

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

**INFLUÊNCIA DA MASTITE NA OCORRÊNCIA DE RESÍDUOS
DE ANTIMICROBIANOS NO LEITE**

ROBERTO BELLIZIA RAIA JÚNIOR

Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE

Orientador:
Prof. Dra. Elizabeth O. da Costa F. Guimarães

São Paulo
2001

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

**INFLUÊNCIA DA MASTITE NA OCORRÊNCIA DE RESÍDUOS
DE ANTIMICROBIANOS NO LEITE**

ROBERTO BELLIZIA RAIA JÚNIOR

Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE

Orientador:
Prof. Dra. Elizabeth O. da Costa F. Guimarães

São Paulo
2001

ROBERTO BELLIZIA RAIA JÚNIOR

INFLUÊNCIA DA MASTITE NA OCORRÊNCIA DE RESÍDUOS
DE ANTIMICROBIANOS NO LEITE

COMISSÃO JULGADORA

DISSERTAÇÃO PARA OBTENÇÃO DO GRAU DE
MESTRE

Prof.^a Dr.^a Elizabeth Oliveira da Costa Freitas Guimarães
Orientador Presidente

Prof. Dr. Hélio Langoni

Prof.^a Dr.^a Elizabeth de Souza Nascimento

São Paulo, 28 de agosto de 2001

Para melhorar a realidade em que vivemos é preciso desenvolver a capacidade de ordem, aprimorar o saber, utilizar análise crítica, criar normas aplicáveis e usar a arte. A ciência engloba todos estes aspectos e é o caminho de transformação da realidade.

Roberto Raia

Dedico

A Isabel, a Henrique e a Renata

Aos meus pais

A todos que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho.

AGRADEÇO

À profa. Elizabeth por dividir seus conhecimentos e experiências que tanto contribuíram para o meu desenvolvimento pessoal e profissional

A todos os Professores e Funcionários da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, área Análises Clínicas e Toxicológicas, pela amizade e apoio.

Em especial à Prof.^a Silvia Berlanga de Moraes Barros e à Prof.^a Miriam Meyer Passareli.

Aos proprietários de fazendas, veterinários de campo, agrônomos e retireiros que participaram e dividiram suas experiências .

Especialmente ao médico veterinário José Bráulio de Oliveira Gomes e à médica veterinária Viviane Coelho.

Aos colegas do NAPGAMA:

Andréia Rentz Ribeiro,

Eliane Tamaki Watanabe

Felício Garino Junior,

Jocelina Aparecida da Silva Bueno,

Marco António Lázaro,

Maria de Fátima Miranda Suzana,

Nilson Roberti Benites,

Priscilla Anne Melville,

Este trabalho é parte integrante dos projetos desenvolvidos pelo Núcleo de Apoio à Pesquisa em Glândula Mamária e Produção Leiteira (NAPGAMA)

Agradeço a FAPESP a concessão da bolsa nível Mestrado.

Este trabalho faz parte do projeto integrado CNPQ nº 93/0594-2

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	1
1.1 Qualidade do leite.....	1
1.2 Legislação Brasileira Direcionada à Qualidade do Leite.....	2
1.3 Resíduos de Antimicrobianos.....	3
1.4 Resíduos de Antimicrobianos e Risco à Saúde Pública.....	5
1.5 Resíduos de Antimicrobianos e Qualidade dos Derivados Lácteos.....	11
1.6 Resíduos de Antimicrobianos no Leite e a Mastite.....	14
1.7 Mastite.....	17
1.8 Fatores que Interferem no Período de Eliminação dos Antimicrobianos no Leite.....	18
1.9 Técnicas de detecção de Resíduos de Antimicrobianos no Leite.....	20
2 OBJETIVO.....	24
3 MATERIAL E MÉTODO.....	25
3.1 Material.....	25
Experimento 1.....	25
Animais.....	28
Experimentos de 2 a 5.....	28
Animais.....	28
Medicamentos.....	30
3.2 Métodos.....	31
Diagnóstico e Caracterização do Processo Inflamatório na Glândula Mamária.....	31
Colheita de Amostras.....	33
Tratamentos.....	34
Testes para a Detecção de Resíduos.....	34
Análise Estatística.....	36

4 RESULTADOS.....	37
Experimento 1.....	37
Experimento 2.....	41
Experimento 3.....	42
Experimento 4.....	44
Experimento 5.....	47
Experimento 5.1.....	47
Experimento 5.2.....	49
Experimento 5.3.....	50
5 DISCUSSÃO.....	51
6 CONCLUSÕES.....	61
7 RECOMENDAÇÕES.....	63
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	64

LISTA DE FIGURAS

Figura 1:	Exame para diagnóstico de mastite clínica realizado com os primeiros jatos de leite, antes da ordenha, evidenciando alterações no leite.....	32
Figura 2:	Teste CMT, realizado antes da ordenha para diagnóstico de mastite subclínica.....	33
Figura 3:	Resultados do teste microbiológico (Delvotest®), para a detecção de resíduos no leite	35
Figura 4:	Correlação entre ocorrência de resíduos de antimicrobianos em tanques resfriadores de propriedades leiteiras no estado de São Paulo e em Minas Gerais, de acordo com o nível de mastite clínica (em porcentagem).....	40
Figura 5:	Avaliação da influência do processo inflamatório na persistência do resíduo de antibiótico em animais tratados por via sistêmica com oxitetraciclina, pelo teste microbiológico (Delvotest®).....	43
Figura 6:	Persistência de resíduo de antimicrobianos em animais tratados com sulfadiazina e trimetoprim ou com penicilina e estreptomicina, utilizando-se teste microbiológico (Delvotest®) e este associado ao PABA ou à penicilinase, respectivamente.....	46
Figura 7:	Persistência de resíduo de antimicrobianos em animais tratados com betalactâmico intramamário, detecção pelo teste microbiológico (Delvotest®).....	48
Figura 8:	Persistência de resíduo de antimicrobianos no leite de animais tratados com gentamicina intramamária, utilizando teste microbiológico (Delvotest®).....	49
Figura 9:	Persistência de resíduo de antimicrobianos em animais tratados com um antibiótico à base de tetraciclina, utilizando teste microbiológico (Delvotest®).....	50

LISTA DE TABELAS E QUADROS

Tabela 1:	Propriedades leiteiras de São Paulo e Minas Gerais que no teste microbiológico (Delvotest®) apresentaram positividade para resíduo de antimicrobiano no tanque resfriador com o respectivo nível de mastite clínica e o tratamento mais utilizado.....	38
Tabela 2:	Presença de resíduos de antimicrobianos em amostras de leite de tanques resfriadores de propriedades leiteiras no estado de São Paulo e em Minas Gerais, detectada por teste microbiológico (Delvotest®).....	39
Tabela 3:	Avaliação da ocorrência de resíduos de antimicrobianos em tanques resfriadores de propriedades leiteiras no estado de São Paulo e em Minas Gerais, de acordo com a porcentagem de mastite clínica, agrupadas em faixas de ocorrência.....	39
Tabela 4:	Avaliação da influência do processo inflamatório da glândula mamária (mastite clínica ou subclínica) na positividade ao teste microbiológico de pesquisa de resíduo (Delvotest®P), em amostras de leite de quartos mamários de animais em lactação não tratados.....	41
Tabela 5:	Avaliação da influência do processo inflamatório na persistência do resíduo de antibiótico em amostras de leite de animais tratados por via sistêmica com oxitetraciclina*, pelo teste microbiológico (Delvotest®P).....	42
Tabela 6:	Avaliação da persistência de resíduo de antimicrobianos em amostras de leite de vacas leiteiras, com mastite clínica, tratadas com associações de antibióticos ou quimioterápicos por via sistêmica.....	44
Tabela 7:	Avaliação da persistência de resíduos em amostras de leite de animais tratados por via sistêmica com sulfadiazina associada ao trimetoprim ou com penicilina associada à diidroestreptomicina, utilizando-se teste microbiológico (Delvotest®) com e sem PABA e com e sem penicilinase.....	45

Tabela 8 :	Avaliação da persistência de resíduos em amostras de leite de animais tratados com antimicrobiano betalactâmico intramamário, utilizando-se teste microbiológico (Delvotest®).....	47
Tabela 9:	Avaliação da presença de resíduo de antimicrobianos em amostras de leite de animais tratados, em quartos com mastite clínica e subclínica, com gentamicina intramamária, utilizando-se teste microbiológico (Delvotest®).....	49
Tabela 10:	Avaliação da presença de resíduo de antimicrobianos em amostras de leite de animais tratados, em quartos com mastite clínica e subclínica, com tetraciclina intramamária, utilizando teste microbiológico (Delvotest®).....	50
Quadro 1:	Exemplos de testes para detecção de resíduos de antibiótico no leite.....	23
Quadro 2:	Características das propriedades leiteiras utilizadas para a coleta de amostras destinadas à análise de resíduos de antimicrobianos, considerando-se o tipo de leite, o número de animais, a quantidade de leite no tanque resfriador e os antimicrobianos mais utilizados nas propriedades.....	26

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

APPCC: Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle

CMT: *California Mastitis Test*

FDA: *Food and Drug Administration*

IDA: ingestão diária aceitável

LPM: limites máximos permitidos

mg/ml: miligramas por mililitro

µg/ml: microgramas por mililitro = miligramas por litro= ppm

NASA: *National Aeronautics and Space Administration*

NOEL: nível de efeito não observado (*non observable effect level*)

ONU: Organização das Nações Unidas

PABA: ácido para aminobenzóico

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

ppb: partes por bilhão

ppm: partes por milhão

UI: unidades internacionais

WHO: *World Health Organization*

RESUMO

A presença de resíduos de antimicrobianos no leite representa um problema de saúde pública, podendo causar reações alérgicas e a seleção de bactérias resistentes aos antimicrobianos. É também um problema econômico interferindo nas culturas lácteas utilizadas na fabricação de derivados. A mastite é a causa mais freqüente para o tratamento de bovinos leiteiros com antimicrobianos. Foram objetivos deste trabalho estudar a influência do processo inflamatório no tempo de eliminação de diferentes antimicrobianos, administrados por via sistêmica ou intramamária em vacas em lactação e avaliar a presença de resíduos detectáveis em tanques resfriadores de propriedades leiteiras, correlacionando com os níveis de mastite nos rebanhos. Foi utilizado teste microbiológico comercial (Delvotest®) para a avaliação da ocorrência de resíduos de antimicrobianos em 60 amostras de leite de tanques resfriadores de propriedades leiteiras e individualmente de 135 vacas em lactação com e sem processo inflamatório na glândula mamária. Foi verificada correlação entre a ocorrência de resíduo de antimicrobiano no tanque resfriador e o aumento da freqüência de mastite clínica ($r= 1,0$; teste de Spearman). O aumento do período de carência, no leite de glândulas com processo inflamatório, foi observado tanto nos animais tratados por via sistêmica quanto naqueles tratados por via intramamária, ultrapassando o período estipulado pelo fabricante do medicamento. Tal fato foi observado em relação a todos os grupos tratados com diferentes antimicrobianos (betalactâmicos, aminoglicosídeos, tetraciclinas e sulfa) variando de 11 a 60 % das amostras analisadas. Após 72 horas da aplicação de medicamento por via sistêmica, houve diferença significativa ($p \leq 0,05$, Fisher) entre as amostras de animais com mastite e as de animais com ausência de processo inflamatório, indicando uma maior persistência de resíduo nas amostras de animais com mastite. Na avaliação da influência de inibidores naturais observou-se que 33% das amostras de quartos com mastite clínica e 18% das amostras de quartos com mastite subclínica apresentaram resultados positivos, sendo que na ausência de processo inflamatório todas as amostras apresentaram resultados negativos. A diferença de positividade foi estatisticamente significativa, quando foram comparadas as amostras de quartos mamários com mastite clínica com as amostras de quartos mamários com ausência de processo inflamatório ($p \leq 0,05$, Fisher). Em síntese concluiu-se que houve uma correlação entre o nível de ocorrência de mastite clínica e a presença de resíduo no leite dos tanques resfriadores de propriedades leiteiras e que glândulas mamárias com processo inflamatório apresentaram maior período de eliminação de resíduos de antimicrobiano pelo leite, em relação às glândulas sem processo inflamatório, muitas vezes ultrapassando o período estipulado pelos fabricantes de medicamentos. Observou-se também que as amostras de leite de animais não tratados, analisadas sem aquecimento prévio, apresentaram positividade demonstrando a influência dos inibidores naturais, produzidos em decorrência do processo inflamatório, nos

resultados dos testes microbiológicos, indicando a necessidade de aquecimento das amostras antes da realização dos testes microbiológicos para a detecção de resíduos, para evitar a ocorrência de resultados falso positivos. Como conclusão geral, a análise dos resultados obtidos no presente estudo demonstrou que a mastite interferiu na ocorrência de antimicrobianos no leite.

ABSTRACT

RAIA, R.B. "Mastitis influence on the occurrence of antimicrobial agents residues in milk" ["Influência da mastite na ocorrência de resíduos de antimicrobianos no leite"] São Paulo, 2001, 86 p. Tese (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo.

The presence of antimicrobial residues in milk is a public health concern, because they may cause allergic reactions and may lead to the development of resistance to antimicrobial agents by bacterial strains. It is also an economic problem because it interferes with starter cultures used in dairy products. Mastitis, the inflammatory process of the mammary gland, is the main reason to treat dairy cows with antimicrobial agents. The purpose of this study was to verify the influence of mastitis on the withdrawal period of several intramammary and parenteral antimicrobial agents used in lactating cows, as well as to evaluate the presence of detectable antimicrobial residues in bulk tank milk, in relation to the mastitis rates among the studied dairy farms. A total of 60 bulk tank samples of dairy farms and 135 individual samples of healthy and mastitic dairy cows were screened to verify the occurrence of antimicrobial residues with a microbiologic test (Delvotest®). A correlation was detected between antimicrobial residues in bulk tank and high clinical mastitis rates ($r= 1.0$; Spearman's test). A higher withdrawal period, exceeding that determined by the manufacturer, was observed in the milk of mammary glands presenting inflammatory processes, both in animals treated by the parenteral route, and those treated by the intramammary route. This observation ranged from 11 to 60% of the analyzed samples and was verified in all groups treated with different antimicrobial agents (betalactam, aminoglycosides, tetracycline and sulfas). Statistically significant difference was detected ($p\leq 0.05$, Fisher's test) at seventy two hours after the parenteral treatment in samples from animals presenting inflammatory processes, in relation to samples from animals that did not present mastitis. That is, there was a higher withdrawal period in the samples from animals presenting mastitis. In the evaluation of the influence of inflammatory reaction natural inhibitors on Delvotest®, it was verified that 33% of the samples from clinical mastitis quarters and 18% from subclinical mastitis quarters were positive, and that quarter samples without inflammatory processes were negative. These differences were statistically significant ($p\leq 0.05$, Fisher's test). Among the main conclusions, it should be pointed out that there was a correlation between high clinical mastitis rates in the dairy herd and antimicrobial residues in bulk tank milk. Another important result was that mammary glands presenting inflammatory processes exhibited higher withdrawal periods when compared with mammary glands that did not present inflammatory processes, and that sometimes this withdrawal period exceeded the period recommended by the manufacturer. It was also observed that milk samples from untreated animals, when tested without preliminary heating at 80°C, were positive, due to the occurrence of natural inhibitors produced by the inflammatory process, showing their interference

on microbiologic tests. Therefore, it was demonstrated that previous heating is helpful to avoid false positive results when microbiologic tests are used to detect antimicrobial agents residues in milk samples. As an overall conclusion, it was well demonstrated that mastitis interferes in antimicrobial residues in milk.

1- INTRODUÇÃO

O leite e seus derivados ocupam um papel importante na nutrição do homem. Um litro de leite por dia supre todas as necessidades de proteína de crianças até seis anos de idade, mais de 60% das necessidades proteicas dos adolescentes e 50% das necessidades proteicas dos adultos. Em relação ao cálcio, o consumo de um litro diário supre cerca de 100% das necessidades (COSTA, 1999).

1.1 QUALIDADE DO LEITE

A indústria de alimentos tem grande preocupação com a qualidade, pois esta é uma exigência crescente do mercado consumidor. A qualidade, na indústria de alimentos, está diretamente ligada ao sistema de Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle - APPCC (TRONCO, 1997).

Desde 1991, o comitê do *Códex Alimentarius*, que trata da higiene e segurança dos alimentos, vem recomendando o uso do sistema APPCC a todos os países-membros da ONU, evidenciando os benefícios oferecidos pela inocuidade e qualidade dos alimentos, assim como pela racionalização de recursos e obtenção de soluções adequadas aos problemas inerentes ao sistema (TRONCO, 1997).

O conceito do sistema APPCC teve origem na década de 50, em setores relacionados à indústria química da Grã-Bretanha. Nas décadas de 50, 60 e 70 foi utilizado pela Comissão Americana de Energia Atômica. Ao final dos anos 60, a NASA (*National Aeronautics and Space Administration*) sugeriu que o sistema APPCC fosse utilizado para a produção de alimentos seguros, diminuindo a probabilidade de ocorrência de doenças de origem alimentar nos tripulantes dos vôos espaciais (BRYAN, 1981). Assim, utilizando conceito que analisa simultaneamente princípios de microbiologia dos alimentos, controle de qualidade e avaliação de risco para a obtenção de um alimento seguro, desenvolveu-se o Sistema APPCC, aplicado à qualidade do leite (BRYAN, 1981).

1.2 LEGISLAÇÃO BRASILEIRA DIRECIONADA À QUALIDADE DO LEITE

No Brasil, de acordo com as recomendações do *Códex Alimentarius*, o Ministério da Saúde emitiu a Portaria 1.428/93, determinando que os estabelecimentos processadores e prestadores de serviços no setor de alimentos e de vigilância sanitária deveriam adotar, em caráter obrigatório, o Sistema APPCC (TRONCO, 1997).

Em relação ao controle de resíduos biológicos, o Ministério da Agricultura, através da Portaria Nº 51, de 06 de fevereiro de 1986, instituiu o Plano Nacional de Controle de Resíduos Biológicos em Produtos de Origem Animal - PNCRB, com a finalidade de sistematizar os meios de controle da contaminação desses produtos por resíduos de compostos de uso na agropecuária, bem como de poluentes ambientais (BRASIL, 1986). Posteriormente, pela Portaria Ministerial nº 527, de 15 de agosto de 1995 (BRASIL, 1995), procedeu-se a definição deste Plano prevendo a adoção de programas setoriais de acordo com as Portarias nº110 para carne (BRASIL, 1996) nº 71 para mel, nº 72 para leite e nº 73 para pescado (BRASIL, 1998).

A Portaria 46, de 10 de fevereiro de 1998 do Ministério da Agricultura e Abastecimento, regulamentou o sistema de Análise de Perigo e Pontos Críticos de Controle a ser implantado, gradativamente, nas indústrias de produtos de origem animal sob o regime do Serviço de Inspeção Federal -SIF (CASTRO et al., 1999).

Infelizmente, no Brasil existem dois tipos de mercado de lácteos, ambos de grande expressão econômica, conhecidos como formal e informal. A diferença básica entre eles é a presença, ou não, da inspeção sanitária e higiênica do governo (GOMES, 1999). Assim, aproximadamente um total de 35% do leite consumido no Brasil (cerca de 8 bilhões de litros) não é submetido à fiscalização (JANK, 1999).

