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

Avaliação da presença de resíduos de gentamicina em leite
de vaca após o tratamento de mastite

Susie Gonçalves

Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE

Orientador:
Prof. Dra. Elizabeth S. do Nascimento

São Paulo
2008

19.298

DEDALUS - Acervo - CQ

30100013905

Ficha Catalográfica

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

G635a Gonçalves, Susie
Avaliação da presença de resíduos de gentamicina em leite
de vaca após o tratamento de mastite / Susie Gonçalves. --
São Paulo, 2008.
77p.

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

Orientador: Nascimento, Elizabeth Souza do

1. Contaminação de alimento : Toxicologia I. T. II
Nascimento, Elizabeth Souza do, orientador.

615.954 CDD

Susie Gonçalves

Avaliação da presença de resíduos de gentamicina em leite
de vaca após o tratamento de mastite

Comissão Julgadora
da
Dissertação para obtenção do grau de Mestre

Profa. Dra. Elizabeth S. do Nascimento
orientador/presidente

1º. examinador

2º. examinador

São Paulo, 07 de novembro de 2008.

Dedico,

Ao meu pai
Mauro de Souza Gonçalves

Minha mãe
Sueli Soares Gonçalves

Minha irmã
Paula Gonçalves

Meu amor
Ricardo Almeida Alves

Que são minha força para não desistir e seguir em frente sempre.
Amo vocês.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora Prof^a. Elizabeth Nascimento que lutou junto comigo desde a seleção para o ingresso na pós-graduação. Obrigada por tudo o que você me ensinou nesse longo caminho. Sem esmorecer jamais.

À Maristela, Myriam e Cristina do Laboratório Chomanalysis por me auxiliarem, colaborarem e cederem seu espaço para que eu pudesse realizar meu trabalho.

À Prof^a. Elizabeth Oliveira Costa mentora deste trabalho e que em muitos momentos me auxiliou.

A Mauro Sucupira do ICB-USP, por me ajudar a desvendar a técnica deste trabalho, sem você provavelmente não seria possível parte deste trabalho.

À Dr. Sérgio Graff que me permitiu ausentar inúmeras vezes de meu trabalho para me dedicar a esta monografia, sem teu incentivo talvez eu não tivesse ingressado na pós-graduação.

À Roberto Raia que gentilmente me ajudou em muitos momentos e que me cedeu as amostras analisadas.

À amiga Claudia Regina dos Santos exemplo de dedicação e carinho que no começo me guiou e orientou sobre como tudo deveria ser.

À todos os meus amigos queridos que não me deixaram quando não pude estar com eles nos aniversários e confraternizações.

À todos que me cercam e me rodeiam pelas palavras de carinho, amizade e compreensão que recebi ao longo desses anos.

SUMÁRIO

1.INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DA LITERATURA	3
2.1 Introdução	3
2.2 Leite	5
2.3 Mastite	7
2.4 Aminoglicosídeos	10
2.5 Farmacocinética dos Aminoglicosídeos	12
2.6 Mecanismo de ação dos Aminoglicosídeos	13
2.7 Toxicidade e Efeitos Adversos dos Aminoglicosídeos	15
2.8 Características da Gentamicina	16
2.9 Resíduos de antibióticos em alimentos e os riscos à saúde humana	18
2.10 Limite máximo de resíduos (LMR)	23
2.11 Métodos analíticos na determinação de gentamicina em leite e derivados	26
3. OBJETIVOS E PLANO DE TRABALHO	31
3.1 Objetivos	31
3.2 Plano de trabalho	31
4. MATERIAL E MÉTODO	32
4.1 Amostras	32
4.1.1 Amostras de leite adquiridas em estabelecimentos comerciais	32
4.1.2 Amostras de leite de animais tratados com gentamicina	33
4.2 Condições cromatográficas	34
4.3 Reagentes	34
4.4 Soluções	35
4.5 Equipamentos, acessórios e vidraria	35
4.6 Métodos analítico para a determinação de gentamicina em leite	36
4.7 Parâmetros de validação	37
4.7.1 Estudo de linearidade	37
4.7.2 Curva de calibração	38
4.7.3. Limite de Quantificação	39
4.7.4 Recuperação	39
4.7.5 Precisão do método analítico	40
4.7.6 Exatidão	40
4.7.7 Estabilidade	41
4.7.8 Análise das amostras de leite comercializadas em São Paulo	41
5. RESULTADOS	42

5.1 Linearidade	43
5.2 Perfil cromatográfico e espectro de massa da gentamicina	45
5.3 Limite de quantificação	45
5.4 Recuperação	46
5.6 Precisão e Exatidão	47
5.7 Estabilidade	48
5.8 Amostras analisadas	49
5.8.1 Cromatogramas das amostras positivas para gentamicina em leite comercializado na cidade de São Paulo e leite de vaca in natura	52
5.8.2 Representação gráfica da dispersão das amostras positivas de leite in natura para gentamicina em comparação ao limite máximo de resíduos	53
5.8.3 Representação gráfica da porcentagem de amostras positivas para gentamicina acima do limite máximo de resíduos	53
5.8.4 Representação gráfica da porcentagem de amostras positivas para gentamicina acima do limite máximo de resíduos para o leite de marca comercial	55
6 DISCUSSÃO	61
7. CONCLUSÃO	62
8. RECOMENDAÇÃO	63
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	76
ANEXOS	

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Etapas da síntese protéica bloqueadas pela ação de antibióticos.	14
Figura 2. Estrutura química da gentamicina.	17
Figura 3. Marcha analítica utilizada na determinação da gentamicina em leite.	36
Figura 4. Curva de linearidade da gentamicina em leite.	42
Figura 5. Perfil cromatográfico da gentamicina 0,1 µg/mL em leite .	43
Figura 6. Perfil cromatográfico da gentamicina 1.2 µg/mL em leite.	44
Figura 7. Espectro de massas da gentamicina.	44
Figura 8. Amostra 23 (leite de marca comercial) positiva para gentamicina.	49
Figura 9. Amostra 086 (leite de vaca in natura) positiva para gentamicina.	50
Figura 10. Amostra 095 (leite de vaca in natura) positiva para gentamicina.	50
Figura 11. Amostra 098 (leite de vaca in natura) positiva para gentamicina.	51
Figura 12. Amostras 104 (leite de vaca in natura) positiva para gentamicina.	51
Figura 13. Dispersão gentamicina e o limite máximo de resíduos	52
Figura 14. Porcentagem de valores obtidos de gentamicina acima do limite máximo de resíduos.	53
Figura 15. Porcentagem de valores obtidos de gentamicina acima do limite máximo de resíduos.	54

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Propriedades dos antimicrobianos para tratamento de uso sistêmico e intramamário.	10
Tabela 2. Aminoglicosídeos, microorganismos de origem e anos de suas descobertas.	11
Tabela 3. Limites Máximos de Resíduos dos aminoglicosídeos em diversos substratos.	24
Tabela 4. Limites Máximo de Resíduos para gentamicina em leite, estabelecidos pelo <i>Codex Alimentarius</i> , FDA e EU.	24
Tabela 5. Métodos cromatográficos usados em análises de gentamicina.	30
Tabela 6. Intervalo dinâmico ($\mu\text{g/mL}$) das curvas de calibração de gentamicina em leite, e procedimento analítico específico.	38
Tabela 7. Concentrações de gentamicina ($\mu\text{g/mL}$) utilizadas no preparo das curvas de calibração para as amostras de leite e o número de replicatas.	39
Tabela 8. Recuperação da gentamicina em amostras de pool de leite nas concentrações de 0,3 e 1,2 $\mu\text{g/mL}$.	45
Tabela 9. Resultados da precisão e exatidão intra e inter-ensaios da gentamicina em amostras de pool de leite.	46
Tabela 10. Estabilidade da gentamicina em pool de leite.	47
Tabela 11. Estabilidade da solução-padrão de gentamicina.	47
Tabela 12. Estabilidade da solução-padrão de gentamicina em água.	48
Tabela 13. Amostras de leite in natura positivas para gentamicina e seus valores de Limite Máximo de Resíduo.	49

LISTA DE SIGLAS

ANVISA: Agência Nacional de Vigilância Sanitária.

IDA: Ingestão Diária Aceitável

FAO: Food and Agriculture Organization.

FDA: Food and Drug Administration.

LC/MS-MS: Liquid Chromatographic Tandem Mass Spectrometer

LD: Limite de detecção.

LQ: limite de quantificação.

LMR: Limite Máximo de Resíduos

ppb: partes por bilhão

ppm: partes por milhão.

PAMVET: Programa de Análise de Resíduos de Medicamentos Veterinários em Alimentos de Origem Animal

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

ONU: Organização das Nações Unidas.

OMS: Organização Mundial da Saúde.

UE: União Européia.

TFA: Ácido Trifluoracético.

RESUMO

GONÇALVES, S. NASCIMENTO, E.S.; Mestrado. Avaliação da presença de resíduos de gentamicina em leite de vacas após tratamento de mastite. Palavras-chaves: gentamicina, leite, resíduos de antibióticos e LC/MS-MS. susiegoncalves@usp.br

Os antimicrobianos são amplamente utilizados no tratamento e prevenção de doenças do gado leiteiro. A ocorrência de resíduos de gentamicina, resultante principalmente do tratamento da mastite bovina é uma das principais causas o aparecimento de resíduos no leite. Neste estudo utilizando como técnica LC/MS-MS, foram analisadas 48 amostras de leite adquiridas em estabelecimentos comerciais, apenas uma apresentou resíduos de gentamicina no valor de 0, 112 ug/mL, superior ao LMR de 100 µg/ml estabelecido pela União Européia (UE), já para o leite *in natura*, das 55 amostras analisadas, quatro amostras foram positivas apresentando os valores 0, 155 ug/mL, 0, 192 ug/mL, 0, 130 ug/ml e 0, 167 ug/mL, todos acima do LMR estabelecido pela União Européia (UE). O método apresentou limite de quantificação de 0,1ng/mL, linearidade de 0,1-1500 ng/mL e coeficientes de determinação de 0,992557, recuperação de 91,5 % e com precisão e exatidão adequadas. Conhecer a dimensão da exposição da população a esses compostos é de fundamental importância para promover as ações de controle visando à proteção do consumidor. Desta forma as políticas de inspeção e qualidade do leite criadas pelo governo devem ser aplicadas e servir de garantia para o consumo seguro deste alimento pela população.

ABSTRACT

GONÇALVES, S. NASCIMENTO, E.S.; Mestrado. Evaluation of the presence of residues of gentamicin in milk of cows after treatment of mastitis. Word-keys: antibiotic gentamicin, milk, residues and LC/MS-MS. susiegoncalves@usp.br

The antibiotics are widely used to treat and prevent diseases for dairy cattle. The occurrence of residues of gentamicin, resulting mainly from treatment of bovine mastitis, are a major cause of the appearance of residues in milk. In this study using the technique LC / MS-MS, 48 samples of milk purchased in shops, only one sample presented residues of gentamicin showing the value 0, 112 $\mu\text{g} / \text{ml}$, exceeding the MRLs of 100 $\mu\text{g} / \text{ml}$ established by the European Union (EU) already for milk in nature, from 55 samples, four samples were positive showing the values 0, 155 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 0, 192 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 0, 130 $\mu\text{g}/\text{mL}$ and 0, 167 $\mu\text{g}/\text{mL}$, All above the MRLs set by the European Union (EU). The method presented limit of quantification, and 0.1 ng / mL , linearity of 0,1-1500 ng/mL and coefficients of determination of 0.992557, recovery of 91.5% and with precision and accuracy appropriate. Knowing the size of population's exposure to these compounds is of fundamental importance to promote measures to control aimed at protecting the consumer. Thus the politics of inspection and quality of milk created by the government should be implemented and serve as a guarantee for the safe consumption of food by the population.

1. INTRODUÇÃO

A ampla gama de antimicrobianos, utilizados no tratamento e na prevenção da mastite bovina, e a falta de cuidados especiais, como o controle da ordenha respeitando o período de carência dos animais tratados, mostra o quanto é fundamental o monitoramento dos resíduos de gentamicina no leite. A mastite bovina é considerada um grande problema para os produtores de leite, sendo a responsável pela ampla utilização de antimicrobianos, contribuindo com o aumento da ocorrência de resíduos no leite, e é considerada como uma das doenças mais comuns no gado leiteiro.

O tratamento dos animais produtores de alimentos e os possíveis riscos à saúde humana decorrentes do emprego de medicamentos veterinários podem estar associados aos resíduos dos mesmos em níveis acima dos limites máximos permitidos (LMRs). A não observação das Boas Práticas Pecuárias no uso de Medicamentos Veterinários e das especificações descritas em rótulo e bula são fatores que levam ao aparecimento destes resíduos em alimentos. Conhecer a dimensão da exposição da população a esses compostos é de fundamental importância para promover as ações de controle visando à proteção do consumidor.

Desta forma o presente trabalho tem por objetivo determinar a presença de gentamicina em amostras de leite comercializadas na cidade de São Paulo e também em amostras de leite de animais tratados com esse antibiótico. Períodos de carência são estabelecidos a partir de protocolos onde são usados animais saudáveis.

