

Faculdade de Ciências Farmacêuticas  
Universidade de São Paulo

*Recebido em 20/08/02  
Milda*

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**  
**FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**  
Programa de Pós-Graduação em Farmácia  
Área de Toxicologia e Análises Toxicológicas

*Milda*

Análise de resíduos dos antibióticos oxitetraciclina, tetraciclina,  
clortetraciclina e doxiciclina, em leite, por cromatografia líquida de  
alta eficiência

Michela Denobile

Dissertação para obtenção do grau de  
**MESTRE**

Orientador:  
Profa. Dra. Elizabeth de Souza Nascimento

São Paulo  
2002

DEDALUS - Acervo - CQ



30100004443

**Ficha Catalográfica**

Elaborada pela Divisão de Biblioteca e  
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

Denobile, Michela

D413a Análise de resíduos dos antibióticos oxitetraciclina, tetraciclina, clortetraciclina e doxiciclina, em leite, por cromatografia líquida de alta eficiência / Michela Denobile. -- São Paulo, 2002. 121p.

Dissertação (mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas.

Orientador: Nascimento, Elizabeth de Souza

I. Contaminação de alimentos : Toxicologia 2. Cromatografia em líquido de alta eficiência : Análise toxicológica I. T. II. Nascimento, Elizabeth de Souza, orientador.

615.954 CDD

**Michela Denobile**

**Análise de resíduos dos antibióticos oxitetraciclina, tetraciclina,  
clortetraciclina e doxiciclina, em leite, por cromatografia líquida de  
alta eficiência**

**Comissão Julgadora  
da  
Dissertação para obtenção do grau de Mestre**

**Profa. Dra. Elizabeth de Souza Nascimento  
orientador/presidente**

**Profa. Dra. Helenice de Souza Spinosa  
1º. examinador**

**Profa. Dra. Maria Cecília de Figueiredo Toledo  
2º. examinador**

**São Paulo, 07 de fevereiro de 2002**

Dedico este trabalho

À minha família, meus pais Ivanice e José Luiz, e a minha irmã Tatiana  
Por não terem poupado esforços e carinho em me dar uma excelente educação e por serem exemplos de dedicação e determinação.

Ao Márcio

Pelo incentivo, compreensão e  
grande ajuda, e por ser luz em minha vida

À Profª. Drª. Elizabeth de Souza Nascimento  
Meu eterno agradecimento, carinho e admiração,  
pela sua dedicada e compreensiva orientação,  
estímulo e amizade.

## **AGRADECIMENTOS**

Aos coordenadores do Curso de Pós-Graduação em Farmácia, Área de Toxicologia e Análises Toxicológicas, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, pela oportunidade;

A Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES – pela concessão da bolsa de estudo;

Aos professores do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, pelos ensinamentos

Aos professores Dra. Alice da Matta Chasin, Dra. Helenice de Souza Spinosa e Dra. Maria Teresa Destro, pelas importantes sugestões e correções no exame de qualificação;

Aos funcionários do Curso de Pós-Graduação em Toxicologia e Análises Toxicológicas, pelo auxílio prestado durante a realização desse trabalho;

Aos colegas do curso de Pós-Graduação em Toxicologia e Análises Toxicológicas: Vanessa, Simone, Míriam, Cristiana, Cláudia, Patrícia, Isarita, Daniele, Fábio, Maurício, Breno, Tânia, Sônia, Daniela e todos os alunos que compartilham dos mesmos objetivos neste curso;

A Bulé, por sua demonstração de amizade e grande disposição em ajudar, que são atitudes preciosas neste mundo moderno;

As amigas Eliane e Nádia, pela amizade e companheirismo;

Ao Centro de Controle de Intoxicações da Unicamp e principalmente a Sueli, Paula e Márcia, por contribuírem com meu aprimoramento profissional;

Ao Tácito e Alessandro que contribuíram para a coleta das amostras, possibilitando a realização deste trabalho;

A todas as pessoas que direta ou indiretamente me ajudaram a realizar este trabalho, meu agradecimento.

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	5
2.1. Agentes antimicrobianos .....	5
2.2. Tetraciclinas .....	9
2.2.1 Farmacocinética .....	11
2.2.1.1. Absorção.....	11
2.2.1.2 Distribuição .....	11
2.2.1.3. Biotransformação e excreção .....	12
2.2.2. Farmacodinâmica .....	13
2.2.3. Efeitos adversos observados na terapia .....	14
2.2.4. Resistência Bacteriana à tetraciclinas .....	16
2.3. Indicações para o uso das tetraciclinas na pecuária .....	16
2.4. Uso de doses subterapêuticas de antibióticos e sulfonamidas na pecuária.....	18
2.5. Resíduos de antibióticos em alimentos e os riscos à saúde pública .....	22
2.6. Interferência dos resíduos de antibióticos na produção de derivados e no controle de qualidade do leite.....	27
2.7. A incidência e principais causas de resíduos de antibióticos no leite .....	29
2.8. Mastite .....	34
2.9. Medidas preventivas para evitar resíduos de antibióticos no leite .....	36
2.10. Limite Máximo de Resíduos.....	37
2.11. O efeito do cozimento nos resíduos de tetraciclinas presentes no alimento .....	40
2.12. Classificação do leite.....	42
2.13. Produção nacional de leite .....	42
2.14. Métodos para detecção de resíduos de antibióticos em leite ....	44

2.14.1. Métodos de triagem .....	44
2.14.2. Métodos cromatográficos na análise das tetraciclinas .....	50
3. OBJETIVOS E PLANO DE TRABALHO .....	61
3.1. Objetivos .....	61
3.2. Plano de Trabalho .....	61
4. MATERIAL E MÉTODO .....	62
4.1. Casuística .....	62
4.2. Material .....	63
4.2.1 Reagentes .....	63
4.2.2. Soluções – padrão e fase móvel .....	64
4.2.3. Equipamentos, acessórios e vidraria.....	65
4.3. Método .....	66
4.3.1. Padronização da técnica de extração do método analítico .....	66
4.3.1.1. Extração em fase sólida (SPE) com coluna C <sub>18</sub> .....	66
4.3.1.2. Extração em fase sólida (SPE) com coluna C <sub>8</sub> .....	66
4.3.1.3. Extração líquido-líquido: acetato de etila e tampão fosfato-sulfito 2M pH 6,1 .....	66
4.3.1.4. Extração líquido-líquido: acetato de etila e tampão fosfato-sulfito 2M pH 3,0 .....	66
4.3.1.5. Extração líquido-líquido: acetato de etila e tampão fosfato-sulfito 2M pH 4,0 .....	66
4.3.2. Otimização do método analítico para a determinação de oxitetraciclina, tetraciclina, clortetraciclina e doxiciclina .....	67
4.3.2.1. Otimização das condições cromatográficas .....	67

4.3.3. Determinação das oxitetraciclina, tetraciclina, clortetraciclina e doxiciclina em leite .....	68
4.3.4. Validação do método analítico para determinação de oxitetraciclina, tetraciclina, clortetraciclina e doxiciclina em leite.....	70
4.3.4.1. Limite de Detecção .....	70
4.3.4.2. Limite de Quantificação .....	70
4.3.4.3. Recuperação .....	71
4.3.4.4. Estudo da Linearidade.....	71
4.3.4.5. Curva de calibração.....	72
4.3.4.6. Precisão do método analítico.....	72
4.3.4.7. Exatidão .....	72
4.3.4.8. Efeito da matriz.....	73
4.3.4.9. Estabilidade do analito na amostra .....	73
4.3.5. Determinação das oxitetraciclina, tetraciclina, clortetraciclina e doxiciclina em amostras de leite coletadas em um laticínio.....	74
5. RESULTADOS .....	75
5.1. Padronização da técnica de extração do método analítico.....	75
5.1.1. Recuperação das tetraciclinas em leite, obtidos utilizando- se a extração em coluna C <sub>18</sub> .....	75
5.1.2. Recuperação das tetraciclinas em leite utilizando-se a extração em coluna C <sub>8</sub> .....	75
5.1.3. Recuperação das tetraciclinas em leite utilizando-se a extração líquido-líquido: acetato de etila e tampão fosfato- sulfito 2M pH 6,1 .....	76
5.1.4. Recuperação das tetraciclinas em leite utilizando-se a extração líquido-líquido: acetato de etila e tampão fosfato- sulfito 2M pH 3,0 .....	76

5.1.5. Recuperação das tetraciclinas em leite utilizando-se a extração líquido-líquido: acetato de etila e tampão fosfato-sulfito 2M pH 4,0.....	77
5.2. Otimização das condições cromatográficas .....	77
5.3. Resultados dos parâmetros da validação do método analítico para determinação das oxitetraciclina, tetraciclina, clortetraciclina e doxiciclina em leite .....	79
5.3.1. Limite de detecção.....	79
5.3.2. Limite de quantificação .....	79
5.3.3. Recuperação .....	80
5.3.4. Linearidade.....	82
5.3.5. Precisão.....	83
5.3.6. Exatidão.....	86
5.3.7. Efeito da matriz.....	87
5.3.8. Estabilidade .....	90
5.4. Determinação de oxitetraciclina, tetraciclina, clortetraciclina e doxiciclina em amostras de leite coletadas em um laticínio.....	92
6. DISCUSSÃO.....	96
7. CONCLUSÕES.....	104
8. REFERÊNCIAS .....	106

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b>	Fontes de produção de alguns antibióticos .....	6
<b>Tabela 2</b>	Antibióticos mais frequentemente misturados à ração animal .....	19
<b>Tabela 3</b>	Produção brasileira de leite (em milhões de litros).....	43
<b>Tabela 4</b>	Testes disponíveis comercialmente para a detecção de resíduos de antimicrobianos no leite e o princípio em que se baseiam .....	45
<b>Tabela 5</b>	Condições analíticas utilizadas na determinação das tetraciclinas em leite por CLAE .....	55
<b>Tabela 6</b>	Recuperação das tetraciclinas adicionadas ao <i>pool</i> de leite, na concentração de 100ng/ml, usando a extração SPE com coluna C <sub>18</sub> .....	75
<b>Tabela 7</b>	Recuperação das tetraciclinas adicionadas ao <i>pool</i> de leite, na concentração de 100ng/ml, usando a extração SPE com coluna C <sub>8</sub> .....	75
<b>Tabela 8</b>	Recuperação das tetraciclinas adicionadas ao <i>pool</i> de leite, na concentração de 100ng/ml, usando a extração líquido-líquido e tampão pH 6,1 .....	76
<b>Tabela 9</b>	Recuperação das tetraciclinas adicionadas ao <i>pool</i> de leite, na concentração de 100ng/ml, usando a extração líquido-líquido e tampão pH 3,0 .....	76
<b>Tabela 10</b>	Recuperação das tetraciclinas adicionadas ao <i>pool</i> de leite, na concentração de 100ng/ml, usando a extração líquido-líquido e tampão pH 4,0 .....	77
<b>Tabela 11</b>	Resultados dos limites de detecção do método para a determinação das oxitetraciclina, tetraciclina, clortetraciclina e doxiciclina em leite .....	79

<b>Tabela 12</b>	Resultados dos limites de quantificação do método para a determinação das oxitetraciclina, tetraciclina, clortetraciclina e doxiciclina em leite .....	80
<b>Tabela 13</b>	Recuperação da oxitetraciclina, adicionada ao <i>pool</i> de leite, nas concentrações de 50; 400; 1200ng/ml .....	80
<b>Tabela 14</b>	Recuperação da tetraciclina adicionada ao <i>pool</i> de leite nas concentrações de 50; 400; 1200ng /ml .....	81
<b>Tabela 15</b>	Recuperação da clortetraciclina, adicionada ao <i>pool</i> de leite, nas concentrações de 50; 400; 1200ng /ml .....	81
<b>Tabela 16</b>	Recuperação da clortetraciclina, adicionada ao <i>pool</i> de leite, nas concentrações de 50; 400; 1200ng /ml .....	81
<b>Tabela 17</b>	Precisão do método analítico para a determinação de oxitetraciclina em leite, expressa pelo coeficiente de variação e desvio padrão .....	84
<b>Tabela 18</b>	Precisão do método analítico para a determinação de tetraciclina em leite, expressa pelo coeficiente de variação e desvio padrão .....	84
<b>Tabela 19</b>	Precisão do método analítico para a determinação de clortetraciclina em leite, expressa pelo coeficiente de variação e desvio padrão .....	85
<b>Tabela 20</b>	Precisão do método analítico para a determinação de doxiciclina em leite, expressa pelo coeficiente de variação e desvio padrão .....	85
<b>Tabela 21</b>	Inexatidão do método analítico para a determinação de oxitetraciclina em leite. ....	87
<b>Tabela 22</b>	Inexatidão do método analítico para a determinação de tetraciclina em leite.....	87
<b>Tabela 23</b>	Inexatidão do método analítico para a determinação de clortetraciclina em leite.....	87
<b>Tabela 24</b>	Inexatidão do método analítico para a determinação de doxiciclina em leite .....	87

<b>Tabela 25</b>	Análise da estabilidade da oxitetraciclina em leite, nas concentrações de 100 e 400 ng/ml, conservadas em freezer (-20°C).....	90
<b>Tabela 26</b>	Análise da estabilidade da tetraciclina em leite, nas concentrações de 100 e 400 ng/ml , conservadas em freezer (-20°C).....	90
<b>Tabela 27</b>	Análise da estabilidade da clortetraciclina em leite, nas concentrações de 100 e 400 ng/ml, conservadas em freezer (-20°C).....	91
<b>Tabela 28</b>	Análise da estabilidade da doxiciclina em leite, nas concentrações de 100 e 400 ng/ml, conservadas em freezer (-20°C).....	91
<b>Tabela 29</b>	Resultados de oxitetraciclina, tetraciclina, clortetraciclina e doxiciclina em amostras de leite da primeira coleta realizada no dia 12 de agosto de 2001 .....	92
<b>Tabela 30</b>	Concentrações de oxitetraciclina determinadas nas amostras de leite positivas da primeira coleta realizada no dia 12 de agosto de 2001.....	93
<b>Tabela 31</b>	Resultados de oxitetraciclina, tetraciclina, clortetraciclina e doxiciclina em amostras de leite da segunda coleta realizada no dia 16 de setembro de 2001 .....	93
<b>Tabela 32</b>	Concentrações de oxitetraciclina determinadas nas amostras de leite positivas da segunda coleta realizada no dia 16 de setembro de 2001 .....	94
<b>Tabela 33</b>	Resultados de oxitetraciclina, tetraciclina, clortetraciclina e doxiciclina em amostras de leite da terceira coleta realizada no dia 13 de outubro de 2001.....	94
<b>Tabela 34</b>	Concentrações de oxitetraciclina determinadas nas amostras de leite positivas da terceira coleta realizada no dia 13 de outubro de 2001 .....	95

## LISTA DE QUADRO E FIGURAS

<b>Quadro 1</b>	Gradiente da fase móvel usado na detecção das tetraciclina.....	68
<b>Figura 1</b>	Estrutura química das tetraciclina .....	10
<b>Figura 2</b>	Etapas da síntese protéica bloqueadas pela ação de antibióticos.....	14
<b>Figura 3</b>	Localização da cidade Cambuí .....	62
<b>Figura 4</b>	Marcha analítica da determinação da oxitetraciclina, tetraciclina, clortetraciclina e doxiciclina em leite.....	69
<b>Figura 5</b>	Perfil cromatográfico da oxitetraciclina, tetraciclina, clortetraciclina e doxiciclina em leite .....	78
<b>Figura 6</b>	Curva de linearidade da oxitetraciclina em leite .....	82
<b>Figura 7</b>	Curva de linearidade da tetraciclina em leite .....	82
<b>Figura 8</b>	Curva de linearidade da clortetraciclina em leite .....	83
<b>Figura 9</b>	Curva de linearidade de doxiciclina em leite.....	83
<b>Figura 10</b>	Resultado da interferência das matrizes água e leite na análise de oxitetraciclina .....	88
<b>Figura 11</b>	Resultado da interferência das matrizes água e leite, na análise de tetraciclina.....	88
<b>Figura 12</b>	Resultado da interferência das matrizes água e leite na análise de clortetraciclina .....	89
<b>Figura 13</b>	Resultado da interferência das matrizes água e leite, na análise de doxiciclina .....	89

## RESUMO

As tetraciclinas são compostos antibacterianos utilizados no gado leiteiro para tratamento de doenças infecciosas, como a mastite e também como aditivos em ração animal para melhorar a conversão alimentar. O uso das tetraciclinas pode resultar na presença de resíduos destes fármacos no leite, principalmente se não forem utilizados de acordo com as indicações e se não for respeitado o período mínimo de eliminação dos antibióticos pelo leite. A presença de resíduos de antibióticos no leite interfere no processo industrial de derivados, inibindo fermentos lácticos usados na produção de iogurtes e queijos, o que, conseqüentemente, causa sérios prejuízos econômicos. Resíduos de antibióticos no leite de consumo podem representar riscos à saúde humana, podendo causar reações alérgicas em indivíduos sensíveis, efeitos adversos à flora intestinal humana prejudicando sua ação protetora local, além de propiciar a seleção de populações de bactérias resistentes. O Food and Drug Administration (FDA) estabelece limite máximo de resíduo (LMR) para as tetraciclinas em leite de 300ppb, enquanto a Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA) e o Plano Nacional de Controle de Resíduos Biológicos em Produtos de Origem Animal do Ministério da Agricultura brasileiro estabelecem LMR de 100 ppb. O objetivo deste estudo foi validar um método multirresíduo para determinação de oxitetraciclina, tetraciclina, clortetraciclina e doxiciclina em leite por extração com desproteínização acídica e identificação e quantificação por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada ao detector de arranjo de diodos. O método apresentou limite de detecção e quantificação, respectivamente de 37,5 e 50ng/ml, linearidade de 50-1600ng/ml e coeficientes de determinação de 0,9996; 0,9994; 0,9996 e 0,9996 para oxitetraciclina, tetraciclina, clortetraciclina e doxiciclina, respectivamente, recuperação entre 66,6 e 89,6%, com precisão e exatidão adequadas. Para avaliar a aplicabilidade do método foram analisadas 231 amostras de leite "in natura", obtidas em um laticínio, em três coletas consecutivas e mensais. O índice de amostras positivas para oxitetraciclina manteve-se superior a 11%. Na primeira coleta 19% das amostras foram positivas para oxitetraciclina, na segunda coleta 11,5% e na terceira coleta 12,2%. Os resultados indicam que o método validado mostrou-se apropriado para monitorização da qualidade do leite.

## ABSTRACT

### **Analysis of antibiotics residues oxytetracycline, tetracycline, chlortetracycline and doxycycline in milk by high performance liquid chromatography**

The tetracyclines are antimicrobial agent used in dairy cattle to treat infection diseases, as mastitis and also as additives in animal food to produce improvements in feed efficiency and growth. The use of tetracyclines can result in presence of residue of these antimicrobials in the milk, especially if they are not used according to the label directions and if the minimum period of their elimination is not respected. The presence of antibiotic residues in the milk interferes in the dairy industrial process diminishing starter culture growth used in the yogurt and cheese production, what causes strong economic loss. Antibiotic residue in the consumer milk can represent risk to the human health, being possible to cause allergic reactions in sensitives human beans, disorders of the intestinal flora damaging its local protection action besides to provide antibiotic resistance development. The Food and Drug Administration (FDA) establishes maximum residue limit (MRL) of 300ppb for tetracycline in milk while the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA) and the National Plan of Biological Residue Control in animal products of Brazilian Agricultural Bureau establish MRL of 100ppb. The objective of this study was to validate the multiresidue method to determine the oxytetracycline, tetracycline, chlortetracycline and doxycycline in milk by acidic desproteinization extraction and to identify and quantify by high performance liquid chromatography with photo-diode array detector. The method presented detection limit and quantification limit respectively of 37,5 and 50 ng/ml, linearity from 50 to 1600ng/ml and correlation coefficient of 0,9996, 0,9994, 0,9996 and 0,9996 to the oxytetracycline, tetracycline, chlortetracycline and doxycycline respectively; recovery between 66,6 and 89,2%, with good precisions and accuracy. There were analyzed 231 samples of milk in nature obtained in a dairy industrie, in three stages consecutive and monthly. The indices of positive samples for oxytetacycline remained superior to 11%. In the first stage 19% of the samples were positive for oxytetracycline, in the second stage 11,5% and in the third stage 12,2%. The results show that the validated method is appropriated for the monitoring the quality of the milk.

## 1. INTRODUÇÃO

Os antibióticos são amplamente utilizados no tratamento de doenças no gado leiteiro e também como suplementos em sua dieta. Sua administração pode ser feita via intramamária, para o tratamento de mastite; por via parenteral (intramuscular, intravenosa, subcutânea) para terapia de infecções; por via intrauterina, para o tratamento de infecções uterinas, cervicais e vaginais e por via oral, para o tratamento de doenças ou como suplemento alimentar, em doses subterapêuticas (BISHOP & WHITE, 1984).

Teoricamente, o uso de antibióticos por todas estas vias pode resultar na presença de resíduos destes fármacos no leite, principalmente se não forem usados adequadamente e se não for respeitado o período mínimo de eliminação de antibióticos pelo leite (SCHENK & CALLERY, 1998).

A presença de resíduos de antibióticos no leite interfere no processo industrial de derivados, inviabilizando a produção destes e, conseqüentemente, causando também sérios prejuízos econômicos, como, por exemplo, inibindo fermentos lácticos que são culturas de microrganismos usadas na produção de iogurtes, queijos e outros derivados (BOISON *et al*, 1994)

Os resíduos de antibióticos no leite de consumo podem representar riscos à saúde humana, podendo causar reações alérgicas em indivíduos sensíveis. Alguns estudos sugerem que a presença de resíduos de antibióticos em alimentos podem, também, ter um efeito adverso na flora intestinal humana, podendo prejudicar sua ação protetora local, além de propiciar a seleção de populações de bactérias resistentes (BRADY &

KATZ, 1992, BRADY & KATZ, 1993, HONKANEN-BUZALSKI & REYBROECK, 1997, MITCHELL, 1998).

Visto que a presença de resíduos de antibióticos no leite pode resultar em prejuízos econômicos e danos à saúde, torna-se fundamental monitorar a qualidade desse produto de consumo.

O leite e seus derivados ocupam um importante papel na alimentação do homem (COSTA, 1996) porque são produtos de alta qualidade nutricional, podendo ser considerados uma das principais fontes de proteínas e cálcio. De acordo com PINAZZA & ALIMANDRO, 1999, o consumo per capita brasileiro é da ordem de 143 litros anuais. Também são considerados exemplos de alimentos naturais e seguros. Para preservar esta reputação, devem apresentar padrões adequados de composição, pureza e ausência de resíduos de antimicrobianos ou outros produtos químicos (BRITO, 2001).

Além disso, a busca pela qualidade do produto tem sido o diferencial das grandes empresas do setor e órgãos de fiscalização, que encontram dificuldades técnicas na identificação e quantificação de resíduos de antibióticos na matéria prima utilizada.

As organizações internacionais envolvidas com a saúde pública, como o Comitê Conjunto FAO/WHO para Aditivos Alimentares em Alimentos (JECFA), a Administração de Alimentos e Drogas (FDA) dos Estados Unidos e o Ministério da Saúde através da Agência Nacional de Vigilância Sanitária, no Brasil, estabelecem as diretrizes para o Limite Máximo de Resíduo ou Limite de Tolerância definidos como a concentração máxima de resíduo (seja ele do composto ou de seus metabólitos) resultante do uso de um medicamento veterinário, expresso em parte por milhão (ppm) ou parte por bilhão (ppb), que é legalmente permitido, ou reconhecido, como aceitável no alimento e é estabelecido

para cada antibiótico e sulfonamida aprovados para uso em animal produtor de alimento, sendo o valor de limite máximo de resíduo correlacionável à Ingestão Diária Aceitável obtida a partir de ensaios de toxicidade, teratogenicidade, e carcinogenicidade (MITCHELL *et al*, 1998, KISER, 1984)

Para monitorar os resíduos de antibióticos em leite, são comumente usados testes de triagem imunológicos e de inibição microbiológica. Algumas desvantagens destes testes de triagem são: baixa especificidade na identificação do antibiótico, sensibilidade que não atende aos critérios de detecção dos Limites Máximos de Resíduos, longo tempo de análise, para alguns testes, além de resultados falso-positivos devido a presença de altas contagens de células somáticas e substâncias inibitórias naturais encontradas em alimentos de origem animal, tais como lisozima e lactoferrina. Portanto, são necessárias técnicas analíticas sensíveis e específicas para a identificação e quantificação de resíduos de antibiótico no leite. A técnica mais utilizada para esta proposta é a cromatografia à líquido de alta eficiência (SHENCK & CALLERY, 1998).

No Brasil, são comercializadas quatro diferentes tetraciclinas: oxitetraciclina, tetraciclina, clortetraciclina e a doxiciclina, em diversas apresentações, para o tratamento de infecções em gado. Exceto a doxiciclina que é comercializada no mercado veterinário somente em uma apresentação farmacêutica, como aditivo em ração ou água. As outras tetraciclinas podem, também, ser usadas como aditivos em ração ou na água. Os testes de triagem para esta classe de antibióticos apresentam algumas limitações, descritas anteriormente, são pouco precisos e não identificam certas tetraciclinas. Além disso, ensaios microbiológicos refletem a concentração total, sem identificar a concentração individual das tetraciclinas.

Assim, o objetivo do presente trabalho foi otimizar e validar um método por cromatografia líquida de alta eficiência para a determinação simultânea de oxitetraciclina, tetraciclina, clortetraciclina e a doxiciclina em leite, visando a utilização deste método na avaliação da presença de resíduos destes compostos em amostras de leite de consumo.

## 2. REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1. Agentes Antimicrobianos

Os agentes antimicrobianos são substâncias químicas usadas para combater os microrganismos deletérios à saúde animal e humana. Estes agentes podem ser inespecíficos ou específicos, sendo que os primeiros atuam sobre microrganismos em geral, quer sejam patogênicos, ou não. Pertencem a este grupo os anti-sépticos e os desinfetantes. Os específicos atuam sobre os microrganismos responsáveis pelas doenças infecciosas, sendo representados pelos quimioterápicos e os antibióticos (SPINOSA, 1996).

A quimioterapia trata as moléstias através da administração de substâncias químicas. Algumas dessas são sintetizadas em laboratório e por isso são chamadas quimioterápicos; outras são produzidas por seres vivos e são chamadas antibióticos. Estes são produzidos, na sua grande maioria, por microrganismos que fazem a síntese total ou parcial da molécula sendo que neste último caso, são concluídos em laboratórios, como por exemplo, os antibióticos semi-sintéticos (ALTERTHUM, 1999).

A maioria dos antibióticos de uso clínico é produzida por fungos do gênero *Streptomyces* e alguns dos gêneros *Penicillium* e *Cephalosporium*, alguns exemplos desses podem ser observados na Tabela 1 (ALTERTHUM, 1999; TORTORA et al, 2000).

