de Origem Animal (PNCR) e a partir de 2007 começou a ser chamado de Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes (PNCRC) (SILVA, 2009). Dessa forma, a Instrução Normativa nº 42 (BRASIL, 1999) estabelece o PNCRC, realizado por uma rede de laboratórios do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), cujo objetivo é conhecer e evitar a violação dos níveis de segurança ou dos LMR's de substâncias autorizadas, bem como a ocorrência de quaisquer níveis de resíduos de compostos químicos de uso proibido no país.

Dados das publicações anuais referentes aos resultados gerais do subprograma de monitoramento e subprograma exploratório do Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes, realizadas pela Secretaria de Defesa Agropecuária do MAPA mostraram que, entre os anos de 2014 e 2016 foram analisadas 3322 amostras de leite cru e encontradas seis violações relacionadas a antimicrobianos, sendo que destas, duas sugeriram a utilização do princípio ativo cloranfenicol, de utilização proibida de acordo com a Instrução Normativa nº 9, de 27 de junho de 2003 (BRASIL, 2003). No ano de 2017, das 888 amostras de leite cru testadas, 4 apresentaram violações referentes a antimicrobianos e, em 2018, das 1081 amostras analisadas, 6 apresentaram-se não conformes quanto à presença de antimicrobianos.

A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) desenvolveu o Programa de Análise de Resíduos de Medicamentos Veterinários em Alimentos de Origem Animal (Pamvet), com o objetivo de operacionalizar sua competência legal de controlar e de fiscalizar resíduos de medicamentos veterinários em alimentos, tendo como linhas básicas de monitoramento, resíduos em alimentos e resistência bacteriana. Esse Programa complementa as ações já desenvolvidas pelo MAPA no âmbito da produção primária, pois avalia o alimento tal como é apresentado ao consumidor (BRASIL, 2009).

Schlemper e Sachet (2017) verificaram que, no sudoeste do Estado do Paraná, de 100 amostras de leite pasteurizado analisadas, 11 foram positivas para beta-lactâmicos e 6 foram positivas para beta-lactâmicos e para tetraciclina, demonstrando que as moléculas de antimicrobianos não são destruídas pelo processo de pasteurização, permanecendo em sua totalidade ou como forma de metabólito, o que evidencia a presença de tais substâncias no produto final. Em relação à pesquisa de quinolonas e de sulfonamidas, de 99 amostras analisadas, 4 foram positivas para o grupo das quinolonas e 6 foram positivas para sulfonamidas, demonstrando que, se a presença dessas substâncias ocorre no leite e não é

verificada, certamente o alimento contaminado passa pelo processo de industrialização e, conseqüentemente, para as prateleiras dos supermercados.

Em outros países é comum a pesquisa de resíduos no leite cru. Em um estudo na Coréia em 2009, usando testes de inibição e confirmação dos resultados por cromatografia, 269 amostras de leite cru foram analisadas e destas, 15 foram positivas para sulfonamidas e 3 para quinolonas. Em uma investigação conduzida em Nova York em 2014, utilizando imunoenaios enzimáticos, das 34 amostras de leite cru testadas, 28 foram positivas para resíduos de antibióticos. Na Macedônia, em 2011, foi realizado um estudo em 497 amostras de leite cru, sendo que todas apresentaram valores positivos para resíduos de antibióticos (SCHLEMPER; SACHET, 2017).

Nos Estados Unidos, os resíduos de drogas são regulados por programas federais e estaduais de segurança alimentar como, por exemplo, o *Federal/State Cooperative Program, the National Conference on Interstate Milk Shipments* (NCIMS), estabelecido sob a Lei do Serviço de Saúde Pública, para garantir a segurança e a integridade do leite e dos produtos lácteos da classe “A”. A *Food and Drug Administration* (FDA) e as autoridades reguladoras dos Estados Unidos participam com a indústria no NCIMS para manter padrões de garantia da segurança do suprimento de leite no país. A FDA publica o *Grade “A” Pasteurized Milk Ordinance* (PMO), como Portaria modelo para os Estados adotarem. No Programa NCIMS Grau “A”, as agências reguladoras estaduais são obrigadas a relatar as atividades de testes em leite cru para o *National Milk Drug Residue Data Base* (NMDRDB). Em 2012, mais de 3,7 milhões de testes foram reportados ao NMDRDB e, no mesmo ano, foi conduzido o *Milk Drug Residue Sampling Survey* do *Center for Veterinary Medicine* (CVM). Dessa forma, qualquer leite que contenha resíduos de drogas de forma ilegal sob o Programa NCIMS Grau “A”, não está autorizado a entrar no suprimento humano de alimentos. Esforços como esse inquérito e o programa de testes em leite NCIMS auxiliam a garantir que quaisquer problemas que possam existir sejam identificados e mitigados através da educação, ação voluntária da indústria leiteira e fiscalização (FOOD AND DRUG ADMINISTRATION, 2015).

O PMO exige que uma amostra de leite cru seja coletada de cada tanque na propriedade rural, juntamente com uma amostra obtida de cada caminhão transportador de matéria-prima que chega a uma fábrica de laticínios. A amostra de cada veículo deve ser testada para a presença de, pelo menos, quatro medicamentos beta-lactâmicos específicos (penicilina, ampicilina, amoxicilina, cloxacilina, cefapirina e ceftiofur). Os resultados positivos levam ao teste obrigatório nas amostras de leite cru de cada propriedade rural (FOOD AND DRUG ADMINISTRATION, 2015).

Dinamarca e Inglaterra possuem um constante controle de resíduos de antibióticos no leite, normatizado por legislações rígidas e campanhas educacionais focadas na conscientização do produtor. A França adotou a proibição de utilização de antimicrobianos de indicação médica humana, para tratamento de enfermidades animais e em alimentos (PEREIRA; SCUSSEL, 2017).

No Brasil, o Programa de controle de resíduos em nível de fiscalização federal realiza o monitoramento apenas dos estabelecimentos registrados no Serviço de Inspeção Federal. Sendo assim, torna-se necessário estabelecer uma ferramenta de controle no Estado do Rio Grande do Sul, a fim de promover as diretrizes para o monitoramento e para as ações de controle sanitário e de fiscalização agropecuária da Secretaria da Agricultura, Pecuária e Desenvolvimento Rural – RS, de modo a contribuir para que os consumidores tenham acesso a alimentos seguros, com relação à ausência ou invariabilidade dos limites máximos permitidos de antimicrobianos na matéria-prima (leite cru). Além disso, a proposta desse trabalho vem ao encontro da tendência de equivalência entre os Serviços de Inspeção no Brasil, conforme estabelecido no Decreto nº 5741, de 30 de março de 2006 – Sistema Unificado de Atenção à Sanidade Agropecuária (SUASA), sendo assim uma exigência do MAPA para que o Serviço de Inspeção Sanitária do Rio Grande do Sul permaneça com adesão ao Sistema Brasileiro de Inspeção de Produtos de Origem Animal (SISBI-POA).

3 MATERIAL E MÉTODOS

A fim de subsidiar dados concisos atualizados e de estimar a verdadeira proporção da presença de resíduos de antimicrobianos acima dos limites máximos de resíduos, foram realizadas coletas de amostras de leite cru a partir dos compartimentos dos tanques de aço inoxidável dos veículos que entregam essa matéria-prima para os estabelecimentos industriais registrados no Serviço de Inspeção Estadual do Rio Grande do Sul, na plataforma de recebimento dessas indústrias. Em seguida foi descrito um esboço de Plano Estadual para o Controle de Resíduos de Antimicrobianos em Leite Cru. As etapas para o desenvolvimento da pesquisa estão descritas a seguir.

3.1 Identificação dos grupos de antimicrobianos pesquisados, no leite cru, pelos laticínios

Atualmente há 25 estabelecimentos de leite e derivados registrados no Serviço de Inspeção Estadual do RS, cujas classificações referem-se a fábricas de laticínios, usinas de beneficiamento e micro usinas de beneficiamento e industrialização de leite, que recebem entre 3700 e 1.233.165 litros de leite cru/mês a granel para beneficiamento e/ou industrialização.

Foi realizado um levantamento, junto a esses estabelecimentos registrados, sobre quais grupos de antimicrobianos estavam sendo pesquisados nos testes de plataforma, dentre as opções de beta-lactâmicos, tetraciclinas, sulfonamidas, aminoglicosídeos, macrolídeos ou outros, através do preenchimento de um questionário único (ANEXO I), com opção de múltiplas respostas e de inclusão de grupos não elencados. No questionário foram contemplados os seguintes itens: identificação e classificação do estabelecimento, teste utilizado pelo estabelecimento para detecção de antimicrobianos e motivo da escolha, grupos de antimicrobianos pesquisados e há quanto tempo pesquisavam os antimicrobianos informados no momento da investigação.

3.2 Determinação das rotas a serem analisadas: o plano amostral

Na Tabela 1 estabeleceu-se o número total de rotas pertencente aos estabelecimentos industriais, bem como o número de amostras (rotas) de leite cru a serem coletadas em cada um deles, de acordo com a análise estatística. Ainda, na Tabela 1, as indústrias foram organizadas de acordo com a supervisão regional a qual pertencem, conforme instituído pela SEAPDR.