O uso da gentamicina, um aminoglicosídeo, em animais com mastite, pode levar ao aparecimento desse composto no leite dos animais tratados, mesmo após a observância do tempo de carência indicado pela bula do medicamento.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Introdução

Os antimicrobianos são amplamente utilizados no tratamento de doenças, prevenção e também como suplementos na alimentação de gado leiteiro. A ocorrência de resíduos de antimicrobianos, resultante principalmente do tratamento da mastite bovina, é um problema importante para a saúde humana uma vez que a presença desses compostos em alimentos pode dificultar sua eficácia ao serem usados em terapia humana, por acarretarem resistência. A microbiota intestinal humana é formada por um sistema balanceado e é muito importante para manter a saúde individual. Doses terapêuticas de alguns antimicrobianos podem alterar esse equilíbrio e desencadear os efeitos de resistência (FDA, 2003).

O controle de resíduos deve ser rigoroso desde a origem do leite, estabelecendo-se padrões mínimos que garantirão a segurança do consumidor (SILVA, 2004). Os medicamentos veterinários são freqüentemente utilizados no tratamento de doenças que acometem o gado leiteiro, como as enterites e mastites. Os aminoglicosídeos mais comumente utilizados são a gentamicina, a neomicina, a diidroestreptomicina e a estreptomicina.

No Brasil, os aminoglicosídeos, em especial a gentamicina, são os medicamentos de escolha para tratamento e prevenção de mastite não apresentando restrição quanto a sua utilização, podendo ser o único antibiótico a ser utilizado, ou em associação a outras classes farmacológicas (RAIA, 2006).

Os prejuízos a saúde, acarretados pelo uso dos antibióticos, podem se apresentar na forma de reações alérgicas em indivíduos sensíveis ou ainda afetar a microbiota intestinal humana, levando a efeitos adversos, tais como hipersensibilidade, e choque anafilático em indivíduos alérgicos (COSTA, 1996; NERO, 2007; SILVA, 2004). Do ponto de vista econômico, a presença de antimicrobianos no leite pode afetar a indústria de laticínios, pois pode interferir em etapas da produção de derivados do leite, tais como iogurte, queijos, entre outros (DENOBILO, 2004).

Os fatores para o aparecimento de resíduos são diversos e incluem a desinformação dos produtores sobre a forma correta no tratamento dos animais, o uso indiscriminado de medicamentos sem a correta orientação de um veterinário, o uso profilático de antibióticos com a finalidade de evitar que os animais sejam acometidos por doenças como a mastite. Trata-se de um processo inflamatório da glândula mamária, que pode afetar a produção de leite, seja pela qualidade, seja pela diminuição da quantidade produzida, e dependendo do tipo de alteração provocada, o leite torna-se inadequado para o consumo humano (STEPHEN *et al*, 1983; WHO, 2002; RAIA, 2006). As alterações estão relacionadas a um menor teor de lactose, caseína (proteína do leite), gordura, cálcio e fósforo e um acentuado aumento de imunoglobulinas (COSTA, 1996).

A mastite pode ser aguda ou crônica, dependendo da sintomatologia apresentada, e ainda pode se apresentar na forma subclínica, onde a sintomatologia é menos evidente, podendo diminuir a produção de leite. Além, disso é uma das principais causas de perdas econômicas e da produção e qualidade do leite (COSTA, 1996). Existem diversos microrganismos que podem contribuir para a ocorrência de

mastites, tais como fungos, vírus e bactérias. Os agentes etiológicos que mais contribuem para o aparecimento da mastite são as bactérias, principalmente as do gênero *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus ssp*, *Streptococcus agalactiae*, *Escherichia coli*, entre outras (COSTA,2002). Injeções intravenosas ou intramusculares de aminoglicosídeos normalmente produzem alguns resíduos no leite mesmo se respeitado o período de carência. Entretanto, o uso intramamário ou intra-uterino pode acarretar a presença de resíduos no leite (GAUDIN, 2005).

Medicamentos veterinários podem deixar resíduos tóxicos nos alimentos, assim, estes deverão atender às normas de qualidade e segurança não só para a saúde animal, mas especialmente para a saúde humana e o meio ambiente. A proteção do consumidor depende do uso seguro desses medicamentos veterinários, evitando-se com isso que fatores de risco à saúde humana estejam presentes nos alimentos (BRASIL, 2008).

2.2 Leite

O leite é um dos alimentos mais consumidos em escala mundial, e é considerado de extrema importância para o crescimento e desenvolvimento humano. É um alimento importante por conter nutrientes essenciais como gorduras, proteínas e cálcio, além de, por seu baixo custo, ser economicamente viável (SAMANIDOU, 2008). O consumo de leite na forma fluída e de derivados varia de acordo com a faixa etária, no Brasil o Ministério da Saúde recomenda que o consumo de leite e derivados para crianças de até dez anos é de 400 mL/dia, isto é, 146 litros/ano de leite fluido ou equivalente na forma de derivados. Para os

jovens de 11 a 19 anos, o consumo é maior, de 700 mL/dia ou 256 litros/ano e para os adultos acima de 20 anos a recomendação é de 600 mL/dia ou 219 litros/ano, inclusive para os idosos, porém o consumo para esse grupo de pessoas deve ser principalmente desnatado.

A maioria do leite e dos derivados de leite consumidos no Brasil é proveniente de gado leiteiro bovino. O leite apresenta em sua composição gorduras, proteína, vitaminas, açúcares e minerais, entre eles o cálcio constituindo-se como importante fonte deste mineral na alimentação. Segundo a Agência de Informação da Embrapa (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária) nos últimos anos no Brasil houve um aumento no consumo de leite longa vida, que possui um maior tempo de validade em relação ao leite pasteurizado (EMBRAPA, 2008). Dados referentes ao primeiro trimestre de 2008 do IBGE revelam a crescente produção leiteira no Brasil, alcançando a marca de mais de 4 bilhões de litros de leite produzidos no país, somente em estabelecimentos submetidos às inspeções sanitária federal, estadual e municipal, e já indicam crescimento em relação ao mesmo período do ano de 2007 (IBGE, 2008). Em 2007 o Brasil produziu 26,4 bilhões de litros de leite, 2 bilhões a mais do que o produzido em 2005 (IBGE, 2008). A crescente produção e consumo do leite devem estar atrelados a sistemas da qualidade em todas as etapas da produção deste alimento. Desta forma as políticas de inspeção e qualidade do leite criadas pelo governo devem ser aplicadas e servir de garantia para o consumo seguro deste alimento pela população.

2.3 Mastite

A mastite é um processo inflamatório que acomete a glândula mamária, interferindo diretamente na produção leiteira, diminuindo a qualidade e quantidade de leite produzido pelo animal. A diminuição da produção de leite na glândula inflamada é o sintoma mais freqüentemente observado nesta doença (COSTA, 2002). Além disso, observa-se aumento de elementos sanguíneos como albumina, imunoglobulinas, cloreto de sódio, ácidos graxos livres, e também menor teor de lactose, caseína, gordura, fósforo e cálcio. Por causa das diversas alterações na composição do leite, o mesmo se torna inadequado para o consumo e para a produção de derivados, devendo ser desprezado. No mundo todo, a mastite em vacas leiteiras em lactação é considerada como a maior causa de perda econômica, devido à diminuição e perda da qualidade do leite (RAIA, 2005). A mastite pode se apresentar de forma aguda com os seguintes sintomas: edema, dor, calor e rubor, além das alterações nas características do leite. Já na mastite subclínica pode ser observada diminuição da produção leiteira, porém não são evidentes os sinais do processo inflamatório ou fibrose, sendo a mastite subclínica a maior causadora de prejuízos na produção leiteira (COSTA, 1998).

A mais importante das etiologias relacionadas à mastite é a infecciosa, pois podem ser veiculados no leite diversos patógenos. Os microrganismos da mastite são classificados quanto a sua origem e modo de transmissão em dois grupos: microrganismos contagiosos ou transmissíveis e os microrganismos ambientais, ubiqüitários, presentes no ar e fezes.

Os microorganismos mais frequentes são: *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus dysgalactiae*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus spp* e *Corynebacterium spp*, *Streptococcus uberis*, *Escherichia coli*, *Klebsiella sp*, *Prototheca sp*, entre outros (RAIA,2006). A presença da mastite no gado e o seu tratamento aumentam a incidência de resíduos de antibióticos no leite. Dessa forma devem ser tomadas ações preventivas, como os tratamentos que devem ser realizados com cautela, respeitando os limites de carência estabelecidos por agências governamentais ou órgãos internacionais.

Os tratamentos visando à cura ou a prevenção da mastite podem ser feitos pelas vias intramamária ou sistêmica. Para o tratamento intramamário devem ser considerados: o tipo de formulação e as características farmacocinéticas e farmacológicas do medicamento a ser administrado.

O conhecimento das características do medicamento e o tipo de veículo usado para a administração são informações importantes que devem ser avaliadas, pois podem influenciar a presença ou não dos resíduos do antibiótico no leite. Outros fatores que devem ser considerado são as propriedades físico-químicas dos medicamentos usados, pois influem na cinética do composto e em última análise na sua ação (COSTA, 2002). É evidente a importância do conhecimento da farmacocinética do medicamento no tratamento da mastite. Não menos importante é também a farmacodinâmica, pois se conhecendo o mecanismo de ação e seu espectro de ação é possível determinar o melhor medicamento para cada caso específico de tratamento. Exames como antibiograma são úteis para o conhecimento dos microorganismos causadores da mastite, porém nem sempre são realizados e a terapia, nestes casos, é efetuada sem o conhecimento real do

patógeno causador da mastite (COSTA, 2002). O tratamento sistêmico pode ser ou não realizado associado ao tratamento intramamário e as vias utilizadas são a intramuscular ou a subcutânea, e em alguns casos opta-se pela intravenosa. Assim como no tratamento intramamário, no sistêmico devem ser avaliadas as características farmacocinéticas e farmacológicas do medicamento a ser utilizado. A eficácia do tratamento, tanto intramamário quanto sistêmico, depende de algumas características do medicamento a ser utilizado.

Existem diversos antimicrobianos de diferentes classes que podem ser usados no tratamento de mastite, e podem ser administrados ou não em associações, visando um melhor resultado no tratamento.

Raia, 2005 descreve a grande variedade entre os betalactâmicos e as associações entre estes e os aminoglicosídeos para o tratamento de mastites. Entre os antibióticos utilizados estão: penicilinas, amoxicilinas, ampicilinas, amicacina, neomicina, gentamicina, entre outras.

Entre os aminoglicosídeos o mais utilizado nas terapias para mastite é a gentamicina, e pode ser encontrado no mercado brasileiro com o nome de Gentocin® fabricando pela empresa Schering-Plough, fornecedora do padrão usado na validação e análises deste projeto. No mercado brasileiro é disponível o medicamento Gentatec®. Devido aos altos custos dos tratamentos de mastites com antibióticos, encontram-se sugestões de terapia alternativa, Loguercio et al, 2006 descrevem o uso do própolis como alternativa no tratamento de mastite, pois este composto atua em cepas de *Staphylococcus coagulase-positiva* e *Streptococcus SP*.

A Tabela 1 apresenta as principais propriedades de um antimicrobiano que devem ser consideradas no tratamento.

Tabela 1. Propriedades dos antimicrobianos para tratamento de uso sistêmico e intramamário.

Tratamento intramamário	Tratamento sistêmico
<u>Vacas em lactação:</u> pouco irritante, MIC baixo, baixo grau de ligação a proteínas, baixo grau de ionização no úbere, liberação rápida e baixa persistência.	O antibiótico deve ter amplo espectro de ação para atingir facilmente as concentrações consideradas ótimas na glândula mamária, ter boa potência, apresentar boa distribuição e difusão para os tecidos mamários, ser lipossolúvel e ter baixa percentagem de ligação a proteínas plasmáticas. Ser uma base fraca, considerando o pH ligeiramente ácido do leite normal.
<u>Vacas em período de secagem:</u> medicamento com ação bactericida, alto peso molecular, não ser irritante, ter alto grau de ligação às proteínas, atividade microbiana estável e o veículo que será usado deve ter absorção e eliminação lenta.	

Fonte: COSTA, 2002.

2.4 Aminoglicosídeos

Os aminoglicosídeos são considerados antibióticos de espectro restrito de ação, pois são mais ativos sobre microrganismos Gram-negativos, para que tenham ação sobre microrganismos Gram-positivos devem ser feitas associações por exemplo com penicilinas naturais, ampliando desta forma seu espectro de ação (SPINOSA, 2002). São constituídos por um núcleo de hexose unido a amino açúcares por ligações glicosídicas (CAI *et al*, 2005). São considerados

medicamentos altamente solúveis em água, estáveis entre pH 6 a pH 8, são polares e catiônicos, características estas que dificultam sua absorção pela via oral e barreira hematoencefálica. É no meio aeróbio e em pH neutro que eles exercerem sua atividade antimicrobiana, pois necessitam de oxigênio para o seu transporte ativo nas células microbianas, sendo mais ativos em meio alcalino (OLIVEIRA *et al*,2006). Os principais representantes da classe dos aminoglicosídeos são: Gentamicina, Amicacina, Tobramicina, Netilmicina entre outros (TRABULSI *et al*, 1999). O que diferencia um aminoglicosídeo do outro é a presença de diferentes açúcares (hexoses) na sua constituição (SPINOSA, 2002). A Tabela 2 apresenta os diversos aminoglicosídeos, os microrganismos do qual se originam e o ano de suas descobertas.