**Tabela 1:** Fontes de produção de alguns antibióticos

<b>Microrganismo</b>	<b>Antibiótico</b>
<b><i>Bacillus Gram-Positivos</i></b>	
<i>Bacillus subtilis</i>	Bacitracina
<i>Bacillus polymyxa</i>	Polimixina
<b><i>Actinomicetos</i></b>	
<i>Streptomyces nodosus</i>	Anfotericina B
<i>Streptomyces venezuelae</i>	Cloranfenicol
<i>Streptomyces aureofaciens</i>	Clortetraciclina e tetraciclina
<i>Streptomyces reythraeus</i>	Eritromicina
<i>Streptomyces fradie</i>	Neomicina
<i>Streptomyces griseus</i>	Estreptomicina
<i>Micromonospora purpurea</i>	Gentamicina
<b><i>Fungos</i></b>	
<i>Cephalosporium Spp.</i>	Cefalotina
<i>Penicillium griseofulvum</i>	Griseofulvina
<i>Penicillium notatum</i>	Penicilina

Fonte: TORTORA et al, 2000

Os antibióticos podem ser classificados segundo vários critérios, como por exemplo, por sua estrutura química (derivados de aminoácidos; derivados de açúcares, derivados do acetato e propionato, entre outros); origem (bactérias, ascomicetos, actinomicetos, síntese); ação biológica (bactericida, bacteriostático, fungicida, fungistático); espectro de ação (Gram-positivos, Gram-negativos, amplo espectro) e mecanismo de ação (parede celular, membrana celular, síntese de ácidos nucleicos, síntese protéica) (SPINOSA, 1996).

Os quimioterápicos são classificados segundo a sua estrutura química (sulfas, quinolonas, nitrofuranos etc.) e seu emprego quimioterápico (agentes antifúngicos, antivirais, etc.) (SPINOSA, 1996).

O uso dos antimicrobianos específicos iniciou-se a partir dos estudos de Paul Erlich (1854-1915), ao observar que alguns corantes orgânicos tinham a propriedade de fixar-se em certos constituintes celulares e, quando isto ocorria com agentes causadores de processo infecciosos, podiam exercer efeito tóxico seletivo sobre estes. Assim, esse autor definiu como quimioterápico a substância química de estrutura definida, produzida sinteticamente, que introduzida no organismo, age de maneira seletiva sobre o agente causador do processo infeccioso, sem causar efeito nocivo sobre o hospedeiro (SPINOSA, 1996).

Em 1928, Alexander Fleming observou que o crescimento da bactéria *Staphylococcus aureus* era inibido na área ao redor de colônias de fungos em placa de Petri. O fungo foi identificado como *Penicillium notatum*, e o componente ativo, isolado mais tarde, foi denominado penicilina. Em microbiologia, observa-se com frequência reações inibitórias similares entre colônias em meio sólido, sendo que o mecanismo de inibição é conhecido como *antibiose*. Desta palavra deriva o termo antibiótico, que define uma substância produzida por microrganismo que, em pequenas quantidades, inibe o crescimento de outro microrganismo. Portanto, os medicamentos do tipo sulfa, totalmente sintéticos, tecnicamente não são considerados como antibióticos. Porém, esta distinção é frequentemente ignorada (TORTORA et al, 2000).

Na primeira metade do século XX, a terapia usada em infecções, particularmente as de origem bacterianas, teve um dos desenvolvimentos mais bem sucedidos no campo da farmacoterapia. A descoberta das sulfonamidas e suas propriedades antibacterianas, em 1932, e sua introdução na terapia, em 1935, permitiu um tratamento mais eficiente dessas infecções (HEESCHEN & BLÜTHGEN, 1991).

Em 1940, um grupo de cientistas da Universidade de Oxford, coordenados por Howard Florey e Ernst Chain, obteve sucesso com o

primeiro teste clínico da penicilina. A partir daí, foram realizados diversos estudos nos Estados Unidos que culminaram com o isolamento de linhagens de *Penicillium*, iniciando a produção de antibióticos em larga escala (HEESCHEN & BLÜTHGEN, 1991, TORTORA et al, 2000).

Os antibióticos foram utilizados com grande sucesso no tratamento de doenças bacterianas em humanos e posteriormente introduzidos na prática veterinária, sendo que, a evolução do uso de antimicrobianos em animais domésticos sempre acompanhou o desenvolvimento e a utilização terapêutica destes agentes na medicina humana (GUSTAFSON, 1991, HONKANEN-BUZALSKI & REYBROECK, 1997, MITCHELL et al, 1998).

À esta utilidade terapêutica, somou-se a descoberta, em 1950, da habilidade dos antibióticos aumentarem o crescimento animal e a eficiência de utilização de ração animal, iniciando uma nova era no manejo de animais e produção de carne. Desde então, o uso de agentes antimicrobianos tem aumentado de forma tão acentuada que muitos admitem, atualmente, que sem eles, as técnicas de produção da agricultura intensiva seriam impossíveis. É extremamente ampla a quantidade de medicamentos veterinários administrados aos animais ou misturada à ração (GUSTAFSON, 1990, MITCHELL et al, 1998). Segundo Miller, 1993 (apud MITCHELL et al, 1998) aproximadamente 42% de todos os medicamentos veterinários são mundialmente usados na forma de aditivos na ração animal, 19% como agentes anti-infecciosos (ex. antibacterianos, antifúngicos e antivirais), 13% como parasiticida, 11% como produtos biológicos e 15% como outros medicamentos. Os agentes antimicrobianos representam a maior proporção de todos os medicamentos usados na produção animal, tanto em volume quanto em valor em dólar.

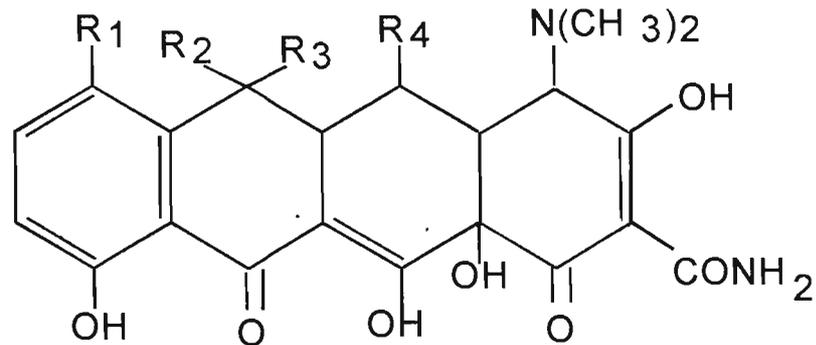
Uma pesquisa realizada entre veterinários nos Estados Unidos revelou que os antibióticos são os medicamentos mais prescritos ou usados em gado leiteiro em lactação, principalmente para o tratamento de mastite,

sendo os mais frequentemente utilizados nesses casos a peniciclina G, o ceftiofur sódico, a cloxaciclina, a ampicilina, a cefapirina e a oxitetraciclina (HEESCHEN & BLÜTHGEN, 1991, HONKANEN-BUZALSKI & REYBROECK, 1997, MITCHELL et al, 1998).

Os antimicrobianos são administrados aos animais através de injeções intramusculares, intravenosas e subcutâneas, por via oral, através de alimentos ou água, infusão intrauterina e intramamária e uso tópico. Teoricamente, todas estas vias podem acarretar a presença de resíduos em alimentos de origem animal, tais como leite, carne e ovos (MITCHELL et al, 1995).

## 2.2 Tetraciclinas

As tetraciclinas são antibióticos produzidos por diversas espécies de *Streptomyces*, sendo algumas semi-sintéticas. As tetraciclinas, ilustradas na Figura 1, são assim denominadas por sua estrutura química ser formada por quatro anéis. Elas não são apenas eficazes contra bactérias gram-positivas e gram-negativas, mas também penetram em tecidos e são particularmente importantes contra riquetsias e clamídias intracelulares (SPINOSA, 1996, TORTORA, 2000).



COMPOSTO	R1	R2	R3	R4
Oxitetraciclina	H	CH <sub>3</sub>	OH	OH
Tetraciclina	H	CH <sub>3</sub>	OH	H
Clortetraciclina	Cl	CH <sub>3</sub>	OH	H
Doxiciclina	H	CH <sub>3</sub>	H	OH

**Figura 1:** Estrutura química das tetraciclina

A primeira tetraciclina foi descoberta por Benjamim Duggar, em 1948, durante um estudo sistemático da atividade antimicrobiana de actinomicetos, presentes no solo, e recebeu o nome de aureomicina, devido à coloração dourada do fungo produtor o *Streptomyces aureofaciens*, sendo posteriormente denominada clortetraciclina. Em 1950, Rogna & Solomons isolaram a segunda tetraciclina, a terramicina (alusão feita ao estudo de microrganismos produtores de antibióticos em amostras de solo provenientes de várias partes do mundo), e posteriormente denominada oxitetraciclina. A elucidação da estrutura química básica destes antibióticos permitiu confirmar as semelhanças entre eles e a obtenção da tetraciclina, em 1953. A partir daí, houve um grande interesse em se produzir derivados semi-sintéticos, tais como a doxiciclina e a minociclina que apresentam a

vantagem de uma meia vida mais longa (SPINOSA, 1996, TORTORA, 2000).

## **2.2.1 Farmacocinética**

### **2.2.1.1. Absorção**

A absorção entérica varia com o tipo de tetraciclina administrada. A clortetraciclina apresenta a menor absorção (30%), enquanto que a absorção da oxitetraciclina e tetraciclina variam de 60 a 80%, a doxiciclina 95% e a minociclina 100% (MARZO & DAL BO, 1998).

As tetraciclinas são parcialmente absorvidas no trato gastrointestinal, sendo que a presença de alimentos no trato digestivo pode prejudicar sua absorção quando administradas por via oral, com exceção da minociclina e doxiciclina. Esses compostos formam quelatos insolúveis com o cálcio, magnésio, zinco, ferro e alumínio. A presença de leite e derivados, as preparações vitamínicas, as preparações férricas, os antiácidos e os catárticos podem reduzir sua absorção. As concentrações plasmáticas de picos de 3 a 5  $\mu\text{g/ml}$  são alcançadas 2 horas após a administração oral e concentrações plasmáticas de picos de 10 a 20  $\mu\text{g/ml}$  são alcançadas 1 hora após administração intravenosa. A meia-vida plasmática em mamíferos com função renal normal varia de 7 a 19 horas dependendo da tetraciclina em questão (SPINOSA, 1996, YAO & MOELLERING, 1995, TIMONEY, 1984).

### **2.2.1.2 Distribuição**

Após a administração oral ou intravenosa, as tetraciclinas são amplamente distribuídas no organismo e concentram-se no fígado e rins. A minociclina e doxiciclina, por serem mais lipossolúveis, apresentam melhor

penetração no cérebro, líquido espinhal, globo ocular, e próstata que outras tetraciclinas, podendo ser secretadas através do leite. Esses compostos atravessam facilmente a placenta depositando-se na forma de um complexo tetraciclina-Ca-ortofosfato nas estruturas formadoras dos ossos e dentes, posteriormente, podendo nesses últimos, resultar em manchas. A contra indicação mais importante relativa à administração de níveis terapêuticos de tetraciclinas durante a gravidez é o aumento do risco de hepatotoxicidade e acidose metabólica (TIMONEY, 1984).

A distribuição das tetraciclinas no organismo animal pode variar de acordo com a sua lipossolubilidade: assim, a doxiciclina é absorvida com maior facilidade, por ser mais lipossolúvel que a tetraciclina e a oxitetraciclina (SPINOSA, 1996).

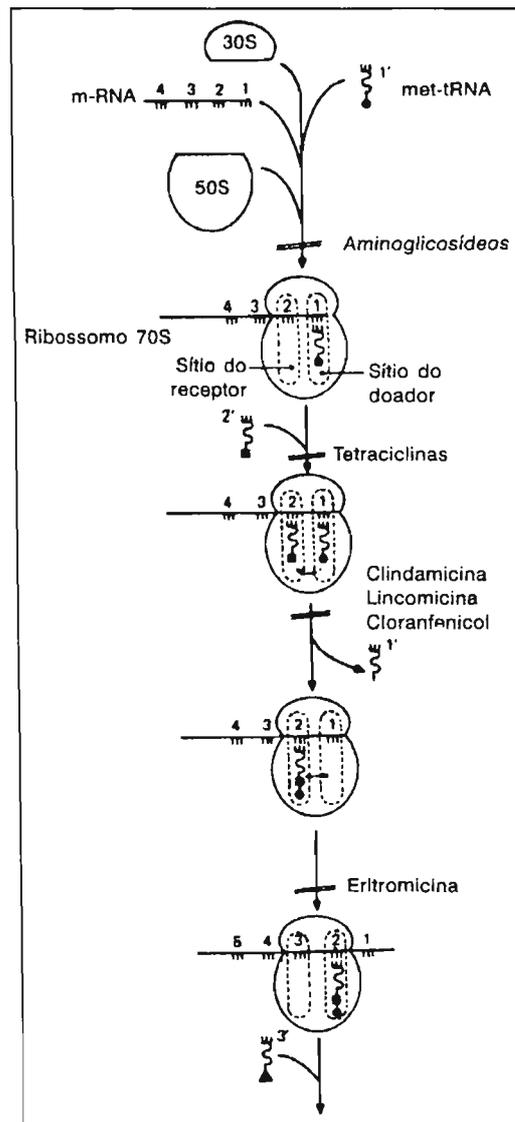
### **2.2.1.3. Biotransformação e excreção**

As tetraciclinas são biotransformadas pelo fígado e concentradas na bile. Observa-se que essas concentrações biliares são três a cinco vezes maiores que os níveis plasmáticos. Esses medicamentos acumulam-se no sangue em pacientes com insuficiência hepática ou obstrução biliar (YAO & MOELLERING, 1995).

Todas as tetraciclinas, exceto a minociclina e a doxiciclina, são excretadas em sua forma ativa através da urina ou, em menor proporção, pela bile, sendo a filtração glomerular o processo responsável pelo mecanismo de excreção renal destes antibióticos (SPINOSA, 1996). Problemas renais prolongam a meia-vida das tetraciclinas, exceto a doxiciclina que é excretada (90%) como um conjugado inativo, via trato biliar, nas fezes (YAO & MOELLERING, 1995).

### 2.2.2. Farmacodinâmica

As tetraciclina inibem a síntese protéica dos microrganismos sensíveis, ligando-se aos ribossomas (que nos microrganismos são constituídos das subunidades 30 e 50 S, enquanto os animais superiores possuem subunidades 40 e 60 S). Estes antibióticos ligam-se à subunidade 30 S do ribossoma do microrganismo, impedindo que os RNA transportadores (RNAt) se fixem ao ribossoma e, com isto, não ocorre incorporação de aminoácidos prejudicando a formação da cadeia peptídica. A Figura 2 ilustra as etapas da síntese protéica bloqueadas pela ação dos antibióticos. Embora as tetraciclina tenham maior afinidade pela subunidade 30 S do ribossoma microbiano, podem ligar-se também à subunidade 40 S do ribossoma de animais superiores, o que explica algumas reações adversas advindas do seu uso terapêutico (SPINOSA, 1996, ALTERTHUM, 1999). Portanto, são antibióticos que apresentam efeito bacteriostático no crescimento de microorganismos, onde a síntese protéica é necessária para a produção de nova biomassa, mas também apresentam efeito bactericida contra alguns microrganismos (SADICK, 2000).



**Figura 2:** Etapas da síntese proteica bloqueada pela ação de antibióticos  
 Fonte: ALTERTHUM, 1999

### 2.2.3. Efeitos adversos observados na terapia

Os efeitos adversos observados após a administração de doses terapêuticas das tetraciclina incluem distúrbios gastrointestinais, hepatotoxicidade, fotosensibilização, acúmulo em pacientes com insuficiência renal, manchas nos dentes, inibição do hormônio antidiurético, toxicidade vestibular, e superinfecção resultante de alterações na flora microbiana bucal, intestinal ou vaginal (TIMONEY, 1984).

A hepatotoxicidade é observada após a administração intravenosa de doses superiores à 2 g/dia em humanos. Este risco é maior durante a gravidez, devido à atividade renal diminuída e em pessoas debilitadas. (TIMONEY, 1984).

As reações de hipersensibilidade são raras, geralmente manifestando-se como urticária, erupções cutâneas e anafilaxia. A reatividade cruzada entre as tetraciclinas é comum e as reações de fotossensibilização consistem de erupções eritematosas nas áreas expostas à luz solar e podem ocorrer com todos os análogos das tetraciclinas. A fotossensibilização é observada ocasionalmente e parece ser uma consequência do acúmulo das tetraciclinas na pele (YAO & MOELLERING, 1995).

As tetraciclinas causam depressão do crescimento ósseo, permanente descoloração dos dentes, e hipoplasia do esmalte dos dentes quando administradas durante o desenvolvimento ósseo e dentário. Por isso são contra-indicadas para crianças, com idade inferior à 8 anos, e durante a gravidez (YAO & MOELLERING, 1995, TORTORA, 2000).

Esses compostos também suprimem a microbiota intestinal normal em consequência de seu amplo espectro, causando distúrbios gastrintestinais e frequentemente levam a superinfecções, particularmente a causada pelo fungo *Candida albicans* (TORTORA, 2000).

Quando administradas por via oral, as tetraciclinas causam irritação de mucosa, provocando manifestações gastrintestinais, tais como náuseas, vômito, diarreia. Podem ocorrer distúrbios da flora intestinal mesmo quando são administradas por vias parenterais, uma vez que podem ser eliminadas pelas fezes. A administração por via intramuscular ou subcutânea causa dor no local da injeção. Devido à capacidade de se ligarem ao cálcio, podem provocar efeitos cardiovasculares, tais como arritmias, além da deposição no tecido ósseo e dentário. Podem também causar efeitos tóxicos em células

hepáticas, como infiltração gordurosa e renais e necrose em túbulos proximais (SPINOSA, 1996).

#### **2.2.4. Resistência bacteriana às tetraciclinas**

Atualmente a resistência bacteriana vem ganhando importância, acarretando a redução da utilização terapêutica destes compostos. A resistência bacteriana adquirida é mediada principalmente por plasmídios R, sendo que algumas bactérias podem também ser induzidas a sintetizar enzimas que inativam o antibiótico. A resistência determinada por plasmídios é mediada por certas proteínas denominadas Tet (Tet A, B, C e D) que, uma vez formadas, localizam-se na membrana citoplasmática, provocando a saída das tetraciclinas do citoplasma da bactéria, ou seja, as proteínas Tet expulsam as tetraciclinas do interior da bactéria (TRABULSI & TOLEDO, 1999).

### **2.3. Indicações para o uso das tetraciclinas na pecuária**

Em geral, as tetraciclinas quando administradas por via intramuscular são altamente irritantes e provocam dor local, assim, somente algumas preparações de oxitetraciclina para uso animal são administradas por esta via. As tetraciclinas podem ser administradas tanto por via oral, como por vias parenterais. As doses orais terapêuticas são contra indicadas para ruminantes e cavalos, devido às possíveis rupturas do rumem e alterações da microflora e microfauna intestinal, embora as doses subterapêuticas sejam bem toleradas. As vias mais apropriadas de administração são a intravenosa, normalmente utilizadas em bovinos e ovinos; a oral em suínos, bovinos, animais de pequeno porte e aves ou a intramamária em bovinos (TIMONEY, 1984, SPINOSA, 1996).

As tetraciclina são de particular interesse na prevenção e tratamento de micoplasma e outras infecções bacterianas envolvendo o trato respiratório de ruminantes e suínos, assim como infecções causadas pelo *Fusobacterium* em gado (TIMONEY, 1984).

Em relação à retenção de placenta são preconizados vários tratamentos na tentativa de reduzir suas sequelas. Uma delas é a infusão intrauterina de oxitetraciclina, devido ao seu amplo espectro de ação antibacteriana e sua habilidade em conservar essas propriedades antibacterianas mesmo na presença de material orgânico, de acordo com os autores Gustafsson, 1988 e Olson et al, 1985, (apud DINSMORE et al, 1996).

A metrite é uma das principais doenças em gado e o seu tratamento é sempre realizado com antibióticos através de infusão intrauterina e, neste caso, a oxitetraciclina é o antibiótico de escolha (KANEENE et al, 1986).

As tetraciclina encontram-se entre os agentes antimicrobianos mais usados no tratamento de mastite, atingindo boa concentração na glândula mamária quando administrados por via parenteral. A oxitetraciclina é a mais recomendada no tratamento da mastite por *Pasteurella haemolytica* e *Aerobacter aerogenes*. As tetraciclina do tipo “longa duração”, na dose de 20 mg/Kg, são capazes de manter uma ótima concentração bactericida por 72 horas, com um período mínimo de descarte do leite de 96 horas após a última aplicação. A doxiciclina é indicada em mastites de difícil tratamento, como as causadas por *Nocardia* spp e *Clamidia* (COSTA, 1996), sendo também eficaz no tratamento de pneumonia causada por *Pasteurella haemolytica* em bovinos (MEIJER et al, 1993).

#### **2.4. Uso de doses subterapêuticas de antibióticos e sulfonamidas na pecuária**

A administração de doses subterapêuticas de antibióticos aos animais, como medida profilática ou no aumento da taxa de conversão alimentar, é praticada mundialmente na pecuária. Hoje, aproximadamente 7,5 milhões de toneladas de antibióticos, tais como, clortetraciclina, penicilina e avoparcina são adicionadas, anualmente, à ração de bovinos, aves e suínos, nos Estados Unidos. Estes compostos auxiliam no controle da difusão da infecção bacteriana entre os animais. Acredita-se que estes antibióticos, promotores de crescimento, melhoram a conversão alimentar mantendo sobre controle as doenças que desviariam energia para o sistema imune, assim, permitindo a conversão desta energia em ganho de peso. Estas doses são muito menores que aquelas necessárias a terapia de infecções graves, mas suficientemente altas para controlarem o crescimento da microflora intestinal susceptível (MANIE et al, 1999).

Os agentes antimicrobianos usados em ração podem ser agrupados nas principais classes: os beta-lactâmicos, as tetraciclina, os aminoglicosídeos, os macrolídeos e as sulfonamidas, os peptídeos, as quinonas e os polienos. A Tabela 2 apresenta alguns exemplos dessas classes de antibióticos (SALVATORE & KATZ, 1993).

**Tabela 2:** Antibióticos mais frequentemente misturados à ração animal

CLASSE	ANTIBIÓTICO
Macrolídeos	Eritromicina
	Oleandomicina
	Tilosina
Aminoglicosídeos	Higromicina B
	Neomicina
	Estreptomicina
	Espectinomicina
	Lincomicina
Tetraciclina	Oxitetraciclina
	Clortetraciclina
Peptídeo	Bacitracina
	Virginiamicina
Polieno	Nistatina
Quinona	Novobiocina
Beta-lactâmico	PenicilinaG

Fonte: SALVATORE & KATZ, 1993

Os efeitos benéficos da clortetraciclina na taxa de crescimento de frangos foram descobertos acidentalmente por pesquisadores, em 1940, quando tentavam encontrar uma fonte de baixo custo de vitamina B<sub>12</sub> para uso em aves. A descoberta foi rapidamente confirmada e também utilizada em bovinos e suínos. A administração de 70 a 80 mg/dia por animal acarreta uma média de aumento de ganho de peso de 6% e uma média de 4% no aumento da eficiência alimentar. O modo de ação da clortetraciclina nesta situação é ainda pouco entendido, porém envolve uma variedade de fatores incluindo a supressão de microrganismos deletérios ao trato intestinal (FRANCO, et al, 1990, TIMONEY, 1984).

Os teores de tetraciclina, normalmente clortetraciclina ou oxitetraciclina adicionados à ração por medidas profiláticas ou terapêuticas variam de 50 a 400 mg/animal/dia e de acordo com a doença a ser evitada

ou tratada. A clortetraciclina pode ser usada em substituintes do leite, na concentração de 0,22 mg/kg peso corpóreo por dia, em bezerros pesando acima de 113,5kg para melhorar o ganho de peso e aumentar a eficiência alimentar. O uso da clortetraciclina, na dose de 0,11 mg/kg de peso corpóreo por dia, auxilia na prevenção da diarreia bacteriana em bezerros. A clortetraciclina, na dose de 70 mg/dia em gado com peso inferior a 317,8kg auxilia na prevenção de diarreia bacteriana e na infecção de casco causada por *Fusobacterium necrophorum*. Este tratamento também auxilia na prevenção de abscessos no fígado de gado de corte. O gado que apresente peso superior a 317,8kg deveria receber 100 mg/dia, para a prevenção de diarreia bacteriana e infecção de casco. A clortetraciclina, na dosagem de 350 mg/dia, auxilia na prevenção da pneumonia bacteriana e septicemia hemorrágica em gado com peso superior a 317,8kg. Esta dose de clortetraciclina em gado também auxilia na prevenção de anaplasmoze. Estas doses necessitam de um tempo de carência de 48 horas para o abate destes animais. A oxitetraciclina, na concentração de 75 a 100 mg por dia, em gado leiteiro pode ser usada na prevenção ou tratamento de diarreia bacteriana, assim como auxiliar da redução da incidência e gravidade do edema e, também, no aumento da produção de leite (TIMONEY, 1984).

A clortetraciclina não tem seu uso permitido como aditivo alimentar para o gado adulto no Reino Unido. Entretanto, nos Estados Unidos, vários medicamentos contendo este composto podem ser administrados em vacas em lactação (sem período de carência) na prevenção de diarreia bacteriana e em moléstias respiratórias. No caso de diarreia bacteriana, a dose recomendada é de 0,22 mg/kg de peso corpóreo por dia. No caso de moléstias respiratórias, se o tratamento é contínuo por mais de 30 dias, a dose é reduzida para 70 mg por animal por dia (0,12mg/kg de peso corpóreo por dia, levando-se em consideração um animal com peso médio de 600kg) (McEVOY et al, 2000).

O uso de antibióticos na ração animal é rigorosamente regulamentado sendo que a responsabilidade do monitoramento está a cargo, entre outros órgãos, do Bureau of Veterinary Medicine (BVM), do Food and Drug Administration (FDA) do Department of Health and Human Services (KISER, 1984, ANÁDON & MARTINEZ-LARRAÑAGA, 1999). No Brasil, o Plano Nacional de controle de Resíduos Biológicos em Produtos de Origem Animal (PNCRB) do Ministério da Agricultura (Instrução Normativa/MAA Nº 42, de 20 de dezembro de 1999) é o órgão que legisla sobre o assunto em questão.

Um limite de tolerância de antibióticos em tecidos comestíveis é estabelecido para cada antibiótico e sulfonamida aprovados para uso em animal produtor de alimento. As indústrias produtoras dos antibióticos devem se responsabilizar pelo desenvolvimento de métodos analíticos que permitam a detecção e quantificação dos compostos em questão e a aprovação fica a cargo do BVM. Os limites de tolerância são determinados em tecidos comestíveis, não cozidos (KISER, 1984).

O tempo de carência é conceituado como sendo o período entre a última administração ou ingestão de uma ração com antibiótico pelo animal até o seu abate. Este tempo é estabelecido através da determinação da concentração de resíduos nos tecidos dos animais, utilizando a maior concentração e o maior tempo permitido. (KISER, 1984).

## **2.5 Resíduos de antibióticos em alimentos e os riscos à saúde pública**

O uso excessivo de antibióticos na produção animal, bem como a presença de resíduos na cadeia alimentar podem acarretar riscos à saúde humana e animal (MITCHELL et al, 1998).

O uso de concentrações subterapêuticas de antibióticos em animais induz o aparecimento de cepas selecionadas de bactérias, eventualmente resistentes. A multiplicação destas populações resistentes, junto com o potencial de resistência cruzada, leva ao desenvolvimento de colônias bacterianas extremamente resistentes à um amplo espectro de antibióticos. Se tais bactérias resistentes forem transferidas aos humanos através do consumo de alimentos produzidos por estes animais, estas bactérias poderiam, em última análise, colonizar novos hospedeiros ou passar sua resistência aos antibióticos para outras bactérias presentes. (BARTON, 1998, BOWER & DAESCHEL, 1999, MANIE et al, 1999, STOBBERINGH & BOGAARD, 2000).