A unidade amostral a ser considerada foi a rota geográfica de coleta onde estão distribuídos os produtores. Neste caso, entende-se por rota, o caminho percorrido pelo veículo transportador, onde estão localizados os produtores de leite fornecedores da matéria-prima. Apesar de saber que o volume de leite também poderia ter influência sobre a pesquisa, optou-se por não considerá-lo neste trabalho.

Cada compartimento do veículo contém uma rota, havendo a identificação do leite de todos os produtores que contribuem para o volume contido naquele compartimento. As amostras foram coletadas de forma probabilística aleatória simples, totalizando 103 amostras. O software estatístico utilizado foi o Win Pepi, versão 11.65, com confiança de 95% nas 103 amostras (rotas) e margem de erro de 5%.

Foram coletados 50 mL de leite cru por rota nos compartimentos dos tanques de aço inoxidável presentes nos veículos transportadores, acondicionados em frascos de polipropileno de primeiro uso com tampa, devidamente identificados quanto à rota e quanto ao estabelecimento industrial de origem, sendo que cada frasco foi acondicionado em envoltório plástico. As amostras foram congeladas, acondicionadas em caixas de isopor com meio refrigerante e remetidas ao LANAGRO - RS acompanhadas de requisição preenchida, para a realização das análises laboratoriais. Essa, por sua vez, foi depositada em envelope com a identificação do laboratório destinatário e enviada juntamente com a amostra.

A Tabela 1 apresenta o número de estabelecimentos industriais participantes da pesquisa, inseridos em suas respectivas supervisões regionais. Para cada um deles foi realizado o levantamento do número total de rotas e, a partir daí, o delineamento estatístico indicou o número de rotas que deveriam ter o leite cru coletado, em cada estabelecimento.

Tabela 1 - Número de rotas a serem coletadas em cada estabelecimento industrial.

Estabelecimentos industriais por supervisão regional da SEAPDR	Identificação do estabelecimento	Número total de rotas	Número de amostras a serem coletadas
Ijuí	A1	5	3
	A2	2	1
Caxias do Sul	A3	13	9
	A4	5	3
	A5	4	3
Santa Rosa	A6	6	4
	A7	10	7
São Luiz Gonzaga	A8	6	4

(continua)

(conclusão)

Tabela 1 - Número de rotas a serem coletadas em cada estabelecimento industrial.

Estabelecimentos industriais por supervisão regional da SEAPDR	Identificação do estabelecimento	Número total de rotas	Número de amostras a serem coletadas
Pelotas	A9	1	1
	A10	1	1
Passo Fundo	A11	3	2
	A12	12	8
	A13	2	1
	A14	2	1
Palmeira das Missões	A15	12	8
	A16	21	15
	A17	5	3
	A18	4	3
Estrela	A19	6	4
	A20	2	1
	A21	9	6
Cruz Alta	A22	5	3
	A23	3	2
Soledade	A24	12	8
Santa Maria	A25	3	2
Total		154	103

Fonte: Elaborado pela autora (2019).

3.3 Coleta da matéria-prima nas indústrias participantes da pesquisa

Foi confeccionado um memorando oficial (APÊNDICE D), determinando a coleta da matéria-prima e contendo, em anexo a ele, o modelo de requisição (APÊNDICE C) para coleta de amostras e um instrutivo (APÊNDICE B) quanto aos procedimentos que deveriam ser adotados nessas coletas.

As coletas de leite cru foram realizadas pelos Fiscais Estaduais Agropecuários da SEAPDR nos compartimentos dos tanques de aço inoxidável dos veículos transportadores nos estabelecimentos industriais e, as amostras, enviadas ao Laboratório de Análise de Resíduos de Pesticidas e Medicamentos Veterinários (RPM) do LANAGRO - RS. A matéria-prima recebida por essas empresas tem origem em propriedades rurais no Estado do Rio Grande do Sul. A amostragem foi aleatória, sendo realizado, pelos Fiscais, um sorteio a partir do total de rotas e levando em consideração o delineamento estatístico, em cada um dos 25 estabelecimentos em atividade no período das coletas, compreendido em março e abril de 2019, que recebem leite cru a granel.

A aplicação do questionário (ANEXO I) e a realização das coletas de leite cru foram realizadas pelos Fiscais Estaduais Agropecuários atuantes no serviço de inspeção sanitária de alimentos de origem animal responsáveis pela inspeção e fiscalização nos estabelecimentos registrados na SEAPDR.

3.4 Ensaios laboratoriais

A metodologia de análise utilizada, cromatografia líquida acoplada ao sistema de espectrometria de massa tandem, foi desenvolvida e validada para aplicação em várias matrizes, incluindo leite bovino. O método é considerado instrumento adequado e suficientemente seletivo, por reduzir o número de amostras que necessitariam ser analisadas em um método confirmatório e quantitativo. O método foi validado de acordo com os critérios da Comissão de Decisão 2002/657/EC e pelo Guia de Garantia de Qualidade Analítica do MAPA (European Commission 2002; Brasil, 2011), os quais apresentam os requerimentos mínimos para os métodos de resíduos de drogas veterinárias. A técnica tem sido utilizada desde 2013 no Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes para determinação de resíduos de antibióticos, fornecendo centenas de resultados para amostras reais. Os critérios avaliados incluem capacidade de detecção, especificidade/seletividade, estabilidade e aplicabilidade/robustez. (JANK *et al.*, 2017).

As amostras de leite cru obtidas do Serviço de Inspeção Estadual foram submetidas à análise pelo LANAGRO – RS nos meses de maio, junho e julho de 2019. Durante o transporte e até a chegada ao laboratório as amostras foram mantidas congeladas. Após o descongelamento, foram homogeneizadas e seu preparo consistiu na extração da fase sólida por solventes, colocação em mesa agitadora durante 10 minutos, centrifugação por 5 minutos, transferência dos sobrenadantes para tubos limpos de polipropileno de 50 mL contendo C18 para lavagem. Após os tubos foram agitados em agitador vortex por 5 segundos e centrifugados novamente durante 5 minutos. Imediatamente os sobrenadantes foram transferidos para tubos de polipropileno de 15 mL e submetidos ao passo de purificação em baixa temperatura. Depois disso foram centrifugados novamente por 10 minutos e os sobrenadantes limpos foram transferidos para outros tubos de 15 mL e evaporados em banho maria a 45°C, até chegar em volume abaixo de 1 mL. Então o extrato foi transferido para o equipamento e o volume foi completado para 1 mL com água ultra pura e submetido à análise. Um volume de 10 µL do extrato foi injetado no sistema analítico.

Na Tabela 2 estão apresentados o LMR, a capacidade de detecção (CC β) e o limite de quantificação (LQ) em matriz leite, para todas as substâncias antimicrobianas analisadas pelo laboratório, indicando, ainda, a respectiva classe a qual pertencem.

Tabela 2 – Limite de quantificação (LQ), limite máximo de resíduo (LMR) na matriz leite para cada analito, capacidade de detecção (CC β) e limite de quantificação (LQ)

Substância	Classe	LQ ($\mu\text{g/L}$)	LMR no leite (ng mL^{-1})	Capacidade de detecção (CC β) (ng mL^{-1})
ERI	Macrolídeos	10	40.0	10.0
SPR	Macrolídeos	50	200.0	50.0
LNC	Lincosamidas	37,5	150.0	37.5
TIL	Macrolídeos	12,5	50.0	12.5
AZT	Macrolídeos	25	100.0	25.0
CLN	Lincosamidas	37,5	150.0	37.5
TLM	Macrolídeos	12,5	50.0	12.5
SMA	Sulfonamidss	25	100.0	25.0
SDMX	Sulfonamidas	25	100.0	25.0
SQX	Sulfonamidas	25	100.0	25.0
SDX	Sulfonamidas	25	100.0	25.0
SFX	Sulfonamidas	25	100.0	25.0
STZ	Sulfonamidas	25	100.0	25.0
SCP	Sulfonamidas	25	100.0	25.0
SDZ	Sulfonamidas	25	100.0	25.0
SMR	Sulfonamidas	25	100.0	25.0
SMZ	Sulfonamidas	25	100.0	25.0
NORF	Fluoroquinolonas	2,5	10.0	2.5
DIFLO	Fluoroquinolonas	25	100.0	25.0
CIPRO	Fluoroquinolonas	12,5	50.0	12.5
ENRO	Fluoroquinolonas	12,5	50.0	12.5
SARA	Fluoroquinolonas	5	20.0	5.0
NALID	Quinolonas	5	20.0	5.0
FLU	Quinolonas	12,5	50.0	12.5
OXO	Quinolonas	5	20.0	5.0
DANO	Fluoroquinolonas	7,5	30.0	7.5
TMP	Diidrofolato inibidores da redutase	12,5	50.0	12.5
BMX	Mucolíticos	12,5	50.0	12.5
TET	Tetraciclina	25	100.0	25.0
CTC	Tetraciclina	25	100.0	25.0
DOX	Tetraciclina	50	100.0	25.0
OTC	Tetraciclina	25	100.0	25.0
PNG	Beta-lactâmicos	1	4.0	1.0
PNV	Beta-lactâmicos	1	4.0	1.0
AMP	Beta-lactâmicos	1	4.0	1.0
AMX	Beta-lactâmicos	1	4.0	1.0
OXA	Beta-lactâmicos	7,5	30.0	7.5
CLX	Beta-lactâmicos	7,5	30.0	7.5
DCX	Beta-lactâmicos	7,5	30.0	7.5
CFT	Beta-lactâmicos	25	100.0	25.0
CFQ	Beta-lactâmicos	5	20.0	5.0
CFAP	Beta-lactâmicos	15	60.0	15.0
CFOP	Beta-lactâmicos	12,5	50.0	12.5
CFN	Beta-lactâmicos	5	20.0	5.0
NAFC	Beta-lactâmicos	7,5	30.0	7.5
CFX	Beta-lactâmicos	25	100.0	25.0

Fonte: adaptado de Jank *et al.* (2017).

