

UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
MESTRADO PROFISSIONAL EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DO LEITE E
DERIVADOS

FABIANA SANTOS SILVA BITTENCOURT

AVALIAÇÃO DE DESEMPENHO E VALIDAÇÃO DE ENSAIOS ANALÍTICOS
QUALITATIVOS COMERCIAIS PARA TRIAGEM DE RESÍDUOS DE
ANTIMICROBIANOS EM LEITE CRU

Juiz de Fora

2017

FABIANA SANTOS SILVA BITTENCOURT

**AVALIAÇÃO DE DESEMPENHO E VALIDAÇÃO DE ENSAIOS ANALÍTICOS
QUALITATIVOS COMERCIAIS PARA TRIAGEM DE RESÍDUOS DE
ANTIMICROBIANOS EM LEITE CRU**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação, Mestrado Profissional em Ciência e Tecnologia do Leite e Derivados, da Universidade Federal de Juiz de Fora, como requisito parcial a obtenção do grau de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Marcone Augusto Leal de Oliveira.

Co- Orientador: Dr. Marcelo Bonnet Alvarenga

Juiz de Fora

2017

Ficha catalográfica elaborada através do programa de geração automática da Biblioteca Universitária da UFJF, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Santos Silva Bittencourt, Fabiana .

AVALIAÇÃO DE DESEMPENHO E VALIDAÇÃO DE ENSAIOS ANALÍTICOS QUALITATIVOS COMERCIAIS PARA TRIAGEM DE RESÍDUOS DE ANTIMICROBIANOS EM LEITE CRU / Fabiana

Santos Silva Bittencourt. -- 2017.

93 p.

Orientador: Marcone Augusto Leal de Oliveira

Coorientador: Marcelo Bonnet Alvarenga

Dissertação (mestrado profissional) - Universidade Federal de Juiz de Fora, Faculdade de Farmácia e Bioquímica. Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia do Leite e Derivados, 2017.

**AVALIAÇÃO DE DESEMPENHO E VALIDAÇÃO DE ENSAIOS ANALÍTICOS
QUALITATIVOS COMERCIAIS PARA TRIAGEM DE RESÍDUOS DE
ANTIMICROBIANOS EM LEITE CRU**

FABIANA SANTOS SILVA BITTENCOURT

ORIENTADOR: Marcone Augusto Leal de Oliveira

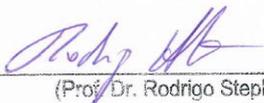
CO-ORIENTADOR: Marcelo Bonnet Alvarenga

Dissertação de Mestrado submetida ao Mestrado Profissional em Ciência e Tecnologia do Leite e Derivados, da Universidade Federal de Juiz de Fora - UFJF, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Ciência e Tecnologia do Leite e Derivados.

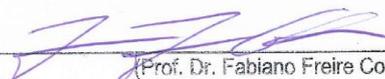
Aprovada em 25/08/2017.



(Prof. Dra. Vanessa Gass da Silveira)



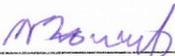
(Prof. Dr. Rodrigo Stephani)



(Prof. Dr. Fabiano Freire Costa)



(Prof. Dr. Marcone Augusto Leal de Oliveira)



(Dr. Marcelo Bonnet Alvarenga)

Dedico este trabalho ao Marcelo Bonnet Alvarenga, pela confiança, amizade e ensinamentos, e ao Marcone Augusto Leal de Oliveira, pelo profissionalismo e atenção.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por estar presente em tudo aquilo que faço e por ser a fonte de toda minha força;

À Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF), ao Instituto de Laticínios Cândido Tostes (ILCT/EPAMIG) e à Embrapa Gado de Leite pelo Mestrado Profissional em Ciência e Tecnologia do Leite e Derivados e, também, pela oportunidade de realização deste trabalho;

À coordenação e secretaria do Mestrado em Ciência e Tecnologia do Leite e Derivados, pelo apoio e atenção dados neste processo, pelo profissionalismo e cuidado com os alunos do programa;

Ao Laboratório de Qualidade do Leite (LQL) da Embrapa Gado de Leite e seus colaboradores, pelo aprendizado e oportunidade de crescimento profissional, em especial aos colegas que estiveram presentes em parte dessa trajetória e, principalmente, às colegas Raquel Rubiale, Fernanda Pyramides do Couto e Suelem Murucci Anchieta pela amizade e dedicação;

Aos colegas do Laboratório de Microbiologia do Leite da Embrapa Gado de Leite, pelo crescimento profissional e pessoal e amizade em todos os momentos;

Ao Laboratório Nacional Agropecuário (LANAGRO- MG), pelo total apoio e ensinamentos transmitidos;

À empresa Hexis Científica/ *Charm Science*, pela confiança e por ter possibilitado a execução e divulgação deste trabalho. Em especial, ao Eduardo Fontes, pelo apoio sempre prestado;

Ao Professor Dr. Marcone Augusto Leal de Oliveira, pela orientação, confiança e atenção na realização deste trabalho, pela paciência, respeito e ensinamentos. Serei sempre grata;

Ao Dr. Marcelo Bonnet Alvarenga, por ser o exemplo de pessoa e profissional que busco ser, pelo incentivo, confiança e cuidado em todos os momentos. Também, pela paciência, respeito e ensinamentos. Você foi muito importante nessa etapa da minha vida;

À minha esposa Regiane Bittencourt de Andrade e à minha querida mãe Railda Ferreira dos Santos, pela paciência, companheirismo e apoio incondicional. Dedico a vocês todas as conquistas da minha vida;

Aos meus amigos-irmãos, pelo companheirismo e aos amigos do mestrado, pela troca de experiências profissionais e pela amizade;

A todos aqueles que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho, o meu profundo agradecimento.

“Seja a mudança que você deseja ver no mundo.”

Mahatma Gandhi

RESUMO

O presente projeto objetivou validar e avaliar o desempenho de produtos comerciais para triagem de resíduos de antibióticos em amostras de leite bovino cru, conforme a Decisão 2002/657/CE da União Européia, que constitui parte dos requerimentos de avaliação de desempenho e validação de ensaios analíticos estabelecidos pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. O escopo e as referências para limites máximos de resíduos (LMR) dos analitos ensaiados observaram a integridade do Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes aplicável à matriz leite (PNCR-Leite), que abrange cinco grupos de analitos (beta-lactâmicos, tetraciclina, sulfonamidas, anfenicóis e quinolonas), totalizando 30 analitos examinados. Avaliaram-se produtos específicos da linha Charm® ROSA® (*Rapid One Step Assay*, ou ensaio rápido em uma etapa), baseados em reação com imunoreceptores para cada um dos cinco grupos relevantes de analitos, bem como o produto baseado em inibição de microrganismo indicador, o Charm® CowSideII®. Os resultados indicam que os produtos da linha Charm® ROSA® foram capazes de detectar satisfatoriamente 26 dentre os 30 analitos constantes do escopo do PNCR-Leite, ao passo que o produto Charm® CowSideII® foi capaz de detectar satisfatoriamente 17 analitos. De fato, os valores para capacidade de detecção (CC β , com $\beta=5\%$) dos produtos Charm® ROSA® para os 26 analitos foram, em sua maioria (20 em 26), iguais ou menores que metade do respectivo LMR. Resultados similares foram obtidos para os 17 analitos satisfatoriamente determinados pelo Charm® CowSideII®. Os produtos Charm® ROSA® também apresentaram características de seletividade/especificidade consistentemente satisfatórias, podendo inclusive (com exceção do Charm® Chloroamphenicol Test®), ser empregados em amostras de leite cru adicionadas dos conservantes Azidiol® ou Bronopol®, conforme rotineiramente recebidas nos laboratórios da RBQL, tutelada pelo MAPA. Entretanto, tais conservantes adicionados ao leite branco qualificado podem gerar resultados falsos não conformes quando do uso do produto Charm® CowSideII®, o que inviabiliza seu emprego em amostras adicionadas de qualquer um dos referidos conservantes. Os resultados para os ensaios de robustez dos produtos frente a pequenas alterações de sete variáveis de teste mostraram-se majoritariamente satisfatórios para todos os produtos testados. Entretanto, os dados experimentais sugerem, em especial, que deve ser evitado o emprego dos produtos de teste em amostras de leite apresentando acidez titulável elevada a 18°D, ou contendo teor de gordura elevado, próximo a 6%. Essas recomendações reforçam a necessidade de observância elementar de adequada uniformização do leite antes da amostragem, bem como emprego de leite de razoável qualidade para triagem de resíduos de antibióticos. Coletivamente, as evidências obtidas no presente estudo permitem indicar a inserção educada e inteligente dos ensaios comerciais de triagem, examinados, visando suplementar e potencializar a agenda nacional oficial já existente para controle de resíduos de antibióticos no leite brasileiro, contribuindo com as políticas nacionais de segurança de alimentos e de saúde pública.