Este fato ocorre devido às doses subterapêuticas de antibióticos rotineiramente adicionados à ração animal, e não devido ao tratamento terapêutico de animais. O FDA aprovou uma variedade de antibióticos para uso em ração animal incluindo a penicilina e os nitrofuranos em aves e suínos; as tetraciclina em todo os animais produtores de alimentos e as sulfas em suínos. Contudo, doses subterapêuticas destes antibióticos favorecem a seleção de microorganismos resistentes nos animais e esse fator pode não ter sido considerado quando os níveis de tolerância foram estabelecidos para esses compostos em alimentos. (BOWER & DAESCHEL, 1999).

O significado do surgimento de população bacteriana resistente não está limitado somente à saúde do animal usado como alimento, mas,

também, ao efeito do resíduo de antibióticos no complexo ecossistema microbiano do intestino humano (BOWER & DAESCHEL, 1999). A diversidade de elementos de resistência na microflora humana pode aumentar através da introdução de flora resistente de origem bovina. A literatura atual fornece evidências do surgimento de algumas bactérias patogênicas com resistência múltipla aos antibióticos que poderiam ameaçar a saúde humana. (BARTON, 1998, MANIE et al, 1999). Os resíduos de antimicrobianos no leite podem, também, ter um efeito adverso na flora intestinal humana, o que pode prejudicar sua ação protetora local, além de propiciar o aparecimento de uma flora resistente (BRITO, 2001, HONKANEN-BUZALSKI & REYBROECK, 1997, MITCHELL, 1998).

Em 1984, Scott Holmberg et al (apud TORTORA, 2000) identificaram, em 18 pessoas, em quatro estados dos EUA, uma infecção causada por uma cepa de *Salmonella newport* resistente, através da ingestão de carne de gado originário do estado de Dakota do Sul. Em 1985, *S. typhimurium*, resistente aos antibióticos, originária da indústria leiteira de Illinois no Estados Unidos, infectou 16.000 pessoas em sete estados. Os dados de outros países mostram padrões similares de resistência. Na Europa, em anos anteriores à 1984, observou-se que *S. dublin* era sensível à ação dos antibióticos. Desde 1984 observa-se que linhagens de bactérias isoladas de gado e de crianças com salmonelose mostram-se resistentes ao cloranfenicol e à estreptomicina.

Em 1985, cerca de 1.000 casos de infecção por *S. newport*, resistente à múltiplos antibióticos foram relatados na cidade de Los Angeles, Califórnia onde foi caracterizado um plasmídeo idêntico carregando genes de resistência múltipla aos antibióticos em 99% dos isolados de *S. newport*. Foi utilizada uma análise do perfil do plasmídeo para rastrear as bactérias à partir das pessoas doentes, identificando o local de processamento da carne, o abatedouro e, finalmente, as três fazendas envolvidas no caso (TORTORA, 2000).

Alguns ensaios utilizando *S. aureus*, como cepa teste, sugerem que combinações de antibióticos em níveis residuais podem causar aumento de resistência. Os resultados de ensaio em colônias de *Staphylococcus aureus* expostas à ampicilina, dihidroestreptomicina, eritromicina, neomicina, oxitetraciclina, e sulfametazina, individualmente ou em combinação de três medicamentos, indicaram que os chamados "níveis seguros" dos antibióticos/antimicrobianos que podem aparecer no leite apresentam uma forte tendência a selecionar populações de bactérias resistentes (BRADY & KATZ, 1992, BRADY & KATZ, 1993).

BORDAS et al, em 1997, investigaram a relação entre resíduos de praguicidas e antibióticos na seleção de resistências, sendo a unidade de medida a concentração inibitória mínima, em cepas de *S. aureus* ATCC 9144 sensíveis à antibióticos. Os níveis de resíduos de antibióticos tais como, ampicilina, dihidroestreptomicina, eritromicina, neomicina, oxitetraciclina e sulfametazina e os praguicidas, Malation, Carbaril e Captan estudados foram todos inferiores aos níveis de tolerância estabelecidos. Os resultados indicaram que esses "níveis seguros" preconizados pelo FDA - Centro de Medicina Vetrinária para resíduos de antibióticos em leite e para os três praguicidas normalmente encontrados em alimentos, ou seja todos em concentrações permitidas, têm potencial, quando seus resíduos estiverem presentes simultaneamente no leite, de aumentar o desenvolvimento de resistência aos antibióticos.

Segundo Debackere, 1984 (apud DEBACKERE, 1995) a questão primordial é a de se estabelecer os níveis de resíduos secretados no leite que tenham influência no desenvolvimento de cepas resistentes, particularmente no trato intestinal humano. Alguns especialistas não consideram essa questão relevante, por admitirem que tal efeito somente pode ser observado à partir de concentrações maiores ou iguais ao valor da concentração inibitória mínima, para a maioria das cepas sensíveis e isto somente é possível em doses terapêuticas.

Em teoria, um outro risco relacionado aos resíduos de antibióticos em leite e seus efeitos antibacterianos é o de causar distúrbios na flora intestinal humana. Embora este problema seja conhecido e debatido há muitas décadas, ainda não existe um consenso. Em um documento intitulado “O risco potencial de efeitos de resíduos antimicrobianos na microflora gastrointestinal humana”, Kidd, 1994 (apud DEBACKERE, 1995) fornece uma revisão excelente e relativamente atual deste risco potencial. Ele chegou as seguintes conclusões:

- 1) a causa mais comum de resistência no homem resulta do uso terapêutico de antimicrobianos na medicina humana;
- 2) a hipótese da ingestão de resíduos afetar o equilíbrio e o padrão da flora intestinal não é encontrado em estudos epidemiológicos e permanece sem provas, mas também não foi refutada;
- 3) muitas organizações oficiais avaliaram estas hipóteses, e cada uma delas concluiu não haver evidências científicas que permitiriam afirmar que resíduos têm efeitos na flora intestinal humana;
- 4) ao contrário dos efeitos negativos bem documentados de doses terapêuticas, não está bem definida a relação entre níveis de antibióticos na faixa de ppm a ppb, a alteração da microflora intestinal e a consequente seleção de organismos resistentes;

O autor conclui, baseando-se na literatura consultada, que não há risco potencial de resíduos antimicrobianos sobre a flora intestinal humana.

As reações alérgicas causadas pelo consumo de alimento contendo agentes antimicrobianos parecem ser muito raras. Porém, essa baixa incidência pode estar relacionada à dificuldade na identificação destas reações. Vickers, em 1964, descreveu reações alérgicas em humanos após o consumo de leite contendo penicilinas. A incidência observada por esse autor foi muito baixa, entretanto, deve-se considerar o fato de que 1 a 10% da população humana pode apresentar reações adversas às penicilinas. (BLACK, 1984).

São poucos os casos documentados de reações alérgicas brandas, tais como, erupções na pele, em indivíduos previamente sensíveis, devido ao consumo de leite ou carne contendo penicilina G (SUNDLOF, 1989, MITCHELL et al, 1998).

Embora os níveis aceitáveis de resíduos de antibióticos em leite sejam inferiores ao limite mínimo necessário para produzir reações alérgicas agudas, não se sabe se a exposição freqüente a baixas concentrações de tais antibióticos possa causar efeitos nocivos aos consumidores. A maioria das informações relativas à hipersensibilidade estão associadas ao uso da penicilina, além de relatos de que aminoglicosídeo, cloranfenicol e novobiocina sejam, também, fortemente alergênicos em indivíduos sensíveis (COLLINS-THOMPSON et al, 1988).

Não existem provas definitivas de que resíduos de antibióticos possam provocar sensibilização e, assim, expor o consumidor a um risco de uma futura reação alérgica ao antibiótico por ocasião de um tratamento terapêutico. Suspeita-se que os resíduos de penicilina presentes no leite possam induzir reações de sensibilização em indivíduos não alérgicos, porém nada existe que comprove esse fato. A sensibilidade aos antibióticos administrados por via oral só ocorre em doses muito maiores do que as necessárias para o mesmo efeito, através da via respiratória ou dérmica (SUNDLOF, 1989, DEBACKERE, 1995).

Existem evidências, pelo menos para alguns antibióticos, de que os seus resíduos possam produzir reações alérgicas em pessoas previamente sensibilizadas. A concentração mínima de resíduos necessária para esta ocorrência ainda é discutível. Dependendo da fonte mencionada, pode variar de 0,03 e 0,06 a 4 e 10 U.I./ml de leite. Uma vez que a penicilina, compostos similares e alguns metabólitos podem ser alergênicos, é necessário que limites máximos de resíduos sejam estabelecidos para a maioria dos antibióticos (SUNDLOF, 1989, DEBACKERE, 1995).

Existem restrições especiais de uso para os compostos considerados potencialmente perigosos à saúde humana, como por exemplo, o cloranfenicol e os nitrofuranos (BLACK, 1983, SUNDLOF, 1989). O cloranfenicol pode provocar a anemia aplástica, um efeito tóxico grave na espécie humana. Os nitrofuranos se mostram carcinogênicos e mutagênicos em testes de genotoxicidade em animais (SETTEPANI, 1984, SUNDLOF, 1989, MITCHELL et al, 1998).

É importante ressaltar que os produtos de degradação térmica das tetraciclinas não causam efeitos adversos e que não foram observadas reações de hipersensibilidade em humanos devido a ingestão de carne e ovos cozidos que originalmente continham resíduos destes compostos (TIMONEY, 1984).

Apesar da dificuldade em definir os riscos dos antibióticos e seus metabólitos à saúde pública, a presença de altas concentrações de resíduos é ilegal e sujeita a multas em muitos países (MITCHELL et al, 1998).

## **2.6. Interferência dos resíduos de antibióticos na produção de derivados e no controle de qualidade do leite**

A preocupação relativa à presença de resíduos de antimicrobianos em alimentos surgiu nas indústrias de laticínios que observaram a inibição dos fermentos lácticos, usados na produção de derivados do leite, devido a presença de resíduos de antibióticos. Assim, os primeiros controles de resíduos de medicamentos veterinários em alimentos foram realizados na indústria de laticínios (MITCHELL et al, 1998). Esse controle realizado pelas indústrias processadoras de leite, durante os anos 50, provocou o primeiro grande impacto para a redução de resíduos de antibióticos nesse alimento (KINDRED & HUBBERT, 1993).

A presença de antibióticos no leite, mesmo em baixas concentrações, causa problemas para a indústria de laticínios, tais como: inadequada coagulação do leite; problemas na fabricação de queijos, ou seja, acidificação e sabores inadequados, textura irregular e tendência à fermentação butírica; diminuição no sabor e acidez durante a fabricação de manteiga e produtos similares, acidificação e formação de odores desfavoráveis na manteiga e no creme. Em produtos lácteos fermentados, o efeito dos antibióticos é observado através da diminuição ou inibição da acidificação, provocando textura inadequada e diminuição da formação de aroma. Pequenas quantidades de antibióticos no leite podem inibir a eficácia dos fermentos lácticos sensíveis utilizados na fabricação de queijos, iogurtes e de outros produtos (HEESCHEN & BLÜTHGEN, 1991, MÄYRÄ-MÄKINEN, 1995, GALLINA et al, 1998, SILVA et al, 1999, MARTINS & VAZ, 2000, BRITO, 2001).

Um outro fator a ser considerado é a interferência na prova da redutase, usada para avaliar a qualidade microbiológica do leite. A presença de resíduos de antimicrobianos pode inibir a multiplicação ou inativar microrganismos existentes e indicar uma falsa boa qualidade do leite (BRITO, 2001, FAGUNDES & MOLIN, 1998).

Certos antibióticos presentes no leite modificam os resultados do teste da enzima fosfatase alcalina que é utilizado para controlar a pasteurização. O leite contendo tetraciclina e penicilina, corretamente pasteurizado, pode não parecer pasteurizado devido ao aparecimento da cor que indica ineficácia da pasteurização, induzida por estes antibióticos (FAGUNDES & MOLIN, 1998).

## **2.7. A incidência e principais causas de resíduos de antibióticos no leite**

O conceito de resíduos de medicamentos veterinários está relacionado à quantidade total desses compostos e de seus produtos de biotransformação nos tecidos ou carnes, ou ainda em fluídos de animais produtores de alimento. Os resíduos desses medicamentos e/ou seus produtos de biotransformação podem se acumular ou depositar em células, tecidos ou excretas do animal após a sua administração. (DEBACKERE, 1995).

Além da administração oral e parenteral para obtenção de efeitos sistêmicos, há também a aplicação local entre as quais a intramamária é a que mais influencia o aparecimento de resíduos de antibióticos no leite e, em menor extensão, a aplicação intrauterina (DEBACKERE, 1995).

O leite apresenta uma situação especial em relação aos resíduos de antimicrobianos devido às altas concentrações de antibióticos em formulações de aplicação intramamária de liberação lenta, amplamente usados para o controle e a terapia da mastite bovina. Em alguns países, a concentração máxima das doses intramamárias é limitada através de legislações específicas. Deve-se desprezar o leite nas primeiras 96 horas após a aplicação de algumas formulações (TIMONEY, 1984).

De acordo com MITCHELL et al, 1998, existem vários estudos relacionados à presença de antibióticos em alimentos de origem animal. Em 1962, observou-se que aproximadamente 12% do leite comercializados nos Estados Unidos apresentavam resíduos de  $\beta$ -lactâmicos. Resultados similares foram observados na Inglaterra, em 1963, quando 11% das amostras de leite testadas continham teores de penicilina. Além disso, estudos conduzidos em 1988, usando métodos de detecção mais sensíveis,

indicaram que 75% do leite consumido nos Estados Unidos continham níveis detectáveis de tetraciclina, sulfametazina e outros antibióticos.

Um estudo realizado nos Estados Unidos, em 1988, por COLLINS-THOMPSON et al avaliou a presença de resíduos de antibióticos em 214 amostras de leite. Das 174 amostras provenientes de 16 estados americanos, 150 mostraram-se positivas para um ou mais antibióticos. O maior número de positivos estava relacionado à sulfametazina (82) e a tetraciclina (48). No Canadá, as 40 amostras analisadas, no mesmo período, também apresentaram-se positivas para resíduos de tetraciclina (12) e sulfametazina (12).

No Japão, OKA et al, em 1991, avaliaram a presença de resíduos de tetraciclina em tecidos de animais abatidos, que não tinham sido aprovados na inspeção por apresentarem sintomas de doenças. Foram analisadas 271 amostras, sendo que 49 (18,1%) mostraram-se positivas para oxitetraciclina, 5 (1,8%) para clortetraciclina e 5 (1,8%) para doxiciclina. As taxas de frequência de resíduos de tetraciclina foram 29,1% (37/127) para bovinos e 15,2% (22/124) para suínos.

ANDERSON et al, em 1995, elaboraram um estudo para avaliar a possibilidade da oxitetraciclina, administrada por três diferentes vias em vacas em lactação, ocasionar a presença de resíduos deste antibiótico em leite. Os resultados mostram que as vias intramuscular e endovenosa apresentam maior potencial de positividade em comparação com a via intrauterina. Nesse estudo, os autores sugerem que os esforços para reduzir resíduos de oxitetraciclina no leite comercializado devem se concentrar nos procedimentos de administração pela via intramuscular e endovenosa.

ALBUQUERQUE et al, em 1996 avaliaram trezentas amostras de seis marcas de leite pasteurizado: 5 marcas do tipo C e uma marca do tipo A coletadas semanalmente, em diferentes regiões da zona metropolitana de

Fortaleza. Do total de amostras analisadas, 209 apresentaram inibidores (69,7%), e destes, 85 estavam relacionados aos resíduos de penicilina, o que representava 28,3% do total analisado.

Outros trabalhos realizados no Brasil avaliaram a presença de resíduos de antibióticos em leite de consumo: BARROS & PERCHES, em 1981, verificaram no leite tipo B, de São Paulo, a presença de inibidores em 15,04% das amostras de leite "in natura", em 21,25% das amostras de leite "in natura" resfriado (carro-tanque) e em 21,87% das amostras de leite pasteurizado. GELLI et al, 1984, analisaram 404 amostras de leite pasteurizado, tipos B e especial, comercializados na cidade de São Paulo, SP, e verificaram que 11,63% apresentaram resultados positivos para resíduos de antibióticos. LOPES et al, 1998 avaliaram a presença de resíduos de antibióticos em 178 amostras de leite pasteurizado comercializado na cidade de Campinas, SP e os resultados indicaram que 7,9% das amostras apresentaram presença de resíduos de antibióticos. O maior número de amostras com presença de resíduos de antibióticos ocorreu respectivamente no leite pasteurizado tipo A (14,1%) e no leite pasteurizado tipo B (2,5%) e no leite pasteurizado tipo C não houve detecção desse tipo de substâncias nas amostras analisadas.

Um estudo conduzido por Booth em 1982 (apud MITCHELL et al, 1998) baseado na opinião de fazendeiros, constatou que 92% das contaminações de antibióticos no leite provavelmente ocorreram devido ao uso de infusões intramamárias (61% em lactação e 31% em vaca seca) para o tratamento de mastite. As injeções foram responsáveis por 6% das contaminações, e 2% foram atribuídas à outras causas. Segundo Heeschen et al, 1996 (apud MITCHELL et al, 1998) e Mc EWEN, 1991a, as infusões intramamárias liberam altas concentrações de antibióticos diretamente nessa glândula, e uma vez que, a maioria desses produtos contém penicilina e outros  $\beta$ -lactâmicos e pelo fato de que muitos testes sejam particularmente sensíveis a estas classes de antibióticos, não é surpresa que os antibióticos  $\beta$ -

lactâmicos sejam os resíduos mais comumente detectados no leite, na maioria dos países.

Num estudo realizado em gado leiteiro em lactação que recebeu clortetraciclina adicionada à ração na concentração de 2, 10, 300 mg/kg por 21 dias, os resultados mostraram, dentro de condições experimentais planejadas para mimetizar a situação real de vacas em lactação que consomem ração adicionada de clortetraciclina, que as concentrações no leite não excederam os Limites Máximos de Resíduos preconizados pelos Estados Unidos e concluíram que esta não é a causa de resíduos de tetraciclinas detectados em leite (McEVOY et al, 2000).

Muitos são os fatores que contribuem para o aparecimento de resíduos, tais como, falhas na notificação dos tratamentos ou na identificação de animais tratados, porém, a maior porcentagem de resíduos ocorre devido ao uso do antibiótico de maneira inconsistente com as indicações de administração. Isto se deve, em primeiro lugar, pela inobservância dos tempos de carência e, segundo, pelo uso do medicamento fora das especificações, como tratamentos envolvendo um outro método que não o indicado, por exemplo, utilizando-se diferentes espécies, aumento da dose, diferentes vias e frequência de administração. Desse modo, os tempos de carência são difíceis ou impossíveis de serem determinados (Mc EWEN, 1991a, MITCHELL et al, 1998, COSTA, 1999).

Um levantamento realizado no Reino Unido, em 1986, mostrou que de 3.484 casos de contaminação do leite com antibióticos, 80% ocorreram devido ao tratamento intramamário, em casos de mastite. Mais de 50% dos casos de contaminação ocorreram devido ao tratamento intramamário durante a lactação e aproximadamente 27%, como consequência do tratamento à secagem. As principais razões encontradas foram:

- Inobservância de um período de carência para a retirada do leite para consumo humano após o tratamento (16,5%);

- Mistura acidental do leite contaminado com antibiótico ao não contaminado (16,7%);
- Excreção prolongada do antibiótico (8,2%);
- Parições antes do período esperado (7,3%);
- Contaminação dos equipamentos de ordenha (7,2%).

Foram, também, identificadas outras causas, como ordenha acidental de vacas no período seco, descarte somente do leite dos quartos mamários tratados, deficiência ou falta de registro dos tratamentos realizados, falta de identificação das vacas tratadas ou perda da identificação, falha de notificação do período de retirada do leite para consumo e uso de formulação para vacas secas durante a lactação (BOOTH & HARDING, 1986).

KANEENE & AHL, em 1987 conduziram um estudo com 3000 produtores de leite no estado de Michigan, EUA, onde observou-se que a presença de resíduos no leite era maior nas fazendas que apresentavam um rebanho maior e um número maior de trabalhadores temporários, uma vez que a tendência a erros, tais como, descumprimento das indicações de administração do antibiótico e falha na identificação dos animais tratados, é maior. Nas fazendas que usavam, mais frequentemente, antibióticos misturados à ração também apresentaram maior incidência de resíduos no leite. Neste estudo, os teores de resíduos mais elevados também foram associados ao inadequado conhecimento sobre os períodos de carência dos antibióticos.

Em outro estudo conduzido com produtores de leite em Ontário, em 1991, não foi observado um aumento significativo na ocorrência de resíduos relacionados ao uso de ração com antibiótico e ao número de trabalhadores. Os fatores principais associados ao aumento da ocorrência de resíduos em leite foram uso de trabalhadores temporários para ordenha, e um aumento na frequência de tratamento de vacas em lactação, com antibióticos por via intramamária (McEWEN et al, 1991b).

Um estudo desenvolvido em 1018 fazendas de leite na França identificou como as principais causas da presença de inibidores em leite a terapia da mastite clínica (64%), a terapia da vaca seca (24%) e os tratamentos de outras patologias (11%). No caso do tratamento da mastite clínica (n=330), o principal fator de erro consistiu da ordenha acidental de vacas tratadas (58%), mais frequentemente devido a um erro na identificação, e ao não cumprimento das prescrições de uso (38%). No caso da terapia durante o período seco (n=122), os principais erros identificados foram o produtor ter esquecido de descartar o leite (66%) ou não respeitar o período de carência recomendado no caso de período seco normal (11%) ou período seco anormal, mais curto (30%) (FABRE et al, 1995).

## **2.8. Mastite**

A mastite é a doença mais comum do gado leiteiro, e requer tratamento antimicrobiano. Em muitos países, observa-se que mais de 50% das vacas apresentam mastite subclínica. Embora a terapia com antimicrobianos não seja eficiente (por exemplo, a taxa de cura encontra-se em torno de 40% em infecções estafilocócicas), são amplamente utilizados nesse tipo de terapia. Os antimicrobianos chamados de longa duração são utilizados na terapia da vaca seca para a prevenção de novas infecções do úbere. A terapia é imediatamente recomendada em casos agudos, quando os sintomas de mastite são visíveis, porém, em casos subclínicos, a terapia da vaca seca pode ser iniciada no final do período de lactação. Além do tratamento antibacteriano da mastite, outras infecções tratadas com antibióticos podem acarretar resíduos no leite. Se, os períodos de carência são seguidos corretamente, não há praticamente risco de contaminação, porém se são negligenciados, os resíduos podem causar problemas e perdas econômicas (HONKANEN-BUZALSKI & REYBROECK, 1997).

A mastite é um processo inflamatório da glândula mamária, afetando quali e quantitativamente a produção leiteira. Observa-se um menor teor de lactose, caseína, gordura, cálcio, e fósforo e aumento de imunoglobulinas, cloretos e lipase, sendo que esta última rancifica o leite. Com estas alterações o leite torna-se inadequado para o consumo e para produção de derivados, podendo ser rejeitado na plataforma da usina (COSTA, 1996).

A mastite clínica pode ser aguda, apresentando sintomatologia evidente de processo inflamatório e alterações das características do leite, ao passo que na mastite crônica observa-se a formação de tecido mamário fibroso e alterações do leite. A mastite subclínica, de sintomatologia não tão evidente, caracteriza-se pela diminuição da produção leiteira, sem que, contudo, se observem sinais de processo inflamatório ou fibrose. Essa moléstia é a causadora dos maiores prejuízos na produção leiteira; estima-se que para cada vaca com mastite clínica existam até nove, ou mais, com mastite subclínica (COSTA, 1996).

O tratamento medicamentoso ideal da mastite seria aquele que pudesse controlar todos os processos infecciosos do úbere e não deixasse resíduos no leite. A administração do antimicrobiano por via intramamária é o método mais freqüente de tratamento da mastite bovina, porém, o tratamento sistêmico associado ou não ao tratamento intramamário, deverá ser utilizado sempre que houver mastite clínica aguda. Das vias sistêmicas disponíveis, usa-se preferencialmente a via intramuscular ou subcutânea; entretanto muitas vezes é necessária a utilização da via intravenosa (COSTA, 1996).

## **2.9. Medidas preventivas para evitar resíduos de antibióticos no leite**

As práticas atuais de produção sinalizam na direção de adoção de medidas preventivas para o controle das doenças infecciosas do gado leiteiro, em especial da mastite, que tem sido a principal causa de aparecimento de resíduos de substâncias antimicrobianas no leite. É papel de todos os envolvidos na produção animal prevenir que resíduos de antibióticos entrem na cadeia alimentar humana (BRITO, 2001).

De acordo com HARDING, 1995 e BRITO, 2001, para se evitar a presença de resíduos no leite as seguintes recomendações devem ser seguidas:

- Somente tratar infecções do gado leiteiro com substâncias antimicrobianas indicadas por um médico-veterinário.
- Não disponibilizar para o consumo humano o leite de vaca tratada com substâncias antimicrobianas, portanto, não comercializar o leite durante e após o tratamento, enquanto o antimicrobiano (antibióticos e sulfonamidas) estiver sendo eliminado no leite. Toda vaca tratada durante a lactação deve ser identificada, para se evitar a mistura acidental do leite contendo resíduos ao restante do leite do rebanho.
- Respeitar rigorosamente o prazo de retirada do leite do consumo para cada produto utilizado. Este prazo varia de acordo com o produto. Antimicrobianos que não trazem esta informação não devem ser usados para tratamento de vacas em lactação.
- Evitar tratamentos desnecessários, principalmente da mastite subclínica durante a lactação. O tratamento feito na ocasião da secagem da vaca apresenta maior taxa de cura.
- Evitar aumentar a dosagem dos antimicrobianos e usar sempre a dosagem recomendada para cada produto.

- Evitar o uso de mais de um antimicrobiano diferente, pois isso pode aumentar o período de excreção no leite e alterar o prazo de retirada do leite para consumo.
- Adotar um plano de controle da mastite, através de medidas preventivas e de higiene, ambiente limpo para as vacas, manutenção e limpeza adequadas dos equipamentos de ordenha.
- Não usar produtos recomendados para tratamento de vacas secas em vacas em lactação, porque os primeiros são formulados para persistirem por mais tempo no úbere. Vacas tratadas na secagem que parirem antes da data esperada devem ter o leite retirado do consumo até completar o período recomendado.
- Ter cuidados rigorosos de higiene na aplicação intramamária de antimicrobianos. Esses procedimentos são necessários para evitar que o próprio tratamento veicule uma nova fonte de infecção com microrganismos do ambiente

## **2.10. Limite Máximo de Resíduos**

A qualidade do alimento disponível para consumo é viabilizada através do controle de resíduos biológicos, decorrentes do emprego de medicamentos veterinários, praguicidas, ou por acidentes envolvendo contaminantes ambientais. É importante frisar que nem todos os medicamentos e compostos químicos aos quais os animais são expostos deixam resíduos perigosos à saúde humana e animal, e mesmo aqueles reconhecidos como potencialmente nocivos, somente permitem tal condição, quando ultrapassam o limite de segurança ou limite máximo de resíduo (LMR), que o alimento pode conter, sem prejuízo da integridade orgânica de seres humanos e animais (BRASIL, 1998).