Segundo a ANVISA (2009), o limite de detecção do método representa a menor concentração em exame que pode ser detectada, mas não necessariamente quantificada, utilizando um determinado procedimento experimental.

Os reagentes químicos utilizados nas análises foram Tetraciclina (TC), Oxitetraciclina (OXI), Clortetraciclina (CTC), Doxiciclina (DOX), Sulfadiazina (SDZ), Sulfatiazol (STZ), Sulfametazina (SMZ), Sulfametoxazol (SMA), Sulfaquinoxalina (SQX), Sulfadimetoxina (SDMX), Sulfadoxina (SDX), Sulfacoloropiridazina (SCP), Sulfamerazina (SMR), Sulfizoxazol (SFX), ácido nalidíxico (NALID), ácido oxolínico (OXO), Flumequina (FLU), Ciprofloxacino (CIPRO), Enrofloxacino (ENRO), Difloxacino (DIFLO), Sarafloxacino (SARA), Danofloxacino (DANO), Norfloxacino (NORF), Penicilina G (PNG), Penicilina V (PNV), Ampicilina (AMP), Amoxicilina (AMX), Oxacilina (OXA), Cloxacilina (CLX), Dicloxacilina (DCX), Ceftiofur (CFT), Cefapirina (CFAP), Cefoperazona (CFOP), Nafcilina (NAFC), Cefquinoma (CFQ), Cefalônio (CFN), Cefalexina (CFX), Eritromicina (ERT), Espiramicina (SPR), Tilmicosina (TLM), Azitromicina (AZT), Tilosina (TIL), Lincomicina (LNC), Clindamicina (CLN), Trimetoprim (TRI) e Bromexina (BMX).

Na tabela 3 estão exibidos o limite de quantificação (utilizado pelo laboratório) e o LMR (de acordo com a Instrução Normativa nº 5 de 2019 do MAPA) para cada antimicrobiano. O limite de quantificação é a concentração mínima para a quantificação das substâncias e é menor que o LMR, exceto para o analito Clindamicina, para o qual não existia LMR disponível, sendo desenvolvido pelo LANAGRO um método de análise, utilizando como base o LMR da Espiramicina para realizar a validação. O método foi ofertado à Coordenação Geral de Laboratórios Agropecuários (CGAL) do MAPA, que incluiu a Clindamicina no PNCRC, mas com um LMR diferente do utilizado para a metodologia.

Tabela 3 - Limite de quantificação (LQ) e limite máximo de resíduo (LMR), em leite.

Antimicrobiano	LQ (µg/L)	LMR (µg/L)
Tetraciclina	25	Soma igual a 100
Oxitetraciclina	25	Soma igual a 100
Clortetraciclina	25	Soma igual a 100
Doxiciclina	50	Soma igual a 100
Sulfadiazina	25	Soma igual a 100
Sulfatiazol	25	Soma igual a 100
Sulfametazina	25	Soma igual a 100

Tabela 3 - Limite de quantificação (LQ) e limite máximo de resíduo (LMR), em leite.

Antimicrobiano	LQ (µg/L)	LMR (µg/L)
Sulfametoxazol	25	Soma igual a 100
Sulfaquinoxalina	25	Soma igual a 100
Sulfadimetoxina	25	Soma igual a 100
Sulfadoxina	25	Soma igual a 100
Sulfacloropiridazina	25	Soma igual a 100
Sulfamerazina	25	Soma igual a 100
Sulfizoxazol	25	Soma igual a 100
Ácido Nalidíxico	5	20
Ácido Oxolínico	5	20
Flumequina	12,5	50
Ciprofloxacino	12,5	Soma igual a 100
Enrofloxacino	12,5	Soma igual a 100
Difloxacino	25	100
Sarafloxacino	5	20
Danofloxacino	7,5	30
Norfloxacino	2,5	10
Penicilina G	1	4
Penicilina V	1	4
Ampicilina	1	4
Amoxicilina	1	4
Oxacilina	7,5	30
Cloxacilina	7,5	30
Dicloxacilina	7,5	30
Ceftiofur	25	100
Cefapirina	15	60
Cefoperazona	12,5	50
Nafcilina	7,5	30
Cefquinoma	5	20
Cefalônio	5	20
Cefalexina	25	100
Eritromicina	10	40
Espiramicina	50	200
Tilmicosina	12,5	50

(continua)

(conclusão)

Tabela 3 - Limite de quantificação (LQ) e limite máximo de resíduo (LMR), em leite.

Antimicrobiano	LQ (µg/L)	LMR (µg/L)
Azitromicina	25	25
Tilosina	12,5	100
Lincomicina	37,5	150
Clindamicina	37,5	10
Trimetoprim	12,5	50
Bromexina	12,5	50
Cloranfenicol	0,1	0,30
Tianfenicol	2	10
Florfenicol	1	10

Fonte: Brasil (2019).

3.5 Elaboração de esboço do programa estadual de controle de resíduos de antimicrobianos em leite cru

Após a obtenção dos dados foram delineadas as principais iniciativas para a elaboração de um esboço do Programa Estadual de Controle de Resíduos de Antimicrobianos em leite cru, a ser proximo estabelecido através de Instrução Normativa publicada pela Secretaria da Agricultura, Pecuária e Desenvolvimento Rural – RS. Como base, foi utilizado o Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes em Produtos de Origem Animal do MAPA, levando em consideração somente o Programa de Controle de Resíduos em Leite e as Instruções Normativas nº 76/2018 e 77/2018, ambas do MAPA, sendo realizadas as adaptações necessárias de acordo com a realidade do Serviço Veterinário Oficial do Rio Grande do Sul e com as demandas da SEAPDR.

3.6 Análise dos resultados

A análise qualitativa dos resultados levou em consideração os grupos antimicrobianos, sendo que os anfenicóis (Cloranfenicol, Tianfenicol e Florfenicol) são princípios ativos proibidos para uso veterinário e na alimentação animal. Dessa forma, verificou-se apenas a presença ou ausência destes compostos.

Os demais princípios ativos foram testados quanto à presença ou ausência e, estando presentes, seriam quantificados e comparados ao LMR.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Análise do questionário aplicado aos laticínios

A análise foi baseada a partir dos dados obtidos através do questionário (APÊNDICE A) aplicado nos 25 estabelecimentos registrados no Serviço de Inspeção Estadual do RS. De acordo com o questionário foi verificado que a totalidade dos estabelecimentos realizava a pesquisa simultânea de beta-lactâmicos e de tetraciclinas na recepção do leite cru, como pode ser observado na Figura 1. Dos 25 estabelecimentos, apenas 8 utilizavam testes para detecção de outros antimicrobianos, além de tetraciclinas e de beta-lactâmicos, sendo sulfonamidas, aminoglicosídeos, macrolídeos e cefalosporinas, como apontado na Figura 1. Com relação à eleição das marcas dos testes de triagem, foi verificado que 15 indústrias utilizavam o teste *Twinsensor* BT® (CAP-LAB), 6 usavam o *Beta Star*® (NEOGEN), 3 faziam uso do *Snap*® (IDEXX Laboratories) e 1 do *Eclipse 50*® (CAP-LAB).

Dessa forma, a investigação de resíduos de antimicrobianos nesses estabelecimentos industriais propicia a presença de resíduos de outros princípios ativos utilizados nos animais em lactação, oportunizando-se que um leite impróprio (pela presença de antimicrobianos) possa ser aceito na plataforma de recepção industrial, ocorrendo assim seu beneficiamento ou a produção de derivados lácteos.

A análise do questionário demonstrou, ainda, que a maioria dos estabelecimentos industriais utilizava os testes eleitos há mais de três anos e os escolheu por orientação do Responsável Técnico, por possuírem boa leitura e resultados confiáveis e pelo preço do teste. Apenas oito das indústrias optaram por determinado teste, levando em consideração o conhecimento dos antimicrobianos utilizados nas propriedades rurais dos seus fornecedores de leite.

A figura 01 descreve a quantidade e quais as classes de antimicrobianos pesquisadas nos testes de triagem, em relação aos estabelecimentos registrados na SEAPDR. Na figura 1 é possível observar que a maioria dos estabelecimentos realiza a pesquisa de antimicrobianos apenas para a classe dos beta-lactâmicos e das tetraciclinas e, apenas 8 indústrias pesquisam, além desta, outras classes, sendo tetraciclinas, sulfonamidas, aminoglicosídeos, macrolídeos e cefalosporinas.