Tabela 2. Aminoglicosídeos, microorganismos de origem e anos de suas descobertas.

Nome do aminoglicosídeo	Microrganismo de origem	Ano de descoberta
Estreptomicina	<i>Streptomyces griseus</i>	1944
Neomicina	<i>Streptomyces fradiae</i>	1949
Kanamicina	<i>Streptomyces kanamyceticus</i>	1957
Paromicina	<i>Streptomyces fradiae</i>	1959
Gentamicina	<i>Micromonospora purpurea</i>	1963
Tobramicina	<i>Streptomyces tenebrarius</i>	1968
Amicacina	<i>Streptomyces kanamyceticus</i>	1972
Netilmicina	<i>Micromonospora inyoensis</i>	1975
Espectinomicina	<i>Streptomyces spectabilis</i>	1962
Sisomicina	<i>Micromonospora inyoensis</i>	1970
Dibecacina	<i>Streptomyces kanamyceticus</i>	1971
Isepamicina	<i>Micromonospora purpurea</i>	1978

Fonte: OLIVEIRA *et al*,2006

Os aminoglicosídeos têm sua utilização terapêutica para humanos em doenças como endocardites bacterianas, taluremia e tuberculose. Na medicina veterinária é utilizado no tratamento de enterites, dermatites e mastites.

2.5 Farmacocinética dos Aminoglicosídeos

São poucos os estudos específicos sobre a farmacocinética da gentamicina. Os aminoglicosídeos em geral têm suas características farmacocinéticas muito parecidas, são mal absorvidos pela via gastrointestinal por serem cátions altamente polares.

A melhor via de administração dos aminoglicosídeos é a via parenteral, para o tratamento de infecções sistêmicas, uma vez que por esta via o medicamento atinge concentração plasmática máxima após 30-90 minutos de sua aplicação intramuscular e após 30 minutos na aplicação endovenosa (SPINOSA, 2002; OLIVEIRA *et al*, 2006).

O fato de serem insolúveis em lipídios faz com que a sua concentração em secreções e nos tecidos seja reduzida, pois atravessam mal as membranas biológicas que não tenham um mecanismo de transporte (OLIVEIRA *et al*.2006) Com exceção do córtex renal, endolinfa e perilinfa do ouvido interno, onde são elevadas as concentrações dos aminoglicosídeos, no restante dos tecidos as concentrações são baixas (GOODMAN & GILMAN, 2006). A eliminação ocorre por filtração glomerular e uma ampla fração da dose administrada por via parenteral é excretada sem sofrer modificações durante as primeiras 24 horas e a maior parte surge nas primeiras 12 horas.

A meia-vida de todos os aminoglicosídeos varia de 2-3 horas em pacientes que não apresentam problemas renais. Uma vez que praticamente toda a eliminação da gentamicina ocorre por via renal, observa-se uma relação linear entre a concentração de creatinina no plasma e a meia-vida de todos os aminoglicosídeos em pacientes com comprometimento moderado da função renal (GOODMAN & GILMAN, 2006).

2.6 Mecanismo de ação dos Aminoglicosídeos

Os aminoglicosídeos são antibióticos considerados bactericidas. O seu mecanismo de ação baseia-se na capacidade de interferir na síntese protéica bacteriana, ocasionando a formação de proteínas defeituosas, pois se ligam na unidade 30S do ribossomo, levando a uma leitura incorreta do código genético e, como consequência, permitem a incorporação de aminoácidos incorretos na cadeia polipeptídica formada no ribossomo (Figura 1) (SPINOSA, 2002; TRABULSI, 1999). Os aminoglicosídeos difundem-se através de canais aquosos formados pelas proteínas purinas na membrana externa das bactérias, penetrando assim no espaço periplasmático, após o transporte através da membrana citoplasmática (SPINOSA *et al*, 2002).

Os aminoglicosídeos têm como principal local intracelular de ação a subunidade ribossômica 30S, que consiste de 21 proteínas e uma única molécula 16S de RNA. A proteína formada é fundamental para o metabolismo da bactéria, porém

na presença do aminoglicosídeos observa-se a morte celular. Por este mecanismo os aminoglicosídeos são conhecidos como antimicrobianos bactericidas (SPINOSA *et al*, 2002).

Figura 1. Etapas da síntese protéica bloqueadas pela ação de antibióticos

Fonte: ALTERTHUM, 1999

Apesar da sua importância, estes fármacos têm sua utilização limitada por sua toxicidade, pois são ototóxicos e nefrotóxicos e podem desencadear reações alérgicas em pessoas sensíveis (GOODMAN & GILMAN, 2006). Bogialli e col.,

2005 relatam que os aminoglicosídeos são amplamente utilizados na medicina veterinária para tratamento de infecções bacterianas, por exemplo, a mastite.

2.7 Toxicidade e Efeitos Adversos dos Aminoglicosídeos

Os aminoglicosídeos são a primeira classe de fármacos que chamam atenção por causarem efeitos ototóxico, são também considerados nefrotóxicos (SPINOSA, 2002), sendo que estes efeitos tóxicos podem ser reversíveis ou não. Todos os aminoglicosídeos possuem essas características de toxicidade, variando apenas o grau e a intensidade com que ocorrem. Os aminoglicosídeos podem causar efeitos ototóxicos dependendo das características de seus componentes e a probabilidade de ocorrência de efeitos é aumentada em decorrência do aumento da dose e duração do tratamento.

Alguns medicamentos diuréticos podem contribuir com o a pontencialização dos efeitos ototóxicos dos aminoglicosídeos (SPINOSA, 2002). Diversas doenças podem ser tratadas com a gentamicina, mas seu uso, assim como o de todos os outros aminoglicosídeos, deve ser feito com cautela para evitar os efeitos tóxicos que podem aparecer em tratamentos prolongados. Assim, os efeitos tóxicos da gentamicina são semelhantes aos dos demais aminoglicosídeos, ou seja: nefrotoxicidade e ototoxicidade.

Spinoza, 2002 relata que a nefrotoxicidade manifesta-se mais freqüentemente por proteinúria transitória e retenção de nitrogênio não protéico, e em casos de tratamentos prolongados podem ser observados necrose tubular aguda. A

ototoxicidade causada pelos aminoglicosídeos pode variar dependendo das características de cada um dos componentes dessa classe de antibióticos e a probabilidade com que ocorre está ligada ao aumento da dose, da concentração e da duração do tratamento (SPINOSA, 2002).

2.8 Características da Gentamicina

A gentamicina é produzida por um actinomiceto *Micromonospora purpurea*, e foi inicialmente introduzido nos Estados Unidos em 1963 na clínica médica como sulfato de gentamicina. É muito utilizado na medicina veterinária para o tratamento de diversas infecções, e é um fármaco de primeira escolha por causa de seu baixo custo e atividade confiável para todos os agentes aeróbios gram-negativos. Sua atividade antibacteriana atinge os seguintes microrganismos: *Salmonella sp*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus indol negativos e positivos*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Aerobacter aerogenes* e *Neisseria* e bactérias Gram-positivas como o *Staphylococcus sp* e *Streptococcus sp* (COSTA, 2002). Esta família é formada pelas gentamicinas C1, C1a e C2, a sisomicina e a netilmicina (o derivado 1-N-etil da sisomicina) que contém o 3-amino açúcar (garosamicina), e as diferentes variações de metilação do amino açúcar resultam em diferentes componentes da gentamicina e tem pouca influência em sua atividade biológica (GOODMAN & GILMAN, 2006).

Poucos são os estudos que disponíveis especificamente sobre a farmacocinética da gentamicina, a maioria dos estudos trata dos aminoglicosídeos em geral (WHO,1998). A gentamicina é altamente solúvel em água, moderadamente solúvel em etanol, acetona e praticamente insolúvel em benzeno e hidrocarbonetos halogenados (MERCK, 2006). Na cromatografia usada na determinação de gentamicina, quando a fase móvel é um solvente orgânico, como metanol, por exemplo, deve ser feita a acidificação do meio para que ocorra a solubilização da gentamicina e facilite a leitura deste aminoglicosídeo (HELLER *et al*,2005).

A Figura 2 ilustra a estrutura química das gentamicinas.

Figura 2. Estrutura química da gentamicina.

Fonte: Adaptado de BOGIALLI, 2005.

A gentamicina apresenta baixa absorção quando administrada por via oral e sua meia vida é de aproximadamente 2 horas. Sua excreção é efetuada pelos rins, através de filtração glomerular, e é encontrada na urina na forma ativa (SPINOSA, 2002). Não foram localizados dados sobre efeitos da gentamicina sobre a

microbiota intestinal humana, entretanto em um estudo *in vitro* utilizando 600 isolados clínicos de bactérias anaeróbicas, incluindo algumas bactérias presentes na microbiota humana, foi possível visualizar a resistência de muitos microrganismos para gentamicina (WHO, 2008). Considerando o fato da gentamicina ser pouco absorvida por via oral e pelos relatos de diarreia descritos nos estudos com animais após a administração de gentamicina, pode-se considerar que os efeitos sobre a microbiota intestinal se devem a sensibilidade aos resíduos deste antibiótico (WHO, 2008).

2.9 Resíduos de antibióticos em alimentos e os riscos à saúde humana

O uso excessivo de antibióticos na produção animal, bem como a presença de resíduos na cadeia alimentar, pode acarretar riscos à saúde humana e animal (MITCHELL *et al*, 1998). O desenvolvimento de resistência causado por certas bactérias patogênicas é mais rápido do que a capacidade da indústria farmacêutica em produzir novos medicamentos.

O uso de antibióticos em concentrações subterapêuticas 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 a um amplo espectro de antibióticos. Se tais bactérias resistentes

forem transferidas aos humanos através do consumo de alimentos, a partir desses, estas bactérias poderiam, em última análise, colonizar novos hospedeiros ou passar sua resistência aos antibióticos para outras bactérias presentes (DENOBILE, 2002). Este fato decorre da presença de doses subterapêuticas de antibióticos rotineiramente adicionados à ração animal, e não devido ao tratamento terapêutico de animais.

A resistência é a capacidade inerente ou adquirida da bactéria não responder aos efeitos inibitórios das drogas antimicrobianas, por diversos mecanismos, entre eles, uma rápida biotransformação do antibiótico - diminuindo o efeito nocivo, ou modificando o sítio de ação do antibiótico de modo a não afetar a função bacteriana. Assim, a União Européia decidiu banir, em 2006, o uso dos antibióticos como promotores de crescimento em frangos – como uma reação à possível resistência aos múltiplos antibióticos, observada em linhagens de bactérias capazes de transmitir fatores de resistência para outras bactérias. Dessa forma, ficaria diminuída a ingestão de antibióticos através dos alimentos. É difícil avaliar extensão da contribuição dessa resistência em termos de alteração da saúde humana (GOODMAN & GILMAN, 2006).

Althaus et al, 2003 discorre sobre os efeitos deletérios causados por resíduos de antibióticos no leite, que podem prejudicar a microbiota intestinal humana, dificultando sua ação protetora local, e permitindo o aparecimento de uma microbiota resistente (ALTHAUS et al, 2003)

É evidente que o uso profilático de antibióticos assegura o bem estar dos animais, diminui a incidência de doenças e morte. Usados como prevenção a doenças em animais de corte permitem melhor crescimento do animal, com o controle do

crescimento de bactérias intestinais. Nesse aspecto é também vantajoso para humanos porque animais saudáveis auxiliam na redução de doenças veiculadas por alimentos e asseguram melhor fonte de proteínas: como a carne, leite e ovos que apresentam proteínas de alta qualidade para uma dieta balanceada. Além disso, apresentam vantagens para o ambiente, como a proteção de fontes de recursos ambientais, a partir da produção de animais, que geram menos dejetos, menor consumo de ração, menor uso de espaços e recursos hídricos. Em contraposição, a esta forma de proceder no mercado produtor, existem grupos ativistas que desejam o banimento dos antibióticos na produção de aves, nem sempre justificado cientificamente (PHILLIPS, 2004; BARTON, 2000).

Observa-se que animais saudáveis caracterizam-se por apresentar um bom funcionamento do aparelho intestinal, fator fundamental na utilização de nutrientes, bom desenvolvimento e maior produção. Esse equilíbrio intestinal pode ser quebrado, em situações de estresse por agressões decorrentes do manejo, variações climáticas ou alimentação. A alteração deste equilíbrio oferece condições para que bactérias patogênicas proliferem e provoquem doenças entre elas a diarreia. Uma alternativa a esses compostos, diminuindo a exposição aos antibióticos em alimentos seria o uso de probióticos, que são suplementos alimentares à base de microrganismos vivos, que afetam benéficamente o animal hospedeiro, promovendo o balanço da microbiota intestinal. (PHILLIPS, 2004; BARTON, 2000). Os benefícios potenciais dos probióticos: modificação do metabolismo do hospedeiro, estimulação do sistema imunológico, diminuição de reações inflamatórias, exclusão e morte de patógenos no trato intestinal, redução da contaminação bacteriana em carcaças processadas, aumento da absorção e

performance dos de nutrientes, e diminuição do risco à saúde humana (PHILLIPS, 2004; BARTON, 2000).