Palavras-chave: Leite cru. Antimicrobianos. Resíduos. Validação. Avaliação de Desempenho. Triagem.

ABSTRACT

The present study sought to validate and to assess the performance of commercial screening tests for antibiotic residues in raw, commingled bovine milk according to The Decision 2002/657/EC of the European Community, which is part of the requirements for performance evaluation and validation of established analytical tests by the Brazilian Ministry of Agriculture, Animal Production and Food Supply (MAPA). In particular, its National Residue Control Plan (PNCR-Milk) was fully observed to define the scope of this study and the references for Maximum Residue Limits (MRL) for each analyte. Thus, five analyte groups were covered (beta-lactams, tetracyclines, sulfonamides, amphenicols and quinolones), yielding 30 PNCR-Milk analytes being examined. Five products belonging to the Charm® ROSA® product line (Rapid One Step Assay, based on immunoreceptors) were assessed, each covering one of the five analyte groups. Also evaluated was the Charm® CowSideII®, a product based on a sensitive indicator microorganism. Results indicate that the products under the Charm® ROSA® line could satisfactorily screen for 26 out of 30 PNCR-Milk analytes, whereas Charm® CowSideII® could satisfactorily screen for 16 PNCR-Milk analytes. In fact, detection capability ($CC\beta$, with $\beta=5\%$) values for Charm® ROSA® products based on the 26 analytes were for the majority of the cases (20 out of 26) equal to, or less than, 0.50 of the respective MRL. Similar performance was obtained for the 17 analytes that were satisfactorily detected by Charm® CowSideII®. Charm® ROSA® products also showed consistent, adequate specificity/selectivity characteristics; furthermore, all products - but the Charm® Chloroamphenicol Test® - can reliably screen milk samples containing the preservatives Azidiol® or Bronopol®, which are generally adopted by the RBQL laboratories' overseen by MAPA. However, qualified milk samples containing such preservatives yielded false non-compliant results when tested with Charm® CowSideII®. This evidence should preclude the use of Charm® CowSideII® to screen for antibiotic residues in samples containing one of these preservatives. Results for test robustness under small changes of seven test variables were mostly adequate for all products tested. Nonetheless, experimental data support our recommendation to avoid the testing of milk samples showing increased titratable acidity ($18^{\circ}D$), or increased fat content (ca. 6%), and, notably, this finding further reinforces the fundamental need to ensure adequate milk agitation prior to sampling, in addition to using milk of fair quality when screening for antibiotic residues. Collectively, the body of evidence hereby generated support an indication for the intelligent, educated insertion of the assessed commercial screening test products to supplement the existing national residue and chemical contaminants control framework for Brazilian milk, as a contribution to national policies in food safety and public health.

Keywords: Raw milk. Antimicrobial. Residues. Validation. Performance evaluation. Screening.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

| | |
|--|----|
| Figura 1 – Estrutura da análise de risco..... | 45 |
| Figura 2 – Princípios dos métodos de triagem baseados em receptores para a detecção de antibióticos..... | 49 |
| Figura 3 – Procedimentos de teste estabelecidos conforme a Decisão 2002/657/CE..... | 59 |
| Figura 4 – Resultados obtidos para analitos β -lactâmicos constantes do PNCR para matriz leite, na avaliação de Nível de Resposta Regulatória (NRR)..... | 61 |
| Figura 5 – Analitos β -lactâmicos e seus respectivos limites de referência, identificados como detectáveis pelo produto Charm® MRL BL Test®..... | 61 |
| Figura 6 – Resultados obtidos para analitos tetraciclínicos constantes do PNCR para matriz leite, na avaliação de Nível de Resposta Regulatória (NRR)..... | 63 |
| Figura 7 – Resultados obtidos para 9 analitos do grupo sulfonamidas constantes do PNCR para matriz leite, na avaliação de Nível de Resposta Regulatória (NRR)..... | 64 |
| Figura 8 – Resultados obtidos para analitos do grupo quinolonas constantes do PNCR para matriz leite, na avaliação de Nível de Resposta Regulatória (NRR)..... | 65 |
| Figura 9 – Analitos detectáveis pelo produto Charm® CowSide II® e seus respectivos limites de referência..... | 74 |
| Figura 10 – Resultados obtidos para analitos do grupo tetraciclinas constantes do PNCR para matriz leite, na avaliação de Nível de Resposta Regulatória (NRR)..... | 75 |
| Figura 11 – Resultados obtidos para analitos do grupo sulfonamidas constantes do PNCR para matriz leite, na avaliação de Nível de Resposta Regulatória (NRR)..... | 76 |
| Figura 12 – Resultados obtidos para analitos β -lactâmicos constantes do PNCR para matriz leite, na avaliação de Nível de Resposta Regulatória (NRR)..... | 76 |
| Gráfico 1 – Descrição da quantidade de antimicrobianos constantes do Plano de amostragem para o Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes em Produtos de Origem Animal, entre os anos de 2010 a 2017..... | 42 |
| Quadro 1 – Pesquisa da capacidade de detecção e o número de observações negativas obtidas sob teste em cada concentração relevante do analito, subsidiadas pelo NRR associado..... | 67 |
| Quadro 2 – Variáveis padrão de teste (A /G) e seus respectivos valores alterados de teste (a/g)..... | 71 |
| Quadro 3 – Quantificação de resultados negativos nos ensaios com produtos ROSA® por total de repetições..... | 71 |
| Quadro 4 – Combinações de tratamento segundo Youden & Steiner..... | 73 |
| Quadro 5 – Pesquisa da capacidade de detecção e o número de observações obtidas sob teste em cada concentração relevante do analito, subsidiadas pelo NRR associado..... | 78 |

| | |
|--|----|
| Quadro 6 – Quantidades de resultados negativos no ensaio Charm® Cow Side II® pelo total de repetições..... | 80 |
| Quadro 7 – Resultados para robustez do produto Charm® CowSideII®..... | 81 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|--|----|
| Tabela 1 – Limites de Referência e Plano de amostragem para o grupo dos β -lactâmicos na matriz Leite – PNCR 2017..... | 38 |
| Tabela 2 – Limites de Referência e Plano de amostragem para o grupo das Tetraciclinas na matriz Leite – PNCR 2017..... | 38 |
| Tabela 3 – Limites de Referência e Plano de amostragem para o grupo das Sulfonamidas na matriz Leite – PNCR 2017..... | 39 |
| Tabela 4 – Limites de Referência e Plano de amostragem para as Quinolonas na matriz Leite – PNCR 2017..... | 39 |
| Tabela 5 – Limites de Referência e Plano de amostragem para o grupo das Cefalosporinas na matriz Leite – PNCR 2017..... | 40 |
| Tabela 6 – Limites de Referência e Plano de amostragem para o grupo dos Macrolídeos na matriz Leite – PNCR 2017..... | 40 |
| Tabela 7 – Limites de Referência e Plano de amostragem para o grupo dos Anfenicóis na matriz Leite – PNCR 2017..... | 40 |
| Tabela 8 – Classificação dos métodos analíticos com as características do desempenho que devem ser determinadas..... | 51 |