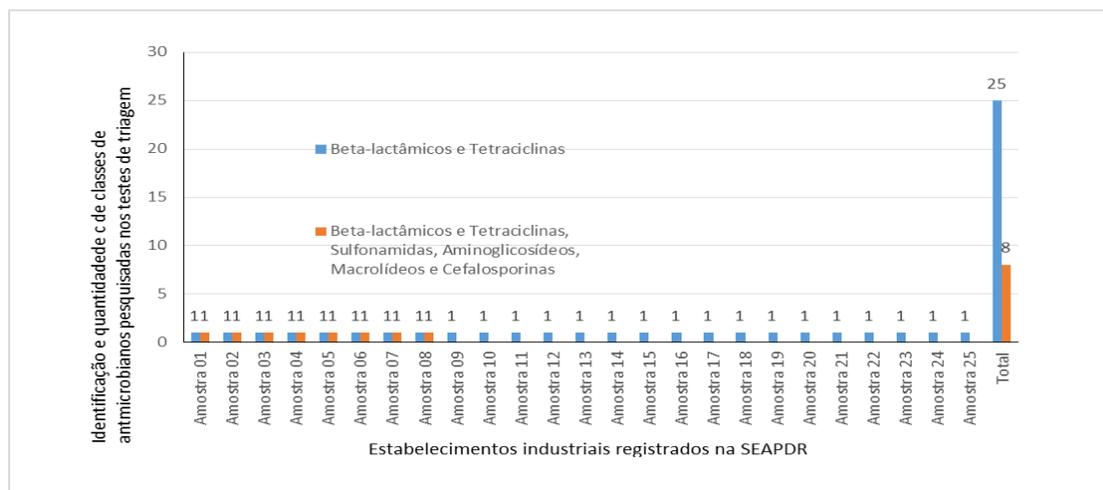


Figura 1 – Identificação e quantidade de classes de antimicrobianos pesquisadas nos testes de triagem, em relação aos estabelecimentos industriais registrados na SEAPDR.

Fonte: elaborado pela autora, a partir dos dados obtidos no questionário (2019).

Galvani (2016) aplicou o mesmo questionário em 36 estabelecimentos de leite e derivados dos 57 registrados na SEAPDR, à época. Observou que beta-lactâmicos eram avaliados pelos 36 estabelecimentos, dentre os quais, 11 pesquisavam exclusivamente resíduos desse antibiótico. Tetraciclina era monitorada por 25 dos estabelecimentos. Verificou, ainda, que para 24 das unidades industriais, o motivo da escolha pelo teste de triagem foi praticidade e rapidez no procedimento, demonstrando que, na maioria das indústrias registradas na SEAPDR, a escolha de analisar determinados antimicrobianos, não está associada com o conhecimento prévio sobre quais dessas substâncias são utilizadas pelos fornecedores de leite no tratamento dos animais.

4.2 Estabelecimentos industriais, rotas e amostras coletadas

Na figura 2 está descrita a distribuição dos estabelecimentos industriais por supervisão regional.

Conforme a figura 2 podemos observar um total de 154 rotas estabelecidas, das quais foram coletadas 103. A Supervisão Regional de Palmeira das Missões apresentou o maior número de rotas (42) e de amostras coletadas (29), seguida pela Supervisão Regional de Caxias do Sul com 24 rotas e 16 amostras coletadas.

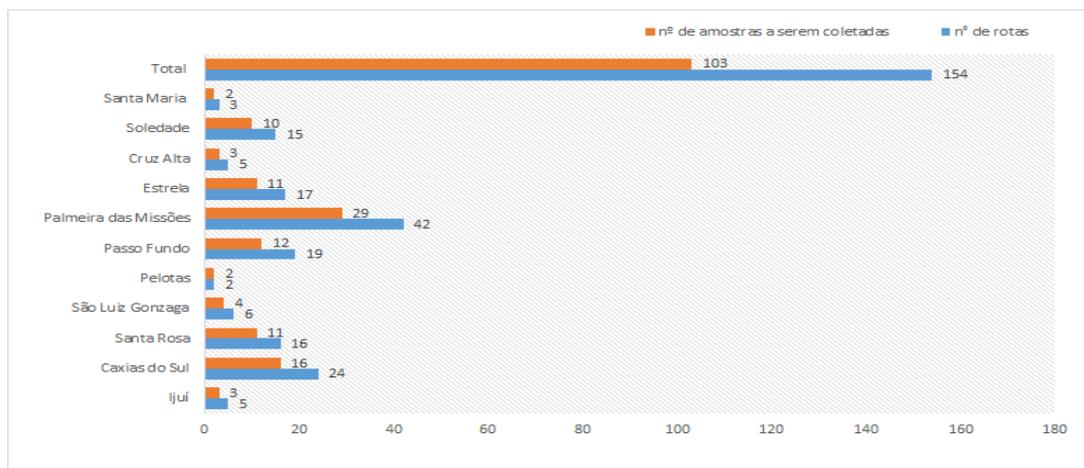


Figura 2 - Distribuição das rotas dos estabelecimentos de leite e derivados por supervisão regional da SEAPDR.

Fonte: elaborado pela autora (2019).

4.3 Análise dos dados laboratoriais das amostras de leite

A análise laboratorial demonstrou que as amostras apresentaram resultado abaixo do limite de quantificação (LQ) para todos os analitos nas três datas verificadas.

A tabela 5 revela o LQ e o limite máximo de resíduo (LMR) em matriz leite para as substâncias Cloranfenicol, Tianfenicol e Florfenicol. O resultado da análise laboratorial das amostras apresentou-se abaixo do LQ para os analitos listados, nas três datas verificadas. Para esses princípios ativos, a capacidade de detecção não é determinada, pois, de acordo com a Decisão da Comunidade Europeia (657/EC, 2002), em caso de substâncias relativamente às quais não se encontra definido um limite permitido, a capacidade de detecção é a concentração mais baixa a que o método é capaz de detectar amostras realmente contaminadas. Essa determinação é importante, visto que se trata de substâncias proibidas para uso no Brasil.

Tabela 4 - Limite de quantificação (LQ) e limite máximo de resíduo (LMR) em matriz leite para Anfenicóis.

Analitos	TÉCNICA	LQ ($\mu\text{g/L}$)			Limite máximo de resíduo (LMR)
		02/05/2019	04/06/2019	05/07/2019	
Cloranfenicol	LC-MS/MS	0,1	0,1	0,1	0,3
Tianfenicol	LC-MS/MS	2	2	2	10
Florfenicol	LC-MS/MS	1	1	1	10

unidade de medida - $\mu\text{g/L}$

Fonte: Elaborado pela autora (2019).

Segundo Jank *et al.* (2017) o método amostral desenvolvido e validado utilizado pelo LANAGRO realiza a análise de 49 resíduos de antibióticos pertencentes às classes das quinolonas, fluoroquinolonas, tetraciclina, sulfonamidas, beta-lactâmicos, cefalosporinas, trimetropim e bromexina. O método é factível para determinação de resíduos de antibióticos de várias classes em diversos tipos de matrizes alimentares. Para cada classe farmacológica, métodos quantitativos e confirmatórios foram previamente desenvolvidos e validados. Quanto ao limite de detecção do método, existe a capacidade para que todos os analitos sejam detectados corretamente em níveis de concentração de pelo menos metade do limite máximo de resíduo (LMR). Espectrometria de massa tandem é uma técnica altamente específica. O detector utilizado permite dados de massa altamente acurados que, se combinados com dados de tempo de retenção, levam a resultados considerados muito específicos.

Jadhav *et al.* (2019), em uma abordagem unificada de preparação de uma única amostra de leite bovino, para análises multirresíduos de alto rendimento de medicamentos veterinários e de pesticidas medidos por cromatografia líquida acoplada a espectrômetro de massa em modo tandem, recomendam a técnica como ideal para análises regulatórias de analitos.

Zhao *et al.* (2018) indicaram que a cromatografia líquida acoplada a espectrômetro de massa em modo tandem foi capaz de quantificar medicamentos veterinários de múltiplas classes e múltiplos resíduos em diferentes matrizes de carne. Os resultados mostraram que a extração líquido-líquido em duas etapas foi eficiente para todo o espectro de medicamentos veterinários.

Os dados obtidos após a análise das amostras pelo LANAGRO – RS indicaram que nenhum dos compostos de interesse encontrava-se acima do LQ do método, ou seja, sua concentração, se existentes, era tão baixa que não superava nem a concentração mínima para a quantificação das substâncias, não sendo possível realizar uma análise da quantidade presente, uma vez que limite de quantificação é definido como a menor quantidade do analito em uma amostra que pode ser determinada com precisão e exatidão aceitáveis sob as condições experimentais estabelecidas. Porém, como o método utilizado não possui estipulado o limite de detecção, ou seja, a concentração mínima para que possa distinguir o sinal do composto de interesse de demais sinais, como efeito matriz ou coeluentes, não é possível afirmar nem que há a presença dos compostos, nem que eles não estejam presentes, embora se estivessem, estariam presentes em níveis entre o limite de detecção e o limite de quantificação dos compostos. Nesse mesmo contexto, segundo a ANVISA (2009), o limite de detecção é a menor concentração, em teste analítico, que pode ser detectada, mas não necessariamente quantificada, dos compostos nesta matriz.

Chiaradia, Collins e Jardim (2008) consideraram a cromatografia com detecção por espectrometria de massas uma técnica bastante eficiente na análise de substâncias tóxicas em nível de traços, em alimentos, no sentido de terem sido atingidos, na maioria das técnicas de análise desenvolvidas, limites de quantificação abaixo dos LMR's dos compostos de interesse, de ter sido possível detectar a maioria dos compostos que se desejou analisar, de ter sido detectado um grande número de analitos de diferentes classes simultaneamente, no caso de análises multirresiduais, e da possibilidade de confirmar a identidade dos compostos analisados, com exatidão.