1.3 RESÍDUOS DE ANTIMICROBIANOS

Um ponto fundamental na qualidade do leite é a ausência de contaminantes, como por exemplo resíduos de antimicrobianos. A presença de resíduos de antimicrobianos no leite constitui um risco específico de origem química, que deve ser monitorado através de testes confiáveis, rápidos e práticos (SISCHO, 1996). É importante orientar o produtor, para que este produza leite de boa qualidade. O produtor deve ser informado dos procedimentos para evitar que o leite com resíduo de antibióticos chegue ao consumidor. Além disso, a fiscalização deve dispor de meios para avaliar a qualidade do leite. (GIBBONS-BURGENER et al., 2000).

Os resíduos de anti-sépticos podem estar presentes no leite em decorrência de medidas de anti-sepsia e/ou desinfecção de utensílios e recipientes ou por acidente tecnológico. Ou ainda, pela adição intencional, na tentativa de prolongar e/ou assegurar o tempo de vida do produto (tempo de prateleira), como resultado de práticas fraudulentas para mascarar a má

qualidade (GELLI et al., 1984). Por outro lado, a presença dos antibióticos e/ou quimioterápicos é, em geral, conseqüência do seu uso em terapêutica veterinária (COSTA et al., 1999; GALLINA et al., 1998, RAIA et al., 1999).

A presença de resíduos de antimicrobianos no leite representa risco à saúde do consumidor e interfere na produção de derivados, inviabilizando muitas vezes a produção destes e determinando prejuízo econômico (COSTA, 1999, MARTINS e VAZ, 2000).

Dentre os principais fatores que afetam a taxa de excreção e a presença de antibióticos no leite, destacam-se: a quantidade de leite produzida pelo animal e o intervalo de tempo entre o tratamento e a ordenha (MARTH e ELLICKSON, 1959), os tipos de antibióticos e veículos utilizados, as vias de administração e as doses administradas (CANNON et al., 1972, COSTA et al., 1999).

Vários pesquisadores relataram que os antibióticos resistem aos métodos de conservação do leite, como calor e congelamento. Assim, o aquecimento do leite ou sua pasteurização não afetam a presença de antimicrobiano, em alguns casos só modificam sua atividade (AURVALLE, 1981).

TRAMER (1964) encontrou que apenas 8% de penicilina foi inativada pela pasteurização do leite e 20% pelo aquecimento a 32°C por 32 minutos. PILLET e THOMA (1969) concluíram que a penicilina e a tetraciclina no leite foram eliminadas após aquecimento a 100°C durante 3 horas.

SCHENCK e FRIEDMAN (2000) avaliaram a estabilidade da ampicilina no leite armazenado a 4°C durante 6 dias e concluíram que não houve alteração no resíduo de ampicilina nesta temperatura durante este período.

Verifica-se pois, pelos resultados dos autores citados, que os métodos habitualmente empregados para a preservação da qualidade do leite, sejam eles aquecimento, pasteurização ou refrigeração, não são efetivos para a inativação de resíduos de antimicrobianos no produto.

1.4- RESÍDUOS DE ANTIMICROBIANOS E O RISCO À SAÚDE PÚBLICA

A descoberta e o amplo uso dos agentes antimicrobianos tiveram um reconhecimento e um impacto profundo sobre a vida e a saúde dos seres humanos e animais. Através do controle das doenças infecciosas e da promoção da saúde, melhoraram a vida dos indivíduos e da sociedade (FRANCO et al., 1990).

Segundo FRANCO et al. (1990) a terapia com antibióticos está em uso no manejo da saúde de animais produtores de alimentos há mais de 40 anos. Os antibióticos são administrados ao gado leiteiro por diferentes vias: oral, intravenosa, intramuscular, subcutânea, intra-uterina e intramamária. Infelizmente, todas estas vias podem acarretar o aparecimento de resíduos de antibióticos no leite.

Em relação à saúde pública, a presença de resíduo de antibiótico no leite é indesejável por várias razões, sendo as mais freqüentes: ocorrência de reações de hipersensibilidade e seleção de microrganismos patogênicos resistentes (COSTA, 1999).

Segundo PAIGE (1998), a alergia é um exemplo de reação aguda em algumas pessoas que consomem alimentos contaminados com resíduos. Em seres humanos o uso clínico de penicilina, estreptomicina e em menor extensão, novobiocina e oleandomicina parece estar associado aos quadros de hipersensibilidade em alguns indivíduos.

Informações epidemiológicas e experimentais indicaram que penicilina em quantidades tão baixas quanto 5 a 10 UI [0,003 a 0,006 mg/Kg (ppm)] foram suficientes para produzir reações alérgicas em indivíduos previamente expostos. A penicilina quando presente no leite, mesmo em níveis baixos, pode causar erupções eczematosas recidivantes em pessoas sensibilizadas (FAGUNDES, 1997). ROSANOVE (1960) relatou um caso onde o paciente apresentou vesículas e erupções orais e cutâneas após ingerir leite com penicilina a 0,05UI/ml.

As reações alérgicas estão muito freqüentemente associadas aos betalactâmicos, particularmente à penicilina, mas podem ser observadas também quando do uso de outros antibióticos. Alergias aos aminoglicosídeos são raras, mas às vezes ocorrem erupções cutâneas urticariformes após o uso desta e de outras classes de antibióticos (COSTA et al., 1999). Além das reações alérgicas, outros problemas podem ocorrer, como por exemplo discrasia sangüínea, anemia aplástica e neurite ótica, associadas ao uso de cloranfenicol (SUNDLOF, 1989).

A anemia aplástica origina-se pela inibição irreversível da medula óssea, induzida pelo cloranfenicol. Embora seja relativamente rara, afetando 1 em cada 20.000 a 50.000 pacientes que receberam terapia com cloranfenicol (SETTEPANI, 1984, SUNDLOF, 1989), trata-se de um efeito secundário freqüentemente fatal. Esse efeito tóxico, idiossincrático e não relacionado com a dose é o fator principal que induziu a *Food and Drug Administration* (FDA), nos Estados Unidos, a proibir o uso de cloranfenicol em animais produtores de alimentos. Posteriormente, outros países também

proibiram ou restringiram o seu uso (COSTA, 1999). O cloranfenicol também produz uma supressão reversível da medula óssea por inibição da síntese protéica, dependente de sua concentração (SETTEPANI, 1984).

Os efeitos adversos de antimicrobianos sobre a microbiota intestinal são preocupantes devido ao importante papel que esta desempenha na manutenção da saúde dos indivíduos. Além disso, perturbações na microbiota intestinal podem comprometer a eficácia de outras substâncias terapêuticas e deste modo afetar negativamente a saúde pública (PAIGE, 1998).

Efeitos teratogênicos podem resultar da exposição aos resíduos de xenobióticos nos tecidos animais. São alterações celulares, de tecidos e órgãos, quando determinadas substâncias químicas são ingeridas durante os três primeiros meses de gestação (organogênese), apresentando um efeito tóxico (PAIGE et al. 1997; MIDIO e MARTINS, 2000). Substâncias teratogênicas são ativas em doses extremamente baixas e mesmo em breves exposições. Assim, a ingestão destas substâncias durante o período crítico de desenvolvimento fetal pode resultar em deformidades para a vida toda (PAIGE, 1998).

Deve-se considerar que o fator idade do usuário é extremamente relevante em relação a algumas das reações adversas aos antibióticos, portanto a presença destes resíduos no leite, que é consumido principalmente na infância, assume particular importância. Também devem ser considerados os riscos ocasionados pelo consumo de leite contendo resíduos de antimicrobianos por gestantes. Como referido, alguns destes têm potencial teratogênico, como os metronidazóis, a rifampicina e o trimetoprim. Outros, como a estreptomicina apresentam ototoxicidade e as tetraciclina podem determinar alterações no desenvolvimento ósseo fetal (COSTA,1999).

Segundo LONG e ROYBAL (1994), foi demonstrado que os aminoglicosídeos apresentam efeitos nefrotóxicos e ototóxicos. Foram atribuídos à sulfadiazina possíveis efeitos carcinogênicos e indivíduos sensíveis podem desenvolver reação de hipersensibilidade quando expostos a baixos níveis de tetraciclina.

Efeitos crônicos, tais como carcinogenicidade, como resultado da exposição aos resíduos de medicamentos em alimentos são particularmente difíceis de serem detectados e têm sido pouco relatados (PAIGE, 1998).

O desenvolvimento de microrganismos resistentes é uma outra preocupação assinalada por diversos autores.

Debate-se ainda se o uso de antibióticos em animais resultaria no desenvolvimento de resistência em patógenos causadores de zoonoses. O surgimento de enterococos-vancomicina-resistentes, *Campylobacter* resistente à fluoroquinolona e *Samonella typhimurium* DT104 multirresistente tem estimulado o debate (BARTON, 1998).

Segundo STOBBERINGH e BOGAARD (2000) o uso de antibióticos em animais, como em seres humanos, não causaria somente o aumento da seleção de bactérias patogênicas resistentes, mas também, resistência das bactérias normais da microbióta intestinal, que poderiam infectar a população humana tanto por contato direto como através da ingestão de produtos de origem animal.

A resistência bacteriana aos antimicrobianos pode ser transferida de um microrganismo para outro, dentro de uma mesma espécie ou entre espécies por um fator de resistência (fator-R) ou plasmídio, fragmentos de DNA presentes no citoplasma celular. Podem ser encontrados em todas as bactérias e atuam na resistência aos antimicrobianos de três maneiras: codificam enzimas inativadoras do antimicrobiano dentro da célula,

diminuem a permeabilidade da parede celular aos antimicrobianos específicos e diminuem a afinidade destes aos componentes celulares (FRANCO et al., 1990, MITCHELL e YEE, 1995)

Transposons, são elementos móveis de um plasmídio e podem se transferir de um lugar para outro no mesmo plasmídio, ou para outro plasmídio em outra célula. Uma vez que, os plasmídios podem conter genes que codificam resistência para mais do que um agente antimicrobiano, o fato dos transposons se movimentarem, aumenta muito a capacidade de resistência das cepas bacterianas aos medicamentos. Isso não se aplica a todas as bactérias, mas a muitas Gram-positivas, Gram-negativas, aeróbias e anaeróbias (FRANCO et al., 1990, MITCHELL e YEE, 1995).

A descoberta dos transposons e outros elementos ajudou a compreender como os fatores - R estão envolvidos; o que parecia ser um novo plasmídio pode ser um plasmídio já conhecido, que simplesmente adquiriu um novo gene de resistência através da inserção de um novo transposon (FRANCO et al., 1990, MITCHELL e YEE, 1995).

A taxa de transferência de plasmídios é baixa. Somente um pequeno número de bactérias em uma população pode adquirir resistência, mas a presença de um antibiótico fornece à bactéria resistente uma vantagem competitiva, porque o antibiótico elimina as susceptíveis (FRANCO et al., 1990).

Historicamente, os produtos de origem animal tem sido, muitas vezes, responsabilizados na transmissão de microrganismos para seres humanos. Produtos como carne bovina e de frango cruas, leite, ovos e derivados são excelentes meios de cultura para o desenvolvimento bacteriano. Outros fatores como o cozimento inadequado, falhas na manipulação, falta de higiene e refrigeração inadequada podem contribuir no processo de contaminação (FRANCO et al., 1990). Uma vez consumida, a

bactéria resistente aos medicamentos, pode colonizar o trato intestinal do ser humano, podendo transferir resistência às outras bactérias pela troca de plasmídios ou transposons. Através do uso de antibióticos pelo ser humano, a microbiota intestinal normal não resistente diminui significativamente, criando um ambiente favorável à rápida proliferação das bactérias resistentes aos antimicrobianos presentes. A infecção resultante pode ocasionar doença grave e até mesmo a morte. As pessoas mais afetadas são aquelas imunodeficientes, crianças e idosos (COSTA et al., 1999).

Mesmo as pequenas doses de antimicrobianos encontradas no leite podem contribuir para a seleção de microrganismos antibiótico-resistentes e além disso, o consumo prolongado pode reduzir a microbiota normal de forma a permitir a proliferação de microrganismos patogênicos (AURVALLE, 1981; FAGUNDES e MOLIN, 1988; BEGLEY, 1994).

Nos Estados Unidos, o FDA (Food and Drug Administration) é responsável pelo estabelecimento de Limites Máximos Permitidos (LMPs) de resíduos de substâncias usadas em veterinária visando a segurança dos alimentos. O LMP pode ser definido como a máxima concentração de um determinado resíduo, resultante do uso de um medicamento veterinário, expresso em partes por milhão (ppm) ou em partes por bilhão (ppb), que é legalmente permitida ou reconhecida como aceitável no alimento (MITCHELL et al., 1998).

O total de resíduo de uma determinada substância ingerida com os diversos alimentos da dieta de uma pessoa não deve ultrapassar a “ingestão diária aceitável” (IDA). A IDA é a quantidade de um agente químico presente no alimento que pode ser ingerido através da dieta diariamente, durante toda a vida do indivíduo, sem provocar risco de intoxicação para seres humanos. É calculada aplicando um fator de segurança (por exemplo: 100, 1000) sobre o valor do “nível de efeito não observado” (NOEL) ou seja, a quantidade de uma substância que quando administrada diariamente num

período de tempo prolongado, não produz efeito tóxico aparente (MITCHELL et al., 1998).

Para a determinação do NOEL são realizados estudos em animais de laboratório verificando a toxicidade aguda, sub aguda, crônica, sub crônica, mutagenicidade, toxicidade fetal, efeitos sobre a fertilidade e a reprodução e em certas condições, a carcinogenicidade e teratogenicidade de resíduos de antimicrobianos Além disso, são avaliados efeitos potencialmente adversos destes resíduos sobre a microbiota intestinal humana após a ingestão oral. (NOUWS et al., 1994; MIDIO e MARTINS, 2000).

Também é determinado o intervalo de tempo que deve decorrer para que os resíduos diminuam, atingindo os limites máximos permitidos (LMP) ou níveis de tolerância. Este intervalo é denominado período de carência. (NOUWS et al., 1994; MIDIO e MARTINS, 2000).

O próprio consumidor está melhor informado sobre a segurança alimentar e exige alimentos de boa qualidade, seguros e livres de resíduos. Assim produtores, veterinários e agências regulamentadoras e de saúde pública, envolvidas na segurança dos alimentos, estão preocupados em produzir produtos seguros, mantendo a confiança e a saúde do consumidor (NOUWS et al., 1994).

1.5 RESÍDUOS DE ANTIMICROBIANOS E QUALIDADE DOS DERIVADOS LÁCTEOS

ALDAMANA et al. (1997) determinaram a presença de resíduos de antimicrobianos, em particular de penicilina, em queijos frescos na cidade de Oaxaca no México. Das setenta e seis amostras analisadas, 47 (61,8%)

resultaram positivas para a presença de resíduos, das quais 26 (34,2%) continham somente penicilina e 19 (25%) outros antimicrobianos.

Em relação à qualidade dos derivados lácteos, do ponto de vista tecnológico, a presença de resíduos de antimicrobianos inibe as culturas lácteas, trazendo problemas na fabricação de iogurte, queijo e manteiga (FAGUNDES e MOLIN, 1988), além de favorecer a multiplicação de microrganismos indesejáveis como coliformes e bactérias putrefativas, que crescem em pH próximo à neutralidade. A presença de antibióticos, inibindo ou retardando as culturas lácteas, pode proporcionar a seleção de bactérias antibiótico resistentes, obtendo-se um produto de má qualidade, além de trazer riscos ao consumidor (FAGUNDES, 1997).

A fabricação do iogurte, produto obtido da fermentação láctea, é afetada pela presença de antibióticos no leite. Estes determinam retardo na acidificação, com conseqüente desequilíbrio no desenvolvimento das bactérias componentes do “fermento láctico”. O iogurte produzido nestas condições apresentará sabor de peptona e aspecto anormal, devido à exsudação abundante de soro que se acumula na superfície do produto (FAGUNDES e MOLIN, 1988).

Muitos pesquisadores avaliaram a interferência de resíduos de antimicrobianos sobre *Streptococcus thermophilus* e *Lactobacillus bulgaricus*, que constituem as principais culturas bacterianas utilizadas na fabricação de iogurtes.

Para KOSIKOWSKI e MOCQUOT (1958), concentrações de 0,01 a 0,05 UI/ml de penicilina no leite inibiram *Streptococcus thermophilus*, enquanto que *Lactobacillus bulgaricus* foi mais resistente (0,30 a 0,60 UI/ml). JACQUET (1953) notou que a concentração de penicilina de 0,02 UI/ml no leite retardou a acidificação láctica do iogurte.

ANIFANTAKIS (1982) observou que a presença de 0,015 a 0,05 UI de penicilina, 0,3 a 1 μg^* de clortetraciclina e oxitetraciclina e 5 a 7 μg de estreptomicina por ml de leite interferiram na produção de iogurte.

Segundo FAGUNDES e MOLIM (1988), a penicilina e a estreptomicina inibiram a produção do iogurte em concentrações de 5×10^{-2} UI/ml (0,05 UI/ml). A clortetraciclina produziu o mesmo efeito na concentração de 5×10^{-4} mg/ml (0,5 ppm). O cloranfenicol retardou a produção a 3×10^{-3} mg/ml (3 ppm) e teve efeito inibidor a 3×10^{-2} mg/ml (30 ppm).

SILVA (1990) avaliou a ação da canamicina no processamento do iogurte produzido com leite de cabra, concluindo que concentrações iguais ou superiores a 0,05 mg/ml de leite (50 ppm) possibilitaram a acidificação (pH 5,35 a 6,27), mas com ausência de formação de coágulo, característico do iogurte.

Outro derivado do leite que sofre interferência na presença de resíduos de antimicrobianos durante as fases de processamento é o queijo. A interferência dos antimicrobianos sobre as culturas microbianas utilizadas na produção de queijo determinam um produto com má dessoragem da coalhada, fermentação indesejada com produção de gás e má maturação (FAGUNDES, 1997).

HUNTER (1949) realizou experimento com queijo Cheddar, a partir de leite com 0,1 - 0,5 UI/ml de penicilina, resultando um produto com sabor e coloração a normais, após três meses de maturação.

BRADFIELD (1950) comprovou que queijos fabricados com leite bovino em presença de antimicrobianos, no final do processo apresentavam sabor anormal, sem textura e muito frágeis.

* (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ = 1 ppm).

FURTADO (1980) relatou que culturas fúngicas utilizadas na maturação de queijos de leite de cabra sofreram influência pela presença de resíduos de antibióticos no leite, diminuindo a produção de ácido láctico e aumentando o pH do produto (próximo da neutralidade), deste modo, favorecendo o surgimento de microrganismos indesejáveis (leveduras e bactérias).

FAGUNDES e MOLIN (1988) verificaram a interferência de diferentes antibióticos (penicilina, clortetraciclina e cloranfenicol) em relação ao ponto de coagulação do leite bovino. A penicilina na concentração de 50 UI/ml de leite prolongou o tempo de coagulação em dez minutos em relação ao controle. As concentrações de 500 UI/ml e 5000 UI/ml de leite provocaram atraso de trinta minutos. A clortetraciclina, na concentração de 0,5 mg/ml (500 ppm), retardou o ponto de coagulação em dez minutos em relação ao controle. O cloranfenicol, nas dosagens de 0,9 a 9,0 mg/ml de leite (900 a 9000 ppm), aumentou em vinte minutos o tempo de coagulação.