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

| | |
|-------------|--|
| AMR | Resistência a antimicrobianos |
| ANVISA | Agência Nacional de Vigilância Sanitária |
| APPCC | Análise de Perigo e Pontos Críticos de Controle |
| BPA | Boas Práticas Agropecuárias |
| BPF | Boas Práticas de Fabricação |
| CAP | Cloranfenicol |
| CAC | Comissão do <i>Codex Alimentarius</i> |
| CE | Eletroforese Capilar |
| CCAB | Comissão do <i>Codex Alimentarius</i> do Brasil |
| CC α | Limite de Decisão |
| CC β | Capacidade de Detecção |
| CCS | Contagem de Células Somáticas |
| CONMETRO | Conselho Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial |
| CLAE | Cromatografia Líquida de Alta Eficiência |
| CPV | Coordenação de Fiscalização de Produtos Veterinários |
| CTB | Contagem Total de Bactérias |
| FAO | Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação |
| FDA | Food and Drug Administration |
| IDA | Ingestão Diária Aceitável |
| ISO | International Standards Organization |
| JECFA | Comitê de especialistas para Aditivos Alimentares |
| LMR | Limite Máximo de Resíduo |
| LMDR | Limite Mínimo de Desempenho Requerido |
| LoQ | Limite de Quantificação |
| MAPA | Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento |
| MS | Espectrometria de Massa |
| NRR | Nível de Resposta Regulatória |
| OMS | Organização Mundial da Saúde |
| PABA | Ácido para-aminobenzoico |
| PAMVet | Programa de Análise de Resíduos de Medicamentos Veterinários em Alimentos de Origem Animal |
| PNCR | Plano Nacional de Controle de Resíduos em Produtos de Origem Animal |

| | |
|------|---|
| PNQL | Programa Nacional de Melhoria da Qualidade do Leite |
| PPHO | Procedimentos Padrões de Higiene Operacional |
| PPR | Programas de Pré-Requisitos |
| RBQL | Rede Brasileira de Laboratórios de Controle da Qualidade do Leite |

SUMÁRIO

| | |
|---|-----------|
| 1 INTRODUÇÃO..... | 17 |
| 2 OBJETIVOS..... | 19 |
| 2.1 OBJETIVO GERAL..... | 19 |
| 2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS..... | 19 |
| 3 REVISÃO DE LITERATURA..... | 20 |
| 3.1 ANTIMICROBIANOS..... | 20 |
| 3.1.1 Conceitos e mecanismos de ação..... | 20 |
| 3.1.1.1 <i>β-lactâmicos (Penicilinas e Cefalosporinas).....</i> | <i>21</i> |
| 3.1.1.2 <i>Tetraciclinas.....</i> | <i>23</i> |
| 3.1.1.3 <i>Sulfonamidas.....</i> | <i>24</i> |
| 3.1.1.4 <i>Quinolonas e Fluoroquinolonas.....</i> | <i>25</i> |
| 3.1.1.5 <i>Anfenicóis.....</i> | <i>26</i> |
| 3.2 A QUALIDADE DO LEITE CRU NACIONAL..... | 27 |
| 3.3 RESÍDUOS DE ANTIMICROBIANOS EM LEITE CRU..... | 30 |
| 3.4 MONITORAMENTO DE RESÍDUOS DE ANTIMICROBIANOS EM LEITE CRU..... | 34 |
| 3.4.1 Análise de risco na pesquisa de resíduos de antimicrobianos em leite cru.... | 43 |
| 3.5 AVALIAÇÃO E VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS EMPREGADOS NA DETECÇÃO DE ANTIMICROBIANOS EM LEITE CRU..... | 46 |
| 4 MATERIAL E MÉTODOS..... | 53 |
| 4.1 PADRÕES ANALÍTICOS..... | 53 |
| 4.2 REAGENTES E SOLUÇÕES..... | 53 |
| 4.3 AMOSTRAGEM..... | 54 |
| 4.4 INSTRUMENTAÇÃO..... | 55 |
| 4.5 CRITÉRIOS DE DESEMPENHO..... | 55 |
| 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO..... | 60 |
| 5.1 TESTES COM PRODUTOS DE RESPOSTA RÁPIDA BASEADA EM IMUNORECEPTORES (ROSA®)..... | 60 |
| 5.1.1 Nível de Resposta Regulatória (NRR)..... | 60 |
| 5.1.2 Capacidade de Detecção (CCβ)..... | 65 |

| | | |
|---------|--|-----------|
| 5.1.3 | Especificidade/ Seletividade | 68 |
| 5.1.4 | Aplicabilidade/ Robustez/ Estabilidade | 70 |
| 5.1.4.1 | <i>Exame exploratório</i> | 70 |
| 5.1.4.2 | <i>Exame segundo Youden & Steiner</i> | 73 |
| 5.2 | TESTES COM PRODUTOS DE RESPOSTA RESPOSTA LENTA BASEADA EM INIBIÇÃO DE MICRORGANISMO INDICADOR (COW SIDE II®) | 74 |
| 5.2.1 | Nível de Resposta Regulatória (NRR) | 74 |
| 5.2.2 | Capacidade de Detecção (CCβ) | 77 |
| 5.2.3 | Especificidade/ Seletividade | 79 |
| 5.2.4 | Aplicabilidade/ Robustez/ Estabilidade | 79 |
| 5.2.4.1 | <i>Exame exploratório</i> | 79 |
| 5.2.4.2 | <i>Exame segundo Youden & Steiner</i> | 80 |
| 6 | CONCLUSÃO | 82 |
| 6.1 | CONSIDERAÇÕES FINAIS | 82 |
| | REFERÊNCIAS | 84 |

1 INTRODUÇÃO

As mudanças estruturais da pecuária leiteira brasileira sofrem grande influência do mercado internacional, ocorridas a partir da abertura do mercado brasileiro para o comércio internacional diante, principalmente, das perspectivas de exportação. Em âmbito mundial a produção de leite tem sido crescente, e a participação do Brasil, mesmo que ainda modesta, vem mostrando sinais de potencial futuro (ROUGEMONT, 2015).

A produção de leite tem crescido perenemente ao longo das últimas décadas, com taxas superiores à do Produto Interno Bruto, denotando que tal comportamento histórico do setor tem superado a média da economia brasileira. Entretanto, o cenário econômico atual tem imposto desafios gerenciais ao setor produtivo, implicações que repercutem na posição competitiva do país frente à exportação de produtos lácteos (CARVALHO; COSTA, 2016).

A produtividade e a qualidade do produto são imperativas no setor agrícola brasileiro e possuem forte relação com as políticas normativas e de financiamento (GEHLEN, 2001). Entretanto, uma das principais barreiras enfrentadas pelo setor brasileiro de lácteos é a dificuldade quanto a padronização do leite observando critérios internacionais de qualidade, exigidos por países importadores (MILINSKI *et al.*, 2008).

Nesse contexto, as Boas Práticas Agropecuárias (BPA) adquirem cada vez mais importância como etapa inicial e primordial para maximizar a qualidade e a segurança dos alimentos e, em particular, do leite e de seus produtos, juntamente com as Boas Práticas de Fabricação (BPF) e os Procedimentos Padrões de Higiene Operacional (PPHO), representam o conjunto de programas de pré-requisitos (PPR) inexoráveis para a adequada implantação do sistema de Análise de Perigo e Pontos Críticos de Controle (APPCC), ao longo da cadeia produtiva. Este, por sua vez, visa especificamente maximizar a segurança dos alimentos ofertados ao consumidor (VALLIN *et al.*, 2009; DERETI, 2017),

O emprego de antimicrobianos, principalmente na bovinocultura, é essencial para manutenção da saúde animal e sustentabilidade da produção. No entanto, há crescentes preocupações globais sobre a resistência a antimicrobianos, incluindo antibióticos, com implicações severas tanto sobre a saúde animal como sobre a saúde pública (FAO, 2016).

Para minimizar riscos associados à RAM, programas de controle têm sido estabelecidos em diversos países, atinentes aos limites regulatórios para possíveis resíduos de antimicrobianos em alimentos, na medida em que estes podem contribuir com a RAM. (PACHECO-SILVA, 2014)

No Brasil, o controle oficial da segurança do leite em relação à presença de resíduos de antimicrobianos é realizado por meio do Plano Nacional de Controle de Resíduos em Produtos de Origem Animal (PNCR) (BRASIL, 1999). Tal programa estabelece critérios para amostragem da produção nacional, além da determinação desses resíduos empregando ensaios analíticos confirmatórios. Em que pese seu caráter imprescindível, tais ensaios, todavia, são onerosos, requerendo instrumentação elaborada e pessoal altamente treinado. (MAPA, 2006).

Nesse contexto, surgem os ensaios qualitativos de triagem, como uma maneira potencial de avançar na agenda de controle de perigos químicos, promovendo um processo integrado, que poderá induzir o aumento do volume, e da qualidade dos dados gerados, a contribuir com o início do efetivo exercício nacional em análise de risco da segurança dos alimentos (CHIOU *et al.*, 2015; DERETI, 2017).