Esses limites são determinados em centros de pesquisa, a partir de ensaios toxicológicos, de curto e médio prazos, em animais de laboratórios, microrganismos e genoma celulares. Após a conclusão destes estudos, organizações internacionais envolvidas com a saúde pública analisam os resultados, e posteriormente recomendam os LMR's dos diferentes compostos aprovados à consideração dos países membros do Codex Alimentarius – Programa das Nações Unidas Sobre Harmonização de Normas Alimentares, gerenciado pela FAO/OMS (BRASIL, 1998).

De acordo com Telling, 1990 (apud MITCHELL et al, 1998) entre as organizações internacionais que estabelecem as diretrizes para os LMR existe a Comissão do Codex Alimentarius, cujas normas são estabelecidas pelo Comitê de Resíduos de Medicamentos Veterinários em Alimentos baseadas em recomendações científicas do Comitê Conjunto FAO/OMS de Peritos em Aditivos Alimentares (JECFA). Outros grupos internacionais incluem a Agência Européia para Avaliação de Produtos Médicos (EMEA) e Consultoria Mundial da Indústria de Saúde Animal (COMISA). Muitos países têm grupos de especialistas em agências, tais como a Food and Drug Administration (FDA) nos Estados Unidos, o Departamento de Drogas Veterinárias do Canadá e o Comitê de Produtos Veterinários do Ministério da Agricultura, Pescados e Alimentos no Reino Unido.

Os limites de resíduos em alimentos são estabelecidos na forma de limites de tolerância ou limites máximos de resíduos. Deve-se notar que o termo tolerância é usado nos Estados Unidos enquanto LMR é usado no Canadá e na União Européia, porém os dois termos são sinônimos. O termo LMR pode ser definido como a concentração máxima de resíduo (seja ele do composto ou de seus produtos de biotransformação) resultante do uso de um medicamento veterinário, expresso em parte por milhão (ppm) ou parte por bilhão (ppb), que é legalmente permitido, ou reconhecido como aceitável, no alimento. O LMR leva em consideração a ingestão diária aceitável (IDA) para aquele composto (MITCHELL et al, 1998).

A IDA é determinada pelo NOEL (dose de não efeito observável), que é uma dose obtida em estudos de experimentação animal na qual não foram observados efeitos adversos da substância avaliada sobre a espécie animal mais sensível. Esta dose é expressa em mg/kg de peso corpóreo. A IDA é obtida dividindo-se o NOEL ou a BMD (Bench Marck Dose) por um fator de segurança arbitrário, que tende a variar de 100 a 1000, que procura considerar, entre outros, diferenças de sensibilidade entre as espécies e a heterogeneidade da população humana. O valor numérico extrapolado para o homem, denominado de ingestão diária aceitável (IDA), representa a quantidade de uma substância, expressa em mg/kg de peso corpóreo, que se pode consumir diariamente e por toda vida, sem risco apreciável à saúde, à luz dos conhecimentos toxicológicos disponíveis na época da avaliação (TOLEDO, 1996, MITCHELL et al, 1998).

Na prática, os valores de IDA são usados por agências nacionais e internacionais para estabelecer quantidades aceitáveis de determinada substância em diferentes alimentos, de forma que seu consumo não exceda a IDA.

Um estudo conduzido pelo FDA Center for Veterinary Medicine (CVM) estabeleceu que o valor de IDA para resíduos totais de tetraciclina, incluindo oxitetraciclina, clortetraciclina e tetraciclina, é 25 µg/kg de peso corpóreo. Baseado nestes estudos, um limite de tolerância de 300 ng/ml foi estabelecido para a soma de resíduos de todas as tetraciclina (oxitetraciclina, clortetraciclina e tetraciclina) no leite, sendo que, também, foi estabelecida em 300 ng/ml, a tolerância individual para cada uma das três tetraciclina (FDA, 1998).

O Comitê Conjunto FAO/OMS para Aditivos Alimentares em Alimentos (JECFA) estabeleceu, na última avaliação realizada em 1996, um LMR para para cada uma das três tetraciclina: oxitetraciclina, tetraciclina e clortetraciclina de 100ppb no leite (JECFA, 2000).

No Brasil, a competência para estabelecer limites máximos de resíduos em alimentos, seja de medicamentos veterinários, agrotóxicos, contaminantes e aditivos, é do Ministério da Saúde através da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (BRASIL, 2001).

No caso de medicamentos veterinários, até o momento, esses limites nacionais não foram definidos pelo setor saúde, e, portanto, vem-se utilizando o Plano Nacional de Controle de Resíduos Biológicos em Produtos de Origem Animal (PNCRB), Instrução Normativa/MAA Nº 42, de 20 de dezembro de 1999, instituído pelo Ministério da Agricultura com a finalidade de sistematizar os meios de controle da contaminação desses produtos por resíduos de compostos de uso na agropecuária, bem como de poluentes ambientais (BRASIL, 2001). Este programa estabelece como LMR para oxitetraciclina, tetraciclina e clortetraciclina o valor de 100ppb no leite para cada tetraciclina (BRASIL, 1998).

### **2.11. O efeito do cozimento nos resíduos de tetraciclinas presentes no alimento**

Produtos de origem animal são normalmente cozidos ou processados de alguma maneira antes de serem consumidos. Portanto, é necessário que seja avaliado o efeito do beneficiamento do alimento no estabelecimento da real exposição humana aos resíduos de antibióticos (MOATS, 1999).

ROSE et al, em 1996 elaboraram curvas de concentrações de oxitetraciclina em água a 100° C, 80° C e 62° C versus tempo e demonstraram que se mantinham constantes em aproximadamente 2, 15, e 120 minutos, respectivamente e após esse período se degradavam. Para as curvas de concentrações de oxitetraciclina em óleo a 110° C e 180° C o tempo de estabilidade foi de aproximadamente 8 minutos à 180° C,

enquanto que à 110° C após 150 minutos, a concentração de oxitetraciclina diminui aproximadamente 25%. A oxitetraciclina, portanto, mostrou-se menos estável ao aquecimento em meio aquoso do que em meio lipídico, sugerindo que uma reação de hidrólise tenha sido a responsável pela degradação observada. Estes resultados mostraram que a oxitetraciclina não é estável nas temperaturas normalmente usadas em cozimento.

Um estudo realizado com diversas concentrações de clortetraciclina em leite mostrou uma redução na concentração de 16,6% quando submetido a temperatura de 62°C por 30 minutos, redução de 27,6% à 71°C por 30 minutos e de 100% à 121° por 15 minutos. O mesmo estudo com diversas concentrações de oxitetraciclina em leite mostrou que as reduções foram 23,6% à 62°C por 30 minutos, 35,6% à 71°C por 30 minutos e 100% à 121° por 15 minutos (MOATS, 1999). Os resíduos de antibióticos em leite não são inativados pelos procedimentos de pasteurização normais (71°C por 15s) (MOATS, 1998).

Pilet et al (apud MOATS, 1988) estudaram o efeito do aquecimento na estabilidade de alguns antibióticos em leite, água, concentrados de carne e músculo de frango. A oxitetraciclina apresentou-se bem menos estável, sendo completamente inativada à 100°C por 30 minutos. A penicilina não foi completamente inativada à 100 °C por 90 minutos. A neomicina apresentou-se mais estável, sendo inativada somente 0 a 20% à 100°C por 5 horas.

Os produtos formados da quebra das moléculas de antibióticos durante os procedimentos de aquecimento não são bem conhecidos. Mesmo se a atividade microbiana é alterada, ainda assim, os compostos formados podem produzir resposta alérgica em pessoas sensíveis. Isto pode ser observado em relação às penicilina, pois muitos indivíduos apresentam uma resposta alérgica a compostos derivados da penicilina, mesmo que estes não apresentem atividade microbiana (MOATS, 1988).

## **2.12. Classificação do leite**

O leite é utilizado como um importante alimento para os humanos, devido à sua qualidade nutricional — fonte de proteínas, de vitaminas A e B2, de fósforo e cálcio. O leite é definido como uma secreção de pH neutro, 6,5 a 6,7, da glândula mamária de mamíferos. Ele é constituído por uma emulsão de gorduras em água, estabilizada por uma dispersão coloidal de proteínas em uma solução de sais, vitaminas, peptídeos, lactose, oligossacarídeos, caseínas e outras proteínas. O leite contém, também, enzimas, anticorpos, hormônios, pigmentos (carotenos, xantofilas, riboflavina), células (epiteliais, leucócitos, bactérias e leveduras), CO<sub>2</sub>, O<sub>2</sub> e nitrogênio. No Brasil, o leite próprio para o consumo, é encontrado no mercado nas seguintes formas: longa vida, pasteurizado e em pó. Há três tipos de leite pasteurizado: A, B e C, que são classificados de acordo com a higiene na ordenha, o resfriamento imediato na fazenda, a contagem de microorganismos prévia ou posterior a pasteurização. (PINAZZA & ALIMANDRO, 1999).

## **2.13. Produção nacional de leite**

O rebanho brasileiro produtor de leite situa-se em torno de 20 milhões de animais adultos, dos quais mais da metade do leite produzido provém de pequenas propriedades rurais com baixa produtividade, quase sempre informal. A produção artesanal ainda é predominante no território brasileiro (HACKER, 2000).

Assim, a produção primária de leite é amplamente dominada por produtores nada ou pouco especializados, com interesses divididos entre a venda sazonal de pequenos volumes de leite de baixo custo e qualidade (a produção média brasileira é inferior a 50 litros/produtor/dia) e a venda de

animais mestiços e de corte. Na verdade, a vigência de uma legislação completamente ultrapassada em relação as normas e padrões de qualidade – aliada a um sistema pouco eficiente de inspeção sanitária do produto – favoreceram o desenvolvimento de uma pecuária *sui-generis* no país (JANK et al, 1999), e um mercado informal bastante expressivo, como pode ser observados nos dados apresentados na Tabela 3.

Tabela 3: Produção brasileira de leite (em milhões de litros)

Ano	Produção Total	Produção Sob Inspeção	Leite Informal e Auto Consumo(1)
1980	11.162	7.728	3.434
1981	11.324	8.400	2.924
1982	11.461	8.126	3.335
1983	11.463	8.585	2.878
1984	11.933	8.887	3.046
1985	12.846	8.834	4.012
1986	12.492	8.698	3.794
1987	12.997	10.037	2.960
1988	13.522	10.262	3.260
1989	13.095	10.135	2.960
1990	14.484	10.747	3.737
1991	15.079	10.413	4.666
1992	14.784	10.700	4.084
1993	15.591	9.146	6.445
1994	15.784	9.441	6.343
1995	16.474	10.577	5.897
1996	18.515	11.366	7.149
1997	18.666	10.558	8.108
1998	19.327	10.932	8.395
1999	19.133	11.073	8.060
2000	20.090	11.500	8.590

(1) Calculado por diferença

Fonte: Produção total, IBGE 1980-97 e CNA/LEITE BRASIL

1998-2000 (estimativa). Produção sob inspeção, IBGE.

Elaboração: LEITE BRASIL, 2001

O Brasil tem passado por importantes mudanças em relação a distribuição geográfica da produção primária de leite. As bacias leiteiras tradicionais localizam-se nas regiões sul e sudeste do país, particularmente nos Estados de Minas Gerais, São Paulo, Paraná e Rio Grande do Sul. Porém, é fato recente e marcante na pecuária leiteira do Brasil a crescente

migração da produção para a região dos cerrados do centro-oeste, com destaque para o crescimento da importância do estado de Goiás e do cerrado mineiro (JANK et al, 1999).

## **2.14. Métodos para detecção de resíduos de antibióticos em leite**

Os testes comercialmente disponíveis para aplicação em campo são, em sua maioria, qualitativos ou semiquantitativos e são classificados como testes de triagem. Os testes quantitativos exigem maior perícia técnica; assim são realizados em laboratórios analíticos como testes de confirmação (MITCHELL et al, 1998).

### **2.14.1. Métodos de triagem**

Atualmente existem vários testes disponíveis comercialmente para detecção de resíduos de antibióticos em leite, como pode ser observado na Tabela 4. Estes testes variam em relação à classe de antibiótico detectável, sua sensibilidade e o tempo de detecção (SENYK et al, 1990). Na triagem de resíduos de antibióticos em leite são mais comumente utilizados os testes de inibição microbiana e os testes rápidos específicos para substâncias ou grupos de substâncias (REYBROECK, 1995a).

**Tabela 4:** Testes disponíveis comercialmente para detecção de resíduos de antimicrobianos no leite e o princípio em que se baseiam.

Princípio do teste	Teste	Fabricante
Inibição do crescimento microbiano	Teste do disco	
	BR-Test	Idetek, Inc., Sunnyvale, Calif.
	BR-Test "Blue Star"	
	BR-Test AS	
	Charm Farm Test	Penicillin Assays, Inc, Malden, MA
	Charm Inhibition Assay	Penicillin Assays, Inc, Malden, MA
	Delvotest-P	G.B. Fermentation Industries, Charlotte, NC
	Delvotest-SP	G.B. Fermentation Industries, Charlotte, NC
Receptor	Charm Cowside Test	Penicillin Assays, Inc, Malden, MA
	Charm I Test	
	Charm II Test	
Ligação à proteína	CITE Probe ( $\beta$ - lactam)	Idetek, Portland, ME
ELISA	CITE Probe (Tetraciclina , Gentamicina)	Idetek, Portland, ME
	Cite Sulfa Trio	Idetek, Portland, ME
	EZ-Screen	Environmental Diagnostics, Inc. Burlington, NC
	LacTek ( $\beta$ - lactam, Gentamicina, Sulfametazina)	Idetek, Inc.
	Signal Neomycin Detection Test, Signal ForeSite Gentamicin, Signal Gentamicin, Signal ForeSite Sulfamethazine	SmithKline Animal Health Products, West Chester , PA
	Enzima	Penzyme
Aglutinação em látex	Spot Test	

Fonte: SUNDLOF, 1989, CULLOR, 1992

O princípio dos testes de inibição microbiana consiste da detecção da inibição microbiana, observada visualmente pela mudança da coloração do indicador de pH no meio. Os microrganismos mais comumente usados nestes testes são *Bacillus stearothermophilus* var. *calidolactis* (Delvotest<sup>SP</sup>, BR-teste), *Streptococcus salivarius* spp. *Thermophilus* (Valiotest T 101), e *Bacillus subtilis* ATTC 6633 (Arla micro teste). Existem, também, vários

testes rápidos enzimáticos e imunológicos disponíveis comercialmente (NOUWS, 1999a, REYBROECK, 1995b).

As desvantagens de maior relevância associadas aos testes de inibição do crescimento bacteriano são a baixa especificidade na identificação do antibiótico, níveis de detecção não compatíveis com os indicados na legislação, e o tempo de análise de 2 a 4 horas quando utilizam-se cepas de *B. stearothermophilus* e *S. thermophilus* e de 16 a 24h com formadores de esporos mesofílicos. Além disso, os testes de inibição de crescimento estão sujeitos aos efeitos de muitas substâncias inibitórias naturais encontradas em alimentos de origem animal, tais como lisozima e lactoferrina. Estes compostos estão presentes em altas concentrações em leite de vaca com mastite e induzem a obtenção de resultados falso-positivos. A microflora das amostras de leite também pode alterar o resultado destes testes através da influência no crescimento do microrganismo usado no teste ou devido a sua atividade metabólica. Aparentemente, alguns destes efeitos são eliminados pelo uso de discos de papel de filtro nestes testes, aquecimento prévio das amostras ou uso de membranas de diálise para separar proteínas de grande peso molecular dos antibióticos de menor peso molecular. As principais vantagens destes testes são seu baixo custo, fácil realização na triagem de um grande número de amostras, além de razoável espectro de detecção antimicrobiana (SUHREN, 1995).

Deve-se levar em consideração que o resultado de um método microbiano para detecção de resíduos de antibióticos em alimento depende da sensibilidade da cepa microbiana e do fato que os resíduos no alimento estão parcialmente livres ou ligados à fração protéica, e que somente a fração não ligada pode inibir os microrganismos. Para alguns grupos de antibióticos, tais como sulfonamidas e tetraciclina, a fração ligada à proteína é tão significativa que uma alta taxa de resultados falsos negativos podem ocorrer em baixas concentrações e/ou em concentrações próximas aos LMRs (AURELI et al, 1999).

O ensaio com receptor competitivo utiliza receptores de células bacterianas, que são específicos para várias classes de antibióticos. Os receptores são adicionados à amostra de leite a ser testada, juntamente com o antimicrobiano marcado radioativamente da classe de antimicrobiano a ser analisado (por exemplo, C<sup>14</sup>-penicilina para betalactâmico, H<sup>3</sup>-sulfametazina para sulfonamidas). Quando a amostra não contém resíduos de antibióticos, todos os sítios dos receptores microbianos serão ocupados pelo antimicrobiano marcado radioativamente, porém quando a amostra contém antimicrobiano, alguns receptores serão ocupados pelo antimicrobiano não marcado. O número de sítios de receptores ocupados pelo antimicrobiano não marcado é diretamente proporcional à concentração do antimicrobiano na amostra. Quanto maior for a radioatividade detectada na amostra, menor a quantidade de antimicrobiano presente (SUNDLOF, 1989).

O Penzyme é um teste que utiliza um processo de ativação enzimática que causa alteração de cor na ausência de antibióticos betalactâmicos. A carboxipeptidase forma um complexo estável e inativo com os resíduos destes antibióticos presentes na amostra de leite. Como a enzima é necessária para iniciar a reação colorida, a mudança de cor não ocorrerá na presença de resíduos de betalactâmicos (SUNDLOF, 1989).

Os ensaios com receptores competitivos, como os testes CHARM I e CHARM II são qualitativos e permitem a rápida detecção de  $\beta$ -lactâmicos, macrolídeos, aminoglicosídeos, tetraciclina, cloranfenicol e sulfonamidas em leite e tecidos (MITCHELL et al, 1998). Estes testes apresentam maior sensibilidade que os testes de inibição microbiana para os antibióticos tetraciclina, eritromicina, estreptomicina, novobiocina, sulfametazina, cloranfenicol e gentamicina (COLLINS-THOMPSON, 1988).

A principal desvantagem do teste de receptor competitivo é o custo, pois necessita de condições laboratoriais específicas, como um contador de

cintilação. Outra desvantagem observada no Charm Test é que o limite de detecção muito baixo do método resulta em amostras positivas, mesmo quando a concentração de resíduos de antimicrobianos não representa risco à saúde humana (SUNDLOF, 1989, NOUWS et al, 1999b).

Alguns trabalhos mostram que estes métodos de triagem podem apresentar resultados falso-positivos ou falso-negativos. Em um estudo realizado com amostras de leite, a incidência de resultados falso positivos usando CHARM II foi de 2,5%, explicada por possíveis erro de técnica, falha de equipamento ou reagentes e amostras de leite anormal (SENYK et al, 1990).

Na avaliação de um teste enzimático modificado, o teste da tetraciclina galactosidase (TG), para a detecção de tetraciclinas em leite, observou-se 12% de resultados falso-positivos em amostras com contagens de células somáticas superior a  $10^6$ /ml, mesmo após o pré-aquecimento das amostras (D'HAESE et al, 1999).

CHARM & CHI, em 1988, ao coordenarem a realização de um estudo colaborativo em 13 laboratórios, usando um teste com receptor competitivo para a detecção de resíduos de grupos de agentes antimicrobianos em leite, observaram uma incidência de resultados falso-negativos de aproximadamente 1%; e de resultados falso-positivos de aproximadamente 3%.

CARSSON & BJÖRCK, em 1992, num estudo comparativo de três testes de inibição de crescimento microbiano (Arla microtest e o Delvotest P e Valio T101 test) e com um teste receptor microbiano (CHARM II) mostraram que o ácido graxo livre, produzido pela lipólise do leite induz a resultados positivos em testes microbianos sem ágar (Arla microtest, Valio T101 test e no teste de receptor CHARM II).

Os testes de triagem baseados nos *B. stearothermophilus* e *S. thermophilus* não apresentam limite de detecção que atende aos critérios de Limites Máximos de Resíduos estabelecidos pela União Européia para as tetraciclinas. Recentemente, foi desenvolvido o teste de difusão em tubo para detecção de tetraciclinas em leite, que apresenta um limite de detecção de 40 a 60ng/ml, e assim, atende ao Limite Máximo de Resíduo estabelecido. Para a identificação das tetraciclinas em um leite positivo no teste de triagem, pode ser usado o Charm HVS, um teste receptor multi-resíduo. Porém, podem ocorrer resultados falso-positivos neste teste devido à presença de ácidos graxos presentes no leite cru. Em um estudo recente, NOUWS et al, em 1998, concluem que resultados inferiores à 150ng/ml neste teste não devem ser considerados confiáveis. A provável consequência prática ao se aceitar resultados abaixo deste valor é o descarte desnecessário do leite (NOUWS et al, 1998, NOUWS et al, 1999b).

Os ensaios microbiológicos são mais comumente usados para a avaliação das tetraciclinas em alimentos, porém são muito longos, não identificam certas tetraciclinas, e tendem a ser imprecisos. Um ensaio microbiológico reflete a concentração total, ou seja, não considera individualmente as tetraciclinas. Portanto, é necessário que se utilize um método de análise cromatográfico específico para as tetraciclinas (OKA et al, 2000, TSAI & KONDO, 1994, OKA et al, 1991, ASHWORTH, 1985).

### **2.14.2. Métodos cromatográficos na análise das tetraciclinas**

As tetraciclinas são quimicamente caracterizadas por uma estrutura de quatro anéis conjugados parcialmente com um grupo funcional carboxiamida. Têm propriedades químicas e físico-químicas similares e são compostos anfotéricos, com valores de pH característicos, solúveis em solventes orgânicos polares ou moderadamente polares e formam sais e hidratos cristalinos com ácidos e bases. Além disso, também têm habilidade de formar complexos fortes com cátions multivalentes. Seus espectros UV mostram forte absorção em torno de 270 e 360nm em soluções ácidas e neutras (FEDENIUK & SHAND, 1998, OKA et al, 2000).

A identificação e a quantificação dos resíduos de tetraciclinas podem ser realizadas por vários métodos através da cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

Na literatura são descritos métodos que preconizam a cromatografia em camada delgada para separar as tetraciclinas usando-se como adsorvente a sílica gel e a celulose. Em geral, a cromatografia em camada delgada é simples e não necessita de equipamento especial, entretanto, a maioria dos trabalhos publicados comenta os inconvenientes em relação a essa técnica, como o tempo excessivo para a preparação das placas e técnicas para evitar a ligação das tetraciclinas com os resíduos de metais dos adsorventes utilizados. Assim, sugerem a adição de EDTA ao adsorvente previamente ao preparo da placa ou a utilização de um sistema solvente contendo EDTA. Entretanto essas técnicas são pouco eficazes para a detecção das tetraciclinas (OKA et al, 2000).

A cromatografia líquida é a mais comumente utilizada para a determinação de tetraciclinas em leite (SCHENCK & CALLERY, 1998). As tetraciclinas possuem diferentes grupos funcionais na sua molécula, cuja presença torna mais complexos os mecanismos envolvidos na sua retenção

nos sistemas cromatográficos. Como consequência da elevada polaridade das tetraciclinas, são utilizadas fases móveis com elevado teor aquoso. Em tais sistemas solventes, desempenham papéis importantes, a formação de pares iônicos, de complexação e a forte interação com grupos silanois residuais. Estes fatores dificultam a quantificação das tetraciclinas (PENA et al, 1997).

Na análise cromatográfica das tetraciclinas são utilizadas as colunas de fase reversa, cujo material de preenchimento permite a retenção destas, através de alguns mecanismos, tais como, formação de pares iônicos, efeitos de competição, locais ativos e não ativos, troca iônica e interação com grupos silanois (PENA et al, 1997).

As tetraciclinas formam quelantes com íons metálicos e tendem a adsorver-se nos grupos silanois na coluna de fase reversa. Assim, tendem a apresentar picos com caudas e baixa resolução. Estes problemas podem ser superados pela adição de ácido oxálico na fase móvel e pelo uso de colunas de poliestirenodivinilbenzeno (OKA et al, 2000, SCHENCK & CALLERY, 1998).

Uma outra forma de evitar a formação destes complexos e sua adsorção nas colunas de fase reversa é fazer uso de fases móveis contendo outros ácidos, como por exemplo, ácido fosfórico, ácido cítrico, ácido perclórico, ácido tartárico (PENA et al, 1997). Entretanto, as tetraciclinas ainda mostram picos com caudas nas colunas de fase reversa, mesmo usando fases móveis contendo estes ácidos, sendo que o ácido oxálico mostra-se o mais apropriado para evitar esses picos. Assim, a fase móvel contendo ácido oxálico aparece em muitos artigos de análises de tetraciclinas em alimentos por CLAE a partir do final da década de 80 (OKA et al, 2000).

A composição da fase móvel, portanto, desempenha um papel muito importante no comportamento cromatográfico das tetraciclinas. PENA et al, em 1997, ao testar diferentes tipos de colunas cromatográficas de fase reversa, verificou que não eram necessárias colunas de melhor qualidade e performance se fosse escolhida uma fase móvel apropriada. Os melhores resultados foram obtidos em pH 2 quer com tampão oxalato, citrato ou fosfato. A adição de ácido oxálico numa concentração adequada atua como um agente complexante muito bom, evitando os picos com caudas e permitindo a determinação precisa das tetraciclinas.

A eficiência pode ser melhorada pela adição de agentes bloqueadores da fase móvel, como é o caso do etilenodiaminatetracetato dissódico (EDTA) que atua como par iônico das tetraciclinas no intervalo de pH entre 3 e 5. Outros pares iônicos usados incluem: dietanolamina, etanolamina, heptanosulfonato de sódio, nitrato e compostos de alquilamônio substituídos no sentido de suprimir a formação de complexos entre as tetraciclinas e os íons metálicos, reduzindo significativamente a cauda dos picos cromatográficos (PENA et al, 1997).

Alguns trabalhos, como Furusawa, 1999, utilizam colunas de sílica de fase reversa “end-capping”, que é um tipo de coluna submetida a um tratamento com trimetilclorosilano onde ocorre a redução do número de grupos silanol livre, enquanto outros usam sistemas baseados na formação de pares iônicos ou no uso de material de troca iônica. Contudo a eficiência é pouco alterada (PENA et al, 1997).

O uso de colunas poliméricas preenchidas com poliestirenodivinilbenzeno, permite uma boa resolução. Porém, segundo White et al, as eficiências dessas colunas e as de fase reversa de tamanho de partículas comparáveis (5 $\mu$ m) são similares (PENA et al, 1997).

Como mencionado anteriormente as tetraciclinas apresentam forte absorção UV, em torno de 270 e 360nm em soluções ácidas e neutras, portanto o método de detecção mais convencional para sua determinação é a CLAE acoplada ao detector UV ou detector de arranjo de diodos (DAD) que permite análise em diferentes comprimentos de onda simultaneamente (OKA et al, 2000).

Esses compostos produzem forte fluorescência com íons metálicos ou em condições básicas. Isto permite uma análise altamente sensível das tetraciclinas em CLAE acoplada ao detector de fluorescência, após a degradação das tetraciclinas em condições alcalinas e a formação de metal quelato (PENA et al, 1997b, OKA et al, 2000,).