A manteiga também sofre interferência de resíduo de antibiótico durante seu processamento, com inibição parcial ou total da fermentação láctea e, conseqüentemente, menor produção de diacetil, que é responsável pelo aroma do produto (AURVALLE, 1981).

1.6 - RESÍDUO DE ANTIMICROBIANOS NO LEITE E A MASTITE

O tratamento de vacas leiteiras com antibióticos para doenças infecciosas, tais como metrite, pneumonia e doença do casco, é relativamente comum. Mas, a principal causa da presença destes resíduos no leite é o tratamento da mastite bovina durante a lactação, tanto por via intramamária como sistêmica. O uso de antibióticos sistêmicos em animais

com processos infecciosos, outros que não a mastite, também pode determinar sua eliminação pelo leite, mas são necessárias altas doses do medicamento para alcançar baixos níveis na glândula mamária. No entanto, em glândulas mamárias com processo inflamatório ocorre aumento de permeabilidade entre o sangue e o tecido glandular, favorecendo uma maior concentração de antibiótico na glândula, mesmo quando usado por via sistêmica (COSTA , 1999).

Desta forma, vários autores têm referido que o tratamento de mastite clínica é um dos principais fatores de contaminação do leite cru por antibiótico (MEEK et al.,1986; McEWEN et al.,1991; RENEAU, 1993).

MEEK et al. (1986) relataram que a ocorrência de mastite clínica (animal/ano) foi a maior entre todas as doenças do gado leiteiro, nas 110 propriedades leiteiras estudadas em Ontário, selecionadas ao acaso. Verificaram que foram administrados em média 3,85 doses de antibiótico por animal por ano.

McEWEN et al. (1991) observaram que a ocorrência de resíduo no leite estava associada com um aumento na frequência de tratamento de vacas em lactação, com antibióticos por via intramamária, indicando que as propriedades leiteiras devem ter um cuidado extra, quando tratar as vacas por esta via. Muitas propriedades leiteiras, segundo os autores no estudo referido, usavam antibiótico intramamário, quando achavam necessário, sem uma orientação direta do veterinário.

No Brasil, em 28 propriedades leiteiras de São Paulo e Minas Gerais, COSTA et al. (1995) verificaram que o nível de ocorrência de mastite clínica era da ordem de 17,5%. Na mesma região, COSTA et al. (1999) em estudo realizado em tanques de mistura, observaram que a alta ocorrência de mastite estava relacionada com a presença de resíduo de antimicrobiano no tanque resfriador de propriedades leiteiras.

A administração de medicamentos em animais produtores sem a orientação de um médico veterinário, também, no Brasil, é um fator importante na ocorrência de antimicrobianos no leite. SILVA et al. (1999) avaliaram a conduta de balconistas de farmácias veterinárias, em Teresina, Piauí, frente aos casos relatados de mastite bovina e concluíram que os balconistas indicavam antibióticos para tratamento da mastite, assumindo uma responsabilidade inerente ao médico veterinário, porém sem a correta orientação sobre o seu uso.

Muitos pesquisadores avaliaram a presença de resíduos de antimicrobianos no leite de consumo. BARROS e PERCHES (1981) analisaram 96 amostras de leite pasteurizado tipo B, comercializado na cidade de São Paulo, SP, encontraram 21,9% das amostras com presença de resíduos de antibióticos. GELLI et al. (1984) analisando 404 amostras de leite pasteurizado na cidade de São Paulo, SP, verificaram que 11,63% foram positivas para a presença de antibióticos. ALBUQUERQUE et al. (1996) observaram que de um total de 300 amostras de leite comercializado em Fortaleza, Ceará, 69,7% foram positivas para a presença de resíduos. LOPES et al. (1998) avaliaram 178 amostras de leite comercializado em Campinas, São Paulo, encontrando 7,9% positivas para resíduo.

McEWEN et al. (1992) relataram que entre as razões para a presença de resíduos de antibiótico no leite, muitas envolveram fatores humanos. A responsabilidade pelos resíduos de antibióticos recai sobre o produtor, sobre a indústria farmacêutica, que deve fornecer as informações sobre período de descarte do leite após tratamento e sobre o veterinário que deve orientar o criador (FONDÉN, 1993; COSTA, 1996; COSTA et al., 1999).

A presença de resíduos de antibióticos no leite decorre principalmente do abuso destes medicamentos ou da sua utilização de maneira inadequada, como por exemplo, uso de medicamentos não

recomendados e com farmacocinética não perfeitamente estabelecida; uso de doses excessivas e não obediência ao período de descarte do leite de animais em tratamento, além de problemas idiossincrásicos de animais que apresentam uma prolongada retenção do medicamento (COSTA, 1999).

1.7 MASTITE

A produção de leite nacional é da ordem de 20 bilhões de litros/ano, sendo importados anualmente cerca de 2 bilhões de litros para atender ao mercado interno (COSTA, 1999). Uma das principais causas de prejuízos na produção leiteira é a mastite, processo inflamatório da glândula mamária. Calcula-se que aproximadamente 17 a 20% da população mundial de vacas leiteiras em um dado momento tenham mastite (DU PREEZ e GIESECKE, 1994). Estimativas feitas em vários países calculam perdas por esse processo da ordem de 10 a 15% da produção. Em 1987, por exemplo, os EUA perderam 8 bilhões de litros, o equivalente à produção brasileira no mesmo ano (COSTA, 1991).

Uma vaca com mastite vai ter sua produção leiteira afetada em quantidade e qualidade. Observa-se um menor teor de lactose, caseína, gordura, cálcio e fósforo e um aumento de imunoglobulinas, cloretos e lipase (COSTA, 1998).

A mastite clínica caracteriza-se por alterações visíveis da glândula e/ou do leite. Pode ser aguda apresentando sintomatologia evidente de processo inflamatório (edema, dor, calor, rubor), ou crônica caracterizada por fibrosamento, ausência de sinais de processo inflamatório e alterações no leite, como grumos e coágulos. A mastite classificada como subclínica se caracteriza pela diminuição da produção leiteira sem que contudo se observem sinais de processo inflamatório ou fibrosamento, sendo necessária

a utilização de testes indiretos para seu diagnóstico, como CMT (*California Mastitis Test*), Whiteside, condutibilidade elétrica, contagem de células somáticas, entre outros (COSTA, 1998).

O uso de antimicrobianos, por via sistêmica ou intramamária, constitui uma das principais medidas de tratamento de mastite, na sua forma clínica ou subclínica.

1.8 FATORES QUE INTERFEREM NO PERÍODO DE ELIMINAÇÃO DOS ANTIMICROBIANOS NO LEITE.

A excreção de substâncias químicas (xenobióticos) por indivíduos da espécie humana ou por animais destinados à produção de alimentos, desempenha papel extremamente importante, pois uma substância tóxica poderá ser transferida do organismo materno para o lactente; assim, também numerosos compostos poderão ser transferidos para a população pelo leite e produtos lácteos (MIDIO e MARTINS, 2000).

As glândulas mamárias de ruminantes são órgãos com características próprias, não somente do ponto de vista da sua fisiologia, bioquímica e anatomia, mas também em relação aos aspectos farmacológicos e terapêuticos. O leite é uma suspensão de glóbulos de gordura numa fase aquosa na qual a lactose, sais inorgânicos e proteínas, principalmente caseína, estão dissolvidos. Os xenobióticos podem estar distribuídos tanto na fase aquosa quanto na fase lipídica do leite, também podem ocorrer ligações destes às proteínas do leite ou do tecido glandular (ZIV, 1980; AERTS et al, 1995).

Xenobióticos, dentre os quais se enquadram os antibióticos, são excretados no leite pelos processos de simples difusão, principalmente os compostos de pronunciada lipossolubilidade. Todavia, em virtude da

diferença de pH existente entre plasma e leite (leite é mais ácido que plasma), bases fracas podem se concentrar mais no leite do que no plasma. Deste modo, tetraciclina, penetamato de penicilina, eritromicina, lincomicina, apresentam concentrações maiores no soro do leite. Por outro lado, ácidos fracos tendem a se concentrar mais no plasma sangüíneo do que no leite. Assim, penicilina, benzilpenicilina, sulfonamidas, novobiocina, apresentam uma concentração maior no plasma sangüíneo do que no soro do leite. Substâncias neutras, como o cloranfenicol, apresentam um equilíbrio não influenciado pela diferença de pH do sangue e do leite (MIDIO e MARTINS, 2000; BALLARINI, 2001).

Diferenças existentes na excreção de agentes químicos através do leite podem ser devidas às variações inter-espécies, tipo de formulação do antibiótico aplicado no animal, quantidade de leite produzido e período de carência. Produtos de biotransformação, desde que não transformados em ácidos fortes, podem também estar presentes no leite (MIDIO e MARTINS, 2000).

O leite de animais com mastite difere em composição e propriedades do leite de animais sadios, assim a mastite pode afetar a eliminação de xenobióticos (MORETAIN e BOISSEAU, 1993; COSTA, 1999). O tempo de eliminação do antibiótico em quartos com mastite pode ser maior do que em quartos saudáveis (MOL, 1975; RAIA et al., 1999).

Também a quantidade de antibiótico administrado e a natureza do veículo parecem ser fatores que afetam tanto a concentração, quanto o período de eliminação (MORETAIN e BOISSEAU, 1993). Os compostos ativos podem ser aplicados sob várias formas como: solução aquosa, suspensão aquosa, cremes, emulsões oleosas, pomadas, suspensões ou soluções em óleos vegetais, ceras naturais, óleo mineral ou misturas destes veículos (MOL, 1975). Podem, ainda, conter aditivos, tais como

emulsificantes e substâncias para retardar a liberação dos ingredientes ativos, influenciando a concentração no leite ou absorção (MOL, 1975).

MERCER et. al (1970) identificaram uma influência potencial da produção de leite sobre a eliminação de 21 produtos antimicrobianos intramamários, compostos principalmente por penicilina, diidroestreptomicina e neomicina, destes, dezesseis produziram resíduo no leite além do período de carência estipulado pelos fabricantes.

ANDERSON et al. (1996) realizaram um experimento para avaliar a persistência de resíduo de ampicilina e amoxicilina após a administração de dose acima da recomendada pelo fabricante, 22 mg/Kg, por via intramuscular (para ampicilina a dose recomendada é de 4 a 11 mg/Kg e para a amoxicilina de 6,6 a 11 mg/Kg). Concluíram que o uso de ampicilina e amoxicilina em doses duas vezes maiores do que os limites estabelecidos pelos fabricantes não produziram resíduo acima de 10 ppb (limite determinado pelo FDA, vide anexo I) após o período de carência de 48 e 96 horas respectivamente.

1.9 TÉCNICAS DE DETECÇÃO DE RESÍDUOS DE ANTIMICROBIANOS NO LEITE

A importância da presença de resíduos de antimicrobianos no leite incentivou o desenvolvimento de vários testes para detecção destes resíduos (BARBERIO e SIGNORINI, 1996).

A partir dos anos 50, o método de ensaio de disco com *Bacillus subtilis* e suas modificações foram usados para detectar resíduos de antimicrobianos no leite. Durante os anos 70 e 80 ocorreu o desenvolvimento de técnicas radioimunológicas e enzimáticas para determinar a presença de beta-lactâmicos e outros antimicrobianos, tais como tetraciclina, estreptomicina, eritromicina, novobiocina, e

sulfonamidas. Outros testes determinam a presença de resíduos de beta-lactâmicos baseados na inibição da reação de enzimas específicas. Finalmente, durante os anos 80 foram introduzidos testes utilizando anticorpos para resíduos específicos (BISHOP et al., 1992).

Métodos físico-químicos como cromatografia gasosa, cromatografia em camada delgada e cromatografia líquida de alta pressão também são utilizados para detecção de resíduos de antimicrobianos no leite (HONKANEN-BUZALSKI e REYBROEK, 1997).

O método de inibição microbiana pela presença de resíduos de antimicrobiano no leite é o mais utilizado em virtude do custo e da capacidade de evidenciar uma ampla gama de antibióticos e quimioterápicos (BARBERIO e SIGNORINI, 1996).

Este método utiliza uma cultura de microrganismo teste, geralmente *Bacillus stearothermophilus*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*, *Micrococcus luteus*, *Escherichia coli*, *Bacillus megaterium* ou *Streptococcus thermophilus*, semeada em meio de crescimento agar ou líquido, que é inoculado com a amostra de leite e incubado por um período de algumas horas. Durante a incubação a amostra se difunde pelo meio e a presença de substâncias inibidoras impede ou reduz o crescimento do microrganismo indicador. Dependendo do teste comercial as substâncias inibidoras são indicadas por zonas de inibição de crescimento ou por mudança na coloração do meio, através de um indicador de pH (MITCHELL et al., 1998).

Outro método bastante utilizado para a detecção de resíduos de antimicrobianos no leite é o imunoenzimático, conhecido como ELISA (*Enzyme linked immunoadsorbant assay*). Indiferente do objetivo da análise, todos os testes ELISA envolvem duas etapas básicas. Na primeira etapa, um antígeno e um anticorpo, um conhecido e outro proveniente da amostra a ser testada, são unidos para reagir, com a formação de imunocomplexos. Na

segunda etapa, a detecção da reação é conduzida pela adição de um reagente denominado enzima conjugada. O conjugado é um antígeno ou um anticorpo quimicamente unido a uma enzima, como por exemplo a fosfatase alcalina. Quando o conjugado reage com o imunocomplexo é formado um produto colorido. A intensidade de cor determina a presença ou ausência do antígeno ou anticorpo primariamente desconhecido e permite a sua identificação (MITCHELL et al. 1998).

A cromatografia é um método físico-químico de separação dos componentes de uma mistura, realizada através da distribuição destes componentes entre duas fases que estão em contato íntimo. A técnica baseia-se na capacidade diferente que uma molécula ou íon possui de distribuir-se através de duas fases. Uma das fases permanece estacionária enquanto a outra move-se através dela. Durante a passagem da fase móvel sobre a fase estacionária, os constituintes da mistura são distribuídos entre as duas fases, de tal forma que cada um dos componentes é seletivamente retido pela fase estacionária, resultando em migrações diferenciais destes (COLLINS et al., 1990).

De acordo com a Portaria nº 8 de 26/06/84 do Serviço de Inspeção Federal do Ministério da Agricultura, publicada no Diário Oficial da União em 11/07/84 (BRASIL, 1984) pelo menos uma vez por semana deve ser realizada, obrigatoriamente a pesquisa de inibidores em amostras de leite de pequena mistura (a nível de produtor) pelo método TTC (cloreto 2-3-5-trifenil tetrazólio), método de disco em placas, Delvotest®, ou outro aprovado.

O método TTC, por exemplo, utiliza cultura de *Streptococcus thermophilus* adicionada à amostra de leite que é incubada em banho-maria a 37°C, durante duas horas, após este período é adicionado 0,3ml de TTC e incubado por mais 30 minutos na mesma temperatura. As amostras

negativas apresentam uma coloração rosa intensa e as positivas branca (BARROS E PERCHES, 1981).

No quadro 1 estão apresentados alguns dos testes disponíveis no comércio

Quadro 1: Exemplos de testes para detecção de resíduos de antibiótico no leite

TESTE*	TIPO
Disco	inibição microbiana.
¹ BR teste (Brilliant black reduction test)	inibição microbiana <i>Bacillus</i> <i>stearotherophilus var.calidolactis</i>
² Charm Farm Teste	inibição microbiana do <i>Bacillus</i> <i>stearotherophilus</i>
³ Delvotest®	inibição microbiana <i>Bacillus</i> <i>stearotherophilus var.calidolactis</i>
⁴ Snap ^{MT} (Beta-lactâmicos)	imunoenzimático(ELISA)
⁵ Snap ^{MT} (tetraciclina);	imunoenzimático(ELISA)
⁶ CITE Probe® gentamicina	imunoenzimático(ELISA)
⁷ CITE®Sulfa-trio (sulfametazina, Sulfatiazol,sulfametoxina)	imunoenzimático(ELISA)
⁸ Lactek (Beta-lactâmicos); (Lactek sulfametazina;Lactek gentamicina)	imunoenzimático(ELISA)
Signal (gentamicina); (Signal sulfametazina;Signal neomicina)	imunoenzimático(ELISA)
⁹ Penzime®	Enzimático

Fonte: COSTA, 1996

- ¹ * BRtest , (Idetek,Inc., Sunnyvale, Calif.)
² Charm Farm (Charm Sciences,Inc., Malden, Md.)
³ Delvotest® (Gis brocades Food Ingredients,Inc., Netherlands)
^{4,5,6,7} CITE Probe®(IDEXX, Portland, Maine)
⁸ LacTek(Idetek, Inc.)
⁹ Penzime® (UCB BioproductsSA, Chemin du Foriest, Belgium)

2- OBJETIVO

Foram objetivos deste trabalho estudar a influência da ocorrência e intensidade do processo inflamatório (mastite clínica e subclínica) na presença de resíduos detectáveis no leite de tanques resfriadores de propriedades leiteiras e ainda, avaliar sua influência no tempo de eliminação de diferentes antimicrobianos administrados por via sistêmica ou intramamária no leite de vacas.

Para tanto utilizou-se o seguinte delineamento experimental:

1^a Etapa – Na pequena mistura (tanques resfriadores)

- Avaliação da presença de resíduos de antimicrobianos em amostras de leite de tanques resfriadores correlacionada ao nível de ocorrência de mastite em propriedades leiteiras.

2^a Etapa – Nos animais

- Avaliação da influência dos inibidores naturais, produzidos em decorrência do processo inflamatório em glândulas mamárias de animais não tratados, sobre teste microbiológico comercial para detecção de resíduos de antimicrobianos.

- Avaliação da influência do processo inflamatório da glândula mamária na persistência de resíduos, em amostras de leite de animais tratados por diferentes vias e antimicrobianos.

3- MATERIAL E MÉTODOS

3.1 MATERIAL

1ª Etapa: Experimento 1

Experimento 1: Avaliação da presença de resíduos de antimicrobianos na mistura de leite de tanques resfriadores e o nível de ocorrência de mastite em propriedades leiteiras.

Foram analisadas 60 amostras do leite de tanques resfriadores e o nível de mastite clínica em propriedades leiteiras, do Estado de São Paulo e Minas Gerais, no período 2 anos. No Quadro 2 estão apresentadas as propriedades e as principais características destas.

Quadro 2: Características das propriedades leiteiras (P) utilizadas para a coleta de amostras destinadas à análise de resíduos de antimicrobianos, considerando-se o tipo de leite, o número de animais, a quantidade de leite no tanque resfriador e os antimicrobianos mais utilizados na propriedade. São Paulo, 2001.