Assim, o presente trabalho objetivou validar e avaliar o desempenho dos testes comerciais de triagem Charm® Rosa® e Charm® Cowside®, para resíduos de antibióticos em leite cru, observando critérios de desempenho conforme a Decisão 2002/657/EC, da União Européia, os quais que compõem parte dos requisitos do MAPA para qualificação de ensaios analíticos de resíduos e contaminantes em matrizes alimentares de origem vegetal e animal.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Gerar elementos técnicos, científicos e estratégicos fundamentais para empregar suplementarmente ensaios comerciais de triagem em programas de controle de resíduos de antibióticos em leite cru.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Avaliar o desempenho de produtos comerciais selecionados para triagem de antimicrobianos em leite bovino cru.

Validar o uso de produtos comerciais selecionados para triagem de antimicrobianos em leite bovino cru.

Oferecer subsídios para a otimização de políticas públicas e privadas na eventual pesquisa e controle analítico de resíduos de antimicrobianos em leite bovino cru.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 ANTIMICROBIANOS

3.1.1 Conceitos e mecanismos de ação

O começo de uma abordagem mais técnico-científica para a preparação dos alimentos decorreu do desenvolvimento de sua conservação por meio do calor. Em 1975, o governo francês percebeu a utilidade estratégica em preservar os alimentos para suas tropas, oferecendo, desse modo, uma grande recompensa a quem desenvolvesse um novo e eficaz método para sua preservação. Nicholas Appert foi então premiado por elaborar um mecanismo para conservação que consistia em utilizar um recipiente em vidro, de larga espessura, vedá-lo com uma tampa e fervê-lo por 6 horas. Em 1810, essa técnica foi transformada e adaptada por Durand, com os avanços tecnológicos que se deram nesse período, utilizando uma lata ao invés do vidro – ambos processos ainda empregados nos dias atuais (FORSYTHE, 2013).

Embora pesquisadores anteriores, como Antonie van Leeuwenhock, tenham descoberto “pequenos animáculos sensíveis ao calor”, foi Louis Pasteur quem iniciou a ciência da microbiologia. Seus estudos hipotetizaram e constataram que a bactéria era o agente causador da deterioração dos alimentos e agente promotor de certas doenças. Mais tarde, o processo de pasteurização foi expandido, sendo utilizado no processamento de outros alimentos, como o leite (FORSYTHE, 2013).

Estudiosos como Robert Koch, identificaram as bactérias responsáveis por doenças como tuberculose, cólera e febre tifoide. Nessa época, as pesquisas eram conduzidas na busca por agentes químicos que manifestassem alguma atividade antibiótica. Paul Ehrlich, conhecido como o pai da quimioterapia foi o responsável pelos conceitos primários de que uma substância poderia interferir no metabolismo e, conseqüentemente, no crescimento de microrganismos, em concentrações toleráveis pelo hospedeiro (PATRICK, 1995). Foi ele também o primeiro a observar e relatar a resistência adquirida mostrando que algumas espécies de tripanossomas não respondiam mais ao tratamento com corantes azoicos (PATRICK, 1995). A partir de então, a antibioticoterapia tornou-se frequente, propiciando a evolução de estudos e a descoberta de numerosas novas drogas (TAVARES, 1990).

Os antimicrobianos são capazes de selecionar microrganismos resistentes, independentemente do reservatório onde são utilizados. Microrganismos considerados patogênicos para humanos, caso tenham reservatórios animais, podem ser transmitidos por alimentos contaminados (transmissão de origem alimentar), por exposição a animais contaminados (transmissão direta) ou por contato com ambientes contaminados (transmissão ambiental) (GUARDABASSI *et al.*, 2009).

O manejo dos rebanhos utilizando antimicrobianos para diversas finalidades tornou-se, ao passar dos anos, mais habitual. Estes compostos podem ser empregados para fins terapêuticos (tratamento de infecções em animais que apresentam sinais clínicos); metafiláticos (tratamento de animais clinicamente saudáveis que pertençam ao mesmo rebanho ou cercados dos animais com sinais clínicos); profiláticos (antimicrobiano aplicado em animais saudáveis para a prevenção de doenças) e ainda como melhoradores de desempenho (antimicrobiano adicionado continuamente à ração para ganho do peso via melhora da conversão alimentar) (AARESTRUP, 2005).

Nesse contexto, a Organização Mundial da Saúde (OMS) vem se preocupando com o controle de resíduos e contaminantes em alimentos. Como resultado, observa-se o desenvolvimento constante de ferramentas para controle do uso de diversas substâncias (antibióticos, hormônios, pesticidas e parasiticidas) na produção animal. Essas estratégias envolvem determinação e observância de concentrações seguras dos resíduos e contaminantes nos alimentos, e também, o desenvolvimento de novas, apropriadas e rápidas técnicas para determinação dos mesmos (BRITO; BRITO, 2003).

3.1.1.1 β -lactâmicos (*Penicilinas e Cefalosporinas*)

O grupo de antimicrobianos classificados como β -lactâmicos representa, em maior proporção, as penicilinas e cefalosporinas (SPINOSA, 2006). São polipetídeos que, em sua estrutura química, o elemento estrutural comum é um azetidina de quatro membros, ou anel β -lactâmico. O anel central β -lactâmico é fundido a outro anel de cinco (tiazolidínico) ou seis (dihidrotiazínico) membros, formando as penicilinas ou cefalosporinas, respectivamente (GUIMARÃES, *et al.*, 2010).

A penicilina é um antibiótico bactericida, que inibe a síntese da parede celular bacteriana em sua fase de crescimento logarítmico (BOOTH, 1992). Especificamente, esse antimicrobiano possui em sua estrutura uma região que lembra uma ligação peptídica, semelhante à existente no D-alanil-D-alanina do penta peptídeo da fração

básica da parede celular. Assim sendo, as enzimas D-alanina-carboxipeptidase e transpeptidase ligam-se à uma fração específica do anel, formando um complexo denominado peniciloil-enzima, conseqüentemente, impedindo as ligações cruzadas entre as diferentes camadas do peptidoglicano, acarretando uma parede celular progressivamente mais fraca (VERMELHO *et al.*, 2007; GUIMARÃES *et al.*, 2010).

As modificações na molécula do ácido 6-amino-penicilânico e o espectro de ação das penicilinas, permitem classificá-las em vários grupos como: penicilinas naturais, penicilinas biossintéticas, penicilinas resistentes à penicilinase, isoxazolilpenicilinas, penicilinas de segunda geração, penicilinas de terceira geração e penicilinas de quarta geração, descreve Spinosa (2006).

As penicilinas naturais, obtidas a partir do fungo *Penicillium*, têm curto espectro de ação e atuam, principalmente, sobre bactérias Gram-positivas. Normalmente têm suas variações indicadas com letras maiúsculas do alfabeto, a exemplo da penicilina G, a mais usada em tratamentos terapêuticos e, também a mais importante. A benzilpenicilina (penicilina G) é inativada pelo pH acidificado no estômago, uma vez que o ácido gástrico é capaz de hidrolisar a cadeia lateral amídica, abrindo o anel β -lactâmico, e impossibilitando sua atividade bactericida (SPINOSA, 2006).

Ainda segundo Spinosa (2006), a penicilina V ou fenoximetilpenicilina, é uma penicilina biossintética obtida pela fermentação do fungo com acréscimo do ácido fenoxiacético. Seu espectro de ação é idêntico ao das penicilinas naturais, particularizadas pelo fato de serem resistentes ao pH estomacal, conferindo-lhe ação bacteriostática.

No início da década de 60, foi observada a capacidade de alguns microrganismos clivarem enzimaticamente o anel beta-lactâmico das penicilinas, favorecendo a perda da atividade antimicrobiana do antibiótico, observando, assim, atividades primárias de resistência à penicilinase. As isoxazolilpenicilinas (oxacilina, cloxacilina, dicloxacilina e flucoxacilina) são inibidores potentes do crescimento da maioria dos *Staphylococcus* sp. produtores de penicilinase, sendo a dicloxacilina a mais eficaz (SPINOSA, 2006).

A ampicilina foi a primeira penicilina de amplo espectro e ação introduzida no tratamento terapêutico contra cocos Gram-positivos e negativos. A amoxicilina é similar à ampicilina também quanto à estrutura química, sendo ambas caracterizadas como penicilinas de segunda geração e, portanto, de mais importância para o presente estudo, uma vez que são empregadas largamente na terapia bovina (SPINOSA, 2006).

As cefalosporinas, descobertas em 1945, têm estrutura e mecanismo de ação bastante semelhantes às penicilinas e, muito embora sejam empregadas no tratamento das mesmas doenças, algumas possuem eficácia sobre microrganismos que destróem o anel β -lactâmico (BOOTH, 1992).