No Brasil, a literatura científica mostra que foram avaliados antibióticos no leite, sendo encontrados resíduos desse medicamento em concentrações superiores as permitidas pela legislação. Raia & Costa, (2001) constataram em animais com mastite clínica tratados por via sistêmica, após o período de carência estabelecido, 52,4 % de amostras de leite positivas para penicilina e estreptomicina e 60% para sulfadiazina e trimetropim.

Barros et al (2001) pesquisaram resíduos de antibiótico em 26 amostras de leite tipo C pasteurizado obtidas no comércio de Salvador, entre outubro de 1998 a março de 1999, que apresentavam algum resíduo, não especificado, de antibiótico em 38,5% delas em teste microbiológico de triagem. Nascimento et al (2001) avaliaram a presença de antibióticos em 96 amostras de leite de marcas diferentes adquiridos na região de Piracicaba, e constataram resíduos do antibiótico penicilina e outros antibióticos não identificados em 50% das amostras coletadas, utilizando ensaios microbiológicos.

Com o objetivo de verificar a presença de resíduos de antibióticos em amostras de leite, e evidenciar a importância do controle mais rigoroso do uso de antibiótico no tratamento de animais produtores de leite foi, realizado no estado de Goiás no ano de 2000 análise de 533 amostras de leite pasteurizado integral utilizando-se ensaios microbiológicos de triagem. Em 53 delas os resultados foram positivos resíduos de antibióticos (BORGES *et al*, 2000).

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.

Em 2001 no Estado do Rio de Janeiro, Folly & Machado (2001) avaliaram a presença de resíduos de antibióticos no leite por de métodos de inibição microbiana, enzimáticos e imunoensaios. Foram analisadas 300 amostras de leite pasteurizado tipo C e leite integral, obtendo uma freqüência de 4,33% de amostras positivas para algum tipo de antibiótico, entre eles a gentamicina. A presença de resíduos de antimicrobianos, principalmente β -lactâmicos, no leite também foi estudada por Nero (2007) utilizando o método de inibição microbiana *Charm-test*TM, onde das 210 amostras de leite cru coletadas em propriedades leiteiras de quatro regiões do país, detectou-se a presença de antibióticos β -lactâmicos, sulfonamidas e em 24 amostras (11,4%). O trabalho não visava quantificar a presença dos antibióticos, mas aponta uma das causas da presença de resíduos no leite, a ordenha de animais tratados com antibióticos antes do termino do período de carência estabelecido. Outro ponto importante apresentado nesse trabalho é a utilização de um método de triagem de fácil utilização e visualização que serve de base para a pesquisa de resíduos.

Para a quantificação dos resíduos se faz necessário a utilização de um método confirmatório como os métodos cromatográficos, tais como o apresentado por GHIDINI et al, (2007) que utilizou o teste de detecção de resíduos Delvotest SP® como método de triagem das amostras e para a confirmação utilizou a cromatografia com espectro de massas. Apesar da dificuldade em definir os riscos

exatos associados ao uso 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).

2.10 Limite máximo de resíduos (LMR)

O Limite Máximo de Resíduos (LMR) ou Limite de Tolerância é a concentração máxima de resíduo expressa em parte por milhão (ppm) ou parte por bilhão (ppb), que é permitida legalmente e que é aceitável em produtos alimentícios ou rações (BRASIL,2003).

Os limites máximo de resíduos são estabelecidos com base em resultados de estudos farmacológicos e toxicológicos de determinada substância química. Baseado no calculo da dose de ingestão diária (IDA) da droga, que por definição representa a quantidade de uma substância expressa em mg/kg de peso corpóreo, que pode ser consumida diariamente e por toda a vida, sem risco a saúde são estabelecidos os valores de LMR. Somente substâncias que possuem dossiês toxicológicos completos possuem valores estabelecidos de IDA (OGA, 1996).

Os limites por eles estabelecidos são considerados fundamentais ao comércio internacional de alimentos, pois estabelecem limites residuais seguros à saúde humana (FONSECA & SANTOS, 2001). O JECFA – Comitê de especialistas em resíduos em alimentos da Organização Mundial de Saúde/FAO propôs os seguintes Limites Máximos de Resíduos para os aminoglicosídeos (Tabela 3).

Tabela 3. Limites Máximos de Resíduos dos aminoglicosídeos em diversos substratos.

AMINOGLICOSÍDIOS	RINS	FÍGADO	MÚSCULO	LEITE	GORDURA	OVOS
Streptomicina (µg/kg)	1000 ^a	600 ^a	600 ^a	200 ^a	600 ^a	-
Dihidroestreptomicina (µg/kg)	1000 ^a	500 ^a	500 ^a	200 ^a	500 ^a	-
Gentamicina (µg/kg)	5000 ^a	2000 ^a	100 ^a	200 ^a	100 ^a	-
Neomicina (µg/kg)	10000 ^a	500 ^a	500 ^a	1500 ^a	500 ^a	500 ^b

a: gado

b: frango

Fonte: CODEX, 2006

A Tabela 4 apresenta os Limites Máximo de Resíduos para gentamicina em leite, estabelecidos pelo *Codex Alimentarius*, FDA e UE.

Tabela 4. Limites Máximo de Resíduos para gentamicina em leite, estabelecidos pelo *Codex Alimentarius*, FDA e UE .

Gentamicina	UE	FDA	<i>Codex Alimentarius</i>
	100 µg/L	30 µg/L	200 µg/L

Fonte: *Codex* , 2006; FDA, 2005; EMEA, 2001.

No Brasil, o Ministério da Agricultura através do Plano Nacional de Controle de Resíduos Biológicos em Produtos de Origem Animal (PNCRB), sistematiza os meios de controle da presença de resíduos de compostos químicos utilizados na produção de alimentos agropecuários (BRASIL, 1998; 2003 a, b).

A competência no Brasil para estabelecer limites máximos de resíduos (LMRs) em alimentos, seja de medicamentos veterinários, praguicidas, contaminantes e

aditivos, é do Ministério da Saúde pela da Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA. No caso da gentamicina esses limites nacionais ainda não foram definidos pelo setor saúde, e, portanto, vem-se utilizando no Plano Nacional de Controle de Resíduos em Produtos de Origem Animal (Instrução Normativa/MAA Nº 42, de 20 de dezembro de 1999), os níveis obtidos de referências internacionais (MERCOSUL, *Codex Alimentarius*, FDA/USA e União Européia).

A Portaria nº 72, de 3 de junho de 1998, estabelece o Plano Nacional de Controle de Resíduos Biológicos em Produtos de Origem Animal, com o objetivo de controlar o uso de antimicrobianos e fornecer meios para o controle destes nos alimentos. Os procedimentos para esse controle baseiam-se na metodologia estabelecida pelo *Codex Alimentarius* (BRASIL, 1998).

Outro programa que visa o controle da presença de resíduos de medicamentos veterinários em alimentos é o PAMVET - Programa de Análise de Resíduos de Medicamentos Veterinários em Alimentos de Origem Animal, criado em 2002, é mais uma ferramenta para a discussão em torno da melhoria da qualidade de alimentos. Assim como no PNCRB, no PAMVET também não indica o limite de resíduo para o aminoglicosídeo Gentamicina. Dessa forma, os limites que devem ser usados são os estabelecidos internacionalmente.

Em 2002 entrou em vigor a Instrução Normativa nº 51 que aprova o regulamento técnico de produção e qualidade do leite. Nessa instrução ficam estabelecidos os critérios e limites de resíduos de antibióticos em leite além de outros critérios que devem ser obedecidos com o objetivo de melhorar a qualidade do leite oferecido à população (BRASIL, 2002).

Não existe consenso entre os valores estabelecidos para os limites de resíduos entre as entidades reguladoras. No Brasil, apesar da ampla utilização da gentamicina, ainda não foram estabelecidos estes limites para detecção destes resíduos no leite que irá para consumo humano.

2.11 Métodos analíticos na determinação de gentamicina em leite e derivados

A grande maioria dos métodos descritos na literatura para determinação de resíduos em leite consiste de métodos rápidos de triagem e métodos cromatográficos de confirmação de resíduos de antibióticos e estão sendo incorporados às análises de rotina em laticínios. As formas de detecção utilizadas baseiam-se em ensaios de aglutinação em látex, inibição microbiana, enzimáticos, radioimunensaio, eletroforese, cromatografia gasosa e líquida como método confirmatório (FOLLY, 2001).

Ensaio aplicando métodos imunoenzimáticos como ELISA, também são realizados para a verificação da presença de gentamicina e outros antibióticos, JIN et al (2003) realizaram um estudo desenvolvendo imunocromatografia para confirmação das amostras positivas após triagem das amostras pelo ELISA (JIN, 2003).

Métodos de inibição microbiana são muito empregados, como forma de triagem por serem de fácil manuseio e rápida leitura, como, por exemplo, o Charm-testTM

(Charm Sciences, INC., USA), BRTAiM® (Brilhiant Black Reduction Test).

O Devoltest é normalmente utilizado para determinar a presença de antibióticos no leite e este teste é eficaz para β -lactâmicos, mas não o é para gentamicina, pois o limite de detecção para este antibiótico é de 250ppb. Assim, o teste atualmente usado no Brasil (Devoltest) é inadequado, necessitando um método que atinja o Limite Máximo de Resíduo de 200ppb (RAIA, 2005, NERO *et al*, 2007). Existem diversos métodos imunológicos, como por exemplo, ELISA, FPIA e métodos com biosensores.

GAUDIN *et al*, (2005) desenvolveram um trabalho comparando o desempenho de diversos kits ELISA para a determinação de aminoglicosídeos em amostras de leite, porém a confirmação da presença do medicamento é feita utilizando técnicas físico-químicas como o LC/MS/MS.

Os métodos de detecção de resíduos de antibióticos tendo como matriz o leite devem levar em conta a complexidade dessa matriz, que possuem alto teor de gordura e proteínas que podem ser interferentes nas análises, desta forma a extração e desproteinização são pontos fundamentais no sucesso de metodologias que envolvam determinação por cromatografia (SAMANIDOU, 2008).

Diversos artigos indicam para a extração técnicas que utilizam colunas SPE (extração em fase sólida) ou apenas uma desproteinização utilização de ácidos como o TFA (ácido trifluoracético) ou TCA (ácido tricloroacético) nas mais diversas concentrações (GHIDINI *et al*, 2007; SAMANIDOU, 2008).

A metodologia validada neste trabalho utiliza TFA 50% em água, visando á desnaturação de proteínas. A cromatografia líquida é muito utilizada como método

de confirmação da presença de resíduos de antimicrobianos como os aminoglicosídeos em amostras de leite.

A utilização de cromatografia acoplada ao espectrômetro de massas é referida em diversos trabalhos como a técnica confirmatória para detecção de resíduos de antimicrobianos, entre eles a gentamicina, em amostras de leite (GHIDINI *et al*, 2007; SAMANIDOU, 2008). Este tipo de técnica tem sido utilizado como método confirmatório para a presença de gentamicina em amostras de leite, após serem realizados testes de triagem, como por exemplo, os métodos de inibição microbiana como o Devoltest® (GHIDINI *et al*, 2007).

A utilização da cromatografia líquida acoplada ao espectro de massa (LC/MS) é uma metodologia simples, sensível e específica que possui um amplo potencial de utilização laboratorial e incrível rapidez na detecção de diversos antimicrobianos (CAI *et al*, 2005; LOUGH e WAINER, 1995).

A metodologia descrita por BOGIALLI *et al*, (2005) e seus colaboradores é uma técnica simples e sensível para determinação não só de gentamicina como também de outros nove aminoglicosídeos presentes em amostras de leite, utilizando a técnica de extração em fase sólida. O método preconiza uma extração em matriz em fase sólida após dispersão em água aquecida a 70°C. Uma vez acidificada e filtrada 0,2 ml do eluato é injetado na coluna cromatográfica.

Alguns autores descrevem a cromatografia líquida de alta eficiência como forma de separar os componentes da gentamicina e descrevem também as dificuldades em quantificar esse antibiótico já que possui baixa absorvância no UV (DE PIETRO; CASS, 2006) Trata-se de um método físico-químico que separa os componentes da mistura através de sua distribuição em duas fases que estão em

íntimo contato.

A técnica cromatográfica baseia-se na diferente capacidade que um íon ou molécula possui de se distribuir através de duas fases, uma das fases é estacionária e a outra fase move-se sobre a fase estacionária. Nessa movimentação da fase móvel sobre a fase estacionária, os constituintes da mistura são distribuídos entre as duas fases, de forma que cada um dos componentes é seletivamente retido pela fase estacionária resultando em migrações diferentes desses constituintes (COLLINS et al.;1990).

Diversos trabalhos apresentam o desenvolvimento de técnicas que possam determinar a presença de multi-resíduos de antimicrobianos no leite para diversas classes de antimicrobianos como sulfonamidas, β -lactâmicos e aminoglicosídeos que estiverem presentes em uma mesma amostra de leite. O desenvolvimento destas técnicas pode garantir um maior controle quanto à presença de resíduos visto que com apenas uma metodologia pode-se detectar mais de um resíduo de uma mesma classe ou de classes diferentes (GHIDINI *et al*, 2007; SAMANIDOU, 2008).