Silva *et al.* (2013), a partir de verificação de que amostras de leite de áreas rurais apresentaram uma proporção muito maior de resíduos do que amostras colhidas em áreas urbanas, sugerem que a detecção de antimicrobianos é mais frequente em amostras provenientes da mistura do leite de poucos animais, quando comparada à mistura de grandes volumes, provavelmente pela diluição resultante da mistura do leite nos laticínios, reforçando a necessidade da realização de testes para a pesquisa de antimicrobianos previamente à mistura do leite de diferentes tanques, ao posterior transporte em veículos com tanque de aço inoxidável.

A sugestão de Silva *et al.* (2013) corrobora com o presente estudo, uma vez que a mistura de leite dos diversos produtores pertencentes às rotas de coleta pode ter interferido na concentração dos antimicrobianos, pela diluição em grandes volumes de matéria-prima nos compartimentos de aço inoxidável dos veículos transportadores.

O resultado obtido (valores abaixo do limite de quantificação) por si só já indica que a amostra coletada de cada rota, caso apresentasse resíduos de antimicrobianos, estes estariam abaixo do LMR, visto que os limites de quantificação são ainda menores que aqueles, sendo assim possível afirmar que, do ponto de vista dos resíduos de antimicrobianos estudados, o produto está apto ao consumo. Não se pode, no entanto afirmar que o leite de todas as propriedades de cada uma das rotas está livre de resíduos de fármacos, visto que a presença destes no produto recebido de alguma das propriedades pode ter sido mascarada por conta da diluição causada pela mistura da matéria-prima de várias propriedades em um mesmo compartimento do veículo transportador. A única maneira de afirmar que todo o leite armazenado nas propriedades rurais de cada rota está livre desses resíduos seria a obtenção de amostras individuais de cada tanque de refrigeração do leite. A partir das coletas realizadas por rota e os resultados que foram obtidos nos testes laboratoriais, é possível apenas concluir que o produto composto da mistura de todas as propriedades rurais pertencentes à determinada rota está abaixo do LMR para resíduos de antimicrobianos e apto ao consumo humano.

A partir do estudo realizado com a aplicação do questionário para verificar os princípios ativos utilizados pelas indústrias, na triagem para pesquisa de resíduos de antimicrobianos e da

realização de ensaios sensíveis e específicos para os analitos existentes, pretendeu-se demonstrar a importância da implantação de um Programa Estadual de Controle de Resíduos de Antimicrobianos em leite cru no Estado do Rio Grande do Sul, para a proteção da saúde pública. Embora não tenha sido detectada a presença de resíduos de antimicrobianos nas amostras pesquisadas, ressalta-se que esse resultado apenas indicou a isenção do perigo direto ao consumidor, entretanto não revelou as práticas realizadas nas propriedades rurais.

Nesse sentido, a Instrução Normativa nº 77 (BRASIL, 2018a) estabelece que os estabelecimentos industriais devem manter, como parte de seu programa de autocontrole, o plano de qualificação de fornecedores de leite, o qual deve contemplar a assistência técnica e gerencial, bem como a capacitação de todos os seus fornecedores, com foco em gestão da propriedade e implementação das boas práticas agropecuárias. Dentre estas, destaca-se o uso racional e a estocagem de produtos químicos, agentes tóxicos e medicamentos veterinários. Determina, ainda, análise de, no mínimo, dois grupos de antimicrobianos, para cada recebimento de matéria-prima e análise do leite para todos os grupos de antimicrobianos para os quais existam especificações de triagem analíticas disponíveis, na plataforma das indústrias, em frequência determinada em seu programa de autocontrole.

A elaboração do Programa Estadual deve contemplar, também, a necessidade de empenhar esforços para que os princípios ativos testados na plataforma de recepção dos estabelecimentos industriais sejam, no mínimo, os mesmos constantes nos medicamentos utilizados no tratamento dos animais a campo, além de contribuir para as ações de controle sanitário e políticas públicas de fiscalização de alimentos.

Justifica-se, ainda, para demonstrar aos diferentes agentes da cadeia produtiva do leite, a necessidade de constante aprimoramento das boas práticas agropecuárias e de fabricação e a verificação do uso correto e seguro dos medicamentos veterinários a fim de reduzir a probabilidade de violação dos limites de referência estabelecidos para resíduos e contaminantes em produtos de origem animal, visando a evitar a presença desses princípios-ativos, comportando todo um esforço no sentido de ofertar aos consumidores do Rio Grande do Sul, alimentos lácteos seguros.

Ibach *et al.* (1998), verificaram que os produtores rurais não respeitam o período de espera entre a utilização de antibióticos e a ordenha, sendo detectados resíduos de oxacilina no leite após 28 dias de utilização. Dessa forma, a população que tem por hábito o consumo desse produto frequentemente, na forma primária ou em derivados, está constantemente ingerindo resíduos de antibióticos. Segundo Galvani (2016), a forma mais efetiva de minimizar a presença de resíduos de medicamentos no leite é através da mudança de comportamento do produtor rural, mediante

assistência técnica veterinária, contemplando entre outras orientações, esclarecimento quanto ao correto período de carência.

Lopes, Carraro e Veiga (2002) realizaram uma pesquisa em 80 propriedades leiteiras na região de Curitiba, no Paraná, e detectaram a prevalência expressiva de resíduos de antimicrobianos em 75% das amostras de leite pesquisadas.

Lapierre *et al.* (2019) pesquisaram a presença de resíduos de antimicrobianos em carne de cordeiro e leite, provenientes de fazendas familiares camponesas selecionadas em oito regiões do Chile. Verificaram que 4 das 14 amostras de carne de cordeiro e 11 de 9 amostras de leite apresentaram resultados positivos para diferentes classes de resíduos de antimicrobianos, como tetraciclina, macrolídeos, aminoglicosídeos e beta-lactâmicos, sendo que três amostras excederam o LMR para essas matrizes.

Galvani (2016) realizou a coleta de 388 amostras de leite cru em propriedades rurais no Rio Grande do Sul, diretamente dos tanques de armazenamento, representando o leite de todas as vacas lactantes no momento da coleta, no período de julho a novembro de 2013. Verificou que das 388 amostras de leite cru analisadas, 96 apresentavam algum resíduo de antimicrobiano, de 45 analitos pesquisados e, destas, 5 foram consideradas suspeitas para violação do LMR estipulado na legislação. Em 91 amostras, observou que a detecção de resíduos não ultrapassou a metade da concentração do LMR. Das classes de antimicrobianos detectadas, constatou que os macrolídeos, seguidos das quinolonas e das tetraciclina foram os mais comumente encontrados em leite cru de propriedades rurais do Rio Grande do Sul e, inclusive, das 5 amostras consideradas suspeitas para violação do LMR, todas referiam-se à classe dos macrolídeos. Em 21 amostras de leite cru identificou a presença de mais de um de antibiótico. Salienta, ainda, que os resíduos de antibióticos da classe dos beta-lactâmicos 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*, já demonstra resistência aos beta-lactâmicos, enquanto que os antibióticos da classe dos macrolídeos, destacando-se a eritromicina, surgem como opção terapêutica para a mastite estafilocócica.

4.4 Confeção de esboço do programa estadual de controle de resíduos de antimicrobianos em leite cru

Apesar de a análise das amostras realizadas pelo LANAGRO – RS ter demonstrado que todos os resultados obtidos ficaram abaixo do limite de quantificação, considera-se importante a

implantação de um Programa Estadual de Controle de Resíduos de Antimicrobianos em Leite Cru (APÊNDICE B), a ser proximamente estabelecido através de Instrução Normativa publicada pela SEAPDR – RS, para que se tenha o constante monitoramento dessas substâncias na matéria-prima e para manter a equivalência do Serviço de Inspeção Estadual do Rio Grande do Sul ao Sistema Brasileiro de Inspeção de Produtos de Origem Animal (SISBI – POA), sendo esta, uma exigência do Ministério da Agricultura e Abastecimento, determinada em auditoria.

Galvani (2016), pelos dados obtidos em seu estudo, recomenda a adoção de um programa regular no Rio Grande do Sul, para monitorar a presença de resíduos de medicamentos veterinários no leite.

Muitas ações de fiscalização são baseadas em Programas de Estado, cujo objetivo é de orientar, regulamentar e padronizar ações sanitárias, como os Programas Federais de Saúde Animal (de Brucelose e Tuberculose, de Febre Aftosa, de Raiva dos Herbívoros e Encefalopatia Espongiforme Bovina, de Sanidade Avícola, de Sanidade Apícola, de Sanidade dos Equídeos, de Sanidade de Caprinos e Ovinos, de Sanidade dos Suídeos e de Sanidade dos Animais Aquáticos) e os Programas relacionados ao Serviço de Inspeção Federal (de Controle de Patógenos, de Avaliação de Conformidade de Padrões Físico-químicos e Microbiológicos de Produtos de Origem Animal Comestíveis e Água de Abastecimento e o Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes) (BRASIL, 2019).