São classificadas mediante agrupamento por gerações, variando sua atividade antimicrobiana, em função das substituições em radicais específicos, conforme sua estrutura química específica (VERMELHO *et al.*, 2007). As cefalosporinas de primeira geração (cefalotina, cefazolina, cefapirina, cefadrina, cefalexina, cefadroxil) são assim denominadas por seu espectro de ação antimicrobiana mais estreito, atuando predominantemente sobre bactérias Gram-positivas. São ativas, também, contra *Staphylococcus* sp. produtores de penicilinase. As de segunda geração (cefamandol, cefoxitina, cefaclor) são menos ativas se comparadas às de primeira geração, entretanto, apresentam maior atividade contra bactérias entéricas Gram-negativas. As definidas como de terceira geração (cefotaxima, moxalactama, cefoperazona, ceftizoxima, ceftriaxona, ceftazidima, ceftiofur) possuem maior espectro de ação contra bactérias Gram-negativas, exibindo também certa estabilidade na presença de betalactamases (SPINOSA, 2006).

As cefalosporinas de primeira geração são as mais indicadas para tratamento de mastite subclínica e na terapia de vacas secas. Sua melhor atuação sobre bactérias Gram-positivas, causadoras da maior parte das mastites subclínicas, garante-lhes um lugar de destaque nestes casos. Na mastite aguda, a ação destas drogas sobre *Escherichia coli* e *Klebsiella* sp. faz com que elas sejam também indicadas (LÓPEZ *et al.*, 1996).

3.1.1.2 Tetraciclinas

A clortetraciclina foi o primeiro membro da família das tetraciclinas descoberta em 1945, por Benjamin Duggar. Trata-se de um produto da fermentação natural de uma bactéria do solo, *Streptomyces aureofaciens*, sendo responsável por uma corrida na pesquisa e obtenção de novas tetraciclinas com grande sucesso. Assim sendo, de 1950 a 1970, vários outros antimicrobianos tetraciclínicos foram desenvolvidos, uns como produtos naturais, outros como produtos semissintéticos sendo que, neste mesmo período, as tetraciclinas figuraram entre os antibióticos mais usados nos Estados Unidos (SHLAES, 2006; SPEER *et al.*, 1992).

Quanto ao mecanismo de ação, as tetraciclinas se ligam a um sítio na subunidade 30S do ribossomo bacteriano, impedindo a ligação do aminoacil-t-RNA no sítio A do ribossomo, a adição de aminoácidos e, conseqüentemente, impedindo a síntese proteica (SHLAES, 2006). São agentes bacteriostáticos, com atividade estendendo-se a numerosos microrganismos Gram-positivos e Gram-negativos, incluindo, organismos anaeróbicos, micobactérias (*Mycobacterium marinum*, *Mycobacterium leprae*) e protozoários, como a *Entamoeba histolytica*, *Balantidium coli*, *Giardia lamblia* e *Toxoplasma gondii* (ZHANEL, *et al.*, 2004).

3.1.1.3 Sulfonamidas

Sulfonamidas, ou drogas sulfa, foram os primeiros agentes quimioterápicos aplicados na prevenção e tratamento de doenças bacterianas, desempenhando importante papel na drástica redução da mortalidade por doenças infecciosas. Com o avanço da farmacocinética, a utilidade médica das sulfonamidas tem sido limitada, mesmo que ainda ocupem um lugar importante na terapêutica antibacteriana (FERNANDEZ, 2009).

A descoberta das sulfonamidas, em 1932, ocorreu por acaso em uma fábrica de corantes pertencentes à empresa IG Farben, quando o cientista alemão Gerhard Domagk observou que um composto, posteriormente denominado Prontosil Rubrum®, usado como corante (corante azo) no tingimento de lãs, mostrou atividade antibacteriana contra *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus* sp., a partir de testes *in vivo* em tecidos de animais experimentais (ratos e coelhos). Um trabalho realizado anos após, no Instituto Pasteur pela equipe de Ernest Fourneau (Tréfouëls, Nitti e Bovet), demonstrou que a atividade antimicrobiana do Prontosil® em animais foi devido à atividade de um metabólito incolor sulfanilamida (p-aminofenilsulfonamida), o qual apresenta atividade antimicrobiana tanto *in vitro* quanto *in vivo*, sendo este o agente responsável pela ação quimioterápica observada anteriormente (CARVALHO, 1998).

O termo sulfonamida é utilizado para referir-se aos derivados do para-aminobenzeno-sulfonamida, da qual a partir dos grupamentos anilina e ácido sulfônico, várias outras classes de fármacos foram sintetizadas. Atualmente, cerca de 5000 diferentes compostos desta classe são conhecidos, mas somente 30 têm efetivo emprego, seja na medicina humana ou nas ciências veterinárias (HOFF, 2008).

Representantes deste grupo possuem estrutura química muito semelhante ao ácido para-aminobenzóico (PABA). As características físicas, químicas, farmacológicas e antimicrobianas mudam de acordo com a ligação de radicais ao grupo amínico. Notadamente, as sulfonamidas são inibidores competitivos da diidropteroato-sintetase, a enzima bacteriana responsável pela incorporação do PABA no ácido diidropteróico, precursor imediato do ácido fólico, sendo, portanto, consideradas antimicrobianos de ação bacteriostática (CHAMBERS, 2003). De maneira geral, apresentam grande espectro de ação, atingindo bactérias Gram-positivas e Gram-negativas (RANG *et al.*, 2001).

3.1.1.4 Quinolonas e Fluoroquinolonas

As quinolonas surgiram, acidentalmente, como produto secundário da síntese de um agente antimalárico, de atividade antibacteriana conhecida e comprovada, a cloroquina. A substância foi descoberta em 1962 por George Lesher em uma destilação, durante a síntese de cloroquina. No entanto, este produto secundário revelou possuir também atividade antimicrobiana, surgindo, a partir desse contexto, a primeira quinolona: o ácido nalidíxico (ANDRIOLE, 2000; HIGGINS *et al.*, 2003).

O ácido nalidíxico foi o primeiro a ser introduzido, seguindo-se a flumequina e o ácido oxonílico, sendo então denominadas quinolonas de primeira geração. Este grupo tornou-se a principal escolha no combate às doenças urinárias de difícil tratamento, devido a eficácia contra a maioria das *Enterobacteriaceae*. Entretanto, nenhum destes compostos possuía qualquer atividade contra *Pseudomonas* sp., anaeróbios e bactérias Gram-positivas. Na década de 1980, após intensas pesquisas realizadas tomando como base os primeiros antimicrobianos do grupo, originaram-se as denominadas quinolonas de segunda geração - as fluoroquinolonas (APPELBAUM; HUNTER, 2000).

Quimicamente, as fluoroquinolonas diferem das anteriores por possuírem a combinação de um átomo de flúor e um grupo piperazinil. Suas principais representantes são a enrofloxacin (uso exclusivo em medicina veterinária), norfloxacin, ciprofloxacina, ofloxacina, lomefloxacina e a perfloxacina (KOROLKOVAS *et al.*, 1992).

Esta combinação ampliou seu espectro de ação, por meio do aumento da capacidade de penetração das quinolonas na parede bacteriana. Consequentemente, há a potencialização da atividade contra bactérias Gram-negativas, abarcando também

algumas espécies Gram-positivas. Desse modo, foi possível atingir melhor perfil farmacocinético, chegando as fluoroquinolonas a apresentar atividade antibacteriana 1.000 vezes superior à observada pelo ácido nalidíxico, seu antecessor (SOUSA, 2007).

Existe, atualmente, um grande número de novas fluoroquinolonas, e as modificações estruturais efetuadas permitiram que esta classe de antimicrobiano se desenvolvesse substancialmente (SOUZA, 2005).

Segundo Scholar (2002), as fluoroquinolonas atuam por inibição da atividade catalítica de duas enzimas responsáveis e essenciais à replicação e transcrição do DNA bacteriano: a DNA girase e a topoisomerase IV (topoisomerasas do tipo II). Uma vez que ambas as enzimas são essenciais ao crescimento e à divisão das células bacterianas, ao bloquearem a ação destas enzimas, esses compostos inibem todas as reações dependentes de sua ação catalítica, levando, assim, à morte da célula bacteriana.