É de fundamental importância o desenvolvimento de uma técnica que seja rápida e eficiente na determinação da gentamicina em leite e assim verificar os níveis deste antibiótico no leite consumido pela população brasileira. Desta forma, os dados obtidos contribuirão para evitar o consumo de leite ou derivados que contenham resíduos de antimicrobianos, para a melhoria da produção de derivados de leite, e assim estabelecer níveis seguros para a presença destes resíduos no Brasil.

A Tabela 5 apresenta alguns métodos, que utilizam cromatografia, para a

quantificação de resíduos de gentamicina em leite.

Tabela 5. Métodos cromatográficos usados em análises de gentamicina

Método		Particularidades do método	Autor
Cromatografia	HPLC- fluorescência	Extração da gentamicina utilizando colunas SPE. Limite de quantificação (LQ): 30 ng/ml.	KIJAK <i>et al</i> ,1996
Cromatografia acoplada ao espectro de massa	LC/MS Íon Trap	Extração da gentamicina com coluna SPE. Limite de quantificação (LQ): 30 ng/ml.	HELLER <i>et al</i> ,2005
Cromatografia acoplada ao espectro de massa	LC/MS-MS	Não é necessário realizar a extração em fase sólida. Desproteínização das amostras de leite com TCA a 30 % e ultracentrifugação. Limite de quantificação (LQ): 4,5 ng/ml.	HELLER <i>et al</i> ,2000
Cromatografia acoplada ao espectro de massa	LC/MS	Técnica de extração em fase sólida. O método preconiza uma extração da matriz em fase sólida após dispersão em água aquecida a 70°C. Limite de quantificação (LQ): 50 ng/ml.	BOGIALLI <i>et al</i> ,2005
Cromatografia acoplada ao espectro de massa	LC/MS-MS	Método de detecção multiresíduos Desproteínização das amostras de leite com TCA a 10 %.	SAMANIDOU, 2008

3. OBJETIVOS E PLANO DE TRABALHO

3.1 Objetivos

O presente trabalho visa avaliar a presença da gentamicina em amostras de leite comercializados na cidade de São Paulo, bem como confirmar sua presença em amostras de leite positivas para o antibiótico em análises de triagem.

3.2 Plano de trabalho

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

- ✓ Revisão bibliográfica relacionada aos seguintes aspectos: Uso da gentamicina em gado leiteiro; toxicocinética; toxicodinâmica; efeitos tóxicos; legislação; ocorrência de resíduos deste antibiótico em leite; metodologia empregada nas análises da gentamicina em leite.
- ✓ Validação de método para a determinação de gentamicina em leite por LC/MS/MS.
- ✓ Análise de confirmação de amostras de triagem com resultados positivos para Gentamicina.
- ✓ Avaliação de amostras de leite comercializadas na cidade de São Paulo

4. MATERIAL E MÉTODO

4.1 Amostras

4.1.1 Amostras de leite adquiridas em estabelecimentos comerciais

Foram analisadas 48 amostras de leite comercializadas na cidade de São Paulo, adquiridas em centros de abastecimento, supermercados, padarias do município de São Paulo e de Osasco. Foram adquiridas todas as marcas e tipos disponíveis nos estabelecimentos visitados. As amostras de leite foram divididas em leite integral, semi-desnatado e desnatado, algumas marcas não são comercializadas nos três tipos e optou-se comprar os tipos que estavam a venda. Foram adquiridos também leite tipo A integral, light e magro pasteurizado. O Anexo I apresenta o tipo e local de obtenção destas amostras.

As amostras de leite UHT permaneceram em suas embalagens originais, mantidas a temperatura ambiente até o dia da análise, já as amostras de leite pasteurizado tipo A foram adquiridas no dia anterior, e acondicionadas em geladeira até o momento das análises. Antes do processamento das amostras foram transferidas alíquotas de 25 ml de leite para tubos Falcon e foram identificadas pelo número de lote, data de fabricação e data de validade.

4.1.2 Amostras de leite de animais tratados com gentamicina

As 55 amostras de leite de animais tratados com gentamicina foram cedidas pelo Dr. Roberto Raia, que as usou em sua tese de doutorado. Todas as amostras de leite foram obtidas de vacas leiteiras, da raça Holandesa, de propriedades localizadas em Pindamonhangaba e Nova Odessa, e foram mantidas congeladas até o momento das análises. As amostras cedidas foram de animais que apresentavam mastite clínica previamente diagnosticada através do teste de Tamis e mastite subclínica diagnosticada através do CMT Teste. Depois de confirmada a mastite os animais receberam o tratamento com antibiótico de acordo com as recomendações de cada fabricante, por via intramamária ou via sistêmica, apenas uma vez, como objetivo avaliar a influência de diferentes fatores na presença dos resíduos de antimicrobianos no leite após o período de carência de 96 horas estipulado nas bulas dos medicamentos. Todos os animais tratados possuíam fichas com os seguintes dados: identificação e data de tratamento, medicamento utilizado e vias de administração. A administração dos medicamentos foi realizada utilizando as seringas e cânulas individuais que acompanhavam os medicamentos para cada animal. Durante o tratamento e período de carência os animais foram ordenhados e o leite desprezado, e a coleta das amostras só ocorreram após o término do período de carência. Para todas as amostras coletadas foi feita a assepsia de cada quarto mamário, foram coletados 5 ml de cada quarto em tubos de ensaio estéreis (16x 160 mm).

4.2 Condições cromatográficas

As amostras de leite comercializadas na cidade de São Paulo e as dos animais com mastite tratados com gentamicina foram analisadas por cromatografia líquida acoplado aos espectrômetros de massas em sequência (LC/MS-MS). O método utilizado não foi desenvolvido para esse trabalho, testou-se e validou-se o método e condições cromatográficas a seguir para gentamicina, porém sua utilização já foi aplicada e validada anteriormente em outras análises de outros compostos, como por exemplo, tetracilinas. As condições cromatográficas utilizadas foram:

- ✓ Coluna: Shodex RSPACK D4-613 (150 mm x 4.6mm).
- ✓ Temperatura do termostato da coluna: 50°C
- ✓ Temperatura do auto sampler: 25°C
- ✓ Fluxo da fase móvel: 1,0 ml/min.
- ✓ Transição analisada: 320 > 160.0
- ✓ Tempo de corrida: 4 minutos
- ✓ Fase móvel: Metanol 30%/Água com 0,1 % de ácido fórmico

4.3 Reagentes

- ✓ Ácido trifluoracético, pureza 99,5 %, MERCK.
- ✓ Ácido fórmico, pureza 96 %, TEDIA.
- ✓ Metanol, grau de pureza cromatográfica HPLC, JTBAKER.

- ✓ Padrão-Sulfato de Gentamicina, potência 619,6 µg/mg, fornecido pela Schering Ploug (Lote: 30303162)
- ✓ Água purificada, MilliQ

4.4 Soluções

- ✓ Ácido trifluoracético a 50 % em solução aquosa água.
- ✓ Ácido fórmico 0,1 % em solução aquosa com metanol.

4.5 Equipamentos, acessórios e vidraria

- ✓ Cromatógrafo líquido de alta performance (HPLC) LC-10AC, SHIMADZU.
- ✓ Espectrômetro de massas, QUATTRO-MICROMASS.
- ✓ Injetor CTC Analytics, HPLC LEAP Technologies.
- ✓ Coluna cromatográfica Shodex RSPACK D4-613 (150 mm x 4.6mm).
- ✓ Sistema de purificação de água Milli Q – Plus Millipore®.
- ✓ Centrifuga Beckman, modelo 152 Microfuge.
- ✓ Pipetas automáticas GILSON (volumes: 20 µL, 100 µL, 200µL e 10 ml).
- ✓ Balança analítica OHAUS Analytical Plus.
- ✓ Vórtex IKA, MS1 Minishaker.
- ✓ Tubos *ependorf*, volume: 2ml.

4.6 Método analítico para a determinação de gentamicina em leite

Para a determinação de gentamicina em leite, empregou-se o seguinte método analítico:

- ✓ Em um tubo *ependorf* pipetou-se 0,2 ml de amostra de leite e 10 μ L da solução de ácido trifluoroacético a 50% em água;
- ✓ Agitação em vórtex por 30 segundos;
- ✓ Centrifugação a 14000 rpm por 5 min;
- ✓ Pipeta-se 100 μ L para outro tubo *ependorf* e adiciona-se 200 μ L de água.
- ✓ Agitação em vórtex por 30 segundos;
- ✓ Injeção automática de 10 μ L do filtrado no cromatógrafo segundo as condições mencionadas no item 4.3.

A Figura 3 ilustra a marcha analítica da extração de gentamicina leite.

Figura 3. Marcha analítica utilizada na determinação da gentamicina em leite.

Amostras de leite enriquecido com gentamicina em diferentes concentrações, foram utilizadas na construção da curva de calibração no momento da análise.

4.7 Parâmetros de validação

A validação do método consiste na avaliação dos seguintes parâmetros: linearidade, curva de calibração, limite de quantificação, recuperação, precisão inter e intra-ensaio, exatidão e estabilidade.

4.7.1 Estudo de linearidade

O estudo de linearidade do método corresponde à capacidade de uma metodologia analítica demonstrar que os resultados obtidos são diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra, dentro de um intervalo especificado.

Para o estudo de linearidade é preconizado que seja feita a análise de no mínimo 5 concentrações diferentes (BRASIL,2003).

No estudo deste parâmetro, amostras de leite foram adicionadas de solução-padrão de gentamicina de forma a fornecer as concentrações descritas na Tabela 6 e analisadas em duplicatas por procedimentos específicos descritos no item 4.6.

Tabela 6. Intervalo dinâmico ($\mu\text{g/mL}$) das curvas de calibração de gentamicina em leite, e procedimento analítico específico.

Matriz	C1	C2	C3	C4	C5	Análise item
Leite	0.1	0.2	0.5	1.0	1.5	4.6

4.7.2 Curva de calibração

A curva de calibração é a representação da relação entre a resposta do instrumento e a concentração conhecida do analito.

Para o preparo da curva de calibração foi adicionada às amostras de leite uma solução-padrão de gentamicina, nas seguintes concentrações: 0.1, 0.2, 0.5, 1.0, 1.5 $\mu\text{g/mL}$. As amostras, assim como os respectivos brancos foram submetidos aos procedimentos analíticos específicos, em duplicata, conforme descritos no item 4.6.

A partir dos resultados dessas análises, as regressões lineares foram obtidas, usando-se então, as equações da reta para o cálculo de gentamicina nas amostras. Através da confecção de gráfico das concentrações versus a área do pico obteve-se a equação da reta, corroborando a linearidade dos pontos pertencentes à faixa dinâmica.

Tabela 7- Concentrações de gentamicina ($\mu\text{g/mL}$) utilizadas no preparo das curvas de calibração para as amostras de leite e o número de replicatas.

Matriz	C1	C2	C3	C4	C5	n
Leite	0.1	0.2	0.5	1.0	1.5	2

4.7.3. Limite de Quantificação

Estabelecido através da análise de soluções contendo concentrações decrescentes do fármaco até o menor nível determinado com precisão e exatidão aceitáveis (BRASIL, 2003). As análises para essa determinação foram realizadas em duplicatas, segundo procedimento analítico no item 4.6.

4.7.4 Recuperação

A recuperação é apresentada pela eficiência de extração de um método analítico, expressa como a porcentagem da quantidade conhecida de um analito, obtida da comparação dos resultados analíticos de amostras branco acrescidas de padrão e submetidas ao processo de extração, com os resultados analíticos de soluções padrão não extraídas. O cálculo da recuperação deve ser feito em função da relação de área do padrão extraído e não extraído (BRASIL, 2003). O teste de recuperação para gentamicina em leite foi realizado utilizando duas concentrações diferentes de gentamicina. Os resultados de recuperação do analito e do padrão

interno próximos a 100% são desejáveis, porém, são aceitos valores menores, desde que a recuperação seja precisa e exata (BRASIL, 2003).

4.7.5 Precisão do método analítico

A precisão do método analítico é a representação do grau de repetibilidade entre os resultados de análises individuais, quando o procedimento é aplicado diversas vezes numa mesma amostra homogeneia, em condições idênticas de ensaio (BRASIL, 2003). 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 (BRASIL, 2003). Para avaliar a precisão, amostras de leite enriquecidas com concentrações diferentes de gentamicina (baixa e alta da faixa dinâmica) foram preparadas e analisadas em três replicatas para o estabelecimento da precisão intra-ensaio e em 2 dias consecutivos para a precisão inter-ensaio (BRASIL,2003).

4.7.6 Exatidão

A exatidão de um método analítico é representada pela proximidade dos resultados obtidos pelo método em estudo em relação ao valor verdadeiro. Neste trabalho foram analisados um pool de leite enriquecidos com as mesmas concentrações de solução-padrão de gentamicina descritas no estudo de recuperação do método e analisadas em seis replicatas, segundo o procedimento

específico de análise para descritos no item 4.6 (BRASIL,2003).