P	LEITE	Nº DE ANIMAIS	TANQUE EM LITROS	Antimicrobianos em uso na propriedade*
1.	B	60	1000	Cefoperazona ¹
2.	B	19	350	Cefoperazona ¹
3.	B	202	3000	Cefalexina+neomicina ²
4.	C	37	500	Gentamicina ³
5.	C	31	450	não informado
6.	C	57	700	não informado
7.	B	90	1800	Cefalexina+neomicina ²
8.	B	37	650	Gentamicina ³ , Espiramicina+ Neomicina ⁴ , Estreptomicina+ novobiocina+Penicilina+polimixina B ⁵
9.	B	175	3800	Neomicina ¹¹
10.	B	28	850	Estreptomicina+ Framicetina+ Penicilina ⁶
11.	B	47	1060	Gentamicina ³
12.	B	44	900	Oxietetraciclina ¹⁰
13.	B	79	1850	Espiramicina+ Neomicina ⁴ , Sulfadiazina + Trimetopim ⁷
14.	B	90	1900	Gentamicina ³ , Tilosina ⁸ , Quemisetina, Oxitetraciclina ¹⁰ , Espiramicina+ Neomicina ⁴
15.	B	246	6000	Cefalexina+neomicina ² , Gentamicina ³
16.	B	65	1050	Cefalexina+neomicina ² , Gentamicina ³
17.	B	247	2100	Cefalosporina
18.	B	27	500	Cefoperazona ¹
19.	B	34	550	Cefoperazona ¹ , Sulfa
20.	B	27	400	Gentamicina ³ , Amoxicilina+ Cloxacilina ⁹
21.	B	152	2900	Espiramicina+ Neomicina ⁴
22.	B	46	550	Neomicina ¹¹
23.	B	35	400	Cefalexina+neomicina ² , Gentamicina ³ , Pirlimicina ¹²
24.	B	86	2550	Gentamicina ³ , Espiramicina+ Neomicina ⁴ , Sulfadiazina + Trimetopim ⁷ , Penicilina+ diidroestreptomicina ¹³ .
25.	B	70	1000	Gentamicina ³ , Oxitetraciclina ¹⁰
26.	B	40	800	Sulfa, Gentamicina ³
27.	B	246	6300	Neomicina ¹¹ , Cloxacilina ¹⁴
28.	B	31	650	Estreptomicina+ Framicetina+ Penicilina ⁶
29.	B	92	2000	Cefoperazona ¹ , Cefalexina+neomicina ² , Espiramicina+ Neomicina ⁴ , Estreptomicina+ novobiocina+Penicilina+polimixina B ⁵ , Estreptomicina+ Framicetina+ Penicilina ⁶ , Tilosina ⁸ , Sulfadiazina + Trimetoprim ⁷ , Oxitetraciclina ¹⁰ .

P	LEITE	Nº DE ANIMAIS	TANQUE EM LITROS	Antimicrobianos em uso na propriedade*
30.	B	35	800	Cefoperazona ¹
31.	B	25	150	não informou
32.	B	224	3900	Espiramicina+ Neomicina ⁴ , Estreptomicina+ Framicetina+ Penicilina ⁶ , Florfenicol ¹⁵ .
33.	B	58	1200	Espiramicina+ Neomicina ⁴ , Sulfadiazina + Trimetoprim ⁷ , Oxitetraciclina ¹⁰
34.	B	75	2000	Sulfa
35.	B	73	1900	Espiramicina+ Neomicina ⁴ , Sulfadiazina + Trimetoprim ⁷ , Oxitetraciclina ¹⁰
36.	B	30	800	Oxitetraciclina ¹⁰ , Cefalexina+neomicina ²
37.	B	61	900	não informou
38.	C	17	170	Espiramicina+ Neomicina ⁴
39.	B	90	1800	Estreptomicina+ Framicetina+ Penicilina ⁶ , Oxitetraciclina ¹⁰ , Quinolona
40.	B	90	1800	Sulfa + Trimetoprim ⁷ , Estreptomicina+ Framicetina+ Penicilina ⁶
41.	B	80	2000	Gentamicina ³ , Espiramicina+ Neomicina ⁴ , Penicilina+ diidroestreptomicina ¹³ , Sulfadiazina+ Trimetoprim ⁷
42.	B	136	2720	Espiramicina+ Neomicina ⁴
43.	B	168	3360	Espiramicina+ Neomicina ⁴
44.	B	18	400	não informou
45.	B	96	2100	Estreptomicina+ Framicetina+ Penicilina ⁶ , Cefoperazona ¹ , Cloxacilina+ampicilina ¹⁶ , Sulfadiazina + trimetoprim ⁷ , Oxitetraciclina ¹⁰
46.	B	48	350	Cefoperazona ¹
47.	B	89	1800	não informou
48.	B	295	6000	Gentamicina ³ , Tetraciclina, Sulfadiazina + trimetoprim ⁷ , Hidroiodeto de penetamato ¹⁷ , Cefalexina + neomicina ² , Pirlimicina ¹²
49.	B	89	1800	não informou
50.	B	81	865	Hidroiodeto de penetamato ¹⁷ , Estreptomicina+ novobiocina+Penicilina+polimixina B ⁵
51.	B	97	2100	Penicilina G + sulfato de hidroestreptomicina ¹⁸ , Cefalexina + neomicina ² , Cloxacilina ¹⁴

P = propriedade leiteira

*antimicrobianos mais utilizados na propriedade para tratamento de diferentes infecções das vacas em lactação.

1-Pathozone – Laboratórios Pfizer Ltda.

2 Rilexine 200 – Virbac do Brasil

3 Gentrin – Produtos Veterinários Ouro Fino Ltda.,
Gentocin Mastite – Schering Plough Veterinária

4 Flumast – Mallinckroot Vet. Ltda.

5 Tetradelta – Rhodia-Mérieux Veterinária Ltda.

6 Leocilin mastite aguda – Boehringer de Angeli

7 Tribissem – Mallinckroot Vet. Ltda. ,

Sulfamax – Vallée S. A.

8-Tylan 200 – Eli Lilly do Brasil, Div. Elanco Saúde Animal

9 Bovigan – Bayer S.A.

10 Bivatorp - Boehringer de Angeli,

Oxivet - Novartis Biociências

11 Neobiotic - Rhodia-Mérieux Veterinária Ltda

12 Pirsue - Rhodia-Mérieux Veterinária Ltda

13 Agrovet PS– Novartis Biociências

14 Anamastit – Univet S.A.,

15 Nuflor - Schering – Plough Veterinária

16 Amplicox - Laboratórios Pfizer Ltda

17 Leocilin injetável - Boehringer de Angeli

18 Agropen - Virbac do Brasil

Animais

Neste experimento, nas diferentes propriedades leiteiras, foram examinadas 4.415 vacas em lactação (Quadro 2) das raças: Holandesa, Jersey, Pardo-suiço e animais mestiços do cruzamento de bovinos europeus (*Bos taurus*) e indianos (*Bos indicus*) para avaliação dos níveis de mastite clínica. Esta etapa foi realizada com a equipe do NAPGAMA.

2ª Etapa - Experimentos de 2 a 5

Animais

Nos experimentos 2, para a avaliação da influência de inibidores naturais, e 3, 4 e 5, para as avaliações da persistência de resíduos em amostras de leite de animais tratados e controles não tratados foram colhidas amostras de 135 vacas em lactação, das raças: Holandesa, Jersey, Pardo-suiço e animais mestiços do cruzamento de bovinos europeus (*Bos taurus*) e indianos (*Bos indicus*). Estes animais foram distribuídos na composição dos grupos experimentais da seguinte forma:

Experimento 2: Avaliação da influência dos inibidores naturais, produzidos em decorrência da reação inflamatória das glândulas mamárias, de animais não tratados sobre teste microbiológico comercial para detecção de resíduos.

Para avaliação da presença de inibidores naturais no leite, de glândulas mamárias com mastite, foram colhidas amostras individuais de quartos de 46 animais, sendo 12 com mastite clínica, 17 com subclínica e 17 sem mastite.

Experimento 3: Avaliação da influência do processo inflamatório da glândula mamária na persistência de resíduos em amostras de leite de animais tratados com antimicrobianos por via sistêmica.

Foram avaliadas, quanto ao período de eliminação do antimicrobiano, 27 amostras de leite de 27 animais tratados por via sistêmica com oxitetraciclina¹, sendo: 9 de glândulas mamárias com mastite clínica, 9 com mastite subclínica e 9 com ausência de processo inflamatório.

Experimento 4: Avaliação da persistência de resíduo de antimicrobianos no leite de vacas tratadas por via sistêmica em relação ao período de carência estipulado pelo fabricante.

Foram colhidas amostras de 26 animais tratados com associações de medicamentos com os seguintes princípios ativos: penicilina G procaína mais diidroestreptomicina² e sulfadiazina mais trimetoprim³.

Experimento 5: Avaliação da persistência de resíduo de antimicrobianos no leite de vacas tratadas por via intramamária em relação ao período de carência estipulado pelo fabricante.

Foram colhidas amostras de 36 animais, tratados com antibióticos do grupo dos betalactâmicos, dos aminoglicosídeos e das tetraciclinas.

Para a avaliação de resíduo no leite de animais tratados com antibiótico do grupo dos betalactâmicos foram colhidas amostras de 16 animais, tratados com cefacetril intramamário⁴ (7 com mastite clínica e 9 com mastite subclínica).

¹ Oxivet® Novartis/Bivatop® Boehringer de Angeli

² Agrovet®PS Novartis

³ Sulfamax ® - Vallée S/A

⁴ Vetimast ® - Ciba-Geigy Química S/A

Para a avaliação de resíduo no leite de animais tratados com antibiótico do grupo dos aminoglicosídeos foram colhidas amostras de 11 animais tratados com gentamicina intramamária⁵ (6 animais com mastite clínica e 5 com subclínica).

Para a avaliação de resíduo no leite de animais tratados com antibiótico do grupo das tetraciclinas foram colhidas amostras de 9 animais tratados com tetraciclina intramamária⁶ (4 animais com mastite clínica e 5 com subclínica).

Medicamentos

Os medicamentos foram escolhidos dentro daqueles adotados nas propriedades que permitiram a realização da pesquisa em seus animais, para não interferir nos esquemas de tratamento normalmente utilizados.

Os medicamentos utilizados nos experimentos 3, 4 e 5 foram aplicados de acordo com as recomendações técnicas dos produtos para tratamento de mastite. No anexo IV encontram-se descritos detalhadamente: composição, indicações, período de carência, dose recomendada para mastite e fabricante dos medicamentos. A aplicação dos tratamentos intramamários foi realizada com seringas e cânulas individuais que acompanham cada produto. Nos tratamentos sistêmicos foram utilizadas seringas (10 ml) e agulhas (30 X 12) descartáveis.

⁵ Gentocin® - Schering-Plough Veterinária

⁶ Unguento Vallée® – Vallée S/A

3.2 MÉTODOS

Diagnóstico e Caracterização do Processo Inflamatório na Glândula Mamária

Em todos os experimentos desta pesquisa para o diagnóstico de mastite clínica e subclínica utilizou-se a mesma metodologia e o seguinte critério de interpretação: os animais foram examinados antes da ordenha, pelos testes de Tamis (RADOSTITIS et al., 1994) e CMT (California Mastitis Test - SCHALM E NOORLANDER, 1957). Os quartos mamários, que apresentaram leite com grumos nos primeiros jatos no exame de Tamis e/ou alterações visíveis da glândula mamária (edema, calor, dor e rubor), foram classificados como casos de mastite clínica e os quartos mamários sem alteração, que apresentaram leite sem grumos, coágulos, filamentos ou sangue, mas positivos ao teste do CMT foram classificados como casos de mastite subclínica. Os quartos que apresentaram leite sem alteração, ao exame de Tamis e negativos ao CMT foram identificados como sem processo inflamatório.

O diagnóstico de mastite clínica, pelo teste de Tamis (caneca telada constituída de malha "standard" nº 120) ou caneca preta, foi interpretado segundo os diferentes escores observados na ordenha dos primeiros jatos de leite : escore 0- leite apresentava-se normal (completa ausência de partículas), escore 1- a secreção apresentava-se semelhante ao leite normal, mas ligeiramente descolorida com presença de grumos finos e delicados; escore 2- a secreção apresentava-se semelhante ao leite, mas com muitos grumos; escore 3- a secreção era semelhante ao leite com grumos grandes; escore 4- a secreção não mais se assemelhava ao leite, apresentando-se com pus e/ou sangue e/ou fibrina, ou ainda com aspecto viscoso, similar ao colostro ou à secreção de vaca seca (WATANABE, 1999). As amostras colhidas, para os diferentes experimentos, foram de

quartos mamários que apresentavam os escores de 0,1,2 ou 3, sendo classificados como casos de mastite clínica a partir do escore 1 (Figura 1).



Figura 1: Exame para diagnóstico de mastite clínica realizado com os primeiros jatos de leite, antes da ordenha, evidenciando alterações no leite. Observa-se na figura grumos visíveis na caneca inferior direita, indicando a presença de mastite na glândula correspondente

O CMT, *California Mastitis Test*, é capaz de detectar a ocorrência de mastite subclínica pelo aumento de células somáticas por mililitros de leite, principalmente polimorfonucleares (PMN). De cada quarto mamário foi retirada uma amostra de leite à qual foi adicionada, na mesma proporção, um detergente aniônico (alquil - lauril sulfato de sódio) capaz de emulsionar os lipídios das membranas dos leucócitos presentes no leite, com conseqüente liberação do material nucleico. Ocorre, a seguir, uma gelificação da mistura leite-reativo proporcional à quantidade de células presentes classificada em diferentes escores, que correspondem às diferentes intensidades do processo inflamatório (THIERS et al. 1999). O teste de CMT foi classificado em escores negativo, traço, 1, 2 ou 3, de acordo com ausência ou aumento da viscosidade da mistura, sendo considerados como casos de mastite subclínica a partir do escore 1 (Figura 2).



Figura: 2 Teste CMT, realizado antes da ordenha para diagnóstico de mastite subclínica

Colheita de Amostras

Para o experimento 1, as amostras foram colhidas preferencialmente da parte superior do tanque, após homogeneização da mistura de leite por agitadores eletrônicos por no mínimo 4 minutos. O volume colhido foi de 30 ml aproximadamente. Os níveis de ocorrência de mastite nas propriedades foram avaliados, na ocasião da colheita, pelo exame de todos os quartos mamários de todos os animais em lactação, utilizando-se os testes de triagem (Tamis e CMT).

Para a colheita das amostras dos experimentos 2, 3, 4, e 5 adotou-se a seguinte metodologia: os quartos mamários foram avaliados quanto à presença de mastite clínica, subclínica ou ausência de processo inflamatório, como descrito. Antes da ordenha dos animais, procedeu-se a anti-sepsia dos tetos, sendo o leite colhido em tubos de ensaio estéreis (16x160 mm). O volume das amostras foi de 20 ml aproximadamente. As amostras foram congeladas até o momento da análise, uma vez que em avaliações preliminares, realizadas em 10 amostras, submetidas em paralelo ao resfriamento e ao congelamento e analisadas pelo teste de detecção de resíduos (Delvotest[®]) não se verificou interferência deste procedimento sobre o teste.

Tratamentos

Para os experimentos 3, 4 e 5 o tratamento dos animais com antimicrobianos ocorreu após a avaliação dos quartos mamários quanto à presença de processo inflamatório (mastite clínica e mastite subclínica). Foram, a seguir, tratados por via sistêmica ou intramamária. O tratamento sistêmico consistiu na aplicação intramuscular profunda do antimicrobiano, conforme instrução do fabricante. O tratamento intramamário consistiu na aplicação do medicamento em um dos quartos do úbere do animal, de acordo com as indicações do fabricante. As amostras de leite foram colhidas 24 horas antes do período de carência, durante o período de carência estipulado pelo fabricante e 24 horas após este período.

Testes para a Detecção de Resíduos

As análises foram realizadas com teste microbiológico comercial, Delvotest[®]P e SP (o SP possui maior sensibilidade para sulfas), composto por ampolas com esporos de cepas bacterianas de *Bacillus stearothermophilus* var. *calidolactis*, em meio de ágar com indicador. O teste obedeceu à seguinte metodologia: 1 - abertura das ampolas (Delvotest[®])

com a retirada da tampa de alumínio, 2 - adição da pastilha nutriente, 3 - adição de 0,1 ml das amostras de leite a serem analisadas, 4 - incubação das ampolas em banho-maria a 64°C por 2,5 horas para o Delvotest® P e 3 horas para o Delvotest® SP, segundo a recomendação técnica, 5 - realização da leitura. Na interpretação dos resultados do teste considerou-se positivo aquele que apresentou coloração púrpura e negativo quando ocorreu mudança da cor púrpura para amarela, de acordo com o controle negativo. Todas as baterias de testes foram sempre acompanhadas de controles. Para diminuir a ocorrência de falso-positivos, pela interferência de substâncias antimicrobianas naturais do leite, as amostras dos animais tratados (experimentos 3, 4 e 5) foram aquecidas a 80°C por 5 minutos em banho-maria, antes dos testes (Figura.3).



Figura 3: Resultados do teste microbiológico (Delvotest®), a coloração amarela significa um teste negativo para resíduo, enquanto a coloração púrpura é um teste positivo.

Todos os testes seguiram este mesmo procedimento à exceção da análise das amostras de leite de animais tratados com associações de antimicrobianos: sulfadiazina associada ao trimetoprim e penicilina associada à diidroestreptomicina. No caso do grupo tratado com sulfadiazina

e trimetoprim, após a realização do Delvotest®SP sem modificação, este foi repetido com adição de ácido para aminobenzóico¹. (PABA). Após a adição da amostra à ampola de Delvotest®SP, foi acrescentado PABA (10 µL), para inibir a ação da sulfa e evidenciar a presença de resíduo de trimetoprim, utilizando-se uma micropipeta²

As amostras de animais tratados com penicilina e diidroestreptomicina foram analisadas através do Delvotest®SP sem modificação e repetido com a adição de penicilinase. Após a adição da amostra à ampola de Delvotest®SP, foi acrescentada penicilinase³ (10 µL), para inibir a ação da penicilina e evidenciar a presença de resíduo de diidroestreptomicina, utilizando-se uma micropipeta²

Análise Estatística

As análises estatísticas foram realizadas utilizando-se o “software” GRAPHPAD INSTAT 1990-93, tendo sido empregados os testes de Fisher e Spearman.

¹ Ácido para aminobenzóico – Sigma Aldrich Química Brasil Ltda

² Pipetman – 10 µl – Gilson, France

³ Bacto Penase – Difco Laboratories, P.O. Box 1058, Detroit - USA

4- RESULTADOS

Experimento 1: Avaliação da presença de resíduos de antimicrobianos na mistura de leite de tanques resfriadores e o nível de ocorrência de mastite em propriedades leiteiras.

Na Tabela 1 estão discriminados os resultados das amostras positivas de leite de tanques resfriadores das propriedades leiteiras analisadas para a presença de resíduo e a porcentagem de casos de mastite clínica. Na Tabela 2 estão agrupados os dados referentes à presença de resíduos, tendo sido verificado que 9 amostras foram positivas, representando 15%. No anexo II e III encontram-se discriminados todos os medicamentos com a respectiva composição e as amostras examinadas com a porcentagem de mastite das vacas em lactação.

Tabela 1: Propriedades leiteiras de São Paulo e Minas Gerais que no teste microbiológico (Delvotest®) apresentaram positividade para resíduo de antimicrobiano no tanque resfriador com o respectivo nível de mastite clínica e o tratamento mais utilizado. São Paulo, 2001.

Propriedade ¹	Mastite Clínica % ²	Antimicrobiano utilizado no tratamento de casos de mastite na propriedade
5	12,90	Não relatado
24	26,74	Espiramicina+Neomicina, Estreptomicina+Penicilina, Sulfadiazina+Trimetoprim
26	10	Gentamicina e sulfametazina
35	13,70	Espiramicina+Neomicina, Sufadiazina+Trimetoprim, Tetraciclina
36	20,00	Tetraciclina, Neomicina+Cefalexina
39	6,41	Estreptomicina+ Framicetina+Penicilina, Tetraciclina, Quinolona
41	29,63	Espiramicina+Neomicina,Estreptomicina+Penicilina, Sufadiazina+Trimetoprim, Gentamicina
44	0	Não relatado
46	8,33	Cefoperazone

Delvotest® -P, Delvotest® -SP (Gist-brocades Food Ingredients, Inc., Netherlands).