3.1.1.5 Anfenicóis

O cloranfenicol (CAP) é um antibiótico da classe dos anfenicóis, de amplo espectro e altamente efetivo, que foi isolado originalmente em *Streptomyces venezuelae*, em 1948 (DURANTE-MANGONI, 2009). O CAP é um antibiótico com classificação bacteriostática de amplo espectro, que tem sido empregado como medicamento de uso veterinário e humano, devido a suas sólidas propriedades de combater uma variedade de microrganismos aeróbios e anaeróbios. O CAP é um composto lipossolúvel que se difunde através da membrana celular e se liga de forma reversível à subunidade proteica 50S dos ribossomos das células de procariontes, evitando a transferência de aminoácidos das cadeias peptídicas em formação, inibindo, assim, a síntese da proteína (MARTINS JÚNIOR *et al.*, 2006).

Seu espectro de ação inclui *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Proteus vulgaris*, *Brucella* sp., *Enterobacter aeruginosa*, *Salmonella* sp., *Bacillus anthracis*, *Corynebacterium pyogenes*, *Erysipelothrix rhusiopathiae* e *Klebsiella pneumoniae* (BOOTH, 1992).

Em humanos, o CAP tem seu uso limitado ao tratamento de conjuntivite aguda, meningite bacteriana e febre tifóide, nas quais os demais antibióticos são menos eficazes. No entanto, efeitos colaterais perigosos, como anemia aplástica ou aplasia medular, favoreceu com que a Comunidade Européia proibisse, em 1994, a

administração do CAP em animais, como bovinos, suínos, camarões, abelhas, dentre outros (COMMISSION REGULATION, 1994).

Em 1996, a Comunidade Européia, através da Diretiva 96/23/ CE, incluiu o CAP como substância de tolerância zero em tecido animal. Mediante controle em dezembro de 1997, iniciou-se um programa para verificar medicamentos veterinários de todos os produtos de origem animal importados de países em desenvolvimento (COUNCIL DIRECTIVE, 1996; COUNCIL DIRECTIVE, 1997). Atinente à tolerância zero para CAP, a Comissão de Decisão 2003/181/CE da Comunidade Européia estabeleceu limite de quantificação requerido para um método analítico em $0,30 \mu\text{g}/\text{kg}^{-1}$ para substâncias que estão proibidas ou não autorizadas ao uso em leite, mel, carne, urina, ovos e produtos de piscicultura (COMMISSION DECISION, 2002).

3.2 A QUALIDADE DO LEITE CRU NACIONAL

Em termos de produção, algumas características são bastante marcantes na pecuária leiteira no Brasil, como o fato de mesmo tendo uma produção extensiva a todo território nacional, não existe um padrão de produção (MÜLLER, 2002; GOMES, 2009; ZOCCAL, 2012).

A produção nacional de leite em 2015, estimada em 34 bilhões de litros, coloca o Brasil em quarto lugar no ranking mundial dos países produtores. Contudo, apesar de ser um grande produtor, o País ainda importa lácteos para abastecer o mercado interno. De janeiro a julho de 2016 importamos 130,2 mil toneladas de produtos, volume que equivale a 1,1 bilhão de litros de leite. Já as exportações ficaram bem abaixo, somando 25,9 mil toneladas (ZOCCAL, 2016).

Ainda assim, a qualidade média do leite brasileiro, de forma geral, é considerada baixa, sendo que sua melhoria constitui grande desafio nacional (MATSUBARA *et al.*, 2011). O leite brasileiro movimenta a economia de pequenas cidades, ajuda na distribuição de renda e gera emprego permanente, principalmente no meio rural (ZOCCAL, 2016).

Para alcançar os níveis de qualidade necessários ao atual contexto competitivo, torna-se essencial revolucionar os processos de gestão. A qualidade de um produto, em si, deixou de ser um diferencial competitivo para tornar-se condição imprescindível para se manter no mercado (BERTOLINO, 2009).

Entendendo a importância do tema, as organizações adotaram medidas para fabricação de produtos visando a qualidade, mediante gestão efetiva e controle, modelo bastante arraigado no segmento até os dias atuais (BERTOLINO, 2009). Entretanto, sozinha, essa abordagem não é plenamente eficaz. Bertolino (2009) afirma que, o controle da qualidade para ser efetivo, necessita de um sistema dinâmico, capaz de abranger todos os setores, direta ou indiretamente, a fim de contribuir para a melhoria e a garantia, principalmente, da segurança dos produtos fabricados.

Praticar a qualidade, portanto, é desenvolver, projetar, produzir e comercializar produtos que sejam mais econômicos, úteis, seguros e satisfatórios ao consumidor. Desse modo, a responsabilidade de assegurar que todos os requisitos sejam, de fato, cumpridos deixa de ser de um departamento e passa a ser obrigação de todos, em vista de um sistema que crie condições favoráveis ao seu constante aperfeiçoamento (TAMIME, 2009).

“Qualidade” segundo a *International Standards Organization* (ISO) 2007, é descrita como a completude das características de um produto ou serviço capaz de atender às necessidades requeridas (FAO, 2010). Entretanto, a definição que aparenta ser a mais adequada é descrita por Juran (1992), o qual afirma que “qualidade é adequação aos fins”.

Contidos nos atributos de qualidade, encontram-se os atributos de segurança do alimento – traduzido do inglês “*food safety*”. Esses atributos consistem no controle de perigos químicos (resíduos e contaminantes químicos), microbiológicos e físicos, de forma a minimizar os riscos associados a esses perigos (CODEX ALIMENTARIUS, 2009).

A Instrução Normativa nº 51, de 18 de setembro de 2002, e a Instrução Normativa nº 62, de 29 de dezembro de 2011, regulamentaram a produção, a identidade, a qualidade, a coleta e o transporte do leite tipo A, leite cru refrigerado e leite pasteurizado. Os controles perfazem requisitos microbiológicos, físico-químicos, como a Contagem de Células Somáticas (CCS), Contagem Bacteriana Total (CBT) e de resíduos químicos a serem cumpridos pelo setor leiteiro e avaliados pela Rede Brasileira de Laboratórios de Controle da Qualidade do Leite - RBQL (BRASIL, 2002; BRASIL, 2011).

No tocante à pesquisa de resíduos de antimicrobianos em leite cru, essa questão ainda se encontra aberta. Os produtores, bem como os laboratórios de referência em qualidade do leite em vários países, conduzem, rotineiramente, pesquisa de resíduos de

antimicrobianos em leite, utilizando-se, principalmente, de ensaios comerciais de triagem. Tal abordagem integrada, entretanto, não está bem disciplinada no Brasil, e isso tem representado um substancial problema (DERETI, 2017).

A implementação dos procedimentos para controle de resíduos na produção torna-se fundamental, sendo esta a melhor alternativa para minimizar os riscos de contaminação nas diferentes etapas do processo de produção, além de estimular a sustentabilidade na agricultura, uma vez que, tais políticas têm mudado o foco do apoio aos preços para a estimulação de uma agricultura sustentável e do desenvolvimento rural (VALLIN *et al.*, 2009; KUIPERS; VERHEES, 2011).

Essas práticas devem garantir que o leite e os seus derivados estejam adequados para o uso a que se destinam, além de manter a produção viável sob as perspectivas econômica, social e ambiental. Cabe considerar que os produtores de leite por fazerem parte da cadeia de produção de alimentos para consumo humano devem estar conscientes da segurança e qualidade do leite que eles produzem (FAO; IDF, 2013).

A preocupação com a segurança dos alimentos que se fortaleceu na década de 50 do século passado, como resultados das exigências do programa espacial americano, vem produzindo um crescente aumento das exigências para produtores, principalmente nos países desenvolvidos, onde a infraestrutura e recursos humanos para a fiscalização encontram-se em maior oferta. Ademais, nesses países a cidadania é mais consciente, portanto mais ativa, exercendo grande influência na elaboração das normas, leis e na atuação das autoridades competentes (ROUGEMONT, 2014).

O controle de resíduos e contaminantes químicos em alimentos é parte fundamental de um programa adequado para maximização da segurança de alimentos, e conseqüente proteção da saúde pública (DE QUEIROZ MAURICIO, 2012). Tal processo deve ser primariamente baseado em prevenção a campo, pelo uso adequado das BPA, processo a ser validado e verificado, de forma secundária, mediante amostragem e análise das matrizes alimentares relevantes (GEHRING *et al.*, 2006).