4.7.7 Estabilidade

O estudo da estabilidade é o parâmetro que visa determinar se um analito mantém-se quimicamente inalterado numa dada matriz sob condições específicas, em determinados intervalos de tempo (BRASIL,2003). Para esse estudo as amostras de leite foram enriquecidas com a concentração de 1,2 ng/mL e a estabilidade foi verificada quanto à armazenagem de longa duração (congelamento) e curta duração (à temperatura ambiente), após ciclos de congelamento e descongelamento e nas condições de análise.

4.7.8 Análise das amostras de leite comercializadas em São Paulo e de leite in natura

As amostras de leite comercializadas em São Paulo e de leite in natura foram submetidas ao método descrito em 4.6.

5. RESULTADOS

Os resultados obtidos são referentes ao processo de validação da metodologia empregada, das amostras de leite comercialmente obtidas na cidade de São Paulo e das amostras de leite de animais tratados com gentamicina.

5.1 Linearidade

A Figura 4 ilustra a linearidade obtida pelo enriquecimento de pool de leite comercial, onde cada ponto corresponde à média dos valores encontrados nas análises em duplicata, e o coeficiente de determinação (r^2) obtido foi de 0,992557.

Figura 4. Curva de linearidade da gentamicina em leite.

5.2 Perfil cromatográfico e espectro de massa da gentamicina

O perfil cromatográfico da gentamicina, nas concentrações de 0,1 e 1,2 µg/mL em leite são ilustrado nas Figuras 5 e 6. A Figura 7 ilustra o espectro de massa da gentamicina.

Figura 5. Perfil cromatográfico da gentamicina 0,1 µg/mL em leite

Figura 6. Perfil cromatográfico da gentamicina 1.2 µg/mL em leite

Figura 7. Espectro de massas da gentamicina.

5.3. Limite de quantificação

O limite de quantificação do método utilizado foi de 0,1µg/mL, onde o desvio-padrão variou de 0,002 a 0,007 e o coeficiente de variação de 2,2 a 7,0%.

5.4 Recuperação

Os valores do estudo de recuperação para a gentamicina são apresentados na Tabela 8.

Tabela 8. Recuperação da gentamicina em amostras de pool de leite nas concentrações de 0,3 (CQB) e 1,2 (CQA) ug/mL.

ENSAIO DE RECUPERAÇÃO DO ANALITO				
ANALITO				
Analito (replicatas)	Lote EXTRAÍDO (Área)		Lote NÃO EXTRAÍDO (Área)	
	CQB	CQA	CQB	CQA
1	900	3063	830	3507
2	850	3158	1001	3648
3	856	3301	860	3584
4	873	3197	909	3708
5	782	3467	945	3737
6	807	3560	913	3728
Média	910	3652	845	3291
DP	61	91	43	191
Coeficiente de Variação (%)	6,7	2,5	5,1	5,8
Recuperação (%)	92,9	90,1	REC média analito (%):	91,5

DP: desvio padrão

CQA: controle de qualidade de alta concentração.

CQB: controle de qualidade de baixa concentração.

5.6 Precisão e Exatidão

Os coeficientes de variação e seus respectivos desvios-padrão obtidos no estudo intra-ensaio e inter-ensaio para as amostras de leite adicionadas de gentamicina nas concentrações: 0,1, 0,3, e 1,2 ng/ml estão apresentados na Tabela 9.

Os resultados da precisão e exatidão do método de gentamicina em leite por LC/MS-MS estão apresentados na Tabela 10.

Tabela 9. Resultados das análises intra e inter dias de gentamicina em amostras de pool de leite.

ENSAIOS DE PRECISÃO E EXATIDÃO									
Conc. (ug/mL)	Ensaio 1			Ensaio 2			Ensaio 3		
	0,1	0,3	1,2	0,1	0,3	1,2	0,1	0,3	1,2
	0,115	0,3308	1,2203	0,1053	0,3172	1,169	0,1085	0,3009	1,2694
	0,1055	0,3316	*	0,1054	0,3176	*	0,1093	0,3016	*
	0,0973	0,3387	1,1963	0,1005	0,3562	1,1706	0,0958	0,3255	1,2897
	0,1052	0,338	1,3111	0,1024	0,3115	1,2187	0,092	0,3458	1,1739
	0,0998	0,3346	1,236	0,1061	0,3152	1,1906	0,1067	0,3195	1,2209
	0,1107	0,3355	1,1437	0,1021	0,3177	1,1938	0,1014	0,3076	1,185
Média	0,11	0,33	1,22	0,10	0,32	1,19	0,10	0,32	1,23
DP	0,01	0,00	0,06	0,002	0,02	0,02	0,01	0,02	0,05
CV (%)	6,2	1,0	5,0	2,2	5,2	1,7	7,0	5,5	4,1
Exat (%)	105,6	111,6	101,8	103,6	107,5	99,0	102,3	105,6	102,3

*Valores fora da faixa de aceitação

DP: desvio padrão

CV: coeficiente de variação

Tabela 10 Resultados da precisão e exatidão do método de gentamicina em leite por LC/MS-MS

RESULTADOS DE PRECISÃO E EXATIDÃO						
	Intra-ensaio			Interensaio		
Conc. (µg/mL)	0,10	0,30	1,2	0,10	0,30	1,2
Precisão {CV (%)}	2,2	5,2	1,7	5,4	4,7	3,9
Exatidão (%)	103,6	107,5	99,0	103,8	108,3	101,1

5.7 Estabilidade

Os resultados para o estudo de estabilidade em leite são apresentados na Tabela 11, e em solução aquosa na Tabela 12.

Tabela 11. Estabilidade da gentamicina em pool de leite

ENSAIOS DE ESTABILIDADE		
CQs	Controle (t = 0)	CCD 3 ciclos
CQA 1,2 (µg/mL)	0,9414	0,9824
	1,1448	1,086
	1,0583	1,0781
	1,127	1,1145
	1,3906	1,1176
	1,0217	1,1262
Média	1,1	1,1
Desvio padrão	0,2	0,1
C.V. (%)	13,9	4,9
Desvio em relação ao controle (%)	-	-2,7

CV: coeficiente de variação

CQA: controle de qualidade de alta concentração.

CQ: controle de qualidade

Tabela 12. Estabilidade da solução-padrão de gentamicina em água.

ENSAIOS DE ESTABILIDADE DA SOLUÇÃO-PADRÃO			
ANALITO	Controle	Bancada 6 h	Geladeira 6 h
	Analito	Analito	Analito
	3507	3673	4849
	3648	3772	3942
	3584	3959	3644
	3708	3745	3950
	3737	3736	3868
	3728	3845	4117
MÉDIA	3689	3821	3895
DESV.PAD	71	104	197
CV%	1,9	2,7	5,0
Desvio (%)	-	3,6	5,6

CV: coeficiente de variação

5.8 Amostras analisadas

Das 48 amostras de leite comercializadas na cidade de São Paulo somente uma se mostrou positiva para resíduos de gentamicina, apresentando o valor de 0,112 ug/mL, superior ao LMR de 100 µg/ml estabelecido pela União Européia (UE), já para o leite *in natura*, das 55 amostras analisadas quatro amostras foram positivas para presença de gentamicina e apresentaram valores superiores dos estabelecido pela UE.

A Tabela 13 apresenta as amostras de leite positivas de animais submetidos a tratamentos com gentamicina e a comparação com os valores de LMR estabelecidos para este antibiótico.

Tabela 13. Amostras de leite in natura positivas para gentamicina e seus valores de Limite Máximo de Resíduo.

Nº amostra	TIPO	RESULTADO (µg/ml)	LMR	
			EU 100 µg/kg	Codex 200 µg/L
086	Leite <i>in natura</i>	0,155	X	-
095	Leite <i>in natura</i>	0,192	X	-
098	Leite <i>in natura</i>	0,130	X	-
104	Leite <i>in natura</i>	0,167	X	-

5.8.1 Cromatogramas das amostras positivas para gentamicina em leite comercializado na cidade de São Paulo e leite de vaca in natura.

Os cromatogramas apresentados nas Figuras 8, 9, 10, 11 e 12 referem-se a amostras positivas para gentamicina em leite.

Figura 8. Amostra 023 (leite de marca comercial) positiva para gentamicina.

Figura 9. Amostra 086 (leite de vaca in natura) positiva para gentamicina.

Figura 10. Amostra de 095 (leite de vaca in natura) positivo para gentamicina.

Figura 11. Amostra 098 (leite de vaca in natura) positiva para gentamicina.

Figura 12. Amostras 104 (leite de vaca in natura) positiva para gentamicina

5.8.2 Representação gráfica da dispersão das amostras positivas de leite in natura para gentamicina em comparação ao limite máximo de resíduos.

A Figura 13 ilustra os valores obtidos nas amostras de leite analisadas positivas para gentamicina e o limite máximo de resíduo de gentamicina.

Figura 13. Dispersão gentamicina e o limite máximo de resíduos.

5.8.3 Representação gráfica da porcentagem de amostras positivas para gentamicina acima do limite máximo de resíduos para o leite in natura.

A Figura 14 ilustra a porcentagem de valores obtidos de amostras positivas para gentamicina acima do limite máximo de resíduos que é de 100 µg/ml.

Figura 14. Porcentagem de valores obtidos de gentamicina acima do limite máximo de resíduos.

5.8.4 Representação gráfica da porcentagem de amostras positivas para gentamicina acima do limite máximo de resíduos para o leite de marca comercial

A Figura 15 ilustra a porcentagem de valores obtidos de amostras positivas para gentamicina acima do limite máximo de resíduos que é de 100 µg/ml

Figura 15. Porcentagem de valores obtidos de gentamicina acima do limite máximo de resíduos.

6. DISCUSSÃO

Durante o levantamento bibliográfico, diversos artigos foram encontrados mostrando a extração em fase sólida como a técnica de eleição na detecção da gentamicina em amostras de leite. A maioria dos artigos pesquisados enfatizava a utilização de colunas SPE (*Solid Fase Extraction*) para extração da gentamicina antes da quantificação do analito por LC/MS-MS. A variação nestes artigos é a forma como a desproteinização é efetuada, algumas utilizando ácidos como o TCA (Ácido Tricloroacético a 30 %, ou a 10%), outras HCL (ácido clorídrico), ou ainda utilizando solventes como metanol e acetonitrila.

Tentou-se realizar a extração de gentamicina em fase sólida e posterior leitura em LC/MS-MS, mas todas as tentativas se mostraram desalentadoras, uma vez que os picos eram muito pequenos e em algumas tentativas não eram observados. Acreditava-se que o problema estava na forma de extração e que a gentamicina deveria estar retida na coluna já que em alguns testes a taxa de recuperação se mostrava muito baixa.

Assim, considerou-se que o problema da análise poderia estar na forma como o leite era centrifugado, pois este processo estava sendo realizado por 10 minutos a 5000 rpm, o que de acordo com os artigos pesquisados não seria suficiente, pois o ideal seria ter uma ultracentrifugação com rotação de pelo menos 14000 rpm, ou seja antes de ser desproteinizado, o leite deveria passar por uma pré-centrifugação antes da extração por coluna SPE. Tentou-se mais uma vez utilizar

colunas SPE, mas novamente os resultados se mostraram insatisfatórios.

O leite tem em sua composição alto teor de gordura, proteínas e alguns minerais como cálcio, configurando-se como uma matriz muito complexa, acarretando o acúmulo de sujeira no canhão de leitura do espectro de massa após a análise de diversas amostras.

Todas as amostras de leite usadas nos testes iniciais foram obtidas de leites comercializados em supermercados, sendo inicialmente utilizado o tipo semi-desnatado, que apresenta 1,9 a 0,6% de teor de gordura. Após passar a utilizar a centrífuga de alta rotação, na temperatura de 4°C, observaram-se resultados mais adequados no LC/MS-MS.

A proposta inicial do trabalho era o de se determinar a presença de gentamicina em amostras de leite de animais que apresentavam mastite e que haviam sido tratados com gentamicina e comprovar que mesmo após o período de carência era possível detectar esse antibiótico nas amostras de leite. Assim, seria necessário incluir na bula no medicamento um novo tempo de carência, uma vez que normalmente este tipo de ensaio é realizado com animais sadios.

Durante o processo de validação do método o foco foi alterado, pois verificou-se a presença de gentamicina em amostra de leite de marca comercializada em um grande estabelecimento da cidade de São Paulo e que o valor apresentado era superior ao estabelecido pela EU. Assim, optou também por analisar amostras de leite comercializadas na cidade de São Paulo, processadas por UHT ou por pasteurização. No Brasil, até o momento, ainda não foi definido o limite máximo de resíduo em alimentos para este antibiótico.

A validação de um método utilizando uma matriz complexa como o leite foi um dos principais desafios encontrados. Diversos trabalhos apresentam a extração em fase sólida como alternativa eficiente, porém após diversos testes e tentativas optou-se por realizar a desproteinização utilizando TFA a 50%. Samanidou & Nisyriou, 2008, preconizam o uso de TFA 1%.

Os autores Heller et al, 2005, Kijak, et al, 1997, indicam o uso de ácido Tricloroacético a 30%, enquanto Cherlet, et al, 2000 utilizou 2% de TCA em tampão fosfato.

No presente trabalho estes métodos foram testados sem sucesso.

A solubilidade da gentamicina em solventes orgânicos é considerada baixa, desta forma, para a sua determinação utilizando a técnica cromatografia, na composição da fase móvel deve ser adicionado ácido fórmico que permite a solubilização da gentamicina em metanol (Heller et al, 2005).