A espectrometria de massa também é utilizada como um método de detecção altamente sensível. Essa técnica permite confirmar os resíduos das tetraciclinas devido ao limite de quantificação satisfatório e seletividade; portanto um método combinando uma simples e precisa separação com uma espectrometria da massa apropriada ofereceria uma vantagem significativa para a confirmação inequívoca de resíduos das tetraciclinas. Embora a cromatografia líquida acoplada ao detector de espectrômetro de massa (CL-EM) pareça ser a mais adequada para esta proposta, a maioria das condições de cromatografia líquida previamente descritas não podem ser diretamente aplicadas aos sistemas de CL-EM existentes, porque elas utilizam fases móveis contendo compostos não voláteis, tais como o ácido oxálico e ácido cítrico para melhorar a resolução cromatográfica. Essas fases quando usadas em CL-EM causam entupimento da interface e um acréscimo de depósitos na fonte de íons, impedindo que o equipamento seja operado por tempo prolongado. (OKA et al, 2000).

As tetraciclinas formam um complexo quelante com íons metálicos e ligam-se às proteínas, assim, devem-se usar ácidos fortes e agentes desproteinizantes acídicos na extração de amostras biológicas. Existe uma

enorme variedade de técnicas a serem usadas na extração das tetraciclinas. A maioria utiliza solução aquosa contendo agente quelante para diminuir a tendência das tetraciclinas à ligarem-se aos cátions da matriz. O EDTA, o ácido oxálico e o ácido cítrico são os mais comumente utilizados como agentes quelantes. O tampão de McIlvaine, usado em muitos procedimentos de extração, contém ácido cítrico (FEDENIUK & SHAND, 1998).

Na purificação observa-se a utilização de uma extração em fase sólida (SPE) usando colunas de sílica alquil ligadas, Amberlite XAD-2 e extração quelante. A técnica mais comum para essa extração utiliza colunas C<sub>18</sub>. Entretanto, estes métodos requerem procedimentos mais elaborados, além de apresentarem baixa recuperação e reprodutibilidade. No sentido de evitar estes problemas preconiza-se um pré-tratamento das colunas C<sub>18</sub> com EDTA ou reagente de silanização. (OKA et al, 2000, FEDENIUK & SHAND, 1998, CROUBELS et al, 1997).

A capacidade quelante das tetraciclinas é usada numa técnica de purificação, que é a cromatografia de afinidade de metal quelato (MCAC), baseado na formação de complexos de cátions com as tetraciclinas (OKA et al, 2000, FEDENIUK & SHAND, 1998, COOPER et al, 1998). Este método necessita uma concentração adicional do eluato do MCAC para se ter baixos limites de detecção. Além disso, o eluato do MCAC desenvolve um precipitado que pode entupir e diminuir significativamente o tempo de vida útil da coluna de CLAE (CROUBELS et al, 1997).

A Tabela 5 apresenta as principais condições analíticas preconizadas por diversos autores na determinação de tetraciclinas em leite por CLAE.

**Tabela 5:** Condições analíticas utilizadas na determinação das tetraciclinas em leite por CLAE preconizadas por diversos autores

Volume de Leite	Identificação	Extração	Características Cromatográficas	Observações	Referência
5 ml	CLAE-UV	- 10 ml tampão succinato de sódio - Fase sólida: resina metal quelato(ác. Imunodiacético ligado a Sepharose 6B Fast flow epóxi ativado)	-coluna PLRP-S (150x4,6mm), 5µm -Fase móvel A: ác. Oxálico 0,01M -Fase móvel B: acetonitrila:metanol - Eluição Gradiente -Fluxo: 1,0 a 1,5ml/min - λ: 355nm	- Estudo colaborativo para a análise de 7 tetraciclinas diferentes - Média de recuperação na conc. de 15 ng/ml: 59% a 78% e conc. de 30 ng/ml: 60% a 110%	CARSON & BRESLYN, 1996
5ml	CLAE-UV	- 10 ml tampão succinato de sódio -Fase sólida: resina metal quelato( Sepharose 6B Fast flow quelante)	-coluna PLRP-S (150x4,6mm), 5µm -Fase móvel A: ác. Oxálico 0,01M -Fase móvel B: acetonitrila:metanol - Eluição Gradiente -Fluxo: 1,0 a 1,5ml/min - λ: 355nm	- Simultânea determinação de 7 tetraciclinas diferentes - Limite de detecção e limite de quantificação para as tetraciclinas individuais menor que 5ng/ml - Recuperações acima de 60% para todas as tetraciclinas	CARSON, 1993

Cont. Tabela 5

Volume de Leite	Identificação	Extração	Características Cromatográficas	Observações	Referência
5g	CLAE-UV	- 3x com 20, 20, 10 ml Na <sub>2</sub> EDTA 0,1M- tampão Mclvaine (pH=4,0) - coluna SPE BAKER 10 C18	- Coluna Lichrosorb RP 8, (250x4,0mm), 10µm - Fase móvel: metanol : acetonitrila : ácido oxálico 0,01M pH=2,0 (1:1,5:2,5) - fluxo 2ml/min - λ: 350nm	- Média de recuperação para OTC: 87,7%, TC: 87,5%, CTC: 79,6%, DC: 67,5% - Limite de detecção para OTC e TC 0,05ppm - Limite de detecção para CTC e DC 0,1ppm	OKA et al, 1985
5ml	CLAE-UV	1ml HCl 0,1N 15ml acetonitrila 10ml hexano 10ml diclorometano	- coluna PLRP-S (150x4,6mm), 5µm - Fase móvel: H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> 0,02 M e decanosulfonato de sódio 0,01M : acetonitrila (70 : 30) - fluxo 1ml/min - λ: 380nm	- Média de recuperação maior que 80% para OTC, TC e CTC - Limite de detecção para OTC e TC 2 ppb - Limite de detecção para CTC 4 ppb	MOATS & HARIK-KHAN, 1995
2ml	CLAE-UV	4 ml tampão Mclvaine/ solução de EDTA filtros "cutoff" peso molecular	- Coluna NOVA PAK C18 (150x3,9mm) - Fase móvel A: ácido oxálico 0,01M - Fase móvel B metanol : acetonitrila. - Eluição Gradiente - fluxo 1 a 1,5 ml/min - λ: 360nm	- Média de recuperação para OTC e TC 97% e CTC 89% - Limite de detecção para OTC:7,9 ppb, TC:11,6ppb e CTC 19,8ppb - Limite de quantificação para OTC:14,1 ppb, TC:31,3ppb e CTC 51,9ppb	THOMAS, 1989

Cont. Tabela 5

Volume de Leite	Identificação	Extração	Características Cromatográficas	Observações	Referência
5g	CLAE-UV	- 0,8ml ác. Sulfúrico 0,6N pH 2,7 - 10ml acetonitrila - 3ml sulfato de amônio - 2ml tampão fosfato - 11ml diclorometano - 2ml TBA HSO4 0,4M pH 8,2 - 0,5 ml ác. Percloreico	- Coluna NUCLEOSIL C18 (250x4,6mm), 5µm - Fase móvel: acetonitrila : ác. Fosfórico 0,02M (24 : 76) - fluxo 1,2 ml/min - λ: 355nm	- Recuperação para OTC 72,7% e TC 85,1% - Limite de quantificação para OTC e TC 10ppb	FLETOURIS et al, 1990
0,5ml	CLAE-UV	- Dispersão em matriz de fase sólida (MSPD) com 2g de octadecilsilano C18, 40µm, "endcapped" - 0,05g EDTA - 8ml hexano - 8ml acetato etila : acetonitrila (1 : 3) para eluição	- Coluna octadecil (ODS) fase reversa (300x4mm), 10µm - Fase móvel: ác. Oxálico 0,01M : acetonitrila (70:30) - fluxo 1 ml/min - λ: 365nm	- Médias de recuperação para OTC, TC, CTC foram de 63,5% a 93,3% - Limite de detecção 100ppb	LONG et al, 1990
5ml	CLAE-UV	- 2x Na2EDTA - tampão McIlvaine (pH=4,0) - coluna SPE Separon SGX C18	- Coluna Spherisorb ODS 2 (250x4mm), 5µm - Fase móvel: ác. Oxálico : acetonitrila : metanol (45:35:20) - fluxo 1 ml/min - λ: 360nm	- Médias de recuperação para OTC: 91,98%, TC: 83,44%, CTC:95,41% - Limite de detecção 0,05ppm	SOKOL et al, 1995

Cont. Tabela 5

Volume de Leite	Identificação	Extração	Características Cromatográficas	Observações	Referência
5g	CLAE-UV e confirmação por TLC/(FAB) MS	- 3x 20, 20, 10ml Na <sub>2</sub> EDTA 0,1M- tampão McIlvaine (pH=4,0) - coluna SPE C18	Para o CLAE-UV: - coluna Bakerbond C8 (250x4,6mm), 5µm - Fase móvel: metanol : acetoneitrila : ác. Oxálico 0,01M (1:1,5:2,5) - λ: 350nm	Para o CLAE-UV: -Limite de detecção para -OTC e TC 10ppb -Limite de detecção para CTC e DC 20ppb Para o TLC/FABMS: - -Limite de detecção 50ppb Média recuperação para as tetraciclina 73,0% a 81,8%	OKA et al, 1994
5ml	CLAE-UV	- 2x 20, 10ml de tampão McIlvaine (pH=4,0) - coluna SPE C8	- Coluna RP-18 (250x4,6mm), 5µm - Fase móvel A: ác. Oxálico 0,01M:THF:TEA:acetoneitrila (80:1:0,1:20) - Fase móvel B: acetoneitrila:metanol (50:50) - Fluxo: 1 ml/min - Eluição em gradiente - λ: 363nm	- Média de recuperação para 7 diferentes tetraciclina foi 80% - Limite de quantificação 100ppb	ABETE et al, 1997

Cont. Tabela 5

Volume de Leite	Identificação	Extração	Características Cromatográficas	Observações	Referência
1,0ml	CLAE-UV	1,5ml TCA 20% filtrar	- Coluna LiCrospher 100 RP-8, end-capped (250x4,6mm), 5µm - Fase móvel: acetonitrila:ác. Acético:água (28:4:68) - Fluxo: 1ml/min - λ: 354nm	- Médias de recuperação para a oxitetraciclina maiores que 89,8% - Limite de detecção 0,05 µg/ml	FURUSAWA, 1999
5ml	CLAE-UV	1ml HCl 1N 24 ml acetonitrila 30 ml diclorometano 30 ml hexano	-coluna PLRP-S (150x4,6mm), 5µm -Fase móvel: tampão oxalato 0,05M : decanosulfonato de sódio (pH=2,3) -Fluxo: 1,0ml/min - λ: 365nm	- Média de recuperação: 87 a 99% - Limite detecção: 5ppb para oxitetraciclina, tetraciclina e clortetraciclina	WHITE, 1993
	Cromatografia líquida ionização química – "Tandem" espectrometria de massa (APCI LC – MS – MS)	"clean-up" das amostras com Bond Elut ENV	- Padrão Interno: demeclociclina - Temperatura do nebulizador: 475°C	- Médias de recuperação para as tetraciclinas 60,1% a 88,9% - Limite de detecção para OTC e TC 1,0ppb - Limite de detecção para CTC 4,0ppb e DC 2,0ppb	NAKAZAWA et al, 1999

Cont. Tabela 5

Volume de Leite	Identificação	Extração	Características Cromatográficas	Observações	Referência
0,5ml	CLAE – fluorescência	- 1,0ml de Na <sub>2</sub> EDTA 0,1M-tampão McIlvaine (pH=4,0) - filtros "cutoff" peso molecular 30.000daltons	- Coluna Chromospher C8 (100x3,0mm) - Fase móvel: ác. Oxálico 0,01M : acetonitrila, pH 2,3 (60:40) -Fluxo: 1,0ml/min - Reação pós coluna com acetato de Magnésio em tampão pH=9,0 - λ excitação: 385nm - λ emissão: 500nm	- Média de recuperação superior a 80% para OTC, TC e CTC - Limite de detecção 50ppb	PENA et al, 1999
10ml	CLAE – fluorescência	- 10 ml tampão succinato de sódio -Fase sólida: resina metal quelato( Sepharose 6B Fast flow quelante)	-coluna PLRP-S (250x4,6mm), 5µm - Fase móvel: ác. Oxálico 0,01M : acetonitrila : metanol (60:15:10) - fluxo 1ml/min - Reação pós coluna com cloreto de zirconul octahidratado 5% (pH 2) - Padrão interno: demeclociclina - λ excitação: 406nm - λ emissão: 515nm	- Limite de detecção para OTC 1ng/ml, TC 2ng/ml e CTC 4ng/ml - Média de recuperação foram para OTC 76%, TC 70% e CTC 66%	CROUBELS et al, 1994 CROUBELS et al, 1995

OT: oxitetraciclina, TC: tetraciclina, CTC: clortetraciclina, DC: doxiciclina, λ: comprimento de onda, PLRP-S: polimérica, CLAE: cromatografia líquida de alta eficiência, UV: detector ultra-violeta

### 3. OBJETIVOS E PLANO DE TRABALHO

#### 3.1. Objetivos

Este trabalho teve por objetivos otimizar e validar um método analítico em cromatografia líquida de alta eficiência acoplada ao detector de arranjo de diodos (CLAE-DAD) para determinação de oxitetraciclina, tetraciclina, clortetraciclina e doxiciclina em leite e avaliar a presença desses antibióticos em amostra desse alimento.

#### 3.2. Plano de Trabalho

O plano de trabalho delineado para se atingir os objetivos propostos consta de:

- Revisão bibliográfica sobre os vários aspectos relacionados à exposição a resíduos de antibióticos através da alimentação, especialmente dos métodos analíticos propostos para determinação de oxitetraciclina, tetraciclina, clortetraciclina e doxiciclina em leite.
- Padronização e validação de um método por CLAE-DAD, através do estudo de sua linearidade, limite de detecção, limite de quantificação, recuperação, precisão, efeito da matriz, exatidão e estabilidade
- Avaliação da oxitetraciclina, tetraciclina, clortetraciclina e doxiciclina em amostras de leite

## 4. MATERIAL E MÉTODO

### 4.1. Casuística

As amostras de leite “in natura”, destinadas à determinação de oxitetraciclina, tetraciclina, clortetraciclina e doxiciclina, foram obtidas em um laticínio em Cambuí, cidade localizada no extremo Sul de Minas Gerais, na região da Serra da Mantiqueira, paralelo 22°36'40" latitude sul e meridiano 46°03'27" longitude oeste, correspondendo ao número 05 na Figura 3.



**Figura 3:** Localização da cidade Cambuí  
 Fonte: CityBrasil, 2001

As coletas das amostras de leite foram realizadas três vezes consecutivas, com um período entre elas de aproximadamente um mês. A primeira coleta ocorreu no dia 12 de agosto de 2001, a segunda, no dia 16 de setembro e a terceira, no dia 13 de outubro deste mesmo ano.

As amostras de leite “in natura” foram coletadas de todos os galões que o laticínio recebeu nestes dias. Cada galão tem capacidade para aproximadamente 60 litros de leite, portanto equivale a um número aproximado de cinco a seis ordenhas.

O seguinte procedimento de amostragem foi padronizado: de cada galão recebido pelo laticínio foi coletada uma amostra de aproximadamente 200 ml de leite e mantida refrigerada com gelo durante o transporte, sendo posteriormente armazenada em freezer a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

Foram coletadas amostras de leite de 63 galões no dia 12 de agosto. No dia 16 de setembro foram coletadas amostras de leite de 78 galões e na última coleta, amostras de 90 galões.

Este laticínio tem aproximadamente 100 fornecedores de leite, sendo que, cada um fornece aproximadamente 60 litros por dia, o equivalente ao recebimento de 180.000 litros de leite por mês. A produção consiste de queijo Minas padrão (18.000 quilos por mês), ricota (7.200 quilos por mês), além de parmesão e mussarela, porém, não comercializa leite fluído para consumo.

## **4.2. Material**

### **4.2.1 Reagentes**

- Metanol Omnisolv, grau de pureza cromatográfica – EM Science<sup>®</sup>
- Acetonitrila Omnisolv, grau de pureza cromatográfica – EM Science<sup>®</sup>
- Ácido oxálico BAKER Analyzed<sup>®</sup>, pureza 99,9%, solução a 0,01M
- Ácido tricloroacético MERCK<sup>®</sup>, pureza 99,5%, solução a 80% em acetonitrila
- Trietilamina para síntese MERCK – Schuchardt
- Padrão de oxitetraciclina, teor 92,1%, fornecido pela Pfizer
- Padrão de tetraciclina, teor 98,2%, fornecido pela UNIVET S.A. Indústria Veterinária
- Padrão de hidrocloreto de clortetraciclina, teor 79% (HPLC), Sigma - Aldrich

- Padrão de doxiciclina, teor 91,9%, fornecido por Interchange Comércio Exterior Ltda
- A água utilizada no preparo das soluções foi de grau reagente (resistividade > 16 megaOhm), Millipore® (Milli Q).

#### 4.2.2. Soluções – padrão e fase móvel

Foram preparadas, separadamente soluções-padrão estoque de 1mg/ml de oxitetraciclina, tetraciclina, clortetraciclina e doxiciclina, pela dissolução de 10mg de cada padrão em 10ml de metanol. Esta solução era preparada mensalmente e conservada a -20°C.

A solução-padrão de trabalho da mistura das quatro tetraciclinas na concentração de 10.000ng/ml foi preparada tomando-se 100ul de cada solução de tetraciclina de 1mg/ml e completando para um volume final de 10ml.

A fase móvel "A" foi preparada misturando 900ml de ácido oxálico 0,01M, 99ml de acetonitrila e 1ml de trietilamina (90:9,9:0,1), filtrada através de filtro Millipore 0,45µm e degaseificada sob pressão.

A fase móvel "B" constituída de 100% de acetonitrila, foi filtrada através de filtro Millipore 0,45µm e degaseificada sob pressão.

### 4.2.3. Equipamentos, acessórios e vidraria

- Cromatógrafo líquido Hewlett Packard<sup>®</sup>, modelo 1100, equipado com detector de arranjo de diodos, acoplado ao computador modelo Vectra XM, série 4-5/150, com *ChemStation* para integração e processamento dos cromatogramas,
- Coluna Nova-Pak Waters<sup>®</sup> RP 8, 60A°, 4µm (3,9 x 150 mm ).
- Balança analítica Sartorius research – modelo R200 D
- Agitador de tubos Fanem<sup>®</sup> - modelo 251
- Bomba de ar Fabbe Primar<sup>®</sup> – modelo 151/VC
- Ultra-som Thornton<sup>®</sup>
- Sistema de purificação de água Milli Q – Plus Millipore<sup>®</sup>
- Conjunto para filtração à vácuo contendo: funil, base e tampa tubulada em borossilicato e garra de alumínio anodizada – Millipore<sup>®</sup>
- Filtro Millipore<sup>®</sup>, membrana HV em PVDF 0,45µm, 47mm de diâmetro
- Centrífuga clínica Spin IV, INCIBRÁS<sup>®</sup>
- Seringa de vidro 5ml, Becton Dickinson<sup>®</sup>
- Unidade Filtrante HV Millex e polietileno com membrana durapore 0,45µm, 13mm
- Tubos de centrífuga;
- Pipetas automáticas Labsystems (volumes: 10-40µl; 40-200µl; 200-1000µl e 1000-5000µl)
- Balões volumétricos (10ml, 100ml, 500ml)
- Béqueres
- Frascos (vials) para amostras

### 4.3. Método

#### 4.3.1. Padronização da técnica de extração do método analítico

4.3.1.1. Na padronização da técnica de extração avaliou-se a recuperação das tetraciclinas adicionadas ao *pool* de leite, na concentração de 100ng/ml, usando extração em fase sólida (SPE) com coluna C<sub>18</sub>, segundo método modificado de Oka et al, 1985.

4.3.1.2. Na padronização da técnica de extração avaliou-se a recuperação das diferentes tetraciclinas adicionadas ao pool de leite, na concentração de 100ng/ml, usando extração SPE com coluna C8, segundo método modificado de Abete et al, 1997.

4.3.1.3. Na padronização da técnica de extração avaliou-se a recuperação das tetraciclinas adicionadas ao *pool* de leite, na concentração de 100ng/ml, usando extração líquido-líquido com solvente orgânico acetato de etila e tampão fosfato-sulfito 2M pH 6,1, segundo método modificado de Reewijk & Tjaden, 1986.

4.3.1.4. Na padronização da técnica de extração avaliou-se a recuperação das tetraciclinas adicionadas ao *pool* de leite, na concentração de 100ng/ml, usando extração líquido-líquido com solvente orgânico acetato de etila e tampão fosfato-sulfito 2M pH 3,0, segundo método modificado de Cooper et al, 1998.

4.3.1.5. Na padronização da técnica de extração avaliou-se a recuperação das tetraciclinas adicionadas ao *pool* de leite, na concentração de 100ng/ml, usando extração líquido-líquido com solvente orgânico acetato

de etila e tampão fosfato-sulfito 2M pH 4,0, segundo método modificado de Cooper et al, 1998.

#### **4.3.2. Otimização do método analítico para a determinação de oxitetraciclina, tetraciclina, clortetraciclina e doxiciclina**

Para a otimização do método analítico foi utilizado um *pool* de leite pasteurizado tipo A, B, C e leite UHT desnatado, semi-desnatado e integral de diversas marcas obtidos comercialmente. As amostras de leite foram homogeneizadas e enriquecidas, no momento do uso, com solução padrão de oxitetraciclina, tetraciclina, clortetraciclina e doxiciclina em diferentes concentrações, para o preparo da curva de calibração e estudo dos parâmetros de validação.

Após revisão da literatura, e avaliação dos resultados obtidos na padronização da técnica de extração, optou-se por extrair os analitos do leite segundo o método proposto por Furasawa, 1999 e identificá-los segundo Abete et al, 1997, introduzindo algumas modificações que visaram melhorar a análise.

##### **4.3.2.1 Otimização das condições cromatográficas**

Para a separação da oxitetraciclina, tetraciclina, clortetraciclina e doxiciclina nas amostras, foram estabelecidas as seguintes condições cromatográficas:

- Coluna Nova-Pak Waters<sup>®</sup> RP 8, 60A°, 4µm (3,9 x 150 mm ).
- Temperatura do termostato da coluna: 35° C
- Fluxo da fase móvel: 1ml/min
- Comprimento de onda: 363nm

- Tempo de corrida: 10 minutos
- Gradiente da Fase móvel: (Quadro 1)

Quadro 1: Gradiente da fase móvel usada na detecção das tetraciclinas

TEMPO (min.)	A (%)	B (%)	FLUXO
0	90	10	1ml/min
1	90	10	1ml/min
3	85	15	0,8ml/min
3,5	85	15	1ml/min
7	85	15	1ml/min
10	90	10	1ml/min

**A:** Ácido oxálico 0,01M : Acetonitrila: Trietilamina (90:9,9:0,1)

**B:** Acetonitrila

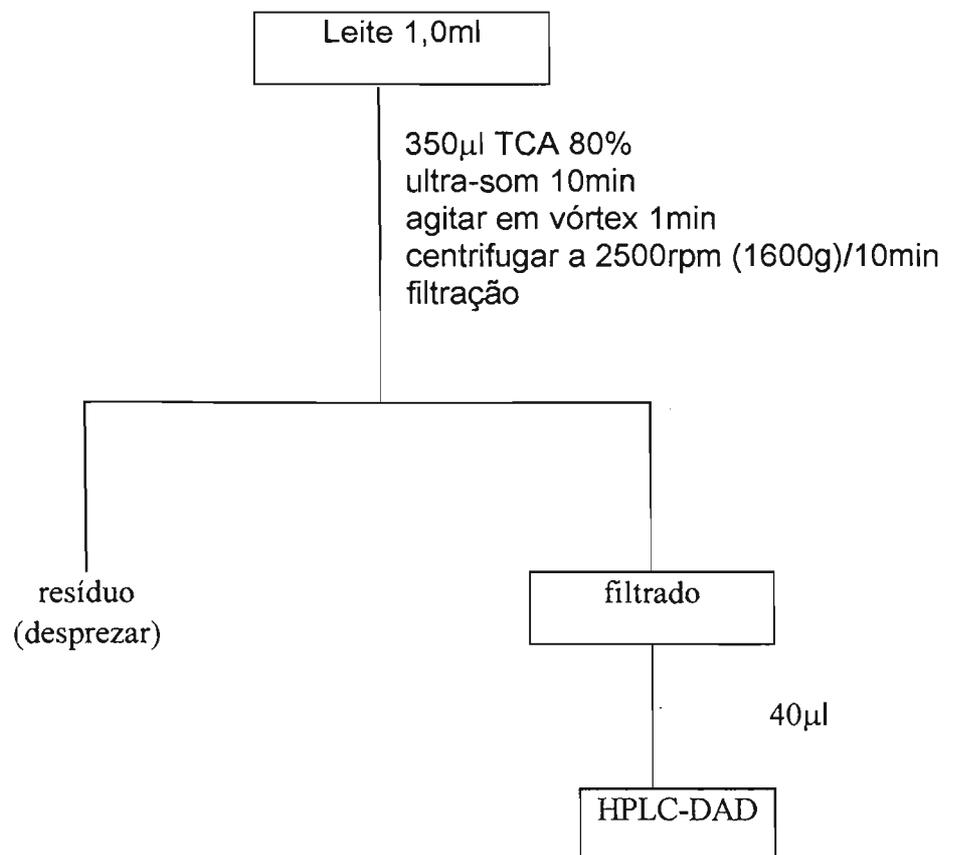
#### 4.3.3. Determinação das oxitetraciclina, tetraciclina, clortetraciclina e doxiciclina em leite

No cálculo das concentrações da oxitetraciclina, tetraciclina, clortetraciclina e doxiciclina foi realizado o seguinte procedimento analítico:

- Em tubo de centrifuga foi colocado 1ml da amostra de leite e adicionado 0,35ml de solução de ácido tricloroacético à 80% em acetonitrila;
- Ultra-som por 10 minutos;
- Agitação em vórtex por 1 minuto;
- Centrifugação a 2500rpm (1600g) por 10min;
- Filtração através de filtro com membrana durapore 0,45 $\mu$ m, 13mm;
- Injeção automática de 40 $\mu$ l do filtrado no cromatógrafo líquido de alta eficiência, segundo as condições especificadas em 4.3.2.1

As amostras foram quantificadas a partir de uma curva de calibração, obtida segundo item 4.3.4.5.

A Figura 4 mostra a marcha analítica para a extração da oxitetraciclina, tetraciclina, clortetraciclina e doxiciclina em leite



**Figura 4** – Marcha analítica da determinação da oxitetraciclina, tetraciclina, clortetraciclina e doxiciclina em leite

#### **4.3.4. Validação do método analítico para determinação de oxitetraciclina, tetraciclina, clortetraciclina e doxiciclina em leite**

A validação do método proposto consiste da avaliação dos parâmetros: limite de detecção, limite de quantificação, linearidade, recuperação, efeito da matriz, precisão inter e intra-dia, exatidão e estabilidade, descritos a seguir.

##### **4.3.4.1. Limite de Detecção**

O limite de detecção, definido como a concentração mínima que se diferencia do zero com determinada confiabilidade (CHASIN et al, 1998), ou seja, a mínima concentração de cada tetraciclina adicionada à amostra que apresentou um coeficiente de variação menor que 20%, foi obtido a partir de diluições sucessivas da amostra adicionada de 50ppb. As análises para cada concentração foram realizadas em 10 replicatas, segundo o procedimento descrito em 4.3.3.

##### **4.3.4.2. Limite de Quantificação**

O limite de quantificação do método, definido como a menor concentração que se pode medir com precisão adequada (CHASIN et al, 1998), e com coeficiente de variação menor ou igual a 10%, foi obtido por adição de cada tetraciclina ao leite, em concentrações inferiores a 50ppb. As análises para cada concentração foram realizadas em 10 replicatas, segundo o procedimento descrito em 4.3.3.