¹ Número correspondente à relação de propriedades representadas no Quadro 2 de Materiais e Métodos.

² Animais com mastite em relação ao total de animais da propriedade.

Tabela 2: Presença de resíduos de antimicrobianos em amostras de leite de tanques resfriadores de propriedades leiteiras no Estado de São Paulo e de Minas Gerais, detectada por teste microbiológico¹. São Paulo, 2001

AMOSTRAS DE LEITE	Nº	%
NEGATIVO	51	85
POSITIVO	9	15
TOTAL	60	100

¹Delvotest®P, Delvotest®SP (Gist-brocades Food Ingredients, Inc., Netherlands)
N = número de amostras analisadas

A Tabela 3, ilustrada pela Figura 1, permite verificar a correlação entre o aumento da frequência de mastite clínica e a ocorrência de resíduo de antimicrobiano no tanque resfriador ($r = 1,0$; teste de Spearman).

Tabela 3: Avaliação da ocorrência de resíduos de antimicrobianos em tanques resfriadores de propriedades leiteiras nos estados de São Paulo e de Minas Gerais, de acordo com a porcentagem de mastite clínica, agrupadas em faixas de ocorrência. São Paulo, 2001

Amostras	Níveis de mastite clínica (faixa de ocorrência em porcentagem)							
	0 a 5%		5,1 a 10%		10,1 a 20%		>20,1%	
	N	%	N	%	N	%	N	%
Positivo	1	12,5	3	13,04	3	15,00	2	22,22
Negativo	7	87,5	20	86,96	17	85,00	7	77,8
Total	8	100	23	100	20	100	9	100

N = número de amostras.

Níveis de mastite: porcentagem de ocorrência de animais positivos, para mastite clínica, em relação ao total de animais em lactação da propriedade

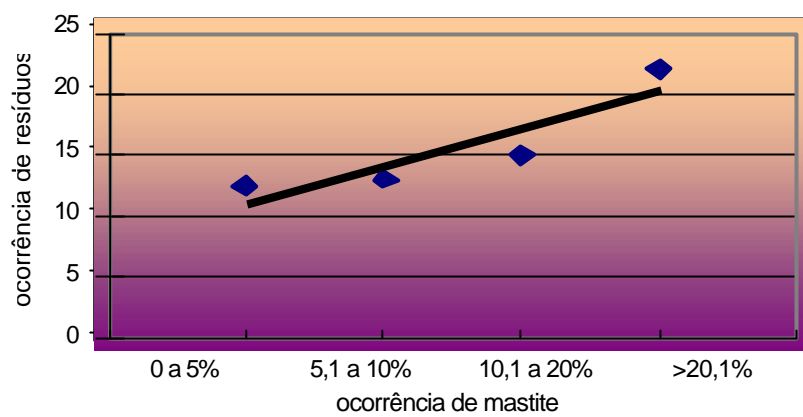


Figura 4: Correlação ($r = 1,0$; Spearman) entre ocorrência de resíduos de antimicrobianos em tanques resfriadores de propriedades leiteiras nos estado de São Paulo e de Minas Gerais, em relação ao nível de ocorrência de mastite clínica (em porcentagem). São Paulo, 2001

Experimento 2: Avaliação da influência dos inibidores naturais produzidos pela reação inflamatória das glândulas mamárias de animais não tratados sobre teste microbiológico comercial de resíduos.

Na Tabela 4 são apresentados os resultados da avaliação de amostras de leite, obtidas de quartos mamários de animais não tratados, pelo teste microbiológico (Delvotest[®]-P). Observou-se que 33% das amostras de quartos com mastite clínica e 18% das amostras de quartos com mastite subclínica apresentaram resultados positivos. Na ausência de processo inflamatório todas as amostras apresentaram resultado negativo. A diferença de positividade foi estatisticamente significativa, quando comparadas as amostras de quartos mamários com mastite clínica e as amostras de quartos mamários com ausência de processo inflamatório ($p \leq 0,05$, Fisher)*.

Tabela 4: Avaliação da influência do processo inflamatório da glândula mamária (mastite clínica ou subclínica) na positividade ao teste microbiológico de pesquisa de resíduo (Delvotest[®]-P), em amostras de leite de 46 quartos mamários de animais em lactação não tratados. São Paulo 2001.

Intensidade do processo inflamatório	Número de quartos	Positividade ao teste ¹	
		N	%
Mastite clínica	12	4	33 ^a
Mastite subclínica	17	3	18
Ausência de processo inflamatório	17	0	0 ^a
Total	46	7	15

¹ Delvotest[®] (Gist-brocades Food Ingredients, Inc., Netherlands.).

^a $p \leq 0,05$ (Fisher, amostras de quartos com mastite clínica em relação às amostras de quartos sem processo inflamatório)

* Testes realizados sem aquecimento preliminar das amostras a 80° C

Experimento 3: Avaliação da influência do processo inflamatório da glândula mamária na persistência de resíduos em amostras de leite de animais tratados

Na Tabela 5 estão apresentados os resultados referentes à avaliação da persistência de resíduo no leite de animais tratados por via sistêmica, com oxitetraciclina, comparando-se amostras colhidas de quartos com processo inflamatório e sem processo inflamatório. Os resultados obtidos nas amostras revelaram que, após 72 horas da aplicação do medicamento, houve diferença significativa ($p \leq 0,05$) entre as amostras com mastite e as com ausência de processo inflamatório, verificou-se um menor número de amostras positivas provenientes de animais sem processo inflamatório em relação às amostras de animais com mastite clínica e subclínica^{**}. Estes resultados são ilustrados pela Figura 2.

Tabela 5: Avaliação da influência do processo inflamatório na persistência do resíduo de antibiótico em amostras de leite de animais tratados por via sistêmica com oxitetraciclina*, pelo teste microbiológico para pesquisa de resíduo (Delvotest® P - Gist brocades) São Paulo, 2001.

Intensidade do processo inflamatório	Período após o tratamento							
	48 hs		72 hs		96 hs		120 hs	
	N	%	N	%	N	%	N	%
Mastite clínica (N=9)	9	100	8	88,8 ^a	4	44,4	1	11,1
Mastite subclínica (N=9)	9	100	7	77,7 ^a	1	11,1	0	0
Ausência de inflamação (N=9)	9	100	1	11,1 ^a	0	0	0	0
Total (N=27)	27	100	16	59,25	5	18,51	1	3,7

* Oxivet ® : oxitetraciclina 200 mg/ml (Novartis Biociência S/A)

*Bivatop ® : oxitetraciclina 200 mg/ml (Boehringer de Angeli Química e Farmacêutica Ltda)

^a $p \leq 0,05$

N= número de animais positivos ao teste

** Testes realizados após aquecimento das amostras de leite a 80°C

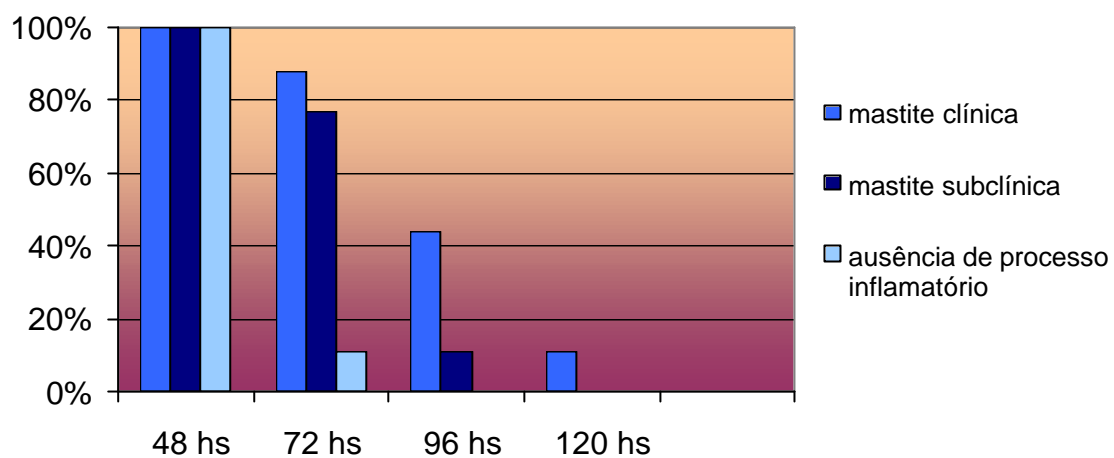


Figura 5 Avaliação da influência do processo inflamatório na persistência do resíduo de antibiótico em animais tratados por via sistêmica com oxitetraciclina, pelo teste microbiológico (Delvotest®) São Paulo, 2001.

Experimento 4: Avaliação da persistência de resíduos de antimicrobianos no leite de vacas tratadas por via sistêmica em relação ao período de carência estipulado pelo fabricante.

Na Tabela 6 estão apresentados os resultados referentes à avaliação da persistência de resíduo no leite de animais com mastite clínica tratados pela via sistêmica com associação de penicilina e diidroestreptomicina e associação de sulfadiazina e trimetoprim. Observaram-se em ambos os casos persistência de resíduos em níveis detectáveis, além do período de carência, sendo 52,4% em relação à penicilina associada à diidroestreptomicina e 60% em relação à sulfadiazina associada ao trimetoprim.

Tabela 6: Avaliação da persistência de resíduo de antimicrobianos em amostras de leite de vacas leiteiras, com mastite clínica, tratadas associações de antibióticos ou quimioterápicos por via sistêmica. São Paulo, 2001.

Associações de antimicrobianos	Período após tratamento					
	48 hs		*72 hs		96 hs	
	N	%	N	%	N	%
Antibióticos ¹	21	100	18	85,7	11	52,4
Quimioterápicos ²	5	100	4	80	3	60

*72 hs - Período de carência estipulado pelos fabricantes

¹ Penicilina G procaina mais diidroestreptomicina (Agrovet® PS, Novartis)

² Sulfadiazina mais trimetoprim (Sulfamax - Vallée S/A)

N = número de animais positivos ao teste

Na Tabela 7 estão apresentados os dados da persistência de resíduos no leite de animais tratados com sulfadiazina associada ao trimetoprim ou com penicilina associada à diidroestreptomicina, pelo teste microbiológico (Delvotest®SP). Nas amostras de animais tratados com sulfadiazina e trimetoprim, após tratamento com PABA para inativar a ação da sulfadiazina, foi possível detectar a persistência do resíduo de trimetoprim. Verificou-se que a sulfadiazina foi detectada por um período maior do que o trimetoprim, ultrapassando o período de carência estipulado pelo fabricante em 60% dos casos. Nas amostras de animais tratados com penicilina e diidroestreptomicina, após tratamento com penicilinase para inativar a ação da penicilina, foi possível detectar a persistência do resíduo de diidroestreptomicina. Verificou-se que a penicilina foi detectada por um período maior do que a diidroestreptomicina, ultrapassando o período de carência estipulado pelo fabricante em 33,3% dos casos. (Figura 3).

Tabela 7: Avaliação da persistência de resíduos em amostras de leite de animais tratados por via sistêmica com sulfadiazina associada ao trimetoprim¹ ou com penicilina associada à diidroestreptomicina², utilizando teste microbiológico³ respectivamente com e sem PABA e com e sem penicilinase. São Paulo, 2001.

Antimicrobianos	Período após tratamento					
	48 hs		*72 hs		96 hs	
	N	%	N	%	N	%
Trimetoprim ^{1,4}	3	60	2	40	0	0
Sulfa ¹	5	100	4	80	3	60
Diidroestreptomicina ^{2,5}	4	66,6	0	0	0	0
Penicilina ²	6	100	4	66,6	2	33,3

*72 hs período de carência estipulado pelo fabricante

¹Sulfamax - Vallée S/A

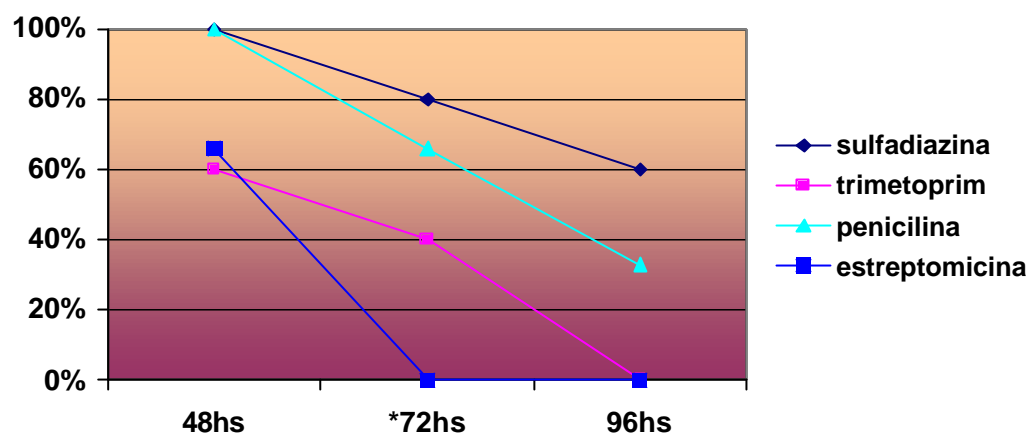
²Agrovet ®-

³Delvotest® SP - Gist brocades

⁴Delvotest® SP associado ao PABA (ácido para-aminobenzóico)

⁵Delvotest® SP associado à penicilinase

N = número de animais positivos ao teste



*72 hs período de carência estipulado pelo fabricante

Figura 6: Persistência de resíduo de antimicrobianos em animais tratados com sulfadiazina e trimetoprim ou com penicilina e diidroestreptomicina, utilizando-se teste microbiológico (Delvotest®), e este associado ao PABA ou a penicilinase, respectivamente, São Paulo, 2000.

Experimento 5: Avaliação da persistência de resíduos de antimicrobianos no leite de vacas tratadas por via intramamária em relação ao período de carência estipulado pelo fabricante.

5.1 Avaliação de resíduo no leite de animais tratados com antibiótico do grupo betalactâmico :

Na tabela 8 estão apresentados os resultados da pesquisa de resíduos de antimicrobiano após a aplicação intramamária de medicamento à base de cefacetril. Houve detecção de resíduo, além do período de carência, em 18,75% das amostras

Tabela 8: Avaliação da persistência de resíduos em amostras de leite de animais tratados com antimicrobiano betalactâmico¹ intramamário, utilizando teste microbiológico² São Paulo, 2001.

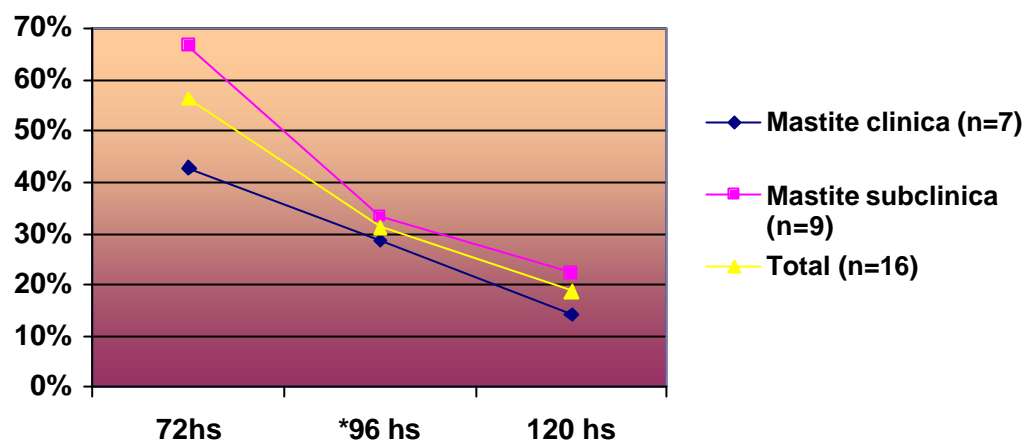
Intensidade do processo inflamatório	Período após tratamento					
	72hs		*96 hs		120hs	
	N	%	N	%	N	%
Mastite clinica (N=7)	3	42,85	2	28,57	1	14,28
Mastite subclinica (N=9)	6	66,66	3	33,33	2	22,22
Total (N=16)	9	56,25	5	31,25	3	18,75

*96 horas período de carência estipulado pelo fabricante

¹Cefacetril, (Vetimat ® Novartis)

²Delvotest® P - Gist brocades

N = número de animais positivos ao teste



* 96 horas período de carência estipulado pelo fabricante

Figura 7: Persistência de resíduo de antimicrobianos em animais tratados com betalactâmico intramamário, detecção pelo teste microbiológico (Delvotest®), São Paulo, 2001.

5.2 Avaliação de resíduo no leite de animais tratados com antibiótico do grupo dos aminoglicosídios:

Na tabela 9 estão apresentados os resultados da presença de resíduos de antimicrobiano após a aplicação intramamária de um medicamento à base de gentamicina. Verificou-se presença de resíduo, além do período de carência em 18,1 % das amostras.

Tabela 9: Avaliação da presença de resíduo de antimicrobianos em amostras de leite de animais tratados, nos quartos com mastite clínica e subclínica, com gentamicina¹ intramamária, utilizando teste microbiológico². São Paulo, 2001.

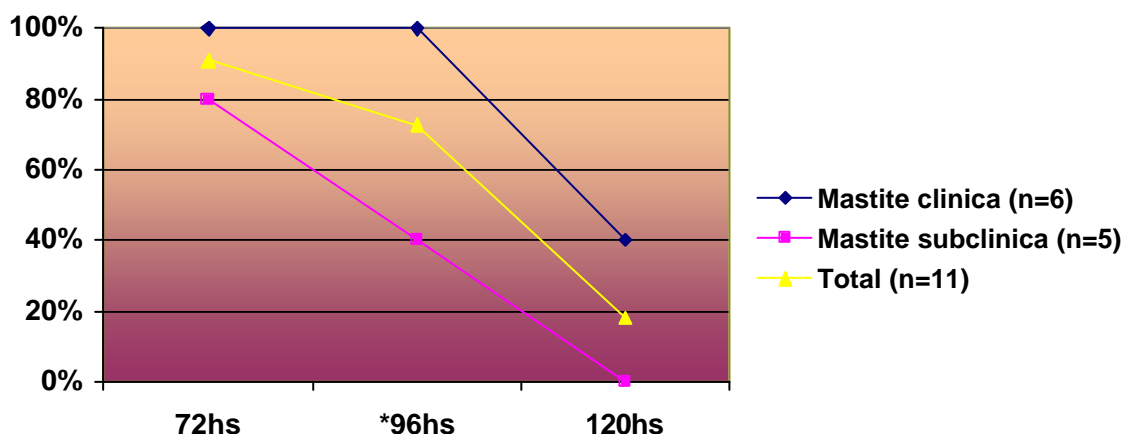
Intensidade do processo inflamatório	Período após tratamento					
	72hs		*96 hs		120hs	
	N	%	N	%	N	%
Mastite clinica (N=6)	6	100	6	100	2	40
Mastite subclinica (N=5)	4	80	2	40	0	0
Total (N=11)	10	90,9	8	72,7	2	18,1

*96 horas período de carência estipulado pelo fabricante

¹Gentocin, Schering Plough

²Delvotest® P - Gist brocades .