Em síntese, o controle consiste do exercício de três processos interdependentes, os quais devem ser compreendidos e aplicados no *continuum* produtivo: i. Adoção obrigatória de programas de autocontrole (BPA, BPDV, BPF, PPHO e APPCC), que permitem o controle proativo e preventivo da segurança dos alimentos; ii. Observância estrita dos limites de referência para cada analito relevante nas diferentes matrizes de alimentos, conforme estabelecido por fóruns oficiais, internacionalmente reconhecidos e competentes; iii. Emprego de métodos analíticos capazes de determinar os analitos em

caráter presuntivo, verificando e validando assim a adequada condição de produção destas matrizes, sempre associado à adoção de planos amostrais estatisticamente adequados (DERETI, 2017).

3.3 RESÍDUOS DE ANTIMICROBIANOS EM LEITE CRU

As tantas possibilidades para aplicação de antimicrobianos na pecuária têm sido controversas, particularmente algumas práticas especiais como, por exemplo, o uso de melhoradores de desempenho. A crescente resistência a antimicrobianos, em especial antibióticos, constitui um dos principais problemas mundiais de saúde pública tornando mais difícil o tratamento de infecções bacterianas (LAPPE, 1982). Em certos países, a exemplo dos Estados Unidos, os melhoradores de desempenho têm sido o assunto de um desacordo prolongado entre grupos agroindustriais que argumentam que a prática não é problemática, e grupos de campanha adversa, ambos alegando que a evidência científica e/ou a falta dela suporta suas podenrações (MARTIN, 2005). Em 2013, o FDA sinalizou uma mudança em sua posição, solicitando à indústria que elimine gradualmente o uso de antimicrobianos importantes. A União Europeia (UE) vêm tomando medidas regulamentares, que como seus homólogos ativos nos EUA, argumentavam sobre a falta de indícios de riscos (DAVIES; GIBBENS, 2013).

A veiculação do antibiótico para o leite depende de certos fatores consideráveis, a saber: dose administrada, natureza do veículo utilizado (se aquoso ou oleoso), tipo do antibiótico e de fatores intrínsecos ao animal tratado. Calcula-se que cerca de 30 a 80% do antibiótico aplicado diretamente na glândula mamária passem da corrente sanguínea para o leite; geralmente, as preparações aquosas persistem por três dias; as oleosas são eliminadas após cinco dias ou mais. Trata-se de um problema persistente e não controlado efetivamente, e sendo pauta de debates há anos (JONES; SEYMOUR, 1988).

Observa-se a relação de causas pesquisadas e descritas por Jones e Seymour (1988), para determinar resíduos de antimicrobianos no leite: a) tratamentos aleatórios; b) problemas ou falhas na identificação dos animais tratados; c) ausência de separação de vacas em tratamento no momento da ordenha; d) uso de dosagens múltiplas; e) uso de dosagem acima da recomendada; f) falhas na observação ou não cumprimento dos períodos de carência dos antimicrobianos administrados; g) uso de medicamentos por períodos muito prolongados ou excessivos; h) uso de medicamentos com períodos de

excreção prolongados; i) mistura acidental de leite não contaminado com leite contaminado; j) uso de equipamentos de ordenha contaminados.

De acordo com pesquisa dirigida por Fletouris (2000), processos biológicos também influenciam os níveis de resíduos de medicamentos em tecidos de animais, bem como o tempo de eliminação, que, por sua vez, depende do perfil farmacocinético da droga. Vários medicamentos em várias espécies são conhecidos por apresentarem diferentes perfis farmacocinéticos quando os animais estão doentes. Muitas condições de doenças exercem um efeito sobre a eliminação da droga e, por conseguinte, sobre a presença de seus resíduos em animais abatidos e seus produtos. Em animais saudáveis, outros estados fisiológicos como idade, sexo ou anatomia podem influenciar significativamente a taxa de eliminação do medicamento.

O uso responsável de antimicrobianos tem repercussão particular uma vez que a resistência antimicrobiana (RAM) tornou-se alvo de políticas importantes. É essencial a elaboração de uma estratégia para identificar adequadamente o problema e combatê-lo, destacando suas múltiplas causas e iniciativas para o uso prudente de antibióticos tanto humanos como animais (SERI, 2013).

Segundo o documento de estratégia global para conter RAM (WHO, 2001), a resistência não é um fenômeno novo. Foi observado anteriormente como uma curiosidade científica e, em seguida, como uma ameaça para o efetivo resultado do tratamento. Entretanto, o surgimento de novas classes de antimicrobianos durante as décadas de 50 e 60 e das modificações dessas moléculas nos anos subsequentes, favoreçam um comodismo no tocante à falta de soluções imediatas ao problema, não impedindo ou prevendo tal avanço.

A RAM refere-se a microrganismos - bactérias, fungos, vírus e parasitas - que adquiriram resistência a substâncias antimicrobianas. Embora esse fenômeno possa ocorrer naturalmente através da adaptação microbiana ao meio ambiente, tem sido exacerbado pelo uso inadequado e excessivo de antimicrobianos. Vários fatores estão envolvidos, tais como: I) falta de regulamentação e supervisão do uso; II) adesão de terapia fraca; III) uso não terapêutico; IV) vendas de balcão ou internet, e; V) disponibilidade de antimicrobianos falsificados ou de baixa qualidade. As consequências da RAM incluem a incapacidade de tratar com sucesso as infecções, levando ao aumento da mortalidade; doença mais grave ou prolongada; perdas de produção; e meios de subsistência reduzidos e segurança alimentar (FAO, 2016).

A FAO encontra-se em posição privilegiada para contribuir para os esforços internacionais para resolver RAM e prestar apoio aos governos, produtores, comerciantes e outras partes interessadas para tomar medidas para minimizar o uso de antimicrobianos e reduzir RAM, sendo sensível às necessidades da alimentação e agricultura em todo o mundo. A Organização possui vasta gama de conhecimentos em diversas disciplinas (saúde animal, bem-estar e produção de animais aquáticos e terrestres, segurança alimentar e alimentar, produção e proteção de culturas, desenvolvimento jurídico, etc.) e está presente nos níveis nacional, regional e mundial (FAO, 2016).

A 39ª Conferência da FAO, em junho de 2015, aprovou a Resolução 4/2015 sobre a RAM, reconhecendo que ela representa uma ameaça cada vez mais grave para a saúde pública e a produção sustentável de alimentos requer, desse modo, de resposta efetiva, que deve envolver todos os setores do governo e da sociedade (FAO, 2016).

Para apoiar a implementação da Resolução 4/2015, o Plano de Ação da FAO (2016) sobre RAM versa sobre quatro áreas principais:

- Impulsionar a conscientização sobre RAM e ameaças relacionadas;
- Desenvolver e implementar a vigilância e monitoramento do uso de antimicrobianos na agricultura e conseqüentemente aumento de RAM;
- Fortalecer a governança relacionada ao tema;
- Promover boas práticas nos sistemas alimentares e agrícolas e no uso prudente de antimicrobianos.

Grande proporção de antimicrobianos não é transformada em compostos inativos e retém suas atividades após excreção renal ou biliar (THANNER et al., 2016). A disseminação de antimicrobianos ativos, metabolitos ou produtos de degradação, estabeleceram também o meio ambiente como outro reservatório importante de RAM (THANNER *et al.*, 2016).

É patente que a propagação de RAM é possível ao longo da cadeia através de contato direto ou indireto. O contato direto ocorre após a exposição imediata de seres humanos com animais e substâncias biológicas (como sangue, urina, fezes, leite, saliva e sêmen) e melhora a disseminação rápida e fácil de bactérias resistentes do hospedeiro para o hospedeiro. Embora esta transmissão não tenha aparecido inicialmente como uma ameaça no nível população-saúde, agora é reconhecido que tal exposição favorece uma rota provável para a entrada de bactérias resistentes a antimicrobianos (MARSHALL;

LEVY, 2011). Indiretamente, a transmissão é uma via de longo alcance e mais complexa (LIU *et al.*, 2016).

Fundamentada a propagação do tema RAM em comunidades com alta expertise no assunto, preocupações foram levantadas sobre a persistente resistência a antimicrobianos em espécies bacterianas benéficas, incluindo cepas probióticas (ANDERSSON; HUGHES, 2010).

Os probióticos comerciais geralmente são considerados seguros para os humanos e com a disponibilidade das cepas probióticas em grande variedade de produtos alimentares e preparações farmacêuticas. Além das reivindicações múltiplas sobre os efeitos benéficos dos probióticos para a saúde, existe a necessidade de salvaguardas suficientes para proteger os consumidores de quaisquer efeitos adversos, e garantindo, de fato, sua eficácia. A avaliação de segurança dessas cepas probióticas, surge, nesse contexto, como problema emergente, no tocante à transferência de genes de resistência antimicrobiana a bactérias patogênicas e/ou à microbiota comensal do intestino humano (COURVALIN, 2006).