Partindo da premissa de que o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento já realiza o controle de resíduos e contaminantes nos estabelecimentos sob sua chancela, um controle realizado pela SEAPDR nas indústrias sob sua fiscalização abrangeria a maioria das propriedades fornecedoras de leite cru, fazendo com que os Serviços de Fiscalização (Federal e Estadual) atuantes no Estado do Rio Grande do Sul tenham grande parte do controle dessa matéria-prima no que se refere ao monitoramento de resíduos de antimicrobianos. Com a publicação da Instrução Normativa 77 (BRASIL, 2018a), a atuação da SEAPDR no controle de resíduos de antimicrobianos em leite cru nas indústrias registradas no Serviço de Inspeção Estadual torna-se mais factível, uma vez que a proposta estabelece a coleta de amostras de leite cru para a pesquisa de violação do LMR de antimicrobianos a partir dos resultados das amostras individuais de todos os fornecedores de leite cru. Dessa forma, as amostras individuais remetidas aos laboratórios da Rede Brasileira de Laboratórios de Controle da Qualidade do Leite (RBQL), que apresentarem resultado positivo para a presença de antimicrobianos terão as propriedades rurais de origem fiscalizadas pelo Serviço Veterinário Oficial da SEAPDR, para levantamento das possíveis causas da não conformidade identificada, com colheita de amostra de leite cru.

5 CONCLUSÃO

No que se refere à presença de resíduos de antimicrobianos em leite cru, os resultados da presente pesquisa demonstraram que, nas amostras testadas, os princípios ativos não estavam presentes, não sendo possível realizar a quantificação para verificar a violação ou não do limite máximo de resíduo.

Entretanto, a presença de resíduos de antimicrobianos em leite cru deve ser um motivo de preocupação para autoridades sanitárias e para estabelecimentos de leite e derivados, pelo risco que pode causar à saúde do consumidor e pelos prejuízos na produção de derivados lácteos, respectivamente. Essa constatação confirma-se pelo fato de que, conforme levantamento realizado nesta pesquisa através da aplicação de questionário, apenas as classes de betalactâmicos e de tetraciclina são pesquisadas pela totalidade das indústrias, além de um número reduzido delas que verifica, também, sulfonamidas, aminoglicosídeos e macrolídeos.

Dessa forma, existe a possibilidade de haver matéria prima contaminada com resíduos de antimicrobianos e estes, por consequência, estarem presentes no leite fluido de consumo direto e nos derivados, acarretando prejuízos à saúde dos consumidores.

Portanto, ações que culminem em elementos de monitoramento de resíduos de antimicrobianos coordenadas pelo Poder Público são essenciais para avaliar a exposição humana a esses compostos e o potencial risco à saúde pública, o que possibilita, a partir dos dados gerados nesse estudo, a estruturação do Programa Estadual de Controle de Resíduos de Antimicrobianos em Leite Cru.

REFERÊNCIAS

- ADDO, K. K.; MENSAH, G. I.; ANING, K. G.; NARTEY, N.; NIPAH, G. K.; BONSU, C.; AKYEH, M. L.; SMITS, H. L. Microbiological quality and antibiotic residues in informally marketed raw cow milk within the coastal savannah zone of Ghana. **Tropical Medicine and International Health**, Oxford, v. 16, n. 2, p. 227-232, Feb. 2011.
- ALANIS, A. J. Resistance to antibiotics: are we in the post-antibiotic era? **Archives of Medical Research**, Indianapolis, v. 36, n. 6, p. 697-705, nov-dez. 2005.
- AMORIM, A. L. B. C. **Avaliação da presença de substâncias químicas em leites cru e beneficiado produzidos e comercializados no Distrito Federal e entorno**. 2017. 49 f. Dissertação (Mestrado em Saúde Animal) – Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, Brasília, DF, 2017.
- ARAÚJO, G. B.; SANTOS, H. A.; FARIAS, C. E.; VIANA, D. A. F.; VIERIRA, E. S.; JUNIOR, A. M. F. Detecção de resíduo de antibiótico em leite *in natura* em laticínio sob inspeção federal. **Scientia Plena**, Sergipe, v. 11, n.4, p. 1-6, 2015.
- ASREDIE, T.; ENGDAW, T. A. Antimicrobial Residues in Cow Milk and its Public Health Significance. **World Journal of Dairy & Food Sciences**, v. 10, n. 2, p. 147-153, 2015.
- BC Centre for Disease Control. Agency of the Provincial Helth Services Authority. Antibiotic Residues in Milk. Dairy Safety Notes, fev. 2013.
- BITTENCOURT, F. S. S. **Avaliação de desempenho e validação de ensaios analíticos qualitativos comerciais para triagem de resíduos de antimicrobianos em leite cru**. 2017. 94 f. Dissertação (Mestrado Profissional em Ciência e Tecnologia do Leite e Derivados) - Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, MG, 2017.
- BOOTH, J. M.; HARDING, F. Testing for antibiotics residues in milk. **The Veterinary Record**, v. 119, n. 23, p. 565-569, 1986.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 42, de 22 de dezembro de 1999. Altera o Plano Nacional de Controle de Resíduos em Produtos de Origem Animal – PNCR e os Programas de Controle de Resíduos em Carne – PCRC, Mel – PCRM, Leite – PCRL e Pescado – PCRP. **Diário Oficial da União**: seção 1: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Brasília, DF, p. 213, 22 dez. 1999. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/assuntos/inspecao/produtos-animal/plano-de-nacional-de-controle-de-residuos-e-contaminantes/documentos-da-pncrc/instrucao-normativa-sda-n-o-42-de-20-de-dezembro-de-1999.pdf/view>. Acesso em: 23 ago. 2019.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 9, de 27 de junho de 2003. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 30 jun. 2003. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/assuntos/insumos-agropecuarios/insumos-pecuarios/alimentacao-animal/arquivos-alimentacao-animal/legislacao/instrucao-normativa-no-9-de-27-de-junho-de-2003.pdf/view>. Acesso em: 23 ago. 2019.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Decreto nº 5741, de 30 de março de 2006. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 30 mar. 2006. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/assuntos/vigilancia-agropecuaria/ivegetal/bebidas-arquivos/decreto-no-5-741-de-30-de-marco-de-2006-suasa.doc/view>. Acesso em 23 ago. 2019.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Programa de análise de resíduos de medicamentos veterinários em alimentos de origem animal: PAMVET: RELATÓRIO 2006-2007: monitoramento de resíduos em leite exposto ao consumo (5º E 6º anos de atividades)**. Brasília, DF, ANVISA, Jun. 2009. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/documents/33916/395364/PAMVET.pdf/4777c371-e5b5-42e0-9c3f-43670009a802>. Acesso em: 23 ago. 2019.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Manual de coleta de amostras do PNCRC/MAPA**. Brasília, DF: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 2011.

BRASIL. Ministério da Agricultura e Abastecimento. Instrução Normativa nº 9, de 21 de fevereiro de 2017. **Diário Oficial da União**: seção 1: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Brasília, DF, edição 46, p. 4, 8 mar. 2017b. Disponível em: http://www.in.gov.br/web/guest/materia/-/asset_publisher/Kujrw0TZC2Mb/content/id/20365591/do1-2017-03-08-instrucao-normativa-n-9-de-21-de-fevereiro-de-2017-20365523. Acesso em: 23 ago. 2019.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Decreto nº 9.013, de 29 de março de 2017. Regulamenta a Lei nº 1.283, de 18 de dezembro de 1950, e a Lei nº 7.889, de 23 de novembro de 1989, que dispõem sobre a inspeção industrial e sanitária de produtos de origem animal. **Diário Oficial da União**: seção 1: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Brasília, DF, edição 62, p. 3, 30 mar. 2017a. Disponível em: http://www.in.gov.br/materia/-/asset_publisher/Kujrw0TZC2Mb/content/id/20134722/do1-2017-03-30-decreto-n-9-013-de-29-de-marco-de-2017-20134698. Acesso em: 23 ago. 2019.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Anuário dos programas de controle de alimentos de origem animal do DIPOA**. Brasília, DF, 2018. v. 4

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 76, de 30 de novembro de 2018. Aprova os Regulamentos Técnicos que fixam a identidade e as características de qualidade que devem apresentar o leite cru refrigerado, o leite pasteurizado e o leite pasteurizado tipo A. **Diário Oficial da União**: seção 1, Brasília, DF, n. 230, p. 9, 30 nov. 2018.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 77, de 30 de novembro de 2018. Estabelece os critérios e procedimentos para a produção, acondicionamento, conservação, transporte, seleção e recepção do leite cru em estabelecimentos registrados no serviço de inspeção oficial. **Diário Oficial da União**: seção 1, Brasília, DF, n. 230, p. 10, 30 nov. 2018a.

BRASIL. **Estatística da produção pecuária**: indicadores IBGE. Brasília, DF: Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, jan./mar. 2019.

BRASIL. Ministério da Agricultura e Abastecimento. Instrução Normativa nº 5, de 25 de abril de 2019. Aprova o plano de amostragem e os limites de referência para o Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes em Produtos de Origem Animal - PNCRC de 2019 para as cadeias de carnes bovina, suína, caprina, ovina, equina, de coelho, de aves e de avestruz, de leite, pescado, mel

e ovos. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 25 abr. 2019. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/assuntos/inspecao/produtos-animal/plano-de-nacional-de-controle-de-residuos-e-contaminantes/InstruoNormativaN05.2019PNCRC2019.pdf> . Acesso em: 23 ago. 2019.

BRITO, M. A. V. P. **Resíduos de antimicrobianos no leite**. Juiz de Fora: Embrapa Gado de Leite, 2000. 28 p. (Circular Técnica, 60).