N = número de animais positivos ao teste



*96 horas período de carência estipulado pelo fabricante

Figura 8: Persistência de resíduo de antimicrobianos no leite de animais tratados com gentamicina intramamária, utilizando teste microbiológico (Delvotest®), São Paulo, 2001.

5.3 Avaliação de resíduo de antimicrobiano no leite de animais tratados com antibiótico do grupo das tetraciclinas:

Na tabela 10 estão apresentados os resultados da presença de resíduo de antimicrobiano após a aplicação intramamária de um medicamento à base de tetraciclina. Detectou-se persistência de resíduo em 11,1% dos casos, além do período de carência.

Tabela 10: Avaliação da presença de resíduo de antimicrobianos em amostras de leite de animais tratados, nos quartos com mastite clínica e subclínica, com tetraciclina¹ intramamária, utilizando teste microbiológico² São Paulo, 2001.

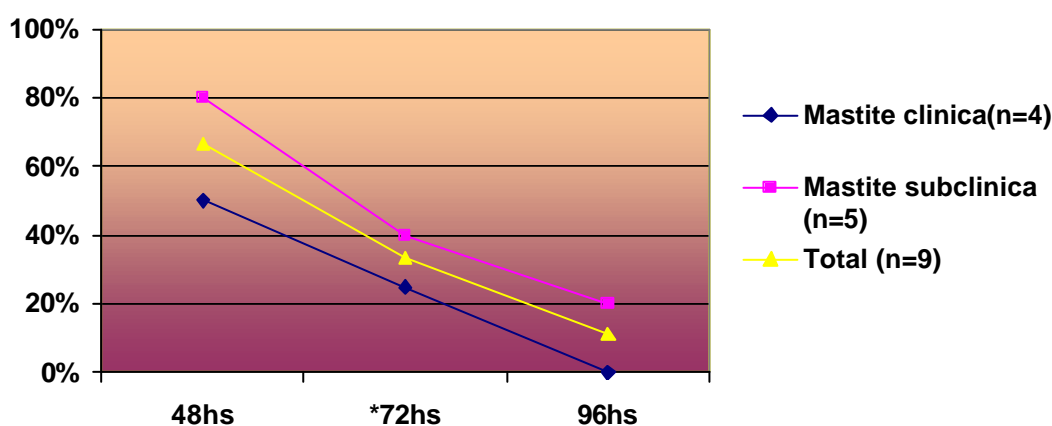
Intensidade do processo inflamatório	Período após tratamento					
	48hs		*72 hs		96hs	
	N	%	N	%	N	%
Mastite clinica (N=4)	2	50,0	1	25,0	0	0
Mastite subclinica (N=5)	4	80,0	2	40,0	1	20,0
Total (N=9)	6	66,6	3	33,3	1	11,1

*72 hs período de carência estipulado pelo fabricante

1 Unguento Vallée - Vallée S/A

2 Delvotest® P - Gist brocades

N = número de animais positivos ao teste



*72 hs período de carência estipulado pelo fabricante

Figura 9: Persistência de resíduo de antimicrobianos em animais tratados com um antibiótico a base de tetraciclina, utilizando teste microbiológico (Delvotest®), São Paulo 2001.

5- DISCUSSÃO

Em muitos países, as amostras de leite das fazendas são rotineiramente monitoradas pelo governo ou indústria para a presença de resíduos de antimicrobianos. No Brasil esta prática está sendo implementada em algumas regiões, mas ainda não atingiu os níveis necessários para um controle adequado, que garanta a qualidade da matéria prima para o consumo e manufatura de derivados lácteos.

Para que isso ocorra, há necessidade de que proprietários de fazendas leiteiras sejam informados sobre os meios para reduzir o risco de resíduos de antimicrobianos no leite de consumo, mantendo os produtos lácteos com qualidade e seguros para o consumidor, evitando-se, conseqüentemente as penalidades econômicas em regiões, onde estas já estão sendo aplicadas, quando da detecção de resíduos de antimicrobianos no leite.

Estudos devem ser conduzidos para fornecer subsídios aos criadores e veterinários, considerando-se as características da produção leiteira das propriedades brasileiras. Raras pesquisas foram realizadas em propriedades leiteiras no País para determinar a importância de um programa adequado de manejo e tratamento, além da adoção de medidas preventivas para evitar resíduos de antimicrobianos nos tanques resfriadores (COSTA et al., 1999). Ao contrário, estão disponíveis na literatura nacional vários estudos sobre a presença de resíduos de antimicrobianos no leite comercializado (BARROS e PERCHES, 1981; GELLI et al., 1984; ALBUQUERQUE et al., 1996; LOPES et al., 1998).

Um total de 60 amostras de leite de tanques resfriadores de diferentes propriedades leiteiras foi submetido à análise com testes para resíduos de antimicrobianos (Delvotest®P e SP) destas, nove (15%) mostraram-se positivas para resíduos (Tabela 2). O Delvotest®, sendo um teste microbiológico, permite a detecção de vários tipos de antimicrobianos, sendo particularmente útil quando não se conhece os medicamentos utilizados nas propriedades. Os resultados demonstraram a ocorrência do problema e a necessidade de se avaliar os fatores que contribuíram para que 15% das amostras estudadas apresentassem resíduos em níveis detectáveis.

Algumas práticas realizadas nas fazendas foram identificadas como fatores de risco para resíduos de antimicrobianos no leite. BOOTH e HARDING (1986), por exemplo, conduziram um estudo em propriedades na Inglaterra onde resíduos de antibióticos foram detectados no leite. Os autores responsabilizaram vários fatores pela ocorrência de resíduos, entre eles: falha na observação do tempo de carência para o leite de vacas tratadas, transferência acidental de leite contaminado para o tanque de mistura, falha na manutenção de registros dos tratamentos e a não identificação dos animais tratados. Além dos referidos, outros estudos identificaram como fatores importantes na ocorrência de resíduos no leite: o tratamento de vacas secas (JOHNSON, et al., 1977; OLIVER et al., 1984) e a persistência de resíduos além do período de carência, em vacas em lactação tratadas com antibióticos (JONES e SEYMOUR, 1988; MARTENIUK et al., 1988).

KANEENE e AHL (1987) referiram que a ocorrência de resíduos de antibióticos estava associada com o aumento do tamanho da propriedade, o número de funcionários, atitude dos produtores em relação ao significado de resíduos na saúde pública e ainda pela dificuldade de realização a campo de testes para resíduos. O mesmo estudo também

demonstrou que os proprietários, em média, eram deficientes no conhecimento de certos fatores relacionados à ocorrência de resíduos, tais como o período de carência e a probabilidade de ocorrência de resíduos de antibióticos no leite, quando do uso inadequado de certos medicamentos no tratamento de animais em lactação.

MEEK et al. (1986) relataram em 110 propriedades leiteiras, selecionadas ao acaso em Ontário, ser a mastite a doença de maior ocorrência, sendo que mais da metade dos antibióticos usados nestas propriedades foram destinados ao tratamento da mastite clínica.

Os resultados obtidos no presente estudo corroboraram com o referido por MEEK et al. (1986). Assim, nesta pesquisa, ao serem as propriedades agrupadas quanto ao nível de mastite clínica, apresentaram uma correlação de 1,0 (Spearman) em relação à porcentagem de ocorrência de resíduo de antimicrobianos nos tanques resfriadores (Tabela 3 e Figura 1). Amostras de leite de tanques resfriadores de propriedades leiteiras que apresentaram alta porcentagem de mastite clínica foram relacionadas com a detecção de resíduo de antimicrobianos no leite, reforçando ser a ocorrência de mastite clínica um fator predisponente importante para a presença de resíduos no leite de tanques resfriadores das propriedades. COSTA et al. (1999) também verificaram, utilizando testes imunoenzimáticos, em 87 propriedades leiteiras no Estado de São Paulo, a ocorrência de 7% das amostras positivas para a presença de resíduos, sendo que a porcentagem de mastite clínica nas propriedades positivas variou de 7,5% a 42%.

RUEGG e TABONE (2000) também observaram a influência da mastite na presença de resíduos em tanques resfriadores de propriedades leiteiras, realizando um estudo retrospectivo (1995 a 1998) em dados do *Wisconsin Department of Agriculture, Trade and Consumer Protection* e verificaram que propriedades com maior ocorrência de resíduos apresentavam alta contagem de células somáticas, acima de 700.000 cel/ml.

O estudo destes autores indicou que altas contagens de células somáticas aumentavam o risco de resíduos de antibióticos no leite dos tanques resfriadores. Segundo WILSON (1997) altos valores de células somáticas indicam propriedades com alta prevalência de mastite subclínica. A identificação de pontos críticos de controle é uma parte do APPCC. Assim os autores concluíram que um ponto crítico de controle para resíduos de antibióticos é a redução da ocorrência de mastite infecciosa nas propriedades leiteiras.

Por outro lado, é importante referir que outras causas, além da mastite, podem contribuir para a presença de resíduos de antimicrobianos no leite (GALLINA et al., 1998; COSTA, 1999). SEYMOUR E JONES (1988), por exemplo, observaram que após aplicação intra-uterina de penicilina procaína e diidroestreptomicina, foram detectados resíduos no leite em 24 e 48 horas. Deve-se ressaltar que, uma propriedade com ausência de mastite clínica (Tabela 1) apresentou resíduo de antimicrobiano no leite do tanque resfriador, confirmando que outras causas, como por exemplo, a utilização de antibióticos no tratamento de outras infecções, também podem resultar na ocorrência de resíduo no leite.

Muitos pesquisadores avaliaram a presença de resíduos de antimicrobianos no leite de consumo. BARROS e PERCHES (1981) analisaram, através do método TTC (cloreto de trifênil tetrazólio), 96 amostras de leite pasteurizado tipo B, comercializado na cidade de São Paulo, SP, e encontraram 21,9% das amostras com presença de resíduos de antibióticos. GELLI et al. (1984) analisando por métodos microbiológicos 404 amostras de leite pasteurizado na cidade de São Paulo, SP, verificaram que 11,67% (Delvotest) e 3,96% (método de difusão em disco) foram positivas para a presença de antibióticos. ALBUQUERQUE et al. (1996) estudaram pelo método de difusão em disco um total de 300 amostras de leite, sendo 69,7% positivas. Das 300 amostras analisadas por estes pesquisadores 33 correspondiam ao leite cru comercializado em Fortaleza,

sendo que destas 81,8% foram positivas. LOPES et al. (1998), utilizaram Delvotest® P para avaliação de 178 amostras de leite pasteurizado, comercializado na cidade de Campinas - SP, 7,9% destas apresentaram resíduos de antibióticos.

É importante referir que as variações observadas, nos diferentes estudos relatados em relação aos níveis de ocorrência de resíduos de antimicrobianos em leite comercializado, podem refletir fatores como: época da realização do estudo, regiões e tipo de testes utilizados. Mas caracterizam a relevância do problema no País.

Os resultados das amostras de tanques resfriadores no presente trabalho, 15% (Tabela 2), foram superiores ao observado por LOPES et al. (1998), que utilizaram o mesmo teste em amostras de leite comercial, em período próximo ao da realização desta pesquisa e em região com características semelhantes. A menor porcentagem de positividade obtida no trabalho dos autores citados, embora utilizando a mesma metodologia do presente estudo, pode ser conseqüência das amostras de tanques resfriadores constituírem a chamada “pequena mistura” (produção de uma propriedade), que posteriormente é misturada às de outras propriedades leiteiras, dando origem ao leite comercializado, portanto, é esperado que os níveis de resíduos encontrados no leite pasteurizado sejam realmente mais baixos pela diluição. Deve-se ressaltar que, exatamente por este motivo, é extremamente preocupante a detecção de resíduos no leite pasteurizado, mesmo em níveis baixos.

A “pequena mistura”, por sua vez, é composta pela produção das vacas em lactação do rebanho de uma propriedade, portanto sujeita à somatória das variações individuais e características de manejo da propriedade, uma vez que a composição do leite é influenciada por fatores genéticos, condições fisiológicas do animal, clima e dieta. Assim, por exemplo, o leite contém várias substâncias naturais inibidoras de

microrganismos. Nestas estão incluídas imunoglobulinas, as enzimas peroxidase, lisozima e lactoferrina, que inibem bactérias analíticas como *Bacillus stearothermophilus* e *Bacillus subtilis*. Todos estes inibidores que ocorrem naturalmente são inativados pelo calor (AERTS et al, 1995).

CARLSSON et al. (1989) demonstraram que os testes para resíduos de antimicrobianos no leite, baseados na inibição do crescimento microbiano, são particularmente propensos a apresentarem resultados falso-positivos, quando o leite testado contém fatores mediadores do processo inflamatório, freqüentemente presentes em casos de mastite clínica.

No presente estudo foi realizada a avaliação da possível interferência do processo inflamatório da glândula mamária sobre a positividade do teste microbiológico (Delvotest® P) devido à presença de inibidores naturais. Em amostras de leite de 46 quartos mamários de animais em lactação não tratados foram observadas reações falso-positivas em 33 % dos quartos com mastite clínica e em 18% dos casos de mastite subclínica. Por outro lado, nos quartos sem mastite, ou seja, na ausência de processo inflamatório na glândula mamária, não ocorreram reações falso-positivas (Tabela 4), demonstrando, como esperado, que os inibidores naturais estão presentes em maior concentração, quanto maior for a intensidade do processo inflamatório.

Portanto, com o objetivo de se obter resultados confiáveis em relação à ocorrência de resíduos de antimicrobianos, todas as amostras de leite analisadas nos experimentos que envolveram tratamentos e as de tanques resfriadores, foram submetidas preliminarmente ao aquecimento a 80°C, para evitar os resultados falso-positivos devido aos inibidores naturais gerados pelo processo inflamatório, uma vez que conforme referido, todos os inibidores naturais são inativados pelo calor.

O processo inflamatório pode influenciar na persistência de resíduos de antimicrobianos no leite de animais tratados. MERCER et al. (1970) sugeriram a leucocitose como um fator importante no aumento da retenção de medicamentos pela glândula mamária, sendo que o tempo de eliminação após infusões intramamárias foi maior nos quartos com mastite do que naqueles com ausência de inflamação.

Também MOL (1975) referiu que o tempo de eliminação do antibiótico em glândulas mamárias com inflamação é maior do que em quartos saudáveis. No presente estudo (Tabela 5 e Figura 2) houve uma diferença significativa na persistência de resíduos entre amostras de glândulas com mastite e amostras de glândulas sem processo inflamatório, após aplicação sistêmica de oxitetraciclina, reforçando que a inflamação da glândula mamária pode ser um importante fator na persistência de resíduos.

De acordo com VAN DRESSLER e WILCKE (1989) as vias de administração têm influência nos resíduos de medicamentos nos tecidos.

Outro fator que pode influir no tempo de persistência é o tipo de veículo utilizado na composição dos medicamentos. Entretanto ANDRADE et al. (1993) ao estudarem, em três rebanhos da bacia leiteira de Belo Horizonte, a liberação de antibiótico no leite de vacas com mastite por *Staphylococcus aureus*, tratadas por via intramamária com 100.000 UI de penicilina e 1.000 mg de estreptomicina, dose única, em veículo oleoso ou aquoso observaram que a liberação de resíduo no leite das glândulas tratadas cessou 120 horas após a aplicação de ambos os tratamentos, independente do veículo.

A natureza do antimicrobiano utilizado tem merecido estudos em relação à persistência de resíduos. EGAN e MEANEY (1985) detectaram penicilina no leite de quartos normais e com mastite por 72 horas após o

tratamento. De acordo com SEYMOUR e JONES (1988) aproximadamente 27% das vacas tratadas com penicilina apresentaram resíduo no final do período de carência recomendado. Estes mesmos autores detectaram resíduos de antibióticos no final do período de carência em 35% das vacas tratadas com cefapirina sódio e encontraram 21% e 12% das amostras de leite positivas, 24 e 48 horas, respectivamente, após o período de carência indicado pelo fabricante.

A análise dos dados obtidos, com a utilização de diferentes grupos de antimicrobianos permitiu observar que houve persistência de resíduos detectáveis além do período de carência estipulado pelo fabricante, em grupos tratados por via sistêmica e também nos tratados por via intramamária.

No presente estudo tanto quando foram utilizados antibióticos (penicilina e diidroestreptomicina) como quimioterápicos (sulfadiazina e trimetoprim) o tempo de persistência de resíduos em níveis detectáveis foi além do período de carência, em 52,4% e 60% respectivamente das amostras analisadas, em animais com mastite clínica tratados por via sistêmica (Tabela 6).

Após 120 horas da aplicação intramamária de medicamento à base de cefacetil, o resíduo persistiu em 18,75% das amostras, sendo que a orientação do fabricante para descarte do leite é de até 96 horas após o tratamento (Tabela 8).

Verificou-se que apesar da orientação do fabricante para descartar o leite até 96 horas após o tratamento intramamário com gentamicina, houve persistência de resíduo em 18,1% das amostras até 120 horas após o tratamento, sendo que 40% foram de quartos com mastite clínica (Tabela 9).

Após a aplicação intramamária de um medicamento à base de tetraciclina, apesar da orientação do fabricante para descartar o leite até 72 horas, o resíduo persistiu em 11,1 % das amostras até 96 horas após o tratamento (Tabela 10).

De acordo com BISHOP et al. (1984) a administração de uma combinação de penicilina procaína mais novobiocina não foi detectada, no leite de animais tratados, após 72 horas (o período de carência recomendado). Um aspecto que merece ser referido é que, em casos de associação de medicamentos, algumas vezes o tempo de carência estabelecido pelo fabricante é suficiente para um dos antimicrobianos constituintes da formulação, mas não é para os demais. Tal fato pode ser observado nos resultados apresentados na Tabela 7, onde se avaliou a persistência de resíduos no leite de associações de sulfadiazina com trimetoprim e de penicilina com diidroestreptomicina em que o tempo de carência preconizado pelo fabricante é de 72 horas. Este período foi suficiente em relação ao trimetoprim ou a diidroestreptomicina, mas em relação à sulfadiazina e à penicilina observou-se a ocorrência de resíduos detectáveis em 60% e 33,3%, respectivamente, das amostras por um período de 96 horas.

Os resultados obtidos demonstram a necessidade de maiores estudos quando da associação de medicamentos, facultando que o tempo de carência preconizado seja suficiente para cobrir o período de eliminação do resíduo do antimicrobiano de maior persistência.

No Brasil, segundo as normas determinadas pelo RIISPOA (Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal), o leite pode ser comercializado 72 horas após a última aplicação do medicamento, contudo contrariando esta determinação, os resultados desta pesquisa e outros como de MERCER (1970) demonstraram que em vacas

com mastite, as amostras de leite apresentaram resíduos de antimicrobianos detectáveis por um tempo mais prolongado.

O leite é um alimento de grande valor para a população humana, principalmente na dieta de recém-nascidos e tem importante papel na indústria de alimentos com a fabricação de derivados como queijo, manteiga e iogurte. Para garantir a saúde do consumidor e a qualidade dos produtos industrializados o leite deve provir de animais saudáveis, sendo necessária muitas vezes, a utilização de antimicrobianos para o tratamento destes. Porém, os antimicrobianos são excretados pelo organismo do animal por várias vias, incluindo a glândula mamária, o que determina a presença de resíduos no leite (MIDIO e MARTINS, 2000). Portanto é importante que proprietários e médicos veterinários estejam familiarizados com o uso de testes para detecção de resíduos. Uma vez que, como foi verificado neste estudo, diversos fatores estão implicados no período de eliminação de antimicrobianos no leite, entre eles a ocorrência e intensidade do processo inflamatório da glândula mamária, não sendo, em alguns casos, as informações técnicas que acompanham os medicamentos suficientes para assegurar a ausência de resíduos no leite.