#### 4.3.4.3. Recuperação

A recuperação das oxitetraciclina, tetraciclina, clortetraciclina e doxiciclina nas amostras de leite, foi avaliada por comparação da concentração obtida, quando a amostra, contendo cada tetraciclina, é submetida ao processo de extração, em relação a concentração obtida quando a amostra, sem a presença de nenhuma das tetraciclina, é submetida ao processo de extração, onde no filtrado final obtido são adicionados os padrões de oxitetraciclina, tetraciclina, clortetraciclina e doxiciclina. As análises foram realizadas segundo o procedimento descrito em 4.3.3.

A porcentagem de recuperação dos analitos foi obtida aplicando-se a equação (CHASIN et al, 1998):

$$\text{Recuperação} = \frac{\text{Concentração amostra}}{\text{Conc. branco adicionado}} \times 100$$

#### 4.3.4.4. Estudo da Linearidade

Para definir o intervalo das concentrações nas quais a intensidade de resposta do detector é diretamente proporcional às concentrações de cada tetraciclina (CHASIN et al, 1998), ou seja, o estudo da faixa de linearidade do método, foi realizado através da adição às amostras de pool de leite, solução-padrão da oxitetraciclina, tetraciclina, clortetraciclina e doxiciclina, para se obter as seguintes concentrações: 50; 100; 200; 400; 800; 1600 ng/ml. Estas amostras e amostra branco de leite foram analisadas em sextuplicata, segundo o procedimento descrito em 4.3.3.

#### 4.3.4.5. Curva de calibração

Para o preparo da curva de calibração foram adicionadas às amostras de *pool* de leite, solução-padrão da oxitetraciclina, tetraciclina, clortetraciclina e doxiciclina, para se obter as seguintes concentrações: 50, 150, 450, 1500ng/ml. Tais amostras, assim como um branco de leite, foram submetidas ao procedimento descrito 4.3.3 e analisadas em triplicata. A partir dos resultados dessas análises, a regressão linear foi obtida, usando-se então, a equação da reta para o cálculo de oxitetraciclina, tetraciclina, clortetraciclina e doxiciclina nas amostras. Esse processo foi realizado para obtenção da curva de calibração em cada lote de amostras (CHASIN et al, 1998).

#### 4.3.4.6. Precisão do método analítico

A precisão do método é o parâmetro que avalia a proximidade entre várias medidas efetuadas em uma mesma amostra. A medida de precisão pode ser expressa através do cálculo do desvio padrão e do coeficiente de variação, obtidos em condições determinadas de repetibilidade e/ ou reprodutibilidade (CHASIN et al,1998). Para avaliar a precisão, amostras de leite enriquecidas com três concentrações diferentes: 50, 400, 1200ppb de oxitetraciclina, tetraciclina, clortetraciclina e doxiciclina foram preparadas e em seguida analisadas em sextuplicata para cada concentração, segundo o procedimento descrito em 4.3.3, em um dia para o estabelecimento da precisão intra-dia, e em três dias consecutivos, para a precisão interdias.

#### 4.3.4.7. Exatidão

A exatidão é a diferença entre o valor real presente na amostra e o valor obtido na análise (CHASIN et al,1998). Para o estudo da exatidão,

amostras de leite enriquecidas com três concentrações diferentes: 100, 400, 1200ppb de oxitetraciclina, tetraciclina, clortetraciclina e doxiciclina foram preparadas e em seguida analisadas em sextuplicata para cada concentração, segundo o procedimento descrito em 4.3.3. A exatidão é avaliada através da inexatidão ou tendenciosidade (bias) e pode ser representada pela equação:

$$\text{Inexatidão (\%)} = \frac{\text{concentr. Obtida} - \text{concentr. Esperada} \times 100}{\text{concentração esperada}}$$

#### 4.3.4.8. Efeito da matriz

Amostras de água enriquecidas com oxitetraciclina, tetraciclina, clortetraciclina e doxiciclina nas concentrações : 50; 100; 200; 400; 800; 1600 ng/ml e o branco foram analisadas em sextuplicata, segundo o procedimento descrito em 4.3.3. Os dados deste estudo foram comparados com os dados do estudo da linearidade, a fim de avaliar a interferência da matriz biológica na análise dentro das condições otimizadas.

#### 4.3.4.9. Estabilidade do analito na amostra

As amostras do *pool* de leite enriquecidas com duas concentrações diferentes: 100 e 400ppb de oxitetraciclina, tetraciclina, clortetraciclina e doxiciclina foram preparadas e armazenadas em alíquotas, até serem analisadas segundo o procedimento descrito em 4.3.3. Foi avaliada a estabilidade em *freezer* (-20°C) no período de 62 dias, através da comparação da concentração obtida no tempo zero e após este período de armazenamento (CHASIN et al, 1994)

**4.3.5. Determinação das oxitetraciclina, tetraciclina, clortetraciclina e doxiciclina em amostras de leite coletadas em um laticínio.**

As amostras de leite foram analisadas segundo o procedimento descrito em 4.3.3, para a determinação de oxitetraciclina, tetraciclina, clortetraciclina e doxiciclina. A concentração foi expressa em ng/ml

## 5. RESULTADOS

### 5.1. Padronização da técnica de extração do método analítico

5.1.1. Os resultados da recuperação das tetraciclinas em leite, obtidos utilizando-se a extração em coluna C<sub>18</sub>, estão representados na Tabela 6.

**Tabela 6:** Recuperação das tetraciclinas adicionadas ao *pool* de leite, na concentração de 100ng/ml, usando a extração SPE com coluna C<sub>18</sub>.

	Recuperação (%) *	DP (%)	CV (%)
Oxitetraciclina	71,4	2,3	3,2
Tetraciclina	71,9	5,9	8,3
Clortetraciclina	46,9	4,2	9,1
Doxiciclina	57,1	2,0	3,5

\* Média dos valores das análises em triplicata

DP: desvio padrão

CV: coeficiente de variação

5.1.2. Os resultados da recuperação das tetraciclinas em leite, obtidos utilizando-se a extração em coluna C<sub>8</sub>, estão representados na Tabela 7.

**Tabela 7:** Recuperação das diferentes tetraciclinas adicionadas ao *pool* de leite, na concentração de 100ng/ml, usando a extração SPE com coluna C<sub>8</sub>.

	Recuperação (%) *	DP (%)	CV (%)
Oxitetraciclina	75,2	0,3	0,4
Tetraciclina	58,9	0,9	1,6
Clortetraciclina	46,6	1,8	3,9
Doxiciclina	62,6	1,7	2,7

\* Média dos valores das análises em triplicata

**5.1.3.** Os resultados da recuperação das tetraciclinas em leite, obtidos utilizando-se a extração líquido-líquido com solvente orgânico acetato de etila e tampão fosfato-sulfito 2M pH 6,1, estão representados na Tabela 8.

**Tabela 8:** Recuperação das tetraciclinas adicionadas ao *pool* de leite, na concentração de 100ng/ml, usando a extração líquido-líquido e tampão fosfato-sulfito 2M pH 6,1.

	Recuperação (%) *	DP (%)	CV (%)
Oxitetraciclina	60,6	4,7	7,8
Tetraciclina	62,7	4,8	7,6
Clortetraciclina	36,1	8,9	24,8
Doxiciclina	37,1	9,2	24,8

\* Média dos valores das análises em triplicata

**5.1.4.** Os resultados da recuperação das tetraciclinas em leite, obtidos utilizando-se a extração líquido-líquido com solvente orgânico acetato de etila e tampão fosfato-sulfito 2M pH 3,0 estão representados na Tabela 9.

**Tabela 9:** Recuperação das tetraciclinas adicionadas ao *pool* de leite, na concentração de 100ng/ml, usando a extração líquido-líquido e tampão fosfato-sulfito 2M pH 3,0.

	Recuperação (%) *	DP (%)	CV (%)
Oxitetraciclina	54,9	1,7	3,2
Tetraciclina	56,2	0,1	0,2
Clortetraciclina	34,0	1,9	5,7
Doxiciclina	52,0	17,0	32,6

\* Média dos valores das análises em triplicata

**5.1.5.** Os resultados da recuperação das tetraciclinas em leite, obtidos utilizando-se a extração líquido-líquido com solvente orgânico acetato de etila e tampão fosfato-sulfito 2M pH 4,0, estão representados na Tabela 10.

**Tabela 10:** Recuperação das tetraciclinas adicionadas ao *pool* de leite, na concentração de 100ng/ml, usando a extração líquido-líquido e tampão fosfato-sulfito 2M pH 4,0.

	Recuperação (%) *	DP (%)	CV (%)
Oxitetraciclina	81,0	0,4	0,5
Tetraciclina	61,6	11,4	18,4
Clortetraciclina	40,0	9,2	23,1
Doxiciclina	39,8	13,5	33,8

\* Média dos valores das análises em triplicata

## 5.2. Otimização das condições cromatográficas

O perfil da separação cromatográfica da oxitetraciclina, tetraciclina, clortetraciclina e doxiciclina obtido da análise do *pool* de leite adicionados encontra-se ilustrado na Figura 5.

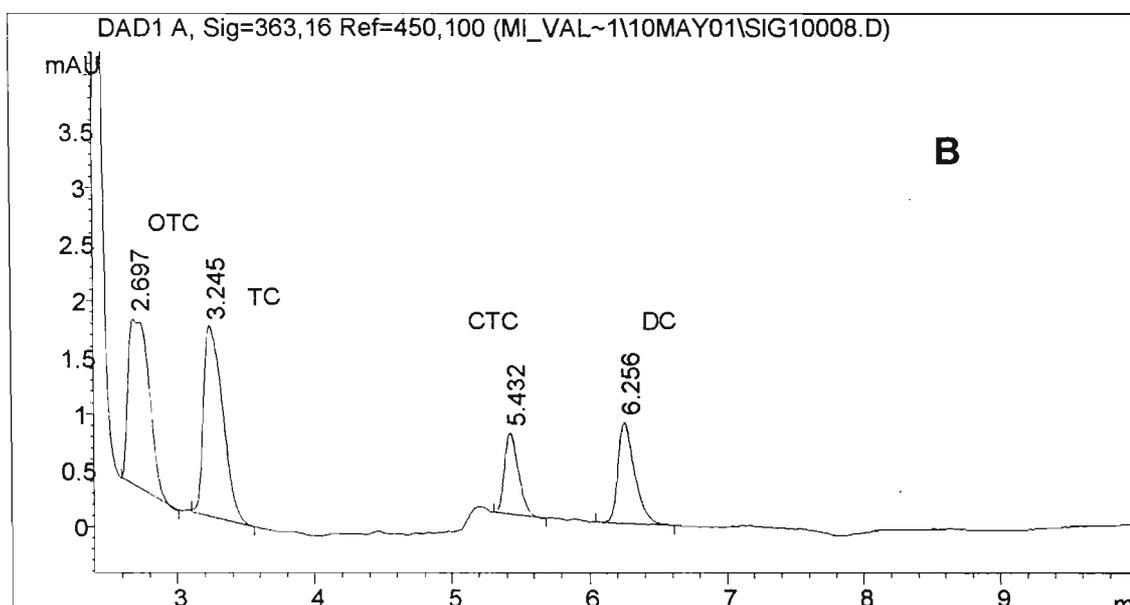
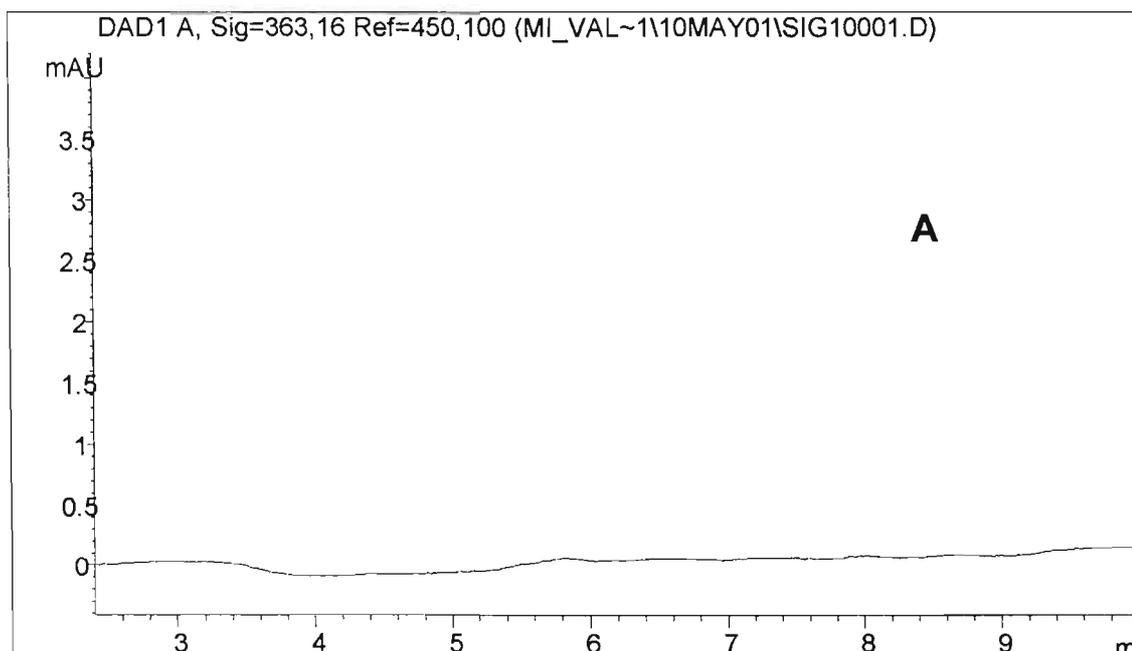


Figura 5: Perfil cromatográfico da oxitetraciclina (OTC), tetraciclina (TC), clortetraciclina (CTC) e doxiciclina (DC) em leite.  
 Cromatogramas: (A): branco e (B): padrão (400ng/ml)

### 5.3. Resultados dos parâmetros da validação do método analítico para determinação das oxitetraciclina, tetraciclina, clortetraciclina e doxiciclina em leite

#### 5.3.1. Limite de detecção

Os limites de detecção do método para as oxitetraciclina, tetraciclina, clortetraciclina e doxiciclina em leite estão apresentados na Tabela 11.

**Tabela 11:** Resultados dos limites de detecção do método para a determinação das oxitetraciclina, tetraciclina, clortetraciclina e doxiciclina em leite.

	<b>Limite de Detecção*</b>	<b>Coefficiente de variação (CV)</b>
oxitetraciclina	37,5ng/ml	10,5%
tetraciclina	37,5ng/ml	18,3%
clortetraciclina	37,5ng/ml	11,3%
doxiciclina	37,5ng/ml	18,0%

\* Média dos valores das análises em 10 replicatas

#### 5.3.2. Limite de quantificação

Os limites de quantificação do método para a determinação das oxitetraciclina, tetraciclina, clortetraciclina e doxiciclina em leite estão apresentados na Tabela 12.

**Tabela 12:** Resultados dos limites de quantificação do método para a determinação das oxitetraciclina, tetraciclina, clortetraciclina e doxiciclina em leite.

	Limite de Quantificação*	Coefficiente de variação (CV)
oxitetraciclina	50ng/ml	3,8%
tetraciclina	50ng/ml	2,9%
clortetraciclina	50ng/ml	3,8%
doxiciclina	50ng/ml	4,2%

\* Média dos valores das análises em 10 replicatas

### 5.3.3. Recuperação

Os valores do estudo da recuperação para a oxitetraciclina, tetraciclina, clortetraciclina e doxiciclina em leite estão apresentados, respectivamente, nas Tabelas 13, 14, 15, 16.

**Tabela 13:** Recuperação da oxitetraciclina adicionada ao *pool* de leite, nas concentrações de 50; 400; 1200ng/ml.

Concentração de oxitetraciclina em leite (ng/ml)	Recuperação*	DP (%)	CV (%)
50	81,5	6,2	7,6
400	77,8	0,9	1,2
1200	89,6	0,1	0,1

\* Média dos valores das análises em sextuplicata

**Tabela 14:** Recuperação da tetraciclina adicionada ao *pool* de leite, nas concentrações de 50; 400; 1200ng /ml.

Concentração de tetraciclina em leite (ng/ml)	Recuperação*	DP (%)	CV (%)
50	80,9	2,4	3,0
400	79,4	6,7	8,4
1200	86,6	1,1	1,3

\* Média dos valores das análises em sextuplicata

**Tabela 15:** Recuperação da clortetraciclina adicionada ao *pool* de leite, nas concentrações de 50; 400; 1200ng /ml.

Concentração de clortetraciclina em leite (ng/ml)	Recuperação*	DP (%)	CV (%)
50	84,4	5,8	6,8
400	87,1	5,3	6,1
1200	73,6	1,3	1,8

\* Média dos valores das análises em sextuplicata

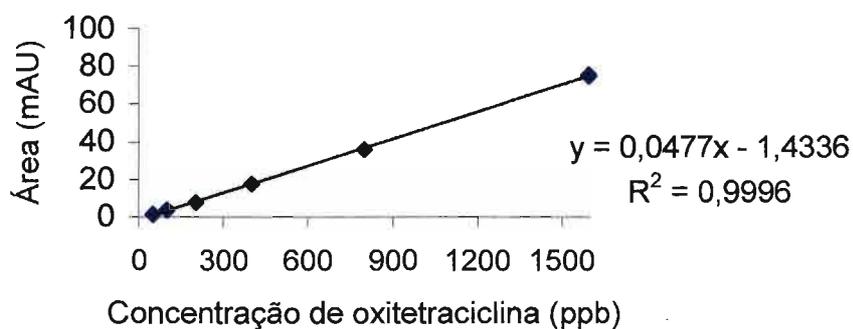
**Tabela 16:** Recuperação da doxiciclina adicionada ao *pool* de leite, nas concentrações de 50; 400; 1200ng /ml.

Concentração de doxiciclina em leite (ng/ml)	Recuperação*	DP (%)	CV (%)
50	72,3	3,7	5,1
400	66,6	1,4	2,1
1200	77,3	0,9	1,2

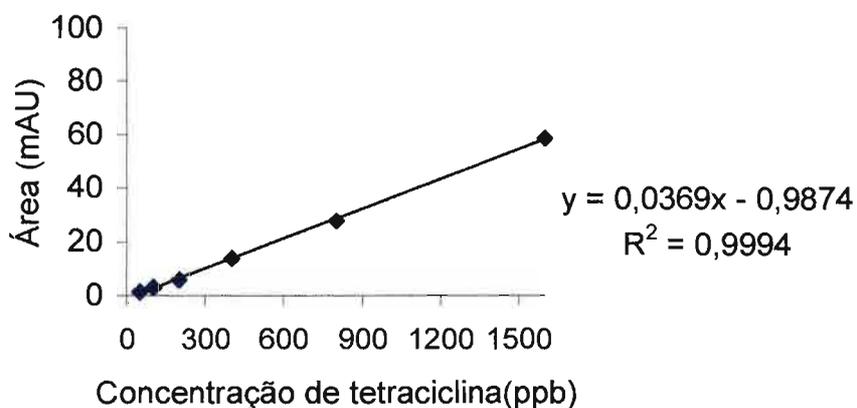
\* Média dos valores das análises em sextuplicata

### 5.3.4. Linearidade

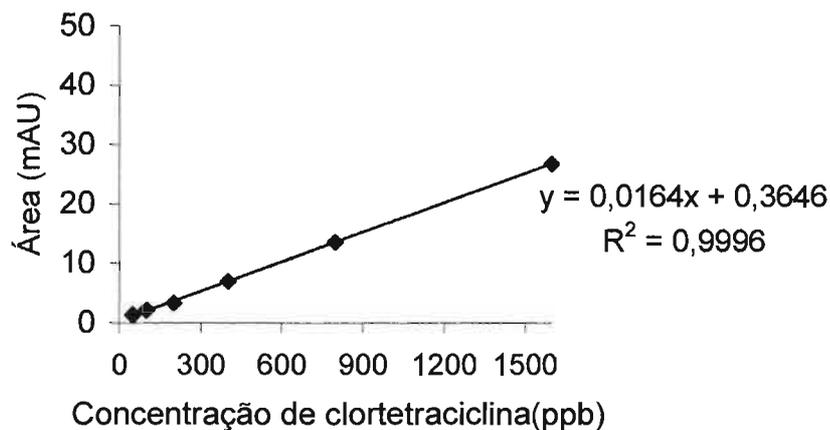
Nas Figuras 6, 7, 8, 9, estão representadas as curvas de linearidade, respectivamente, das oxitetraciclina, tetraciclina, clortetraciclina, doxiciclina em leite, nas concentrações de 50; 100; 200; 400; 800; 1600 ng/ml. Cada ponto corresponde a média dos valores encontrados na análise em sextuplicata.



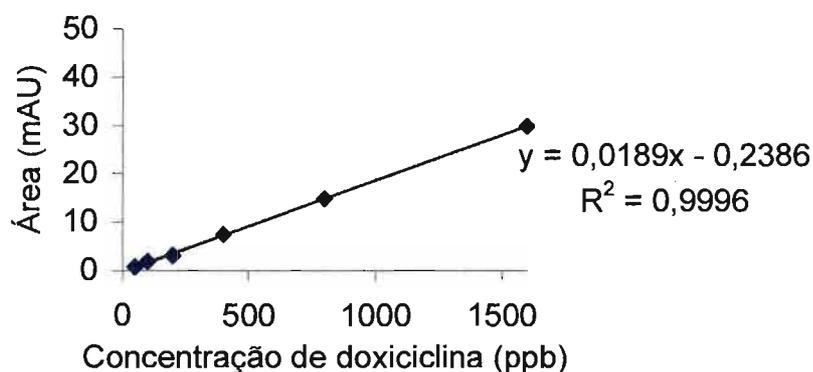
**Figura 6:** Curva de linearidade da oxitetraciclina em leite



**Figura 7:** Curva de linearidade da tetraciclina em leite



**Figura 8:** Curva de linearidade da clortetraciclina em leite



**Figura 9:** Curva de linearidade de doxiciclina em leite

### 5.3.5. Precisão

Os coeficientes de variação e desvio padrão obtidos no estudo da precisão intra-dia e interdias para as amostras de leite adicionadas de oxitetraciclina, tetraciclina, clortetraciclina e doxiciclina nas concentrações de 100, 400 e 1200ng/ml estão apresentados nas Tabelas 17, 18, 19 e 20, respectivamente.

**Tabela 17:** Precisão do método analítico para determinação de oxitetraciclina em leite, expressa pelo coeficiente de variação e desvio padrão

Concentração de oxitetraciclina em leite (ng/ml)	Precisão intra-dia*		Precisão inter-dias (3 dias) *	
	CV (%)	DP	CV (%)	DP
100	7,30	0,23	6,57	5,43
400	0,17	0,03	4,14	15,05
1200	0,55	0,27	6,28	7,07

\* Média dos valores das análises em sextuplicata

**Tabela 18:** Precisão do método analítico para determinação de tetraciclina em leite, expressa pelo coeficiente de variação e desvio padrão.

Concentração de tetraciclina em leite (ng/ml)	Precisão intra-dia*		Precisão inter-dias (3 dias) *	
	CV (%)	DP	CV (%)	DP
100	2,86	0,12	6,92	7,29
400	0,38	0,07	7,55	3,31
1200	0,63	0,35	9,96	13,38

\* Média dos valores das análises em sextuplicata

**Tabela 19:** Precisão do método analítico para determinação de clortetraciclina em leite, expressa pelo coeficiente de variação e desvio padrão.

Concentração de clortetraciclina em leite (ng/ml)	Precisão intra-dia*		Precisão inter-dias (3 dias) *	
	CV (%)	DP	CV (%)	DP
100	4,22	0,09	10,59	39,04
400	1,28	0,08	1,92	23,67
1200	0,55	0,12	10,70	16,80

\* Média dos valores das análises em sextuplicata

**Tabela 20:** Precisão do método analítico para determinação de doxiciclina em leite, expressa pelo coeficiente de variação e desvio padrão.

Concentração de doxiciclina em leite (ng/ml)	Precisão intra-dia*		Precisão inter-dias (3 dias) *	
	CV (%)	DP	CV (%)	DP
100	3,34	0,07	8,65	7,75
400	2,15	0,17	5,33	21,33
1200	0,66	0,18	10,24	13,31

\* Média dos valores das análises em sextuplicata

### 5.3.6. Exatidão

A exatidão do método, sendo representada pela tendenciosidade, ou seja, a inexatidão (CHASIN et al, 1998), verificou-se através da análise em sextuplicata das amostras de leite adicionadas de oxitetraciclina, tetraciclina, clortetraciclina e doxiciclina nas concentrações de 100, 400 e 1200ng/ml e os valores obtidos estão apresentados nas Tabelas 21, 22, 23 e 24, respectivamente

**Tabela 21:** Inexatidão do método analítico para determinação de oxitetraciclina em leite.

<b>Concentração de oxitetraciclina em leite (ng/ml)</b>	<b>Inexatidão (%)*</b>
100	-15,23
400	-6,88
1200	0,51

\* Média dos valores das análises em sextuplicata

**Tabela 22:** Inexatidão do método analítico para determinação de tetraciclina em leite.

<b>Concentração de tetraciclina em leite (ng/ml)</b>	<b>Inexatidão (%)*</b>
100	0,63
400	9,81
1200	6,55

\* Média dos valores das análises em sextuplicata

**Tabela 23:** Inexatidão do método analítico para determinação de clortetraciclina em leite.

Concentração de clortetraciclina em leite (ng/ml)	Inexatidão (%)*
100	15,95
400	-10,32
1200	9,56

\* Média dos valores das análises em sextuplicata

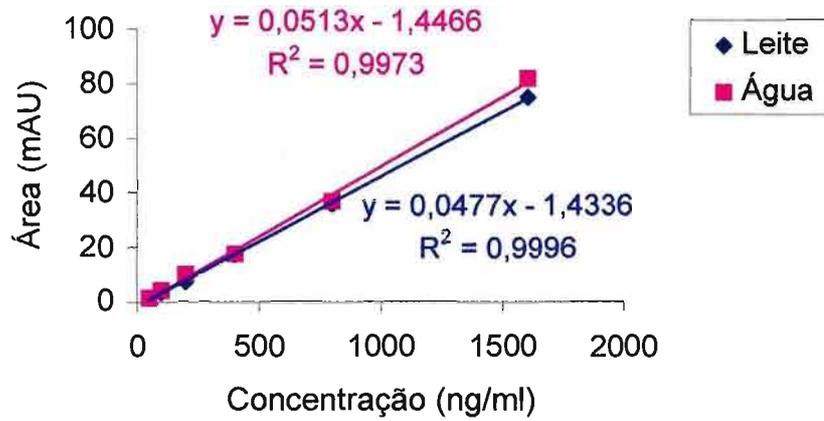
**Tabela 24:** Inexatidão do método analítico para determinação de doxiciclina em leite.