A técnica validada apresenta como vantagem a fácil realização e aplicação, apenas necessitando a desproteinização e centrifugação para posterior injeção, o que facilita a reprodução da técnica e pode ser aplicada para um grande número de amostras.

O Programa de Análise de Resíduos de Medicamentos Veterinários em Alimentos de Origem Animal – PAMVet, pesquisa resíduos de antibióticos no leite, a partir de um plano de amostragem por estados.

No Estado de São Paulo, de acordo com o último relatório publicado em 2005, foram coletadas 57 amostras em diversos estabelecimentos comerciais. No presente trabalho coletou-se um número de 48 amostras da cidade de São Paulo, o que indica ser este um número aceitável de amostras, se comparado ao

PAMVET que coleta um número aproximado em todo o Estado de São Paulo (BRASIL, 2005).

Lamentavelmente, o programa não avalia amostras de leite *in natura*, porém o número de amostras analisadas também se mostra dentro de um número aceitável quando se compara com as coletas usadas em um programa de abrangência nacional como o PAMVET.

No programa PAMVET, de 2005 foram analisadas 312 amostras, sendo que 11% desta amostras de mostraram positivas nos testes de triagem, porém não puderam ser confirmadas, pois não havia nos laboratórios da rede métodos confirmatórios (BRASIL, 2005). Isto mostra a importância de ensaios confirmatórios para constatar a positividade das amostras de alimentos em relação aos antibióticos.

Os resultados obtidos nesse trabalho em que 4 (quatro) amostras de leite de vaca *in natura* se mostraram positivos para gentamicina e apenas 1 (uma) amostra de leite de marca sugerem a necessidade de estudos mais aprofundados sobre o período de carência dos medicamentos utilizados para tratamento de mastite e a possível inclusão da gentamicina nos programas governamentais de resíduos de antibióticos em alimentos no Brasil. Os resultados positivos estão acima do LMR de 100 ug/ML estabelecidos pela União Européia, pois no Brasil ainda não foram estabelecidos limites para resíduos de gentamicina em alimentos, desta forma são utilizados valores internacionais. Raia, 2005 em seu estudo aponta que a maioria das amostras positivas para gentamicina nos testes de triagem utilizados eram de animais tratados para mastite clínica (47,7%) e subclínica (34,9%). A confirmação utilizando técnicas cromatográficas se deu em 4 casos.

O resultado apresentado por Raia, 2005 e neste estudo indica que um dos principais fatores para a presença de resíduos no leite é o tratamento dos animais doentes, aliada a persistência dos medicamentos nos processos inflamatórios.

Os resultados obtidos nesse trabalho assim como os resultados obtidos nos artigos pesquisados (Folly & Machado, 2001; Barros, et al, 2001, Borges, et al, 2000) ressaltam a importância da necessidade de controles mais rigorosos e inspeções mais criteriosas nas fazendas produtoras de leite para que se possa garantir a melhora na qualidade do leite que é vendido e consumido pela população.

As políticas de qualidade do leite produzido devem ser voltadas para a utilização correta de terapias envolvendo antibióticos e a conscientização dos produtores sobre os riscos do consumo de leite contendo resíduos de antibióticos.

Outro ponto importante que deve ser levado em consideração na aplicação de políticas e programas envolvendo a qualidade do leite são os possíveis problemas, na produção de seus derivados que pode ser afetada ocasionando prejuízos na produção. A aplicação das medidas aliada ao aumento da produção de leite no Brasil poderá permitir que o país seja inserido em melhores posições no mercado internacional, fornecendo produtos de boa qualidade.

Do ponto de vista toxicológico a preocupação em torno dos resíduos em leite é voltada para o consumo de leite in natura visto que este apresentou um “n” maior de amostras positivas para resíduos de gentamicina, assim a população que consome o leite tipo C ou o leite diretamente após a ordenha expõe-se mais a presença do medicamento e possíveis efeitos que o consumo destes resíduos possa acarretar, do que o restante da população que consome o leite UHT.

Os parâmetros de validação estudados e os resultados obtidos permitem considerar que o método escolhido para determinação da gentamicina apresentou resultados confiáveis para as amostras de leite positivas para esse antibiótico.

7. Conclusão

De acordo com os resultados experimentais obtidos no presente trabalho pode-se concluir que:

- A desproteinização de amostras de leite deve ser feita com ácido forte em altas concentrações para uma melhor quantificação da gentamicina.
- A metodologia aplicada e validada para determinação de gentamicina em amostras de leite utilizando Cromatografia Líquida acoplada ao Espectrômetro de Massas (LC/MS-MS) apresentou linearidade, limite de quantificação, exatidão, precisão e recuperação adequados.
- Mesmo respeitando o período de carência de 96hs estabelecido em bula ainda foi possível detectar e quantificar o antibiótico nas amostras de leite.

8.Recomendação

- ✓ Rever testes para determinação do período de carência
- ✓ Inserir a Gentamicina no PAMVET
- ✓ Realizar inspeções por amostragem nas fazendas para controle da presença dos resíduos no leite.
- ✓ Realizar inspeções periódicas por amostragem nas marcas de leite comercial para verificação da presença de gentamicina e outros antimicrobianos.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALTERTHUM, F Origem e natureza química dos principais agentes antibacterianos. In: TRABULSI, L.R., ALTERTHUM, F., GOMPERTZ, O.F, CANDEIAS, J.A.N. **Microbiologia**, 3.ed. São Paulo, Atheneu, 1999, p.87-92.

ALTHAUS, R.L; TORRES A., MONTERO, S., BALASCH, S., MOLLINA M. P., Detection Limits of Antimicrobials in Ewe Milk by Delvotest Photometric Measurements **J.Dairy Sci.**; v.86: p457-463, 2003

BLACK, W.D. The use of antimicrobial drugs in agriculture. **Can. J. Physiol. Pharmacol.**, Ottawa, v62, p.1044-148,1984.

BARTON, M.D. Antibiotic use in animal feed and its impact on human health. **Nutrit. Research Reviews** v13, p.279-299, 2000.

BARROS, G.M.S.; JESUS, N.M.; SILVA, M.H. Pesquisa de resíduos de antibióticos em leite pasteurizado tipo C, comercializado na cidade de Salvador. **Rev. Bras. Saúde Prod. An.** v.2.n.3, p.69-73, 2001.

BORGES,G.T., SANTANA, A.P.,MESQUITA, A.J., MESQUITA, S.Q.P., *et al.* Ocorrência de resíduos de antibióticos em leite pasteurizado integral e padronizado produzido e comercializado no estado de Goiás. Goiânia: **Ciência Animal Brasileira**. v.1. 2000

BOGIALLI S.,CURRINI R.,DI CORCIA A.,LAGANA A. S., et al.; Simple confirmatory assay for analyzing residues of aminoglycoside antibiotics in bovine milk: hot water extraction followed by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**,v.1067, p.93-100,2005.

[BRASIL]. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Medicamentos. Inspeção. Centros de Bioequivalência. Legislação. Resolução n.899, de 29 de maio de 2003. Determina a publicação do “**Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos**”. Disponível em <http://e-legis.bvs.br/leisref/public/showAct.php?id=15132&word>. Acesso em: 30 julho 2008

[BRASIL]. Portaria n.51, de fevereiro de 1996. O Ministério da Agricultura do Abastecimento institui o Plano Nacional de Resíduos Biológicos em produtos de origem animal-PNCBR. **Diário Oficial da União**, Brasília, n.23, 7 fev.1986.

[BRASIL]. Portaria n.51, de setembro de 2002. O Ministério da Agricultura do Abastecimento aprova os regulamentos técnicos de produção e qualidade do leite. **Diário Oficial da União**, Brasília, 15 ago.2002.

[BRASIL]. **Ingestão diária aceitável e Limite Máximo de resíduos** acervo.anvisa.gov.br/auxiliary/pt/gacta_pamvet_ida.pps .-2003 Acesso em: 18 dez 2008.

[BRASIL]. Portaria n.72, de 3 de junho de 1998. O Ministério da Agricultura do Abastecimento e da Reforma Agrária estabelece o Programa de Controle e Resíduos Biológicos em Leite (PCRBL). **Diário Oficial da União**, Brasília, n.107, 8 jun.1998. Secção I, p.131.

[BRASIL]. **Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Alimentos. Comissões. Resíduos.** Disponível em <http://www.anvisa.gov.br/alimentos/comissoes/residuos.htm> Acesso em: 10 jan. 2008.

[BRASIL] **Programa Nacional de Análises de Resíduos de Medicamentos Veterinários em Alimentos Expostos ao Consumo – PAMVet.** Disponível em <http://www.anvisa.gov.br/alimentos/pamvet/pamvet.pdf> . Acesso em 10 dez.2007.

BACKER,P; CHERLET, M., BAERE S.,Determination of gentamicin in swine and calf tissues by high-performace liquid chromatography combined with e electrospray ionization mass spectrometry. **Journal of mass espectrometry.** 2000,v.35, p.1342-1350

CAI, Y. et al .Comparative study on the analytical performance of three waveforms for the determination of several aminoglycoside antibiotics with high performance liquid chromatography using amperometric detection. **Journal of Chromatography A.** 2005, 1085. p.124–130

CODEX ALIMENTARIUS. **Maximum Residue Limits for Veterinary Drugs in Foods** (July 2008). Disponível em: www.codexalimentarius.net/download/standards/45/MRL2_e.pdf. Acesso em 03 Ago 2008.

CODEX ALIMENTARIUS. **Veterinary Drugs Residues in Foods**. Disponível em: http://www.codexalimentarius.net/mrls/vetdrugs/jsp/vetd_q-e.jsp- 2006. Acesso em 28 dez 2008.

COLLINS-THOMPSON, D.L., WOOD, D.S., THOMSON, I.Q. Detection of antibiotic residues in consumer milk supplies in North América using the Charm Test II procedure. **J. Food Prot.**, Des Moines, v.51, n.8, p.632-633, 1988

COSTA E.O. Uso de antimicrobianos na mastite. In: SPINOSA, H.S.;GORNIAK, S.L.; BERNARDI, M.**Farmacologia aplicada a Medicina Veterinária**. 3 ed Rio de Janeiro: Guanabara Koogan,2002. cap.42.p.443-445.

COSTA E.O. Resíduos de antibióticos no leite: um risco à saúde do consumidor. **Higiene Alimentar**, v.10, n.44, p.15-17,1996.

COSTA E.O. Importância da mastite na produção leiteira do país. **Rev. Educ. Continuada**. São Paulo , v1, n1,p.3-9, 1998.

CHASIN, A.A.M.; NASCIMENTO, E.S.; NETO, L.M.R. Validação de métodos em análises toxicológicas: uma abordagem geral. **Rev. Bras. Toxicol.**, São Paulo, v.11, n.1, p.1-6, 1998.

DENOBILE M.; **Análise de resíduos dos antibióticos oxitetraciclina, tetraciclina e doxiciclina, em leite, por cromatografia líquida de alta eficiência.** 2002.121f. Dissertação (Mestrado)-Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas. São Paulo, 2002.

DENOBILE, M. & NASCIMENTO, E.S. Validação de método para determinação de resíduos dos antibióticos oxitetraciclina, tetraciclina, clortetraciclina e doxiciclina, em leite, por cromatografia líquida de alta eficiência. **Rev. Bras. Ciências Farmacêuticas**, v. 40, n.2,p.209-218, 2004.

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

DE PIETRO A.C.; CASS Q.B.;Quantificação dos componentes da gentamicina em medicamentos veterinários utilizando cromatografia de pareamento iônico e ELSD. São Carlos: **30º Reunião da Sociedade Brasileira de Química**, QA-151, 2006.

EMBRAPA. Agência de informação Embrapa-Agronegócio do Leite. Disponível em http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/Agencia8/AG01/arvore/AG01_168_2172003_9245.html. Acesso em: 18 dez 2008.

EMA. The European Agency for the evaluation of medicinal products veterinary medicines and inspections. **Committee for veterinary medicinal products**. Nov. 2001. Disponível em <http://www.emea.europa.eu/pdfs/vet/mrls/080301en.pdf>. Acesso em: 18 dez 2008.

EURACHEM. **Fitness for purpose of analytical methods: a laboratory guide to method validation and related topics**. Teddington: Eurachem, 54p, 1998.

[FDA]. Codex Activities. **Committee on Residues of Veterinary Drugs in Foods**. Disponível em: <http://www.cfsan.fda.gov/~cjm/codexvdf.html>. Acesso em: 30 jul 2008.

[FDA]. **Department of Health and Human Services**. Disponível em: <http://www.fda.gov/cvm/Guidance/fguide152.pdf>. Acesso em: 03 ago 2008.

[FDA] Department of Health and Human Services- **Tolerance and/or Safe Levels of Animal Drug Residues in Milk**. Disponível em: <http://www.cfsan.fda.gov/~ear/mj-05-5.html>. Acesso em: 03 ago 2008.

[FAO] **Summary of Evaluations Performed by the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives.** Disponível em: http://jecfa.ilsi.org/new_listnames.cfm?SelectedClass=VETERINARY_DRUGS&criteria=FUNCTIONAL_CLASS. Acesso em: 19 dez 2008.