6 - CONCLUSÕES

Há uma influência do nível de ocorrência de mastite clínica em relação à presença de resíduo no leite dos tanques resfriadores de propriedades leiteiras nos Estados de São Paulo e Minas Gerais, tendo sido verificada uma alta correlação ($r=1$, Spearman).

O teste microbiológico, utilizado na presente pesquisa, se mostrou eficaz na detecção de resíduos no leite de animais tratados e no tanque de mistura.

Quando da utilização de testes microbiológicos para detecção de resíduos de antimicrobianos, as amostras devem ser aquecidas previamente para evitar a interferência das substâncias antimicrobianas naturais presentes durante o processo inflamatório da glândula mamária.

Há influência do processo inflamatório da glândula mamária no período de eliminação do antimicrobiano no leite.

Ao utilizar vários grupos de antimicrobianos, por diversas vias, verificou-se ocorrência e persistência de resíduo no leite de animais tratados além do período de carência estipulado pelo fabricante.

Na utilização de associações de antimicrobianos, o tempo de carência pode ser diferente para cada substância, portanto há necessidade de que o período de carência preconizado seja suficiente para a eliminação do antimicrobiano que apresentar a maior persistência.

Somente a informação do fabricante do medicamento quanto ao período de carência, algumas vezes, não é suficiente para garantir um leite livre de resíduo detectável de antimicrobiano.

A mastite interferiu na ocorrência de antimicrobianos no leite.

7. RECOMENDAÇÕES

É importante a orientação aos produtores e veterinários sobre os procedimentos para evitar resíduos de antimicrobianos no leite.

Quando da utilização de testes microbiológicos para detecção de resíduos de antimicrobianos, as amostras devem ser aquecidas previamente para evitar a interferência das substâncias antimicrobianas naturais presentes durante o processo inflamatório da glândula mamária.

8- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBUQUERQUE, L.M.B., MELO, V.M.M., MARTINS, S.C.S. Investigações sobre a presença de resíduos de antibióticos em leite comercializado em Fortaleza – CE – Brasil. **Hig. Aliment.**, São Paulo, v.10, n.41, p.29-32, 1996.

AERTS, M.M.L., HOGENBOOM, A.C., BRINKMAN, U.A. Analytical strategies for the screening of veterinary drugs and their residues in edible products. **J. Chromatogr., B: Biom. Sci. Appl.**, Amsterdam, v.667, n.1, p.1-40, 1995.

ALDAMANA, P.L., MAYA, J.J.M., ANGEL, L.S.S. Determinación de penicilina y otros inhibidores en quesos frescos de la ciudad de Oaxaca, México. **Vet. Mex.**, México, n.28, v.3, p.185-188, 1997.

ANDRADE, J.R.A., FIGUEIREDO, J.B., LINS, J.L.F.H.A. Avaliação da liberação de resíduos de antibióticos no leite de vacas, pós medicação com penicilina e estreptomicina, em formulação aquosa e oleosa, coadjuvada pelo dimetilsulfóxido. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, Belo Horizonte, v.45, n.4, p.343-351, 1993.

De acordo com a Norma NBR 6023/2000 preconizada pela Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT). As abreviaturas dos periódicos seguem o Chemical Abstracts Service Source Index (CASSI) 1999 [CD-ROM]

ANDERSON, K.L., MOATS, W.A., RUSHING, J.E., WESEN, D.P., PAPICH, M.G. Ampicillin and amoxicillin residue detection in milk, using microbial receptor assay (Charm II) and liquid chromatography methods, after extra-label administration of the drugs to lactating cows. **Am. J. Vet. Res.**, Schaumburg, v.57, n.1, p.73-78, 1996.

ANIFANTAKIS, E.M. Excretion rates of antibiotics in milk of sheep and their effects on yoghurt production. **J. Dairy Sci.**, Savoy, v.65, n.3, p.426-429, 1982.

AURVALLE, A.E. Presença de antibióticos no leite. **Hora Vet.**, Porto Alegre, v.1, n.3, p.20-27, 1981.

BALLARINI, G. Terapia della mastite bovina e farmacocinetica. **Obiettivi Doc. Vet.**, Bologna, v.22, n.3, p.27-31, 2001.

BARBERIO, A., SIGNORINI, F. Antibiotici e sulfamidicini nel latte. **Obiettivi Doc. Vet.**, Bologna, v.17, n.12, p.29-36, 1996.

BARTON, M.D. Does the use of antibiotics in animal affect human health? **Aust. Vet. J.**, Artarmon, v.76, n.3, p.177-180, 1998.

BARROS, V.R.M., PERCHES, E.M.C. Pesquisa de inibidores no leite tipo B distribuído ao consumo da grande São Paulo. **Rev. Inst. Laticínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora, v.36, n.216, p.39-42, 1981.

- BEGLEY, S. The end of antibiotics. **Newsweek**, Dayton, v.123, n.13, p.35-39, 1994.
- BISHOP, J.R., BODINE, A.B., O'DELL, G.D., JANZEN, J.J. Retention data for antibiotics commonly used for bovine infections . **J. Dairy Sci.**, Savoy, v.67, n.2, p.437-440, 1984.
- BISHOP, J.R., SENYK, G.F., DUCAN, S.E. Detection of antibiotic/drug residues in milk and dairy products. In: MARSHALL, R.T. **Standard methods for the examination of dairy products**. 16.ed. Washington: American Public Health Association, 1992. cap.12, p.347-395.
- BOOTH, J.M., HARDING, F. Testing for antibiotic residues in milk. **Vet. Rec.**, London, v.119, n.23, p.565-569, 1986.
- BRADFIELD, A. The effect of mastitis curativis on cheese making. **Can. J. Comp. Med. Vet. Sci.**, Gardenvale, v.14, n.2, 1950. Apud: FAGUNDES, C.M. **Inibidores e controle de qualidade do leite**. Pelotas: Editora Universitária, 1997. 128p.
- BRASIL. Leis, Decretos, etc. Portaria n.8, de 26 jun. 1984. In: **Balde Branco**, São Paulo, v.18, n.238, p.30-35, 1984. [Ministério da Agricultura, Secretaria Nacional de Defesa Agropecuária e Secretaria de Inspeção de Produto Animal definem normas técnicas e higiênico-sanitárias para a produção de leite tipo "B"].
- BRASIL. Leis, Decretos, etc. Portaria n.51, de 6 fev. 1986. **Diário Oficial da União**, Brasília, n.23, 7 fev. 1986. [O Ministério da Agricultura instituiu o Plano Nacional de Controle de Resíduos Biológicos em produtos de origem animal – PNCRB].

BRASIL. Leis, Decretos, etc. Portaria n.527, de 15 ago. 1995. **Diário Oficial da União**, Brasília, n.157, 16 ago. 1995. [O Ministério da Agricultura, do Abastecimento e da Reforma Agrária institui a adequação do Plano Nacional de Controle de Resíduos Biológicos em produtos de origem animal – PNCRB].

BRASIL. Leis, Decretos, etc. Portaria n.110, de 26 ago. 1996. **Diário Oficial da União**, Brasília, n.174, 6 de set. 1996. Seção I, p.17642. Anexo II [O Ministério da Agricultura, do Abastecimento e da Reforma Agrária estabelece o Programa de Controle e Resíduos Biológicos em Carne – PCRBC].

BRASIL. Leis, Decretos, etc. Portaria n.71, de 3 jun. 1998. **Diário Oficial da União**, Brasília, n.107, 8 de jun. 1998. Seção I, p.126. [O Ministério da Agricultura, do Abastecimento e da Reforma Agrária estabelece o Programa de Controle e Resíduos Biológicos em Mel – PCRBM].

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

BRASIL. Leis, Decretos, etc. Portaria n.73, de 3 jun. 1998. **Diário Oficial da União**, Brasília, n.107, 8 de jun. 1998. Seção I, p.136. [O Ministério da Agricultura, do Abastecimento e da Reforma Agrária estabelece o Programa de Controle e Resíduos Biológicos em Pescado – PCRBP].

BRODIE, B.O. Penicilin in milk after intramammary infection. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, Schaumburg, v.140, n.2, p.1293-1294, 1962.

BRYAN, F.L. Hazard analysis of food service operations. **Food Technol.**, Chicago, v.35, n.2, p.78-87, 1981.

CANNON, R.Y., HAWKINS, G.E., WIGGINS, A.M. Duration of secretion of bacteriostatic drugs in milk. I. Penicillin, following oral and parenteral administration. **J. Dairy Sci.**, Savoy, v.45, n.6, p.769-773, 1972.

CARLSSON, A., BJORCK, L., PERSSON, K. Lactoferrin and lysozyme in milk during acute mastitis and their inhibitory effect in Delvotest P. **J. Dairy Sci.**, Savoy, v.72, n.12, p.3166-3175, 1989.

CASTRO, M.C.D., SILVA, P.H.F., PORTUGAL, J.A B. Perspectivas do agronegócio do leite no Brasil. **Inf. Agropecu.**, Belo Horizonte, v.20, n.199, p.103-110,1999.

COLLINS, C.H., BRAGA, G.L., BONATO, P.S. **Introdução a métodos cromatográficos**. 4.ed. Campinas: Unicamp, 1990. 279p. (Série manuais).

COSTA, E.O., Importância econômica da mastite infecciosa bovina. **Rev. Fac. Med. Vet. Zotec. Univ. São Paulo**, São Paulo, v.15, n.1, p.21-26, 1991.

COSTA, E.O., MELVILLE, P.A., RIBEIRO, A.R., WATANABE, E.T., WHITE, C.R., PARDO, R.B. Índices de mastite bovina clínica e subclínica nos Estados de São Paulo e Minas Gerais. **Rev. Bras. Med. Vet.**, Niterói, v.17, n.5, p.215-217, 1995.

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

COSTA, E.O. Importância da mastite na produção leiteira do país. **Rev. Educ. Continuada**, São Paulo, v.1, n.1, p.3-9, 1998.

COSTA, E.O. Uso de antimicrobianos na mastite. In: SPINOSA, H.S., GÓRNIK, S.L., BERNARDI, M.M. **Farmacologia aplicada à medicina veterinária**. 2.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999. cap.42, p.422-433.

COSTA, E.O., RAIA, R.B., GARINO JÚNIOR, F., WATANABE, E.T., RIBEIRO, A.R., GROFF, M.R. Presença de resíduos de antibióticos no leite de pequena mistura de propriedades leiteiras. **Napgama**, São Paulo, v.2, n.1, p.10-13, 1999.

DU PREEZ, J.H., GIESECKE, W.H., TUSTIN, R.C. Mastitis. In: COETZER, J.A.W., THOMSON, G.R. **Infectious diseases of livestock**. New York: Oxford University Press, 1994. v.2, cap.190, p.1564-1595.

EGAN J., MEANEY, W.J. Persistence of detectable residues of penicillin and cloxacillin in normal and mastitic quarters following intramammary infusion. **Vet. Rec.**, London, v.116, n.16, p.436-438, 1985.

FAGUNDES, C.M., MOLIN, L. Interferência dos resíduos de antibióticos no controle de qualidade do leite e derivados. **Inf. Agropecu.**, Belo Horizonte, v.13, n.155, p.24-30, 1988.

FAGUNDES, C.M. **Inibidores e controle de qualidade do leite**. Pelotas: Editora Universitária, 1997. 128p.

FONDÉN, R. Some aspects of inhibitory substances and milk quality **Bull. Int. Dairy Fed.**, Brussels, n.283, p.13-14, 1993. [Título específico: Inhibitory substances in milk - current analytical practice].

FRANCO, D.A., WEBB, J., TAYLOR, C.E. Antibiotic and sulfonamide residues in meat: implications for human health. **J. Food Prot.**, Des Moines, v.53, n.2, p.178-185, 1990.

FURTADO, M.M. **Fabricação de queijo de leite de cabra**. São Paulo: Nobel, 1980. 126p.

GALLINA, D.A., FARIA, J.E., FERREIRA, C.L., BRANDÃO, S.C.C. Resíduos inibidores no leite de vacas tratadas com antibióticos. **Ind. Laticínios**, São Paulo, v.3, n.15, p.70-79, 1998.

GELLI, D.S., JAKABI, M., SOUZA, A. Inibidores microbianos em leite pasteurizado do comércio da cidade de São Paulo. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, São Paulo, v.44, n.1, p.19-24, 1984.

GIBBONS-BURGENER, S.N., KANEENE, J.B., LLOYD, J.W., ERSKINE, R.J. Influence of the milk and dairy beef quality assurance program on dairy farm drug management practices. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, Schaumburg, v.26, n.12, p.1960-1964, 2000.

GRAPHPAD INSTAT®, version 3.01 San Diego: GraphPad Software, Inc. 1998. ONLINE.

GOMES, S.T. Efeitos da globalização na produção de leite no Brasil **Inf. Agropecu.**, Belo Horizonte, v.20, n.199, p.93-102, 1999.

HONKANEN-BUZALSKI, T., REYBROECK, W. Antimicrobials. In: INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION. **Monograph on residues and contaminants in milk and milk products**. Brussels: International Dairy Federation, 1997. cap.4, p.26-34.

HUNTER, G.J.E. The effect of penicillin in milk on the manufacture of cheddar cheese. **J. Dairy Res.**, London, v.16, n.2, p.235-241, 1949.

JACQUET, J. Presence d'antibiotique dans le lait, et ses consequences pour e industrie laiture. In **International Dairy Congress**, 13 H.E. Hangué, n. 3: 1043-5. 1953. Apud: FAGUNDES, C.M., MOLIN, L. Interferência dos resíduos de antibióticos no controle de qualidade do leite e derivados. **Inf. Agropecu.**, Belo Horizonte, v.13, n.155, p.24-30, 1988.

- JANK, M.S. Brazil: official and academic view on the upcoming round of the WTO agricultural negotiations. **Bull. Int. Dairy Fed.**, Brussels, n.343, p.68-73, 1999.
- JOHNSON, M.E., MARTIN J.H., BAKER, R.J., PARSONS, J.G. Persistence of antibiotics in milk from cows treated late in the dry period. **J. Dairy Sci.**, Savoy, v.60, n.10, p.1655-1661, 1977.
- JONES, G.M, SEYMOUR, E.H. Cowside antibiotic residue testing. **J. Dairy Sci.**, Savoy, v.71, n.6, p.1691-1699, 1988.
- KANEENE, J.B., AHL, A.S. Drug residues in dairy cattle industry: epidemiological evaluation of factors influencing their occurrence. **J. Dairy Sci.**, Savoy, v.70, n.10, p.2176-2180, 1987.
- KOSIKOWSKI, F.V., MOCQUOT, G. Antibiotics residues in milk for cheese. Advances in cheese technology. **FAO. Agr. Studies**, Roma, v.38, 1958. Apud: FAGUNDES, C.M. **Inibidores e controle de qualidade do leite**. Pelotas: Editora Universitária, 1997. 128p.
- LONG, A.R., ROYBAL, J.E. Drug residues in foods of animal origin. In: HUI, Y.H., GORHAM, J.R., MURREL, K.D., CLIVER, D.O. **Foodborne disease handbook**. New York: Marcel Dekker, 1994. v.3, p.529-554.
- LOPES, L.T., GANDARA, A.L.N., CRISTIANINI, M. Detecção de resíduos de antibióticos em leite comercializado na cidade de Campinas. **Rev. Inst. Laticínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora, v.53, n.301, 302, 303, p.64-67, 1998.

- MARTENIUK, J.V., AHL, A.S., BARTLETT, P.C. Compliance with recommended withdrawal requirements for dairy cows sent to market in Michigan. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, Schaumburg, v.193, n.4, p.404-407, 1988.
- MARTH, E.H., ELLICKSON, B.E. Problems created by the presence of antibiotics in milk and milk products: a review. **J. Milk Food Technol.**, Orange, v.22, n.7, p.266-272, 1959.
- MARTINS, M.A., VAZ, A.K. Comparação entre o Delvotest®P e o teste de coagulação pelo fermento láctico para a detecção de substâncias inibidoras no leite. **Hora Vet.**, Porto Alegre, v.19, n.113, p.53-55, 2000.
- McEWEN, S.A., MEEK, A.H., BLACK, W.D. A dairy farm survey of antibiotic treatment practices, residue control methods and associations with inhibitors in milk. **J. Food Prot.**, Des Moines, v.54, n.6, p.454-459, 1991.
- McEWEN, S.A., BLACK, W.D., MEEK, A.H. Antibiotic residues (bacterial inhibitory substances) in the milk of cows treated under label and extra-label conditions. **Can. Vet. J.**, Ottawa, v.33, n.8, p.527-534, 1992.
- MEEK, A.H., MARTIN, S.W., STONE, J.B., McMILLAN, I., BRITNEY, J.B., GRIEVE, D.J. The relationship among current management systems, production, disease and drug usage on Ontario dairy farms. **Can. J. Vet. Res.**, Ottawa, v.50, n.1, p.7-14, 1986.

MERCER, H.D., GELETA, J.N., SCHULTZ, E.J., WRIGHT, W.W. Milk-out rates for antibiotics in intramammary infusion products used in the treatment of bovine mastitis: relationship of somatic cell counts, milk production level, and drug vehicle. **Am. J. Vet. Res.**, Schaumburg, v.31, n.9, p.1549-1560, 1970.

MIDIO, A.F., MARTINS, D.I. **Toxicologia de alimentos**. São Paulo: Varela, 2000. p.295.

MITCHELL, M.J., YEE, A.J. Antibiotic use in animals and transfer of drug resistance to humans: should we stop treating animals with these drugs ? **Dairy Food Environ. Sanit.**, Ames, v.15, n.8, p.484-487, 1995.

MITCHELL, J.M., GRIFFITHS, M.W., McEWEN, S.A., McNAB, W.B., YEE, 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.

MOL, H. Antibiotics and milk: a contribution to the evolution and solution of a problem. Utrecht, 1975. p.331. (Tese de Doutorado – Rijksuniversiteit te Utrecht)

MORETAIN, J.P., BOISSEAU, J. Elimination of aminoglycoside antibiotics in milk following intramammary administration. **Vet. Q.**, Utrecht, v.15, n.3, p.112-117, 1993.

NOUWS, J.F.M., KUIPER, H., VAN KLINGEREN, B., KRUYSWIJK, P.G. Establishment of a microbiologically acceptable daily intake of antimicrobial drugs residues. **Vet. Q.**, Utrecht, v.16, n.3, p.152-156, 1994.

OLIVER, S.P., DUBY, R.W., TRITSCHLER, J.P. Residues in colostrum following antibiotic dry cow therapy. **J. Dairy Sci.**, Savoy, v.67, n.12, p.3081-3084, 1984.

PAIGE, J.C., TOLLEFSON, L., MILLER, M. Public health impact on drug residues in animal tissues. **Vet. Hum. Toxicol.**, Manhattan, v.39, n.3, p.162-169, 1997.

PAIGE, J.C. The issues of residues and human health. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, Schaumburg, v.23, n.12, p.1735-1736, 1998.