CARVALHO, G. R.; ROCHA, D. T.; CARNEIRO, A.V. (coord.). **Indicadores**: leite e derivados, Juiz de Fora, ano 9, n. 78, maio 2018. Boletim eletrônico mensal. Disponível em: <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/176816/1/Indicadores-leite-78-Maio.pdf> . Acesso em: 23 ago. 2019.

CERQUEIRA, M. M. O. P.; SOUZA, F. N.; CUNHA, A. F.; PICININI, L. C. A.; LEITE, M. O.; PENNA, C. F. A. M.; SOUZA, M. R.; FONSECA, L. M. Detection of antimicrobial and anthelmintic residues in bulk tank milk from four different mesoregions of Minas Gerais State – Brazil. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 66, n. 2, p. 621-625, 2014.

CHIARADIA, M. C.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F. O estado da arte da cromatografia associada à espectrometria de massas na análise de compostos tóxicos em alimentos. **Química Nova**, São Paulo, v. 31, n. 3, p. 623-636, 2008.

COSTA, A. S. **Avaliação da presença de resíduos de antimicrobianos em leite e bebida láctea UHT por teste de inibição microbiana comercial**. 2009. 59 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2009.

COSTA, A. B. L. *et al.* Avaliação de Resíduos de Antibióticos em Leite Cru Produzido na Região de Marília São Paulo. **Unimar Ciências**, Marília, v. 26, n. 1-2, p. 114-123, 2017.

DIAS, M.; MONTEIRO, M. S.; MENEZES, M. F. Antibiótico e resistência bacteriana, velhas questões, novos desafios. **Cadernos Otorrinolaringologia. Clínica, Investigação e Inovação**, Porto, p. 1-10, dez. 2010.

European Commission (2010) Commission regulation (EU) No. 37/2010 of 22 December 2009: on pharmacologically active substances and their classification regarding maximum residue limits in foodstuffs of animal origin. Off. J. Eur. Union 1–72.

FONSECA, G. P.; CRUZ, A. G.; FARIA, J. A. F.; SILVA, R.; MOURA, M. R. L.; CARVALHO, L. M. J. Antibiotic residues in Brazilian UHT milk: a screening study. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 29, n. 2, p. 451-453, abr.-jun. 2009.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. Department of Health and Human Services. Center for Veterinary Medicine. **Milk drug residue sampling survey, Washington, DC: CVM**, mar. 2015.

GALVANI, J. W. C.; **Avaliação da ocorrência de resíduos de antibióticos em leite cru produzido em propriedades rurais no Rio Grande do Sul**. 2016. 103 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, 2016.

HIGHAM, L. E.; DEAKIN, A.; TIVEY, E.; PORTEUS, V.; RIDGWAY, S.; RAYNER, A. C. A survey of dairy cow farmers in the United Kingdom: knowledge, attitudes and practices surrounding antimicrobial use and resistance. **Veterinary Record**, London, v. 10, n. 1136, 2018.

IBACH, A. *et al.* Oxacillin residues in milk after drying off with Stapenor Retards TS. **Analyst**, Cambridge, v. 123, n. 12, p. 2763-2765, dez. 1998.

JADHAV, M. R.; PUDALE, A.; RAUT, P.; UTTURE, S.; SHABEER, T. P. A.; BANERJEE, K. A unified approach for high-throughput quantitative analysis of the residues of multi-class veterinary drugs and pesticides in bovine milk using LC-MS/MS and GC-MS/MS. **Food Chemistry**, Amsterdam, v. 22, p. 292-305, 2019.

JANK, L. *et al.* Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry Multiclass Method for 46 Antibiotics Residues in Milk and Meat: Development and Validation. **Springer Science+Business Media**, New York, jan. 2017. Food Anal. Methods. doi: 10.1007/s12161-016-0755-4.

LAPIERRE, L.; QUINTREL, M.; LAGOS-SUSAETA, F.; HERVÉ-CLAUDE, L. P.; RIQUELME, R.; OVIEDO, P.; MAINO, M.; CORNEJO, J. Assessment of Antimicrobial and Pesticide Residues in Food Products Sourced from Peasant Family Farming in Chile. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 82, n. 9, p. 1583-1590, 2019.

LOPES, M. O.; CARRARO, C. N. M.; VEIGA, D. R. Levantamento do uso e detecção de resíduos de antimicrobianos no leite produzido na região metropolitana de Curitiba-PR. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora, v. 57, n. 32, p. 233-235, 2002.

NADEEM, R.; KI-HYUN, K. Quantification techniques for important environmental contaminants in milk and dairy products. **Trends in Analytical Chemistry**, Amsterdam, v. 98, p. 79-94, 2018.

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

NERO, L. A.; MATTOS, M. R.; BELOTI, V.; BARROS, M. A. F.; RANCO, B. D. G. M. Resíduos de antibióticos em leite cru de quatro regiões leiteiras no Brasil. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 27, n. 2, p. 391-393. 2007.

NUNES, E. R. C. **Avaliação de Resíduos de Antimicrobianos em Leite *in natura* Procedente do Rebanho Bovino Leiteiro da Microrregião de Garanhuns, Pernambuco**. 2013. 69 f. Dissertação (Sanidade e Reprodução de Ruminantes) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Garanhuns, PE, 2013.

PEREIRA, M. N.; SCUSSEL, V. M. Resíduos de antimicrobianos em leite bovino: fontes de contaminação, impactos e controle. **Revista de Ciências Agroveterinárias**, Lages, v. 16, n. 2, p. 170-182, 2017.

- PORTZ, A. J.; COUTO, E. P.; FERREIRA, M. A. Resíduos de antibióticos e qualidade microbiológica de leite cru e beneficiado. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, São Paulo, v. 73, n. 4, p. 345-350, 2014.
- PUGH, K. E.; HENDY, P. G.; EVANS, J. M. A possible source of antibiotic contamination of milk. **Veterinary Record**, London, v. 101, n. 15, p. 313, out. 1977.
- RUBIN, L. S.; RUBIN, V. S. Garantia de qualidade e desafios institucionais: o caso do leite no Brasil. In: CONGRESSO SOBER: Sociedade Brasileira de Economia, Administração e Sociologia Rural, 48., Campo Grande, 25 a 28 de julho de 2010. **Anais**. Campo Grande: Sociedade Brasileira de Economia, Administração e Sociologia Rural, 2010. 19p.
- SANTIAGO NETO, W. **Avaliação de fatores de risco para resistência múltipla a antimicrobianos em bactérias da glândula mamária do gado de leite em sete regiões do Brasil**. 2015. 98 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, 2015.
- SCHLEMPER, V.; SACHET, A. P. Antibiotic Residues in pasteurized and unpasteurized milk marketed in southwest of Paraná, Brazil. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 47, n. 12, dez. 2017.
- SILVA, D. P.; GELLEN, L. F. A.; SILVA, T. S.; COSTA, J. L.; SILVA, A. L. L.; SCHEIDT, G. N. Resíduos de antibióticos em leite: prevalência, danos à saúde e prejuízos na indústria de laticínios. **Evidência**, Joaçaba, v. 13, n. 2, p. 127-152, jul./dez. 2013.
- SILVA, E. P.; SOUZA, J. R.; CALDAS, E. D. Veterinary drug residues in milk and eggs. **Química Nova**, São Paulo, v. 37, n. 1, p. 111-122, 2014.
- SILVA, T. S. **Abordagem crítica sobre o Programa Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes em leite com ênfase em antibióticos**. Goiânia: Universidade Federal de Goiás, 2009. 46 f. Trabalho apresentado junto à Disciplina Seminários Aplicados do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Goiás.
- SOUZA, L. B.; PINHEIRO, C. G. M. E.; GERALDO NETO, S. A. G.; SILVA, J. B. A. Resíduos de antimicrobianos em leite bovino cru no Estado do Rio Grande do Norte. **Ciência Animal Brasileira**, Goiânia, v. 18, p. 1-6, e-23050, 2017.
- SREDNIK, M. E.; TREMBLAY, Y. D. N.; LABRIE, J.; ARCHAMBAULT, M.; JACQUES, M.; CIRELLI, A. F.; GENTILINI, E. R. Biofilm formation and antimicrobial resistance genes of coagulase-negative staphylococci isolated from cows with mastitis in Argentina. **Federation of European Microbiological Societies Microbiology Letters**, Reino Unido, v. 364, 2017.
- TENÓRIO, C. G. M. S. C.; CERQUEIRA, M. M. O. P.; VIEGAS, R. P.; RESENDE, M. F. S.; CLINQUART, D. L.; SANTOS, A. K. R.; SOUZA, M. R.; PENNA, C. F. A. M. Eficiência dos testes COPAN (Microplate e Single) na detecção de resíduos de antimicrobianos no leite. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 61, n.2, p. 504-510, abr. 2009.
- TRONCO, V. M. **Manual de inspeção da qualidade do leite**. 4. ed. Santa Maria: UFSM, 2010. 195 p.

ZASTEMPOWSKA, E.; GRAJEWSKI, J.; TWARUŻEK, M. Food-borne pathogens and contaminants in raw milk – a review. **Annals of Animal Science**, Krakow, v. 16, n. 3, p. 623-639, 2016.

ZHAO, L.; LUCAS, D.; LONG, D.; RICHTER, B.; STEVENS, J. Multi-class multi-residue analysis of veterinary drugs in meat using enhanced matrix removal lipid cleanup and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 1549, p. 14-24, 2018.