[FAO]. **FAO/WHO Food Standards- Codex Alimentarius.** Disponível em: <http://www.codexalimentarius.net/mrls/servelet/VetDrugServlet?Substances=335&Item>. Acesso em: 07 ago 2008.

FISHER, L.D.; VAN BELLE, G. *Biostatistics: a methodology for the health science*. New York: **Wiley-Interscience**, 1993. 991p. (Wiley series in probability and mathematical statistics. Applied probability and statistics).

FOLLY M.M.;MACHADO S.C.A.; Determinação de resíduos de antibióticos, utilizando-se métodos de inibição microbiana, enzimático e imunoensaios no leite pasteurizado comercializado na região norte do estado do Rio de Janeiro, Brasil. Rio de Janeiro: **Ciência Rural**,v.31,n1,p.95-98,2001.

FONSECA, L.F.L., SANTOS, M.V. Eficácia da gentamicina e cloxamicina para tratamento intramamário de vacas secas.**Vet. Nov.**v.6,n.2,2000.

GOODMAN L.S.; GILMAN A.;LAURENCE L.; LAZO J.S.; PARKER K.L.; **Pharmacological basis of therapeutics**; 11 ed. New York: McGraw-Hill.2006.2021p.

GAUDIN V.;CARDIEU N.; SANDERS P.; Results of a European proficiency test for the detection of streptomycin/ dihydrostreptomycin, gentamicin and neomicin in milk by ELISA and biosensor methods. France: **Analytica Chimica Acta**, 2005.273-283p.

GHIDINI, S.; ZANARDI, E. CONTER, M.; VARISCO, G.; BOLZONI, G. IANIERI, A.; Residues of Aminoglycosides in Milk: Confirmatory Analysis. Brescia: **Veterinary Research Communications**.2007.31.p 365-367.

HELLER, D.N.; CLARK S.B.; RIGHTER H.F.; Confirmation of gentamicin and neomycin in milk by weak cation-exchange extraction in electrospray ionization/ion trap tandem mass spectrometry. Maryland: **Journal of Mass Espectrometry**, 2000. 35, p.39-49.

HELLER, D.N. *et al.*; LC/MS/MS measurement of gentamicin in bovine plasma, urine, milk, and biopsy samples taken from kidneys of standing animals. Starkville: **Journal of Chromatography B**. 2005, 821, p.22-30.

IBGE. Pesquisa de orçamentos familiares 2002-2003. Disponível em <http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/populacao/condicaodevida/pof/2002aquisicao/default.shtm>. Acesso em 10 ago. 2008.

JIN Y., JANG J.W.,HAN C.H.,LEE M.H., Development of ELISA and Immunochromatographic Assay for the Detection of Gentamicin. Seoul: **Journal of Agricultural Food Chemistry**. 2005, v.53, p.7639-7643

KIJAK P.J.; JACKSON J.; SHAIKH B.; Determination of gentamicin in bovine milk using liquid chromatography with post-column derivatization and fluorescence detection.Beltsville: **Journal of Chromatography B**. 1996, 691, p.377-382.

LOGUERCIO A.P *et al.* Atividade *in vitro* do extrato de própolis contra agentes bacterianos da mastite bovina. **Pesq. Agropec. Bras.** Brasília, v.41,n.2,p.347-349,fev.2006.

L.C-Y.; FENG.C-H. On-line concentration of neomycin and screening aminoglycosides in milk by short capillary column and tandem mass spectrometry. **J. Sep. Sci.**Taiwan,2006. 29 p.2143-2148.

MEDEIROS, N.G.A., CARVALHO, M.G.X., SANTOS, M.G.O., SUELY, CP.L. Detecção de antibióticos no leite in natura consumido no município de Patos, Paraíba. **Higiene Alimentar**. São Paulo, v.18, n.124, p.85-88, 2004.

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.

NASCIMENTO, G.G.F., MAESTRO, V. CAMPOS, M.S.P., OCORRÊNCIA DE RESÍDUOS DE ANTIBIÓTICOS NO LEITE COMERCIALIZADO EM PIRACICABA, SP. Campinas: **Rev. Nutr.**, v.14(2), p.119-124, 2001

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

OGA,S.; **Fundamentos de Toxicologia**. São Paulo. Atheneu 1996. 515p.

OLIVEIRA, João Fernando P., CIPULLO, José Paulo and BURDMANN, Emmanuel A. Aminoglycoside nephrotoxicity. **Rev Bras Cir Cardiovasc**, Oct./Dec. 2006, vol.21, nº.4, p.444-452. ISSN 0102-7638

O' NEIL M.J; The Merck Index: The Merck Index: An Encyclopedia of Chemicals, Drugs, and Biologicals.; 14º ed.; Whitehouse Station, NJ; 2006. 2564 p.

PHILLIPS, I. CASEWELL, M. COX, T. GROOT, B. FRIIS, C. JONES, R. NIGHTINGALE, C. PRESTON, R. WADDELL, J. Does the use of antibiotics in food animals pose a risk to human health? A critical review of published data. **J. Antimicrobial Chemotherapy**, v.53 p.28-52, 2004.

RAIA JUNIOR, R.B. **Influência da mastite na ocorrência de resíduos de antimicrobianos no leite**. 2001. 78p. Dissertação (Mestrado em Toxicologia e Análises Toxicológicas) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, São Paulo.

RAIA JUNIOR, R.B.; **Resíduos de antimicrobianos no leite em diferentes protocolos de tratamento e controle de mastite em bovinos leiteiros.** 2005. 64f. Qualificação (Doutorado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas. São Paulo. 2005

RAIA JUNIOR, R.B.; **Fatores fisiológicos, clínicos e farmacológicos, determinantes de resíduos de antimicrobianos no leite, avaliados em protocolos terapêuticos de mastite em bovinos leiteiros.** 2006. 85f. Dissertação (Doutorado em Toxicologia e Análises Toxicológicas) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas. São Paulo. 2006

RAIA JUNIOR, R.B.; COSTA E.O. Influence of mastitis on the withdraw periodo of several intramamary and parenteral antimicrobial agents used in lactating cows. In: **International Mastitis Congress.** 12-15 September. Vancouver, CA, 2001.

ROSARIO, T.R. Avaliação da presença de resíduos de antibióticos no leite comercializado no município de Pirassununga, S.P. 2002. 89f. **Dissertação (Mestrado em Qualidade e Produtividade Animal)** – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga.

SAS Institute Inc., SAS OnlineDoc®, Version 8, Cary, NC: SAS Institute Inc., 1999.

SILVA JUNIOR, L.S. **Tetraciclinas em medicamentos veterinários e produtos lácteos**. Campinas, São Paulo, 2004. 95p. Tese de Doutorado – Faculdade de Engenharia de Alimentos – UNICAMP.

SAMANIDOU,V., NISYRIOU.,S., MULTI-RESIDUE METHODS FOR CONFIRMATORY DETERMINATION OF ANTIBIOTICS IN MILK. **J.Sep.Sci.**2008 v.31.p.2068-2090.

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

SPINOSA, H.S.;GORNIAC, S.L.; BERNARDI, M.**Farmacologia aplicada a Medicina Veterinária**. 3º ed Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002. cap.42.p.443-445.

TRABULSI. W.R et al.; **Microbiologia**. 3 ed São Paulo. Atheneu 1999. 586p.

[WHO]. World Health Organization. **Use of antimicrobials outside human medicine and resultant antimicrobial resistance in humans-2002**. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs268/en/> Acesso em 27 dez.2008.

[WHO]. World Health Organization. **Who Food Additives Series 41**-1998.

Disponível em: <http://www.inchem.org/documents/jecfa/jecmono/v041je05.htm>.

Acesso em 10 ago.2008.

Anexo 1. Amostras de leite de marca

AMOSTRAS TESTADAS	TIPO DE LEITE	LOTE	FABRICAÇÃO	VALIDADE	RESULTADO
001	DESNATADO	921906	25/5/2008	25/10/2008	ND
002	INTEGRAL	882911	5/5/2008	5/10/2008	ND
003	SEMI-DESNATADO	W	18/5/2008	15/9/2008	ND
004	INTEGRAL	F	23/5/2008	20/9/2008	ND
005	DESNATADO	C	4/4/2008	4/8/2008	ND
006	INTEGRAL	APAGADO	2/5/2008	2/9/2008	ND
007	INTEGRAL	CBR1210	17/6/2008	17/10/2008	ND
008	DESNATADO	ITG2116	29/5/2008	29/8/2008	ND
009	SEMI-DESNATADO	CDVM14	28/5/2008	28/9/2008	ND
010	INTEGRAL	CPSA08	8/6/2008	5/10/2008	ND
011	INTEGRAL	L2158M2IFD	11/6/2008	11/12/2008	ND
012	DESNATADO	D11114M3QLD	4/5/2008	4/11/2008	ND
013	DESNATADO	35E	18/5/2008	18/9/2008	ND
014	INTEGRAL	305	11/6/2008	11/11/2008	ND
015	SEMI-DESNATADO	18F	9/6/2008	9/10/2008	ND
016	DESNATADO	M2	26/5/2008	26/9/2008	ND
017	INTEGRAL	abr/13	25/5/2008	25/10/2008	ND
018	INTEGRAL	26052A	26/5/2008	26/9/2008	ND
019	INTEGRAL	CDVM20	15/5/2008	15/9/2008	ND
020	INTEGRAL	TC04	31/5/2008	1/12/2008	ND
021	INTEGRAL	ITF1212	3/6/2008	3/10/2011	ND
022	INTEGRAL	2	16/3/2008	16/8/2008	ND
023	DESNATADO	4	4/5/2008	4/9/2008	0,112
024	INTEGRAL	mar/22	8/5/2008	8/10/2008	ND
025	DESNATADO	F	14/5/2008	11/11/2008	ND
026	SEMI-DESNATADO	10210	15/4/2008	14/8/2008	ND
027	DESNATADO	10106	17/4/2008	15/8/2008	ND
028	INTEGRAL	106	15/4/2008	13/8/2008	ND
029	SEMI-DESNATADO	20111	25/4/2008	25/8/2008	ND
030	DESNATADO	109	30/4/2008	28/8/2008	ND
031	INTEGRAL	20217	5/4/2008	5/8/2008	ND
032	SEMI-DESNATADO	M7	26/3/2008	24/7/2008	ND
033	DESNATADO	M2	4/4/2008	2/8/2008	ND
034	INTEGRAL	M8	30/3/2008	28/7/2008	ND
035	SEMI-DESNATADO	05EM21	18/4/2008	18/8/2008	ND
036	DESNATADO	05VA15	12/4/2008	12/8/2008	ND
037	INTEGRAL	10DK06	1/4/2008	31/7/2008	ND
038	SEMI-DESNATADO	V1092024	18/4/2008	18/8/2008	ND
039	DESNATADO	V1150916	24/4/2008	24/8/2008	ND
040	INTEGRAL	V113140	22/4/2008	22/8/2008	ND
041	INTEGRAL	9C3	20/3/2008	20/7/2008	ND
042	SEMI-DESNATADO	V1193418	28/4/2008	28/8/2008	ND
043	DESNATADO	V1050920	14/4/2008	14/4/2008	ND
044	INTEGRAL	V0980211	7/4/2008	7/8/2008	ND
045	LIGHT	L	7/5/2008	12/5/2008	ND
046	MAGRO	M	7/5/2008	12/5/2008	ND
047	INTEGRAL	I	8/5/2008	13/5/2008	ND
048	INTEGRAL	128	7/5/2008	13/5/2008	ND

*amostras obtidas em supermercados.

Anexo 2. Amostras de leite in natura

AMOSTRAS TESTADAS	TIPO DE LEITE	RESULTADO
051	Leite in natura	ND
052	Leite in natura	ND
053	Leite in natura	ND
054	Leite in natura	ND
055	Leite in natura	ND
057	Leite in natura	ND
058	Leite in natura	ND
059	Leite in natura	ND
060	Leite in natura	ND
061	Leite in natura	ND
062	Leite in natura	ND
063	Leite in natura	ND
064	Leite in natura	ND
065	Leite in natura	ND
066	Leite in natura	ND
068	Leite in natura	ND
069	Leite in natura	ND
070	Leite in natura	ND
071	Leite in natura	ND
072	Leite in natura	ND
073	Leite in natura	ND
074	Leite in natura	ND
075	Leite in natura	ND
076	Leite in natura	ND
077	Leite in natura	ND
079	Leite in natura	ND
080	Leite in natura	ND
081	Leite in natura	ND
082	Leite in natura	ND
083	Leite in natura	ND
084	Leite in natura	ND
085	Leite in natura	ND
086	Leite in natura	0,1553
087	Leite in natura	ND
088	Leite in natura	ND
090	Leite in natura	ND
091	Leite in natura	ND
092	Leite in natura	ND
093	Leite in natura	ND
094	Leite in natura	ND
095	Leite in natura	0,1921
096	Leite in natura	ND
097	Leite in natura	ND
098	Leite in natura	0,13
099	Leite in natura	ND
101	Leite in natura	ND
102	Leite in natura	ND
103	Leite in natura	ND
104	Leite in natura	0,1677
105	Leite in natura	ND
106	Leite in natura	ND
107	Leite in natura	ND
108	Leite in natura	ND
109	Leite in natura	ND
110	Leite in natura	ND