PILLET, C., THOMA, B. Essais sur la thermostabilité de quelques antibiotiques. Cahiers. Rev. Méd. Vét., v.38, p.227-231, 1969. Apud: FAGUNDES, C.M. **Inibidores e controle de qualidade do leite**. Pelotas: Editora Universitária, 1997. 128 p.

RADOSTITS, O.M., LESLIE, W.B., FETROW, J. Mastitis control in dairy herds. In: **Herd health: food animal production medicine**. 2.ed. Philadelphia: Saunders, 1994. p.229-276.

RAIA, R.B., COSTA, E.O., GARINO JÚNIOR, F., WATANABE, E.T., THIERS, F.O., GROFF, M.R. Estudo da persistência de eliminação de resíduos de antibióticos no leite após tratamento sistêmico e intramamário de mastite. **NAPGAMA**, São Paulo, v.2, n.1, p.4-8, 1999.

RENEAU, J.K. Clinical mastitis records in production medicine programs. **Compend. Contin. Educ., Food Anim. Pract.**, Trenton, v.15, n.3, p.497-503, 1993.

ROSANOVE, R. Contamination of milk penicilin. **Minn. Med.**, St. Paul, v.43, p.306-309, 1960. Apud: FAGUNDES, C.M. **Inibidores e controle de qualidade do leite**. Pelotas: Editora Universitária, 1997. 128p.

RUEGG, P.L., TABONE, T.J. The relationship between antibiotic residue violations and somatic cell counts in Wisconsin dairy herds **J. Dairy Sci.**, Savoy, v.83, n.12, p.2805-2809, 2000.

SCHALM, O.W., NOORLANDER, D.O. Experimental and observation lading to development of California mastitis test. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, Schaumburg, v.130, n.5, p.199-204, 1957.

SCHENCK, F.J., FRIEDMAN, S.L. The effect of storage at 4°C on the stability of ampicillin residues in raw milk. **Food Addit. Contam.**, Basingstoke, v.17, n.8, p.675-677, 2000.

SETTEPANI, J.A. The hazard of using chloramphenicol in food animals. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, Schaumburg, v.184, n.8, p.930-931, 1984.

SEYMOUR, E.H., JONES, G.M. Cowside antibiotic residue testing. **J. Dairy Sci.**, Savoy, v.71, n.6, p.1691-1699, 1988.

SILVA, W.P. Interferência do antibiótico Kanamicina sobre a coagulação enzimática e fermentação láctica do leite de cabra. Pelotas, 1990. 54p. (Dissertação Mestrado - Faculdade de Agronomia - UFPel).

- SILVA, P.R.M., QUESSADA, A.M., FREITAS, M.V.M. Conduta adotada por balconistas de farmácias veterinárias frente a casos relatados de mastite bovina. **Rev. Bras. Med. Vet.**, Niteroi, v.21, n.2, p.65-68, 1999.
- SISCHO, W.M. Quality milk and tests for antibiotic residues in: symposium : drug residue avoidance: the issue of testing. **J. Dairy Sci.**, Savoy, v.79, n.6, p.1065-1073, 1996.
- STOBBERINGH, E.E., BOGAARD, A.E. Spread of antibiotic resistance from food animals to man. **Acta Vet. Scand.** Vanloese, v.93, suppl., p.47-52, 2000.
- 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.
- TRAMER, J. Les antibiotiques dans le lait. **J. Soc. Dairy Technol.**, v.2, n.17, p.95, 1964. Apud: FAGUNDES, C.M. **Inibidores e controle de qualidade do leite**. Pelotas: Editora Universitária, 1997. 128p.
- TRONCO, V.M. Sugestões de melhorias da qualidade para a indústria de laticínios através do uso do sistema Análise de Perigo e Pontos Críticos de Controle (APPCC). **Leite Deriv.**, São Paulo, n.33, p.50-58, 1997.
- THIERS, F.O., BENITES, N.R., RIBEIRO, A.R., COSTA, E.O. Correlação entre contagem direta de células somáticas e o teste de “California Mastitis Test”(CMT) no leite de vacas. **NAPGAMA**, São Paulo, v.2, n.4, p.9-12, 1999.

VAN DRESSLER, W.R., WILCKE, J.R. Drug residues in food animals. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, Schaumburg, v.194, n.12, p.1700-1710, 1989.

WATANABE, E.T. Avaliação do uso de antibióticos por via intramamária e sistêmica no tratamento de mastite clínica em vacas em lactação e subclínica na interrupção da lactação. São Paulo, 1999. 121p. (Dissertação de Mestrado - Instituto de Ciências Biomédicas - USP).

WILSON, D.J., HAS, H.H., GONZALEZ, R.N., SEARS, P.M. Association between management practices, dairy herd characteristics, and somatic cell count of bulk tank milk. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, Schaumburg, v.210, n.10, p.1499-1502, 1997.

ZIV, G. Practical pharmacokinetic aspects of mastitis therapy. 1. Parenteral treatment. **Vet. Med.**, Kansas City, v.75, n.2, p.277-290, 1980.

ANEXOS

ANEXO I

Limites Máximos de Resíduos (LMRs) e níveis de Segurança/Tolerância para resíduos de antimicrobianos em leite (ppb) fixados pelo *Codex Alimentarius*, União Européia e *Food and Drug Administration* (USFDA) – Situação em 01/12/96. No Brasil, níveis de ação fixados pelo PCRBL (1998*)

Antimicrobianos	<i>Codex Alimentarius</i> LMR	União Européia LMR	FDA Segurança/ Tolerância	Brasil*
Penicilina				4
Benzilpenicilina	4	4	5/0	
Ampicilina		4	10/10	4
Amoxicilina		4	10/10	4
Oxacilina		30		
Cloxacilina		30	10/10	
Dicloxacilina		30		
Penetamato		4		
Ceftiofur	100	100	50/1000	100
Cefaquinona		20		
Cefapirina			20/20	
Tetraciclina		100	80/0	100
Oxitetraciclina	100	100	30/0	100
Clortetraciclina		100	30/0	100
Espiramicina		200		
Tilosina		50	50/50	
Eritromicina		40	50/0	40
Espectinomicina	200	200	30/0	
Estreptomicina		200		200
Diidroestreptomicina	200	200	125/0	
Gentamicina	100	100	30/0	
Neomicina	500	500	150/150	500
Marbofloxacina		75		
Colistina		50		
Rifaximina		60		
Sulfonamidas		100		
Sulfametazina				100
Sulfadimetoxina				100
Sulfadimidina	25		10/0	
Sulfametoxina			10/10	
Sulfamerazina			10/0	
Sulfatiazol			10/0	100
Sulfadiazina			10/0	
Trimetoprim		50		
Baquiloprim		30		
Nitrofuranos		0		
Ronidazol		0		
Dimetridazol		0		
Dapsona		0		
Cloranfenicol		0	0/0	5(ii)
Novobiocina			100/100	

(ii) Limite de detecção das metodologias oficialmente adotadas

HONKANEN-BUZALSKI, T., REYBROECK, W. Antimicrobials. In: INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION. Monograph on residues and contaminants in milk and milk products. Brussels: International Dairy Federation, 1997. cap.4, p.26-34.

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

ANEXO II

Caracterização, composição e período de carência dos principais medicamentos utilizados nas propriedades avaliadas no experimento 1

Medicamento	Fabricante	Composição	Indicação	Período de carência	Dose recomendada para mastite
Agropen LA	Virbac do Brasil	Penicilina G procaina 10.000.000 UI PenicilinaG benzatina 10.000.000 UI Sulfato de hidroestreptomicina 20 g Veículo qsp 100 ml	nas infecções causadas por microrganismos sensíveis à penicilina e à estreptomicina	Leite: 5 dias (10ª ordenha) Carne 10 dias	5 a 10 ml para cada 100 Kg de peso (injetável)
Agrovet® PS	Novartis Biociências	Penicilina G procaina 20.000.000 UI Diidroestreptomicina 25 g Veículo qsp 100 ml	nas infecções causadas por microrganismos sensíveis à penicilina e à estreptomicina	Leite 72 horas Carne 30 dias	1 ml para cada 20 Kg de peso (injetável)
Amplicox -LC	Laboratórios Pfizer Ltda	Cloxacilina 200 mg Ampicilina 75 mg Veículo qsp 3g	tratamento da mastite clínica em vacas em lactação	Leite: 60 horas Carne: 7 dias	uma seringa (3g) em cada quarto infectado, a cada 12 horas em 3 aplicações
Anamastit L 200	Univet S.A	Cloxacilina 200 mg Veículo qsp 10 ml	Nas mastites , agudas ou crônicas em vacas em lactação	Leite: 48 horas	10 ml em cada quarto afetado, a cada 24/48 horas
Bivatop - 200	Boehringer de Angeli	Oxitetraciclina 200 mg por ml	nas mastites dos bovinos	não encontrado	1 ml para cada 10 Kg de peso (injetável)
Bovigan® L	Bayer S.A.	Ampicilina 75 g Cloxacilina 200 mg Veículo qsp 5 g	Nas mastites , agudas ou crônicas em vacas em lactação	Leite 72 horas Carne 7 dias	5g em cada quarto afetado
Flumast	Mallinckroot Vet. Ltda.	Flumetasona 0,0025g Espiramicina 7.692300UI Neomicina 2,0 g Veículo qsp 100 ml	Nas mastites , agudas ou crônicas em vacas em lactação	Leite 4 dias	10 ml em cada quarto afetado
Gentocin Mastite	Schering Plough Veterinária	Gentamicina 150 mg Veículo qsp 10 ml	Nas mastites , agudas ou crônicas em vacas em lactação	Leite 96 horas	10 ml em cada quarto afetado (250 mg de gentamicina)
Gentrin	Prod.Vet. Ouro Fino Ltda	Gentamicina 4,4 g Veículo qsp 100 ml		Leite: 96 horas Carne: 30 dias	1 ml para cada 10 Kg de peso, durante 7 dias consecutivos (injetável)

Leocilin mastite aguda	Boehringer de Angeli	Hidriodeto penetamato 150 mg Diidroestreptomicina 150 mg Framicetina 50 mg Prednisolona 5 mg Veículo qsp 5 ml	Nas mastites , agudas ou crônicas em vacas em lactação	Leite 72 horas Carne 7 dias	5 ml em cada quarto afetado
Leocillin injetável	Boehringer de Angeli	Hidroid. de penetamato 5.290.000UI Veículo qsp 5 ml	Nas mastites em bovinos	Leite: 72 horas Carne: 7 dias	5 milhões de unidades por dia
Neobiotic L	Rhodia-Mérieux Veterinária Ltda	Sulfato de neomicina 50 mg Veículo qsp 1 ml	nas infecções sensíveis à neomicina	Leite: 36 horas	1 ml para 4 Kg de peso vivo
Nuflor	Schering Plough Veterinária	Florfenicol 30 g Veículo qsp 100 ml	doenças respiratórias, diarreia e pododermatite	não administrar o produto em vacas lactantes Carne: 28 dias	1 ml para cada 15 Kg de peso(20 mg/Kg)
Oxivet LA	Novartis Biociências	Oxitetraciclina 200 mg/ ml	Indicado para mastite por <i>E. coli</i> , estafilococos e estreptococos	não administrar em vacas lactantes Carne: 30 dias	1 ml para cada 10 Kg de peso(20 mg/Kg)
Pathozone	Laboratórios Pfizer Ltda.	Cefoperazone 250 mg Veículo qsp 10 ml	Nas mastites clínicas	Leite 84 horas Carne 48 horas	10 ml em cada quarto afetado
Pirsue	Rhodia-Mérieux Veterinária Ltda	Cloridrato de Pirlimicina 51,0 mg Veículo qsp 10 ml	Nas mastites clínicas e subclínicas	Leite: 36 horas	10 ml em cada quarto afetado
Rilexine 200	Virbac do Brasil	Cefalexina 100 mg Sulfato de neomicina 100mg Prednisolona 10 mg Veículo qsp 10 ml	Nas mastites , agudas ou crônicas em vacas em lactação	Leite 84 horas (7ª ordenha)	10 ml em cada quarto afetado
Sulfamax	Vallée S. A.	Sulfadiazina 40,0g Trimetoprim 8,0 g Veículo qsp 100,00 ml	nas infecções bacterianas, incluindo mastite infecciosa	Leite 72 horas Carne 28 dias	300 a 450 Kg aplicar 15ml (intramuscular) acrescentar 1 ml para cada 30 Kg a mais

Tetradelta	Rhodia-Mérieux Veterinária Ltda	Acetato de hidrocortisona 20 mg Succinato hidrocortisona 122,5 mg Penicilina G procaina 100.000 UI Novobiocina 150 mg Sulfato de polimixina B 50.000 UI Diidroestreptomicina 100 mg Clorubutanol 50 mg Veículo qsp 10 ml	Nas mastites , agudas ou crônicas em vacas em lactação	não encontrado	10 ml em cada quarto afetado
Tribissem	Mallinckroot Vet. Ltda	Sulfadiazina 400 mg Trimetoprim 80,0 mg Veículo qsp 1 ml	nas mastites severas	Leite 72 horas Carne 28 dias	300 a 450 Kg aplicar 15ml (intramuscular) acrescentar 1 ml para cada 30 Kg a mais.
Tylan 200	Eli Lilly do Brasil, Div. Elanco Saúde Animal	Tilosina 20 mg	nas mastites agudas	Leite 72 horas Carne 7 dias	de 0,5 a 1 ml para cada 20 Kg de peso (injetável)

Compêndio Veterinário – Dicionário Brasileiro de Medicamentos Veterinários 29^o ed. , Organização Andrei Editora Ltda. 1997, São Paulo – SP.
Manual de Produtos Veterinários SINDAN – Sindicato Nacional da indústria de produtos para a saúde animal 1^a ed. SINDAN, 441p., 1997, São Paulo

ANEXO III

Pesquisa de resíduos de antimicrobianos em tanques resfriadores de propriedades leiteiras do Estado de São Paulo e Minas Gerais e nível de mastite clínica em vacas em lactação. São Paulo, 2001.

Propriedades leiteiras	*Delvotest®	Mastite Clínica	Localidades
1.	Neg	18,33%	Santa Rita do Passa Quatro - SP
2.	Neg	5,26%	Santa Rita do Passa Quatro - SP
3.	Neg	12,50%	São José do Rio Pardo - SP
4.	Neg	10,81%	Aguaí – SP
5.	Pos	12,90%	Leme – SP
6.	Neg	3,51%	Pirassununga – SP
7.	Neg	9,76%	Arcos – MG
8.	Neg	13,51%	Descalvado – SP
9.	Neg	13,14%	Analândia – SP
10.	Neg	32,14%	Corumbataí – SP
11.	Neg	17,02%	Casa Branca – SP
12.	Neg	11,36%	Muzambinho – MG
13.	Neg	18,18%	Guaranésia – MG
14.	Neg	20,88%	Guaranésia – MG
15.	Neg	10,57%	São José do Rio Pardo - SP
16.	Neg	26,15%	Pirassununga – SP
17.	Neg	4,45%	São José do Rio Pardo - SP
18.	Neg	29,63%	Santa Rita do Passa Quatro – SP
19.	Neg	20,59%	Santa Rita do Passa Quatro – SP
20.	Neg	29,63%	Santa Rita do Passa Quatro - SP
21.	Neg	13,16%	Analândia – SP
22.	Neg	8,70%	São Simão – SP
23.	Neg	2,86%	Iracemapolis – SP

Propriedade	Delvotest	Mastite Clínica	Localidades
24.	Pos	26,74%	Guaranésia – MG
25.	Neg	10%	Guaxupé – MG
26.	Pos	10%	Muzambinho – MG
27.	Neg	10%	Muzambinho – MG
28.	Neg	10%	Muzambinho – MG
29.	Neg	10%	Muzambinho – MG
30.	Neg	10%	Muzambinho – MG
31.	Neg	4,45%	São José do Rio Pardo - SP
32.	Neg	35,48%	Corumbataí – SP
33.	Neg	4,35%	Tambaú – SP
34.	Neg	5,17%	Santa Rita do Passa Quatro – SP
35.	Neg	0%	Santa Rita do Passa Quatro – SP
36.	Neg	6,7%	Dourado – SP
37.	Neg	13,79	Guaxupé – MG
38.	Neg	8%	Guaxupé – MG
39.	Pos	13,7%	Guaranésia – MG
40.	Pos	20%	Muzambinho – MG
41.	Neg	18,03%	Tambaú – SP
42.	Neg	0%	Santa Rosa do Viterbo – SP
43.	Pos	6,41%	Pirassununga – SP
44.	Neg	11,11%	Pirassununga – SP
45.	Pos	29,63%	Guaranésia – MG
46.	Neg	10,29%	São Sebastião da Grama - SP
47.	Neg	7,14%	São Sebastião da Grama – SP
48.	Pos	0%	Santa Rita do Passa Quatro- SP
49.	Neg	12,50%	Tambaú – SP

Propriedade	Delvotest	Mastite Clínica	Localidades
50.	Pos	8,33%	Pirassununga – SP
51.	Neg	14,61%	Pirassununga – SP
52.	Neg	5,42%	Caçapava – SP
53.	Neg	5,42%	Caçapava – SP
54.	Neg	5,42%	Caçapava – SP
55.	Neg	5,42%	Caçapava – SP
56.	Neg	5,42%	Caçapava – SP
57.	Neg	5,42%	Caçapava – SP
58.	Neg	15,73%	Pirassununga – SP
59.	Neg	11,11%	Caçapava – SP
60.	Neg	5,15%	Caçapava – SP

*Delvotest® -P, Delvotest® -SP (Gist-brocades Food Ingredients, Inc., Netherlands).

ANEXO IV

Caracterização, composição e período de carência dos principais medicamentos utilizados no presente estudo, nos experimentos 3 a 5

Medicamento	Fabricante	Composição	Indicação
Agrovet® PS	Novartis Biociências	Penicilina G procaina 20.000.000 UI Diidroestreptomicina 25 g Veículo qsp 100 ml	nas infecções causadas por microrganismos sensíveis à penicilina e à estreptomicina
Bivatop - 200	Boehringer de Angeli	Oxitetraciclina 200 mg por ml	nas mastites dos bovinos
Gentocin Mastite	Schering Plough Veterinária	Gentamicina 150 mg Veículo qsp 10 ml	Nas mastites , agudas ou crônicas em vacas em lactação
Oxivet LA	Novartis Biociências	Oxitetraciclina 200 mg/ml	nas doenças causadas por microrganismos sensíveis Indicado para mamite por <i>E. coli</i> , estafilococos e estreptococos
Sulfamax	Vallée S. A.	Sulfadiazina 40,0g Trimetoprim 8,0 g Veículo qsp 100,00 ml	nas infecções bacterianas, incluindo mastite infecciosa
Ungüento Intramamário Vallée	Vallée S.A.	Sulfanilamida 100 mg Tetraciclina 185 mg Hidrocortisona 20 mg Vitamina A 6.000 UI Vaselina qsp 10 g	tratamento das mastites agudas e crônicas
Vetimast	Novartis Biociências	Cefacetil sódio 250 mg Veículo qsp 10.000,00 mg	controle de mastites agudas e crônicas dos bovinos

Compêndio Veterinário – Dicionário Brasileiro de Medicamentos Veterinários 29^o ed. , Organização Andrei Editora Ltda. 1997, São Paulo – SP.
Manual de Produtos Veterinários SINDAN – Sindicato Nacional da indústria de produtos para a saúde animal 1^a ed. SINDAN, 441p., 1997, São Paulo.