Concentração de doxiciclina em leite (ng/ml)	Inexatidão (%)*
100	-15,88
400	-5,86
1200	0,46

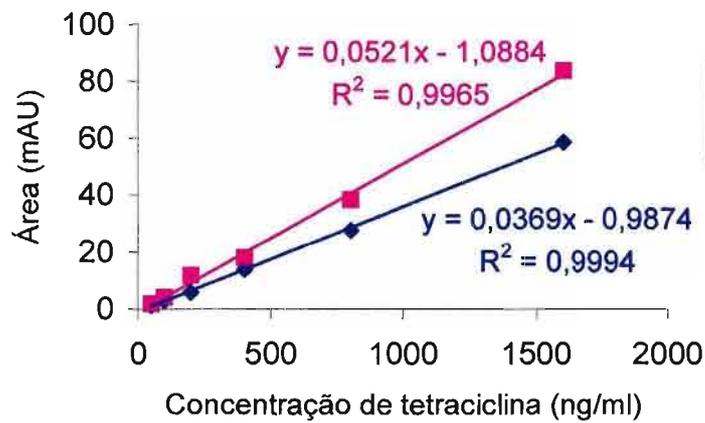
\* Média dos valores das análises em sextuplicata

### 5.3.7. Efeito da matriz

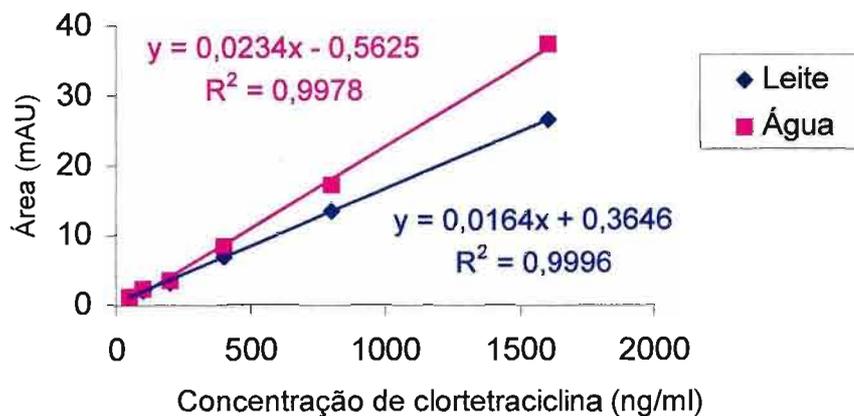
As Figuras 10, 11, 12, 13 ilustram as curvas obtidas, respectivamente, de adicionados de oxitetraciclina, tetraciclina, clortetraciclina, doxiciclina em água e leite, nas concentrações de 50; 100; 200; 400; 800; 1600 ng/ml. Cada ponto corresponde a média dos valores encontrados na análise realizadas em sextuplicata.



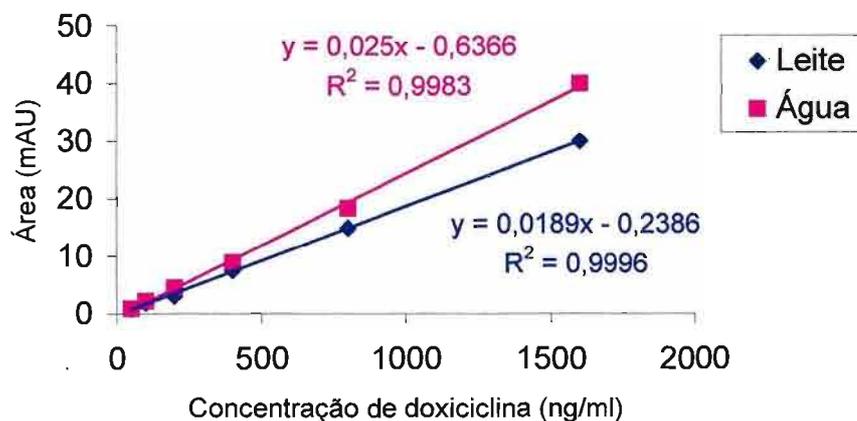
**Figura 10:** Resultado da interferência das matrizes água e leite na análise de oxitetraciclina



**Figura 11:** Resultado da interferência das matrizes água e leite, na análise de tetraciclina



**Figura 12:** Resultado da interferência das matrizes água e leite na análise de clortetraciclina



**Figura 13:** Resultado da interferência das matrizes água e leite, na análise de doxiciclina

### 5.3.8. Estabilidade

Os resultados do estudo da estabilidade da oxitetraciclina, tetraciclina, clortetraciclina, doxiciclina em leite, nas concentrações de 100 e 400ng/ml, são apresentados nas Tabelas 25, 26, 27 e 28, respectivamente, referem-se a estabilidade das amostras mantidas em freezer por 62 dias. A concentrações obtidas se referem a média da determinação das tetraciclinas realizadas em sextuplicata.

**Tabela 25:** Análise da estabilidade da oxitetraciclina em leite, nas concentrações de 100 e 400 ng/ml conservadas em freezer (-20°C).

Concentração esperada (ng/ml)	Concentração obtida no tempo zero (ng/ml) *	Concentração obtida após 62 dias (ng/ml) *	CV (% em relação ao tempo zero)
100	84,77	108,22	17,2
400	372,48	395,42	4,22

\* Média dos valores das análises em sextuplicata

**Tabela 26:** Análise da estabilidade da tetraciclina em leite, nas concentrações de 100 e 400 ng/ml conservadas em freezer (-20°C).

Concentração esperada (ng/ml)	Concentração obtida no tempo zero (ng/ml) *	Concentração obtida após 62 dias (ng/ml) *	CV (% em relação ao tempo zero)
100	113,78	119,74	3,61
400	472,12	446,23	3,99

\* Média dos valores das análises em sextuplicata

**Tabela 27:** Análise da estabilidade da clortetraciclina em leite, nas concentrações de 100 e 400 ng/ml conservadas em freezer (-20°C).

<b>Concentração Esperada (ng/ml)</b>	<b>Concentração Obtida no tempo zero (ng/ml) *</b>	<b>Concentração Obtida após 62 dias (ng/ml) *</b>	<b>CV (% em relação ao tempo zero)</b>
100	144,33	124,16	10,62
400	437,33	438,89	0,25

\* Média dos valores das análises em sextuplicata

**Tabela 28:** Análise da estabilidade da doxiciclina em leite, nas concentrações de 100 e 400 ng/ml conservadas em freezer (-20°C).

<b>Concentração esperada (ng/ml)</b>	<b>Concentração obtida no tempo zero (ng/ml) *</b>	<b>Concentração obtida após 62 dias (ng/ml) *</b>	<b>CV (% em relação ao tempo zero)</b>
100	104,31	119,61	9,66
400	418,43	457,81	6,36

\* Média dos valores das análises em sextuplicata

#### 5.4. Determinação de oxitetraciclina, tetraciclina, clortetraciclina e doxiciclina em amostras de leite coletadas em um laticínio.

As amostras de leite foram analisadas segundo o procedimento descrito em 4.3.3, para a determinação de oxitetraciclina, tetraciclina, clortetraciclina e doxiciclina. A concentração foi expressa em ng/ml.

As Tabelas 29 e 30 apresentam os resultados da determinação de oxitetraciclina, tetraciclina, clortetraciclina e doxiciclina em amostras de leite coletadas no dia 12 de agosto de 2001. Os resultados estão expressos em ng/ml.

As Tabelas 31 e 32 apresentam os resultados da determinação de oxitetraciclina, tetraciclina, clortetraciclina e doxiciclina em amostras de leite coletadas no dia 16 de setembro de 2001. Os resultados estão expressos em ng/ml.

As Tabelas 33 e 34 apresentam os resultados da determinação de oxitetraciclina, tetraciclina, clortetraciclina e doxiciclina em amostras de leite coletadas no dia 13 de outubro de 2001. Os resultados estão expressos em ng/ml.

**Tabela 29:** Resultados de oxitetraciclina, tetraciclina, clortetraciclina e doxiciclina em amostras de leite da primeira coleta realizada no dia 12 de agosto de 2001.

Número de amostras	
Total	63
Negativas	51
Positivas para oxitetraciclina	12
Positivas para tetraciclina	0
Positivas para clortetraciclina	0
Positivas para doxiciclina	0

**Tabela 30:** Concentrações de oxitetraciclina determinadas nas amostras de leite positivas da primeira coleta realizada no dia 12 de agosto de 2001.

<b>Amostra</b>	<b>Concentração de oxitetraciclina (ng/ml)</b>	<b>Acima do LQ, abaixo do LMR</b>	<b>Acima do LQ, e do LMR</b>
A08	242,86		X
A19	58,47	X	
A20	97,32	X	
A27	88,08	X	
A30	58,20	X	
A31	59,72	X	
A32	196,35		X
A37	1639,24		X
A38	134,60		X
A42	55,83	X	
A77	442,85		X
A81	211,71		X

**Tabela 31:** Resultados de oxitetraciclina, tetraciclina, clortetraciclina e doxiciclina em amostras de leite da segunda coleta realizada no dia 16 de setembro de 2001.

<b>Número de amostras</b>	
Total	78
Negativas	69
Positivas para oxitetraciclina	9
Positivas para tetraciclina	0
Positivas para clortetraciclina	0
Positivas para doxiciclina	0

**Tabela 32:** Concentrações de oxitetraciclina determinadas nas amostras de leite positivas da segunda coleta realizada no dia 16 de setembro de 2001.

Amostra	Concentração de oxitetraciclina (ng/ml)	Acima do LD, abaixo do LQ	Acima do LQ, abaixo do LMR	Acima do LQ, e do LMR
B44	42,23	X		
B46	150,96			X
B48	109,27			X
B92	234,44			X
B100	117,49			X
B126	79,81		X	
B127	64,39		X	
B128	83,00		X	
B130	149,56			X

**Tabela 33:** Resultados de oxitetraciclina, tetraciclina, clortetraciclina e doxiciclina em amostras de leite da terceira coleta realizada no dia 13 de outubro de 2001.

Número de amostras	
Total	90
Negativas	79
Positivas para oxitetraciclina	11
Positivas para tetraciclina	0
Positivas para clortetraciclina	0
Positivas para doxiciclina	0

**Tabela 34:** Concentrações de oxitetraciclina determinadas nas amostras de leite positivas da terceira coleta realizada no dia 13 de outubro de 2001.

Amostra	Concentração de oxitetraciclina (ng/ml)	Acima do LD, abaixo do LQ	Acima do LQ, abaixo do LMR	Acima do LQ, e do LMR
C04	51,02		X	
C05	37,76	X		
C34	43,73	X		
C56	191,83			X
C62	62,54		X	
C65	105,44			X
C66	200,22			X
C70	61,99		X	
C75	63,03		X	
C79	254,26			X
C83	196,02			X

## 6. DISCUSSÃO

A revisão bibliográfica dos métodos analíticos propostos para determinação das tetraciclinas em leite indicou a cromatografia líquida de alta eficiência com detector UV (CLAE-UV) como a técnica mais comumente utilizada. Portanto, este trabalho primeiramente objetivou a otimização de um método por CLAE acoplada ao detector de arranjo de diodos para determinação de oxitetraciclina, tetraciclina, clortetraciclina e doxiciclina em leite e, posteriormente, a validação deste método otimizado.

Para a escolha da coluna cromatográfica, observou-se na literatura que as colunas cromatográficas normalmente utilizadas na separação das tetraciclinas são as de sílica de fase reversa C<sub>8</sub> ou C<sub>18</sub>. Num estudo prévio, realizado pelos autores do presente trabalho, foram avaliados a eficiência das colunas RP 18 e RP 8 de diferentes comprimentos e diâmetro interno, sendo selecionada a Nova-Pak Waters® RP 8, 60A°, 4 µm (3,9 x 150 mm) por apresentar boa separação entre os picos das tetraciclinas e dos componentes endógenos do leite.

Na maioria dos métodos analíticos utilizados na determinação de tetraciclinas por CLAE-UV, o ácido oxálico faz parte da fase móvel, para evitar a fraca resolução dos picos cromatográficos das tetraciclinas, devido à adsorção destas aos grupos silanois livres presentes na superfície do material de preenchimento da coluna de sílica de fase reversa. Foram testadas diversas composições e fluxos das fases móveis, baseadas no trabalho de ABETE et al, 1997, que analisaram sete diferentes tetraciclinas e no trabalho de PENA et al, 1999, que analisaram três diferentes tetraciclinas simultaneamente, sendo que a fase móvel finalmente escolhida permitiu uma eficiente separação das oxitetraciclina, tetraciclina, clortetraciclina e doxiciclina, bem como dos constituintes do leite.

Para detecção das tetraciclinas, é comumente utilizado o detector UV, pois estas apresentam forte absorvância em torno de 270 e 360nm em soluções ácidas e neutras. Alguns trabalhos preconizam o uso do detector de fluorescência, porém as tetraciclinas somente apresentam forte fluorescência quando ligadas aos íons metálicos ou em condições básicas, exigindo uma etapa de derivação pós-coluna com íons metálicos em pH alcalino, que requer equipamento próprio para esta finalidade. Alguns trabalhos utilizam detector de espectrometria de massa, porém nestas condições, as fases móveis normalmente utilizadas na cromatografia líquida são indesejáveis, pois contêm compostos não voláteis, como já comentado anteriormente. Devido aos problemas e limitações no uso dos detectores de fluorescência e de espectrometria de massa, decidiu-se pela utilização do detector de arranjo de diodos (DAD), disponível em nosso laboratório e que permite a detecção em diferentes comprimentos de onda. A escolha do comprimento de onda baseou-se no trabalho de ABETE et al, (1997), embora não existam diferenças significativas nas absorvâncias obtidas entre os comprimentos de onda 350nm a 370nm, como pudemos observar através dos resultados obtidos no DAD.

Para a escolha da técnica mais adequada de extração das tetraciclinas, foram realizados estudos de algumas das diversas técnicas propostas na literatura atual. Inicialmente, avaliou-se a extração em fase sólida (SPE), utilizando colunas C<sub>8</sub> e C<sub>18</sub> segundo os trabalhos OKA et al, (1985), OKA et al, (1994), ABETE et al, (1997), e os resultados de recuperação obtidos com coluna C<sub>18</sub> (Tabela 6) e com coluna C<sub>8</sub> (Tabela 7) não foram satisfatórios para justificar o uso de um material de elevado custo, além da técnica mostrar-se mais laboriosa e apresentar baixa reprodutibilidade, como mencionado em alguns trabalhos de OKA et al, 2000, FEDENIUK & SHAND, 1998, CROUBELS et al, 1997.

A extração líquido-líquido com solvente orgânico foi avaliada, baseando-se no trabalho de REEWIJK & TJADEN, 1986, que utilizou tampão fosfato-sulfito 2M pH 6,1 e extração com acetato de etila. As recuperações obtidas, adicionando-se este mesmo tampão às amostras de leite, não foram satisfatórias (Tabela 8), por isso, foram feitas novas extrações, apenas modificando-se o pH deste tampão na tentativa de melhorar a recuperação: pH 3 (Tabela 9), pH 4 (Tabela 10), sendo os resultados obtidos não satisfatórios e pH 9, onde não houve recuperação das tetraciclinas. Procurou-se, assim, outras alternativas para melhorar a recuperação utilizando-se outros tampões: tampão citrato 1M, pH 4 e tampão fosfato 1M pH 6, e mantendo a extração com acetato de etila, mas os valores de recuperação obtidos com esses tampões mostraram-se inferiores aqueles obtidos com tampão fosfato-sulfito. As baixas recuperações das tetraciclinas obtidas na extração líquido-líquido podem ser explicadas por suas estruturas químicas apresentarem valores de pKa igual a 3,3, 7,5 e 9,4 devido a presença de grupos hidroxila e dimetilamino.

Alguns trabalhos utilizam agentes desproteinizantes acídicos para extrair as tetraciclinas de amostras biológicas. Esta foi a técnica de escolha devido à obtenção de valores de recuperações satisfatórios, sendo realizada com algumas modificações, à partir do método proposto por Furusawa, 1999, que utilizou como agente desproteinizante a solução de ácido tricloroacético (TCA) a 20% para extração da oxitetraciclina. Esta técnica apresenta a vantagem de fácil e rápida realização, pois o princípio de extração baseia-se em uma desproteinação da amostra, seguida de centrifugação e a injeção do sobrenadante filtrado no sistema cromatográfico.

Com as condições cromatográficas e analíticas estabelecidas, ou seja, a otimização do método concluída, foram avaliados os parâmetros do processo de validação, para assegurar a confiança dos resultados analíticos,

visando minimizar eventuais erros. Os dados relativos à linearidade demonstram que há correlação entre as concentrações das tetraciclinas na faixa de 50 a 1600 ng/ml e as respectivas áreas. Os coeficientes de determinação de 0,9996; 0,9994; 0,9996 e 0,9996 encontrados para oxitetraciclina, tetraciclina, clortetraciclina e doxiciclina, respectivamente, permitem considerar que o método gera resultados proporcionais à concentração das substâncias em análise, dentro de uma faixa específica, sendo possível relacionar a medida dependente da concentração (CHASIN et al, 1998). A faixa de linearidade estudada incluiu o valor de LMR de tetraciclinas em leite estabelecido pelo Comitê Conjunto FAO/OMS para Aditivos Alimentares em Alimentos (JECFA), pelo Ministério da Agricultura brasileiro (100ng/ml), além do valor de limite de tolerância estabelecido pelo FDA (300ng/ml).

O limite de quantificação de 50ng/ml e de detecção de 37,5ng/ml , com CV respectivamente, menor ou igual a 10% e 20%, foram aceitos neste trabalho, já que alguns autores colocam a reprodutibilidade da resposta, precisão, fornecida pelo CV, como um critério que pode ser utilizado na determinação do LD e LQ (CHASIN et al, 1994, JENKE, 1996).

O limite de quantificação de 50ng/ml para a oxitetraciclina, tetraciclina, clortetraciclina e doxiciclina, foi inferior ao valor de LMR de tetraciclinas em leite estabelecidos pelo FDA, pelo Comitê Conjunto FAO/OMS para Aditivos Alimentares em Alimentos (JECFA) e pelo Ministério da Agricultura brasileiro. Na literatura, existem trabalhos que apresentam valores de limite de quantificação inferiores aos obtidos no presente trabalho, porém as técnicas de extração são muitas vezes demoradas ou complicadas, por utilizarem várias etapas, como a extração em fase sólida, ou necessitarem de uma grande quantidade de solvente orgânico, como pode ser observado na Tabela 5, em alguns dos métodos que permitem a determinação das tetraciclinas em leite por CLAE.

Os valores de recuperação nas concentrações de 50, 400 e 1200ng/ml obtidos a partir de adicionados de padrões das oxitetraciclina, tetraciclina, clortetraciclina e doxiciclina às amostras de *pool* de leite, forneceram resultados satisfatórios, ou seja, entre 66,6 e 89,6% para as tetraciclinas, nas diferentes concentrações. FURUSAWA, em 1999, obteve uma média de recuperação de 89,6% de oxitetraciclina adicionada ao leite nas concentrações de 100, 500 e 1000ng/ml.

Os coeficientes de variação obtidos no estudo da precisão intra-dia e inter-dia, das amostras de leite adicionadas de oxitetraciclina, tetraciclina, clortetraciclina e doxiciclina nas concentrações de 100, 400 e 1200ng/ml, foram adequados para todas as tetraciclinas nas diferentes concentrações, como pode ser observado nas Tabelas 17, 18, 19 e 20, segundo o critério de aceitação para o coeficiente de variação, menor que 15% (JENKE, 1996, FDA, 1998).

Os resultados obtidos no estudo da exatidão, expressa em função de porcentagem de inexatidão, das amostras de leite adicionadas de oxitetraciclina, tetraciclina, clortetraciclina e doxiciclina nas concentrações de 100, 400 e 1200ng/ml podem ser observados nas Tabelas 21, 22, 23 e 24. Estes resultados mostraram-se de acordo com o critério de aceitação que estabelece uma porcentagem de inexatidão menor ou igual a 15% (JENKE, 1996, FDA, 1998).

Os resultados dos estudos do efeito da matriz (Figura 10, 11, 12, 13) para avaliar se esta exerce alguma interferência na análise, mostrou que ao se comparar as curvas de linearidade obtidas em água e em leite, em todos os gráficos a matriz tem uma influência negativa em relação a curva em água, sendo possível visualizar essa diferença, pois as curvas não se sobrepuseram. Este resultado pode ser explicado pelo fato das tetraciclinas, se ligarem às proteínas presentes em leite, fato que não ocorre quando

estão em água. Desta forma para garantir a confiabilidade da análise, optou-se por preparar sempre os calibradores em leite.

Devido a possibilidade de alterações nas concentrações das tetraciclinas em leite, durante os ensaios, foi importante avaliar a estabilidade das amostras por um período de tempo prolongado. Assim, utilizou-se como critério que, a variação entre as concentrações de tetracilinas na amostra no tempo zero e as concentrações após algum tempo em *freezer* (-20°C), não apresentassem um coeficiente de variação maior que 10% (CHASIN et al, 1998). Os resultados do estudo da estabilidade da oxitetraciclina, tetraciclina, clortetraciclina, doxiciclina em leite, nas concentrações de 100 e 400ng/ml, apresentados nas Tabelas 25, 26, 27 e 28, respectivamente, demonstram que as amostras são estáveis quando mantidas em *freezer* por 62 dias, exceto para a oxitetraciclina e a clortetraciclina na concentração de 100ng/ml. No presente trabalho, as amostras não ultrapassaram um período superior a 15 dias armazenadas em *freezer*.

O método validado foi aplicado à amostras de leite obtidas de um laticínio localizado na cidade de Cambuí, no sul de Minas Gerais. Foram analisadas 231 amostras, sendo que estas foram obtidas em três coletas realizadas mensalmente entre agosto e outubro de 2001.

Os resultados obtidos nas análises das amostras (Tabelas 30, 32 e 34) foram expressos em função de ng/ml, visto que os parâmetros de validação de metodologia, foram definidos nesta unidade.

Conforme os resultados apresentados nas Tabelas 29, 31 e 33, o índice de amostras positivas para oxitetraciclina manteve-se superior a 11% em todas as coletas realizadas. Não foram constatados resultados positivos, em nenhuma das coletas, para as outras tetraciclinas.

As amostras positivas que apresentaram concentrações de oxitetraciclina superiores ao limite máximo de resíduos de tetraciclinas em leite permitido pela legislação brasileira apresentaram valores de oxitetraciclina compreendidos entre 105,44 e 1639,44 ng/ml, o que demonstra uma faixa bastante ampla de concentrações irregulares.

Os resultados encontrados demonstram que o índice de amostras positivas para oxitetraciclina é expressivo, ao contrário das outras tetraciclinas para as quais não foram encontradas amostras positivas.

De acordo com o Sindicato Nacional da Indústria de Produtos para a Saúde Animal (SINDAN), 2002, a indústria veterinária fechou o ano 2000 com um faturamento de US\$ 771.479.436, sendo que, por classe de produtos, os antibióticos representam 10% deste valor.

Dentre a classe dos antibióticos, os betalactâmicos são os mais utilizados na terapia em gado, seguidos das tetraciclinas, onde neste grupo, a oxitetraciclina tende a ser a mais utilizada. Essa constatação foi feita informalmente através de entrevistas e conversas com veterinários e membros das indústrias que produzem ou comercializam medicamentos veterinários. A dificuldade em se obter informação oficial relativa ao volume de venda dos diferentes grupos de antibióticos, no país, se deve ao fato de que as indústrias veterinárias não se dispõem a fornecê-las, considerando-as sigilosas. Porém, a porcentagem de resultados positivos para oxitetraciclina está de acordo com as informações extra-oficiais obtidas sobre a preponderância de uso dessa tetraciclina em relação às outras.

Os resultados obtidos neste estudo, assim como, os avaliados da literatura, demonstram a necessidade das indústrias de laticínios implantar um sistema de fiscalização da qualidade do leite recebido, em relação à

presença de resíduos de antibióticos, a fim de evitar prejuízos econômicos decorrentes de possíveis interferências no processo de produção de derivados causadas pela presença destes no leite. Para esta fiscalização, o laticínio deve optar por um método qualitativo ou quantitativo de acordo com as suas condições e necessidades.

De acordo com os dados observados na Tabela 3, entre 1995 e 2000, mais que 50% do leite produzido no Brasil é de origem informal, ou seja, não é submetido a nenhum tipo de fiscalização e de controle de qualidade. Os resultados obtidos neste trabalho mostram a relevância de se estabelecer fiscalizações constantes do leite de consumo e/ou do leite utilizado como matéria prima para produção de derivados.

Os resultados deste estudo, assim como, outros estudos realizados no Brasil mostram a constante presença de resíduos de antibióticos em leite (ALBUQUERQUE et al, 1996, BARROS & PERCHES, 1981, GELLI et al, 1984, LOPES et al, 1998).

O método validado no presente trabalho mostrou-se apropriado para a verificação da presença de resíduos dos antibióticos tetraciclina em amostras de leite, apresentando fácil execução, curto tempo de análise (aproximadamente 1 hora) e baixo custo.

## 7. CONCLUSÕES

De acordo com os resultados experimentais obtidos no presente trabalho, podemos concluir que:

- A extração mais adequada, escolhida entre várias técnicas testadas durante a padronização do método, foi a desproteínização acídica por ser de rápida realização e mais econômica quando comparada com as extrações em fase sólida e com a extração líquido-líquido com solvente orgânico.
- O método analítico validado para determinação da oxitetraciclina, tetraciclina, clortetraciclina e a doxiciclina em leite, utilizando cromatografia líquida de alta eficiência com detecção UV (detector de arranjo de diodos), após extração com desproteínização acídica, apresentou linearidade, exatidão, precisão, recuperação, limites de detecção e de quantificação adequados à sua aplicação na monitoramento da qualidade do leite relacionada aos resíduos de antibióticos tetraciclina;
- O método mostrou-se útil para a avaliação da presença de resíduos dos antibióticos tetraciclina, como pode ser constatado através dos resultados das análises de 231 amostras coletadas em um período de três meses;
- Os resultados obtidos de amostras positivas para oxitetraciclina sugerem sua maior utilização em gado leiteiro, quando em comparação com as demais tetraciclina. Este resultado apresenta-se condizente

com o fato da oxitetraciclina ser a mais comercializada no mercado veterinário brasileiro quando comparada com as outras tetraciclinas;

- O resultado significativo de amostras positivas para oxitetraciclina, ou seja, superior a 11% nas três coletas realizadas, sendo que deste total, um valor superior a 45% em todas as coletas apresentou concentrações superiores ao LMR das tetraciclinas em leite permitido pela legislação brasileira, indica a necessidade real de monitoramento de resíduos de oxitetraciclina em leite de consumo e/ou do leite utilizado como matéria prima na produção de derivados.

## 8. REFERÊNCIAS

- ABETE, M.C., GENTA, E., SQUADRONE, S. Tetraciline nel latte: determinazione mediante HPLC/DAD. **Ind. Aliment.**, Pinerolo, v.36, p.753-755, 1997.
- ALBUQUERQUE, L.M.B., MELO, V.M.M., MARTINS, S.C.S. Investigações sobre a presença de resíduos de antibióticos em leite comercializado em Fortaleza-CE-Brasil. **Hig. Aliment.**, São Paulo, v.10, n.41, p.29-32, 1996.
- ALTERTHUM, F. Origem e natureza química dos principais agentes antibacterianos In: TRABULSI, L.R., ALTEERTHUM, F., GOMPERTZ, O.F., CANDEIAS, J.A.N. **Microbiologia**, 3.ed. São Paulo: Atheneu, 1999. p.87-92.
- ANÁDON, A, MARTINEZ-LARRAÑAGA, M.R. Residues of antimicrobial drugs and feed additives in animal products: regulatory aspects. **Livest. Prod. Sci**, London, v.59, p.183-198, 1999.
- ANDERSON, K.L., MOATS, W.A., RUSHING, J.E., WESEN, D.P., PAPICH, M.G. Potencial for oxytetracycline administration by three routes to cause milk residues in lactating cows, as detected by radioimmunoassay (Charm II) and high-performance liquid chromatography test methods. **Am. J. Vet. Res.**, Schaumburg, v.56, n.1, p.70-77, 1995.
- ASHWORTH, R.B. Liquid chromatography assay of tetracyclines in tissues of food-production animals. **J. Assoc. Off. Anal. Chem.**, Washington, v.68, n.5, p.1013-1018, 1985.