ANEXO I – Questionário

AVALIAÇÃO DA PESQUISA DE RESÍDUOS DE ANTIBIÓTICOS NA PLATAFORMA DE RECEBIMENTO DO LEITE - DIPOA	
Classificação do estabelecimento:	CISPOA n° :
<input type="checkbox"/> Fábrica de Laticínios <input type="checkbox"/> Usina de Beneficiamento de Leite <input type="checkbox"/> Micro Usina de Beneficiamento	
1- Teste-Kit de detecção de resíduos de antibióticos utilizado na empresa:	
Nome: _____	
Marca: _____	
2- Grupos de resíduos de antibióticos pesquisados (é possível marcar mais de uma opção):	
<input type="checkbox"/> Betalactâmicos <input type="checkbox"/> Tetraciclinas <input type="checkbox"/> Sulfonamidas <input type="checkbox"/> Aminoglicosídeos (ex. gentamicina) <input type="checkbox"/> Macrolídeos	
Outros? Quais: _____	
3- Motivo da escolha, pela empresa, do Teste-Kit para pesquisa dos resíduos de antibióticos descritos no item 2 (é possível marcar mais de uma opção):	
<input type="checkbox"/> Preço do Teste-Kit	
<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. Qual? _____	
4- Há quanto tempo pesquisa os resíduos de antibióticos descritos no item 02?	
<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	

APÊNDICE A - Esboço de Programa Estadual de Controle de Resíduos de Antimicrobianos em Leite Cru

Introdução:

O Programa terá suas ações direcionadas para se conhecer e evitar a violação dos LMR's de substâncias antimicrobianas autorizadas, bem como a ocorrência de quaisquer níveis de resíduos de compostos químicos antimicrobianos de uso proibido no país. Os antimicrobianos podem, em soluções diluídas, impedir temporariamente ou definitivamente as funções vitais de bactérias. O uso seguro e correto dessas drogas para o tratamento e prevenção de doenças está amplamente difundido na pecuária. O uso indiscriminado dessas substâncias promove o desenvolvimento de microrganismos resistentes, dificultando a ação da antibióticoterapia.

Objetivo:

Tornar a SEAPDR parte integrante do esforço destinado à melhoria da produtividade e da qualidade do leite e dos seus derivados colocados à disposição dos consumidores. Para isso, as metas estarão direcionadas para a verificação do uso correto e seguro dos antimicrobianos, de acordo com as práticas recomendadas, no sentido de garantir a produção e a produtividade do leite no Rio Grande do Sul, com ações direcionadas ao conhecimento das violações em decorrência do uso indevido desses medicamentos.

Operacionalização do Programa:

1. Todos os fornecedores de leite cru, cujas amostras individuais remetidas aos laboratórios da Rede Brasileira de Laboratórios de Controle da Qualidade do Leite (RBQL), conforme a Instrução Normativa nº 77/2018 (BRASIL, 2018), apresentarem resultado positivo para a presença de antimicrobianos terão suas propriedades fiscalizadas pelo Serviço Veterinário Oficial da SEAPDR, para levantamento das possíveis causas da não conformidade identificada, com colheita de amostras de leite cru em triplicata (BRASIL, 2009) diretamente do tanque de armazenagem da matéria-prima na propriedade rural de origem do leite, após a ordenha de todos os animais, seguindo o procedimento prévio de homogeneização.
2. A amostra deverá ser enviada aos laboratórios da rede oficial (LANAGRO) do MAPA.
3. Se o resultado da análise da amostra for negativo nenhuma ação é recomendada.
4. Confirmada a violação do LMR:
 - 4.1 Notificar o proprietário e o estabelecimento industrial receptor;

4.2 A propriedade fica impedida de comercializar a matéria-prima até a apresentação de resultado negativo em uma nova análise, a partir de coleta oficial.

5. Confirmada a utilização de substâncias proibidas:

5.1 Notificar o proprietário e o estabelecimento industrial receptor;

5.2 Cabe recurso da análise da contraprova até 15 dias após a notificação;

5.3 Confirmado o resultado da primeira análise pela contraprova, fica o proprietário sujeito a sanções decorrentes de sindicância da Polícia Federal, bem como do Ministério Público Federal;

5.4 A propriedade fica impedida de comercializar a matéria-prima até a apresentação de resultado negativo em uma nova análise, a partir de coleta oficial.

Colheita, preparação, acondicionamento e envio de amostras sob investigação, para análise:

Será rigorosamente observado o disposto no Manual de Coleta de Amostras do PNCRC/MAPA (BRASIL, 2011).

APÊNDICE B - Instrutivo de procedimento para coleta de leite

De acordo com o Manual de Coleta de Amostras do PNCRC/MAPA (BRASIL, 2011).

Passo 1: Homogeneizar o leite a ser amostrado por aproximadamente 3 minutos;

Passo 2: Coletar 50 ml de leite cru de cada rota sorteada;

Passo 3: Acondicionar a amostra no frasco de polipropileno com tampa, completando o volume;

Passo 4: identificar o frasco de acordo com a rota e o nº de registro CISPOA do estabelecimento.

Passo 5: Preencher a requisição, carimbar e assinar;

Passo 6: Acondicionar a amostra no envoltório plástico;

Passo 7: Congelar a amostra;

Passo 8: Após o congelamento, acondicionar hermeticamente a amostra e o meio refrigerante na caixa de isopor, proporcionando as condições necessárias para que chegue ao laboratório de destino em condições adequadas para a realização das análises;

Passo 9: depositar a via da requisição em um envelope;

Passo 10: identificar o envelope (AMOSTRA DO PROGRAMA DE CONTROLE DE RESÍDUOS LEITE/DIPOA/SEAPDR);

Passo 11: Fixar o envelope contendo a requisição com uma fita adesiva na face externa da caixa de isopor;

Passo 12: Enviar a amostra para a DIPOA, aos cuidados da Seção Técnica de Laticínios.

Poderá ser enviado mais de um frasco em uma mesma caixa de isopor, desde que identificado e devidamente acondicionado conforme as orientações desse instrutivo e desde que as requisições respectivas estejam depositadas no envelope que deverá ser fixado à caixa com fita adesiva.

APÊNDICE C – Requisição para análise



ESTADO DO RIO GRANDE DO SUL
SECRETARIA DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E DESENVOLVIMENTO RURAL
Departamento de Defesa Agropecuária
Divisão de Inspeção Industrial de Produtos de Origem Animal

REQUISIÇÃO PARA ANÁLISE DE LEITE	
NOME DO ESTABELECIMENTO:	
CISPOA:	
ENDEREÇO:	
MUNICÍPIO:	
PRODUTO COLETADO:	LEITE CRU REFRIGERADO
DATA DE PRODUÇÃO:	
IDENTIFICAÇÃO DA ROTA:	
ANÁLISES SOLICITADAS	
MICROBIOLÓGICAS	FÍSICO-QUÍMICAS
	<input checked="" type="checkbox"/> Multiensaios Leite 2
DATA E HORA DA COLETA:	
EMPRESA TRANSPORTADORA E CNPJ:	
NOME DO MOTORISTA E CPF:	
Nº DO COMPARTIMENTO COLETADO:	
PLACA DO VEÍCULO:	
ROTA DO VEÍCULO:	
FUNCIONÁRIO QUE REALIZOU A COLETA:	
TIPO DE PRODUTO	
<input type="checkbox"/> RESFRIADO	
<input checked="" type="checkbox"/> CONGELADO	
<input type="checkbox"/> TEMPERATURA AMBIENTE	

ASSINATURA E CARIMBO

APÊNDICE D – Memorando de solicitação de coleta



ESTADO DO RIO GRANDE DO SUL
SECRETARIA DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E DESENVOLVIMENTO RURAL
Departamento de Defesa Agropecuária
Divisão de Inspeção Industrial de Produtos de Origem Animal

MEMORANDO N.º XX/2019

Para: Supervisão Regional		De: Seção Técnica de Laticínios, Ovos e Mel/DIPOA		
Data: ___/___/2019	<input checked="" type="checkbox"/> URGENTE <input type="checkbox"/> CONFIDENCIAL	Rubrica do remetente	Rubrica do destinatário	Referência
<p style="text-align: center;">Assunto: Coletas de leite cru</p> <p style="text-align: center;">Senhor Supervisor:</p> <p>Tendo em vista projeto em andamento nesta SEAPDR, em parceria com o LANAGRO – RS, para a pesquisa de resíduos de antimicrobianos em leite cru, solicitamos suas providências para o atendimento da seguinte demanda:</p> <p>Coleta de amostra de leite cru no estabelecimento Fulano de Tal Ltda. – CISPOA XXX. Deve ser realizado pelo FEA responsável, um sorteio do total das <u>(nº de rotas)</u> rotas do estabelecimento, sendo que destas, <u>(nº de amostras)</u> devem ter o leite cru coletado (uma amostra de leite cru por rota).</p> <p>A coleta deverá ser realizada a partir dos compartimentos do tanque de aço inoxidável do veículo, podendo ser feita pelo transportador sob acompanhamento do FEA responsável.</p> <p>O material para coleta (frasco, envoltório, gelo e caixa isotérmica) deverá ser retirado na DIPOA (Nível Central).</p> <p>Anexos a este Memorando estão sendo remetidos o modelo de requisição e as instruções para coleta.</p> <p style="text-align: center;">Atenciosamente,</p> <p>De acordo: Seção Técnica de Laticínios, Ovos e Mel</p>				