- AURELI, P. FERRINI, A.M., MANNONI, V. Effect of some proteolytic enzymes on microbial detection levels for tetracyclines and sulfonamides in milk serum. **Arch. Lebensmittelhyg.**, Hannover, v.50, p.115-118, 1999.
- BARTON, M.D. Does the use of antibiotics in animal affect human health?. **Aust. Vet. J.**, Artarmon, v.76, n.3, p.177-180, 1998.
- BARROS, V.R.M., PERCHES, E.M.C. Pesquisa de inibidores no leite tipo B distribuído ao consumo da grande São Paulo. **Rev. Inst. Laticínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora, v.36, n.216, p.39-42, 1981.
- BISHOP, J.R., WHITE, C.H. Antibiotic residue detection in milk – A review. **J. Food Prot.**, Des Moines, v.47, n.8, p.647-652, 1984.
- BLACK, W.D. The use of antimicrobial drugs in agriculture. **Can. J. Physiol. Pharmacol.**, Ottawa, v.62, p.1044-1048, 1984.
- BOISON, J.O.K., KENG, L.J.Y., MACNEIL, J.D. Analysis of penicillin G in milk by liquid chromatography. **J. Assoc. Off. Anal. Chem.**, Washington, v.77, n.3, p. 565-70, 1994
- BOOTH, J.M., HARDING, F. Testing for antibiotic residues in milk. **Vet. Rec.**, London, v.119, p.565-569, 1986.
- BORDAS, A.C., BRADY, M.S., SIEWIERSKI, M., KATZ, S.E. In vitro enhancement of antibiotic resistance development – interaction on residue levels of pesticides and antibiotics. **J. Food Prot.**, Des Moines, v.60, n.5, p.531-536, 1997.

- BOWER, C.K., DAESCHEL, M.A. Resistance responses of microorganisms in food environments. **Int. J. Food Microbiol.**, Amsterdam, v.50, p.33-44, 1999.
- BRADY, M.S., KATZ, S.E. In vitro effect of multiple antibiotic/antimicrobial residues on the selection for resistance in bacteria. **J. Assoc. Off. Anal. Chem.**, Washington, v.75, n.4, p.738-742, 1992.
- BRADY, M.S., WHITE, N., KATZ, S.E. Resistance development potencial of antibiotic/antimicrobial residue levels designated as "safe level". **J. Food Prot.**, Des Moines, v.56, n.3, p.229-233, 1993.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Alimentos. Comissões. Resíduos. Histórico. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/alimentos/alimentos/comissoes/residuos.html>  
Acesso: 28 nov. 2001
- BRASIL, Leis, Decretos, etc. Portaria n.72, de 3 jun. 1998. Diário Oficial da União, Brasília, n.107, 8 de jun. 1998. Seção I, p.131. [O Ministério da Agricultura, do Abastecimento e da Reforma Agrária estabelece o Programa de Controle e Resíduos Biológicos em Leite – PCRBL].
- BRITO, M.A.V.P. Perigos dos resíduos antimicrobianos. Disponível em: <http://www.leitebrasil.org.br/revistaedant.html> Acesso: 3 jan. 2001.
- CARLSSON, A. & BJÖRCK, L. Liquid chromatography verification of tetracycline residues in milk and influence of milk fat lipolysis on the detection of antibiotic residues by microbial assays and the Charm II test. **J. Food Prot.**, Des Moines, v.55, n.5, p.374-378, 1992.
- CARSON, M.C., BRESLYN, W. Simultaneous determination of multiple tetracycline residues in milk by metal chelate affinity chromatography:

- collaborative study. **J. Assoc. Off. Anal. Chem.**, Washington, v.79, n.1, p.29-42, 1996.
- CARSON, M.C. Simultaneous determination of multiple tetracycline residues in milk by using metal chelate affinity chromatography. **J. Assoc. Off. Anal. Chem.**, Washington, v. 76, n.2, p.329-334, 1993.
- CHARM, S.E., CHI, R. Microbial receptor assay for rapid detection and identification of seven families of antimicrobial drugs in milk: Collaborative Study. **J. Assoc. Off. Anal. Chem.**, Washington, v.71, n.2, p.304-316, 1988.
- CHASIN, A.A.M., CHASIN M., SALVADOR, M.C. Validação de métodos cromatográficos em análises toxicológicas. **Rev. Farm. Bioquím.-USP**, São Paulo, v.30, n.2, p. 49-53, 1994.
- CHASIN, A.A.M., NASCIMENTO, E.S. RIBEIRO-NETO, L.M., SIQUEIRA, M.E.P.B., ANDRAUS, M.H., SALVADOR, M.C., FERNÍCOLA, N.A.G., GORNI, R., SALCEDO, S. Validação de métodos em análises toxicológicas: uma abordagem geral. **Rev. Bras. Toxicol.**, São Paulo, v.11,n.1, p. 1-6, 1998
- CITYBRASIL. Minas Gerais. Pouso Alegre Disponível em: <http://www.citybrasil.com.br> Acesso: 28 dez. 2001.
- COLLINS-THOMPSON, D.L., WOOD, D.S., THOMSON, I.Q. Detection of antibiotic residues in consumer milk supplies in North America using the Charm Test II procedure. **J. Food Prot.**, Des Moines, v.51, n.8, p.632-633, 1988.
- COOPER, A.D., STUBBINGS, G.W.F., KELLY, M., TARBIN, J.A., FARRINGTON, W.H.H., SHEARER,G. Improved method for the on-line

- metal chelate affinity chromatography - high performance liquid chromatographic determination of tetracycline antibiotics in animal products, **J. Chromatogr., A**, Amsterdam, v.812, p. 321- 326, 1998.
- COSTA, E.O. Uso de antimicrobianos na mastite In: SPINOSA, H.S., GÓRNIK, S.L., BERNARDI, M.M. **Farmacologia aplicada à medicina veterinária**, 2.ed, Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999, p.422-433.
- COSTA, E.O., RAIA, R.B., GARINO JÚNIOR, F., WATANABE, E.T., RIBEIRO, A.R. GROFF, M.R. Presença de resíduos de antibióticos no leite de pequena mistura de propriedades leiteiras. **Napgama**, São Paulo, v.2, n. 1, p. 10-13, 1999.
- CROUBELS, S., BAEYENS, W., PETEGHEM, C.V. Post-column zirconium chelation and fluorescence detection for the liquid chromatographic determination of tetracyclines. **Anal. Chim Acta**, Amsterdam, v.303, p.11-16, 1995.
- CROUBELS, S., PETEGHEM, C.V., BAEYENS, W. Sensitive spectrofluorimetric determination of tetracycline residues in bovine milk. **Analyst**, Amsterdam, v.119, p.2713-2716, 1994.
- CROUBELS, S.M., VANOOSTHUYZE, K.E.I., PETEGHEM, C.H.V. Use of metal chelate affinity chromatography and membrane-based ion-exchange as clean-up procedure for trace residue analysis of tetracyclines in animal tissues and egg. **J. Chromatogr., B: Biomed. Sci. Appl.**, Amsterdam, v.690, p.173-179, 1997.
- CULLOR, J. S. Tests for identifying antibiotic residues in milk: How well do they work?. **Vet. Med.**, Kansas, v.87, p. 1235-1241, 1992

- D'HAESE, E., NELIS, H.J., REYBROECK, W., RUYCK, H. Evaluation of a enzymatic test for the detection of tetracyclines in milk. **J. Food Prot.**, Des Moines, v.62, n.6, p.632-636, 1999.
- DEBACKERE, M. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of antimicrobials in relation to their residues in milk. In: SYMPOSIUM ON RESIDUES OF ANTIMICROBIAL DRUGS AND OTHER INHIBITORS IN MILK, Kiel, 1995. **Proceedings**. Brussels: International Dairy Federation, 1995. p.41-53
- DINSMORE, R.P., STEVENS, R.D., CATTELL, M., SALMAN, M.D., SUNDLOF, S.F. Oxytetracycline residues in milk after intrauterine treatment of cows with retained fetal membranes. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, Schaumburg, v.209, n.10, p.1753-1755, 1996.
- FABRE, J.M., MORETAIN, J.P., ASCHER, F., BROUILLET, P., BERTHELOT, X. Main causes of inhibitors in milk – A survey in one thousand french dairy farms In: SYMPOSIUM ON RESIDUES OF ANTIMICROBIAL DRUGS AND OTHER INHIBITORS IN MILK, Kiel, 1995. **Proceedings**. Brussels: International Dairy Federation, 1995. p.27-31.
- FAGUNDES, C.M., MOLIN, L. Interferência dos resíduos de antibióticos no controle de qualidade do leite e derivados. **Inf. Agropecu.** Belo Horizonte, v. 13, n. 155, p.24-30, 1998.
- FDA. U. S. Food and Drug Administration. Tolerances established for tetracycline in milk. Disponível em: <http://www.cfsan.fda.gov/~ear/mi-98-7.html> Acesso em: 22 jan. 2000.

- FDA. U. S. Food and Drug Administration. Guidance for industry – Bioanalytical methods validation for human studies Disponível em: <http://www.fda.gov> Acesso em: 14 dez 98
- FEDENIUK, R.W., SHAND,P.J. Theory and methodology of antibiotic extraction from biomatrices. **J. Chromatogr., A**, Amsterdam, v.812, p.3-15. 1998.
- FLETOURIS, D.J., PSOMAS, J.E., BOTSOGLOU, N.A. Trace analysis of oxytetracycline, tetracycline, and in milk by high performance liquid chromatography. **J. Agric. Food Chem.**, New York , v. 38, p.1913-1917, 1990.
- FRANCO, D.A., WEBB, J., TAYLOR, C.E. Antibiotic and sulfonamide residue in meat: implications for human health. **J. Food Prot.**, Des Moines, v.53, n.2, p.178-185, 1990.
- FURASAWA, N. Rapid liquid chromatography determination of oxytetracycline in milk. **J. Chromatogr., A**, Amsterdam, v.839, p.247-251, 1999.
- GALLINA, D.A., FARIA, J.E., FERREIRA, C.L., BRANDÃO, S.C.C. Resíduos inibidores no leite de vacas tratadas com antibióticos. **Ind. Laticínios**, São Paulo, v.3, n.15, p.70-79, 1998.
- GELLI, D.S., JAKABI, M., SOUZA, A. Inibidores microbianos em leite pasteurizado do comércio da cidade de São Paulo. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, São Paulo, v.44, n.1, p.19-24, 1984.
- GUSTAFSON, R.H. Symposium: Antibiotic residues in meat and milk – Use of antibiotics in livestock and human health concerns. **J. Dairy Sci.**, Savoy, v.74, p.1428-1432, 1991.

- HACKER, S.L. Ambiente competitivo e comportamento do mercado farmacêutico veterinário no Brasil. Piracicaba, 2000, 115p. (Tese de mestrado – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, da Universidade de São Paulo).
- HARDING, F. **Milk Quality**. 1 ed., London: Blackie Academic & Professional, 1995, 166p.
- HEESCHEN, W.H., BLÜTHGEN, A. Veterinary drugs and pharmacologically active compounds In: INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION. **Monography on residues and contaminants in milk and milk products**. Brussels: IDF, 1991. p.16-83. (International Dairy Federation, Special Issue 9101).
- HONKANEN-BUZALSKI, T., REYBROECK, W. Antimicrobials In: INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION. **Monography on residues and contaminants in milk and milk products**. Brussels: IDF, 1997. p.26-34. (International Dairy Federation, Special Issue 9701).
- JANK, M.S., FARINA, E.M.M.Q., GALAN, V.B. **O agribusiness do leite no Brasil**, São Paulo: Milkbizz, 1999. 108p.
- JECFA. Summary and conclusions of the of the fiftieth meeting, Rome, 17-26 june 1998/ Veterinary drugs and BST/ antimicrobial agents/ chlortetracycline, oxytetracycline and tetracycline. Disponível em: <http://www.jecfa.ilsa.org/evaluation.cfm> Acesso em 10 jul. 2000.
- JENKE, D.R. Chromatographic method validation: a review of current practices and procedures. General concepts and guidelines. **J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.**, New York, v. 19, n.5, p.719-736, 1996.

- KANEENE, J.B., AHL, A.S. Drug residues in dairy cattle industry: Epidemiological evaluation of factors influencing their occurrence. **J. Dairy Sci.**, Savoy, v.70, n.10, p.2176-2180, 1987.
- KANEENE, J.B., COE, P.H., SMITH, J.H., RAPNICKI, P., SMITH, C.L., GERLOFF, B., MORROW, D.A. Drug residues in milk after intrauterine injection of oxytetracycline, lincomycin-spectinomycin, and povidone-iodine in cows with metritis. **Am. J. Vet. Res.**, Schaumburg, v.47, n.6, p.1363-1365, 1986.
- KINDRED, T.P., HUBBERT, W.T. Residue prevention strategies in the United States. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, Schaumburg, v.202, n.1, p.46-49, 1993.
- KISER, J.S. Subtherapeutic uses of antibiotics and sulfonamides in animal agriculture. In: STEELE, J.H., JUKES, T.H., DUPONT, H.L., CRAWFORD, L.M. eds. **Antibiotics, Sulfonamides, and Public Health**, Boca Raton: CRC Press, 1984, v.1, p. 81-107 (CRC Handbook Series in Zoonoses section D).
- LEITE BRASIL. Banco de dados. Produção brasileira de leite total, formal e informal – 1990/2000 Produção brasileira de leite. Disponível em: <http://www.leitebrasil.org.br> Acesso em 03 jan. 2001.
- LONG, A.R., HSIEH, L.C., MALBROUGH, M.S., SHORT, C.R., BARKER, S.A. Matrix solid-phase dispersion (MSPD) isolation and liquid chromatographic determination of oxytetracycline, tetracycline, chortetracycline in milk. **J. Assoc. Off. Anal. Chem.**, Washington, CIDADE, v.73, n.3, p.379-384, 1990.
- LOPES, L.T., GANDARA, A.L.N., CRISTIANINI, M. Detecção de resíduos de antibióticos em leite comercializado na cidade de Campinas. **Rev. Inst.**

- Laticínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora, v.53, n.301, 302, 303, p. 64-67, 1998.
- MANIE, T., BRÖZEL, V.S., VEITH, W.J., GOUWS, P.A. Antimicrobial resistance of bacterial flora associated with bovine products in South Africa. **J. Food Prot.**, Des Moines, v.62, n.6, p.615-618, 1999.
- MARTINS, M.A., VAZ, A.K. Comparação entre o Delvotest® e o teste de coagulação pelo fermento láctico para a detecção de substâncias inibidoras no leite. **Hora Vet.**, Porto Alegre, v.19, n.113, p.53-55, 2000.
- MARZO, A., DAL BO, L. Chromatography as an analytical tool for selected antibiotic classes: a reappraisal addressed to pharmacokinetic applications. **J. Chromatogr., A**, Amsterdam, v. 812, p. 17-34, 1998.
- MÄYRÄ-MÄKINEN, A. Technological significance of residues for the dairy industry In: SYMPOSIUM ON RESIDUES OF ANTIMICROBIAL DRUGS AND OTHER INHIBITORS IN MILK, Kiel, 1995. **Proceedings**. Brussels: International Dairy Federation, 1995. p.137-143.
- McEVOY, J.D.G., MAYNE, C.S., HIGGINS, H.C., KENNEDY, D.G. Transfer of chlortetracycline from contaminated feedingstuff to cows' milk, **Vet. Rec.**, London, v.146, p.102-106, 2000.
- McEWEN, S.A., BLACK, W.D., MEEK, A.H. Antibiotic residue prevention methods, farm management, and occurrence of antibiotic residues in milk. **J. Dairy Sci.**, Savoy., v.74, n.7, 1991a.
- McEWEN, S.A., MEEK, A.H., BLACK, W.D. A dairy farm survey of antibiotic treatment practices, residue control methods and associations with inhibitors in milk. **J. Food Prot.**, Des Moines, v.54, n.6, p.454-459, 1991b.

- MEIJER, L.A., CEYSSENS, K.G.F., GRÈVE, B.I.J.A.C., BRUIJN, W. Pharmacokinetics and bioavailability of doxycycline hyclate after oral administration in calves. **Vet. Q.**, Utrecht, v.15, n.1, p.01-05, 1993.
- MITCHELL, M., BODKIN, B., MARTIN, J. Detection of beta-lactam antibiotics in bulk tank milk. **J. Food Prot.**, Des Moines, v.58, n.5, p.577-578, 1995.
- MITCHELL, J.M., GRIFFITHS, M.W., McEWEN, S.A., McNAB, W.B., YEE, A.J. Antimicrobial drug residues in milk and meat: causes, concerns, prevalence, regulations, tests, and test performance. **J. Food Prot.**, Des Moines, v.61, n.6, p.742-756, 1998.
- MOATS, W. A. The effect of processing on veterinary residues in foods. **Adv. Exp. Med. Biol.**, New York, v.459, p.233-241, 1999.
- MOATS, W.A. Inactivation of antibiotics by heating in foods and others substrates – A review. **J. Food Prot.**, Des Moines, v.51, n.6, p.491-497, 1988.
- MOATS, W.A., HARIK-KHAN,R. Rapid HPLC determination of tetracycline antibiotics in milk. **J. Agric. Food Chem.**, New York, v.43, p.931-934, 1995.
- NAKAZAWA, H., INO, S., KATO, K., WATANABE, T., ITO, Y., OKA, H. Simultaneous determination of residual tetracyclines in foods by high performance liquid chromatography with atmospheric pressure chemical ionization tandem mass spectrometry, **J. Chromatogr., B: Biomed. Sci. Appl.**, Amsterdam, v.732, p.55-64, 1999.
- NOUWS, J., EGMOND, H.V., LOEFFEN, G., SCHOUTEN, J., KEUKENS, I., SMULDERS, I., STEGEMAN, H. Suitability of the charm HVS and a

- microbiological multiplate system for detection of residues in raw milk at EU maximum residue levels. **Vet. Q.**, Utrecht, v.21, n.1, p.21-27, 1999b.
- NOUWS, J., EGMOND, H.V., SMULDERS, I., LOEFFEN, G., SCHOUTEN, J., STEGEMAN, H. A microbiological assay system for assesment of raw milk exceeding EU maximum residue levels. **Int. Dairy J.**, Amsterdam, v.9, p. 85-90, 1999a.
- NOUWS, J., LOEFFEN, G., SCHOUTEN, J., EGMOND, H.V., KEUKENS, I., STEGEMAN, H. Testing of raw milk for tetracycline residues. **J. Dairy Sci.**, Savoy, v.81, p. 2341-2345, 1998.
- OKA, H., IKAI, Y., HAYAKAWA, J., MASUDA, K., HARADA, K., SUZUKI, M. Improvement of chemical analysis of antibiotics. Part XIX: Determination of tetracycline antibiotics in milk by liquid chromatography and thin-layer chromatography/fast atom bombardment mass spectrometry. **J. Assoc. Off. Anal. Chem.**, Washington, v. 77, n.4, p.891-895, 1994.
- OKA, H., IKAI, Y., KAWAMURA, N., HAYAKAWA, J. Limited survey of residual tetracyclines in tissues collected from diseased animals in Aichi Prefecture, Japan. **J. Assoc. Off. Anal. Chem.**, Washington, v.74, n.6, p.894-896, 1991.
- OKA, H., ITO, Y., MATSUMOTO, H. Chromatographic analysis of tetracycline antibiotics in foods. **J. Chromatogr., A**, Amsterdam, v.882, p. 109-133, 2000.
- OKA, H., MATSUMOTO, H., UNO, K., HARADA, K., KADOWAKI, S., SUZUKI, M. Application of prepacked C<sub>18</sub> cartridge for the analysis of tetracycline residues in animal liver, Japan, **J. Chromatogr.**, Amsterdam, v.325, p.265-274, 1985.

- PENA,A., LINO,C.M., SILVEIRA,I.N. Tetraciclina: relação entre as suas propriedades físico-químicas e a determinação por HPLC. **Rev. Port. de Farm.**, Lisboa, v. XLVII, n.4, p.149-154, 1997.
- PENA, A.L.S., LINO, C.M., SILVEIRA, I.N. Determination of oxytetracycline, tetracycline, and chlortetracycline in milk by liquid chromatography with postcolumn, derivatization and fluorescence detection. **J. Assoc. Off. Anal. Chem.**, Washington, v.82, n.1, p.55-60, 1999.
- PENA, A.L.S., SILVEIRA, M.I.N., CASTILLO, B. Antibióticos em alimentos: determinação e quantificação por HPLC com detecção fluorimétrica. **Ars Pharm.**, Granada, v.38, n.1, p.27-37, 1997b.
- PINAZZA, LA., ALIMANDRO, R. Pecuária de leite: mercado interno. **Agroanalysis**, v.19, n.3, p. 39-47, 1999.
- REEUWIJK, H.J.E.M., TJADEN,U.R. High-performance liquid chromatography of tetracyclines. **J. Chromatogr.**, Amsterdam, v.353, p.339-350, 1986.
- REYBROECK, W. Evaluation of screening test for the detection of antimicrobial residues in milk. In: SYMPOSIUM ON RESIDUES OF ANTIMICROBIAL DRUGS AND OTHER INHIBITORS IN MILK, Kiel, 1995. **Proceedings**. Brussels: International Dairy Federation, 1995a. p.182-186.
- REYBROECK, W. Sensitivity and selectivity of screening tests for the detection of antimicrobial residues in milk. In: SYMPOSIUM ON RESIDUES OF ANTIMICROBIAL DRUGS AND OTHER INHIBITORS IN MILK, Kiel, 1995. **Proceedings**. Brussels: International Dairy Federation, 1995b. p.216-217.

- ROSE, M.D., BYGRAVE, J., FARRINGTON, W.H.H., SHEARER, G. The effect of cooking on veterinary drug residues in foods: 4. oxytetracycline. **Food Addit. Contam.**, Schaumburg, v.13, n.3, p.275-286, 1996.
- SADICK, N.S. Antibiotics: unapproved uses or indications. **Clin. Dermatol.**, New York, v.18. p.11-16, 2000.
- SALVATORE, M.J., KATZ, S.E. Solubility of antibiotic used in animal feeds in selected solvents. **J. Assoc. Off. Anal. Chem.**, Washington v.76, n.5, p.952-956, 1993.
- SCHENCK, F.J., CALLERY, P.S. Chromatographic methods of analysis of antibiotics in milk. **J. Chromatogr., A**, Amsterdam, v.812, p. 99-109, 1998.
- SENYK, G.F., DAVIDSON, J.H., BROWN, J.M., HALLSTEAD, E.R., SHERBON, J.W. Comparison of rapid tests used to detect antibiotic residues in milk. **J. Food Prot.**, Des Moines, v.53, n.2, p.158-164, 1990.
- SILVA, P.R.M., QUESSADA, A.M., FREITAS, M.V.M. Conduta adotada por balconistas de farmácias veterinárias frente a casos relatados de mastite bovina. **Rev. Bras. Med. Vet.**, Niterói, v.21, n.2, p.65-68, 1999.
- SINDAN. Informações. Mercado veterinário. Faturamento Anual do mercado veterinário-Brasil 2000. Disponível em: <http://www.sindan.com.br/mercado.html> Acesso em 05 jan. 2002
- SOKOL, J., DUDRIKOVÁ, E. CABADAJ, R., MATISOVÁ, E. Solid-phase extraction and liquid – chromatography determination of oxytetracycline antibiotics in milk. In: SYMPOSIUM ON RESIDUES OF ANTIMICROBIAL DRUGS AND OTHER INHIBITORS IN MILK, Kiel,

1995. **Proceedings**. Brussels: International Dairy Federation, 1995. p.308-309.
- SPINOSA, H.S. Antibióticos: tetraciclina, cloranfenicol e análogos IN: H.S., GÓRNIAK, S.L., BERNARDI, M.M. **Farmacologia aplicada à medicina veterinária**, 2.ed, Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, p.400-404, 1999.
- SPINOSA, H.S. Considerações gerais sobre os antimicrobianos IN: H.S., GÓRNIAK, S.L., BERNARDI, M.M. **Farmacologia aplicada à medicina veterinária**, 2.ed, Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, p.333-336, 1999.
- SETTEPANI, J.A. The hazard of using chloranphenicol in food animals. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, Schaumburg, v.184, n.8, p.930-931, 1984.
- STOBBERINGH, E.E., BOGAARD, A.E. Spread of antibiotic resistance from food animals to man. **Acta Vet. Scand.** Vanloese, v.93, suppl., p.47-52, 2000.
- SUHREN, G. Possibilities and limitations of microbiological inhibitor tests. In: SYMPOSIUM ON RESIDUES OF ANTIMICROBIAL DRUGS AND OTHER INHIBITORS IN MILK, Kiel, 1995. **Proceedings**. Brussels: International Dairy Federation, 1995. p.159-171.
- SUNDLOF, S.F. Drug and chemical residues in livestock. **Vet. Clin. North Am.: Food Anim. Pract.**, Philadelphia, v.5, n.2, p.411-449, 1989.
- THOMAS, M.H. Simultaneous determination of oxytetracycline, tetracycline, and chlortetracycline in milk by liquid chromatography. **J. Assoc. Off. Anal. Chem.**, Washington, v.72, n. 4, p.564-567, 1989.
- TIMONEY, J.F. The tetracyclines. In: STEELE, J.H., JUKES, T.H., DUPONT, H.L., CRAWFORD, L.M. eds. **Antibiotics, Sulfonamides, and Public**

- Health**, Boca Raton: CRC Press, 1984, v.1, p. 267-279 (CRC Handbook Series in Zoonoses section D).
- TOLEDO, M.C.F. Aditivos alimentares IN: OGA,S. **Fundamentos de toxicologia**, 1ed., São Paulo: Atheneu, , p.405-439, 1996.
- TORTORA, G., FUNKE, B.R., CASE, C.L. Drogas antimicrobianas IN: TORTORA, G., FUNKE, B.R., CASE, C.L. **Microbiologia**, 6.ed., Porto Alegre: Artes Médicas Sul, 2000, p.531-552.
- TRABULSI, L.R. & TOLEDO, M.R.F. Resistência bacteriana a drogas IN: TRABULSI, L.R., ALTEERTHUM, F., GOMPERTZ, O.F., CANDEIAS, J.A.N. **Microbiologia**, 3.ed, São Paulo: Atheneu, 1999, p.105-192.
- TSAI, C.E., KONDO, F. Simple continuous and simultaneous determination of tetracycline residues. **Res. Vet. Sci**, London, v.56, p.277-283, 1994.
- WHITE, C.R., MOATS, W.A., KOTULA, K.L. Optimization of a liquid chromatographic method for determination of oxytetracycline, tetracycline, and chlortetracycline in milk. **J. Assoc. Off. Anal. Chem.**, Washington, v.76, n.3, p.549-554, 1993.
- YAO, J.D.C., MOELLERING JR., R.C. Antibacterial Agents IN: MURRAY, P.R., BARON, E.J., PFALLER, M.A., TENOVER, F.C., YOLKEN, R.H. **Manual of Clinical Microbiology**, 6.ed, Washington: D.C.: ASM Press, 1995, p.1281-1307.