Ademais, culturas *starter* utilizadas na produção de leite são, de fato, muito sensíveis a presença de antimicrobianos. A presença desses compostos no leite pode causar determinados efeitos indesejáveis, como atraso ou até impossibilidade completa do processo de fermentação. Até 60% do leite que chega ao estágio de processamento contém penicilina em concentração de 0,005 UI/mL. Essa quantidade geralmente não afeta radicalmente a produção de queijo e manteiga, contudo pode retardar o processo de produção de iogurte (BOŽO; ANDEL, 2008).

Para atestar a segurança da matéria prima e manter rastreáveis as informações relevantes, deve-se observar o período de descarte, ordenhando animais tratados por último, evitando a contaminação do leite do rebanho (SILVA *et al.* 2013).

Quando tais medicamentos não são utilizados sob diretrizes de Boas Práticas, os mesmos podem não ser eficazes para o propósito em que são empregados além de, ameaçar a saúde animal e a saúde pública (MARSHALL, *et al.*, 2011). No Brasil, é premente e urgente a necessidade do controle da venda, da dispensação e da prescrição de antibióticos para uso animal, analogamente às políticas de controles para uso humano (DERETI, 2017).

Foram apontadas divergências entre recomendações da literatura científica, orientações das bulas e práticas de prescrição dos veterinários no tratamento de infecções respiratórias em equinos. Pressupõe-se que o fato de que animais e pessoas

infectados pelas mesmas bactérias e sob a terapia antimicrobiana pode ocasionar o aumento global da pressão de seleção de resistência bacteriana aos antibióticos (DERETI, 2003; MCDUGALL *et al.* 2016 *apud* DERETI, 2017).

Produtores, bem como, laboratórios de qualidade de leite em vários países, conduzem mediante rotina analítica a pesquisa de resíduos de antimicrobianos em leite, utilizando ensaios comerciais de triagem como ferramentas de suporte, associados adequadamente à certa quantidade de ensaios confirmatórios. Tal abordagem integrada, entretanto, não está bem disciplinada no Brasil, e isso tem representado um substancial problema, uma vez que a cadeia produtiva, justificadamente, e à luz da experiência de vários países, tem demandado controles de antibióticos em leite mais imediatos, complementares ao PNCR (DERETI, 2017). Parte desse desafio pode ser suplantado por meio de geração, adaptação e validação desses métodos otimizados para controle analítico, sempre associadas a protocolos de amostragem consistentes (DE QUEIROZ MAURICIO; LINS, 2012).

3.4 MONITORAMENTO DE RESÍDUOS DE ANTIMICROBIANOS EM LEITE CRU

Os produtos veterinários são subdivididos em classes, tais como: biológicos, antiparasitários, antimicrobianos, terapêuticos, suplementos alimentares e outros (COINF *apud* SINDAN, 2013). Podem, também, ser agrupados de acordo com suas classes farmacêuticas (biológicos, fármacos e suplementos nutricionais) além de direcionados a uma variedade de animais (CAPANEMA *et al.*, 2007).

Segundo estudo realizado por Capanema e colaboradores (2007), o setor farmacêutico vem apresentando crescimento devido a, principalmente, três fatores: primeiramente, destaca-se o aumento das exportações de produtos veterinários, uma vez que o Brasil é um centro de produção importante para as multinacionais; de forma secundária, salienta-se a maior fiscalização sanitária e critérios cada vez mais exigentes para a comercialização, interna ou externamente; e, por fim, frisou-se a maior conscientização dos criadores da importância de manter os rebanhos saudáveis, com programas sanitários eficazes e regulares.

Compete oficialmente ao MAPA, por meio da Coordenação de Fiscalização de Produtos Veterinários (CPV), a fiscalização, o comércio e o uso de produtos veterinários, estabelecendo normas, regras e instruções que orientem produtores,

veterinários e consumidores. Por meio desses instrumentos, é possível incentivar o uso adequado e prudente de produtos de uso veterinário legalizados e também rastrear, controlar e impedir a comercialização de produtos irregulares (BRASIL, 2016).

Além da legislação que retrata o amplo e crescente mercado de produtos veterinários, existem peculiaridades sobre determinados grupos de substâncias que são discriminados em Instruções Normativas e Portarias vigentes, firmadas pelo MAPA. No tocante ao emprego de antimicrobianos, a Instrução Normativa nº 26, de 9 de julho de 2009, aprovou o regulamento técnico para a fabricação, controle de qualidade, comercialização e emprego destes produtos no país (BRASIL, 2009).

Em complemento às ações já desenvolvidas pelo MAPA, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) atua neste contexto controlando e fiscalizando, através do Programa de Análise de Resíduos de Medicamentos Veterinários em Alimentos de Origem Animal (PAMVet), resíduos de medicamentos veterinários em alimentos, conforme determina a Lei nº 9.782, de 26 janeiro de 1999. A implementação do PAMVet é resultado de recomendações originárias de um fórum de discussão promovido pela Anvisa em 2000 e 2001, com participação de vários segmentos, e cujo objetivo principal continha duas linhas básicas de monitoramento: uma relativa ao conteúdo sobre resíduos em alimentos e outra realçando a resistência bacteriana (ANVISA, 2009).

A preocupação com o uso de medicamentos veterinários em animais produtores de alimentos, cujos resíduos poderiam significar risco à saúde pública, motivou o início do PAMVet em 2002, tendo como primeira matriz de análise o leite bovino. O conjunto dos resultados deste Programa permite o acompanhamento incisivo e, por conseguinte, autocontrole sobre a ocorrência de resíduos de medicamentos veterinários, principalmente antimicrobianos em leite, observando as práticas de produção e o risco de exposição aos resíduos pesquisados. Tais informações são importantes para ampliar o debate sobre o tema, monitorar dados e, como resultado, gerar informações rastreáveis, viabilizando a adoção ou recomendação de medidas preventivas de alcance em toda a cadeia produtiva (ANVISA, 2009).

Um resíduo é, literalmente, definido como "o que sobrou" (ALLISON, 1985). É uma fração da droga e, também, seus metabólitos, interpretados como produtos de conversão ou reação e impurezas que permanecem no alimento originário de animais tratados, segundo definição do *Codex Alimentarius* FAO/ OMS, adotada na Instrução

Normativa nº 42, a qual altera o Plano Nacional de Controle de Resíduos em Produtos de Origem Animal (PNCR) (BRASIL, 1999).

Documentadamente, adversidades quanto a presença de antimicrobianos em leite foram trazidos à luz em 1948 por Kastli (STOLTZ; HANKINSON, 1953), que foi o primeiro a relatar, especificamente, que o leite ordenhado de um animal tratado com penicilina prejudicaria a fabricação de manteiga e queijo a partir dele. De fato, seu estudo descobriu que 0,1 UI a 1,0 UI de penicilina por mililitro de leite eram suficientes para inibir o crescimento das culturas *starter* de *Streptococcus* sp.. Mais tarde, outra evidência publicada da necessidade de controle de resíduos de antimicrobianos em leite data de 1949, onde em trabalho dirigido por Katznelson e Hood nos EUA, e corroborado por Krienk neste mesmo ano, confirmou-se a inibição de culturas *starter* de *Streptococcus* sp. por resíduos de penicilinas e outros antibióticos na fabricação de queijo tipo cheddar (STOLTZ; HANKINSON, 1953). Desde então, programas nacionais vêm sendo elaborados, nesse âmbito, atinente não só ao controle de resíduos de antibióticos, mas também de outros resíduos e contaminantes (STOLTZ; HANKINSON, 1953).

Assim sendo, a contaminação do leite por quaisquer antimicrobianos, é seqüela frequente do tratamento de doenças em animais produtores de leite. Descartar tal produto contaminado representa perda econômica considerável, mas, a ausência desse descarte, pode conduzir a sanções severas se o antimicrobiano for detectado na parcela enviada à venda, completa Allison (1985).

Em 1963, por ocasião de conferência para elaboração de normas oficiais para segurança dos alimentos e práticas justas de comércio, presidida pela FAO/ ONU (Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura) e pela OMS (Organização Mundial da Saúde), ficou solidamente instituída a Comissão *Codex Alimentarius* (CAC). Tal Comissão é responsável por estabelecer normas internacionais na área de alimentos, incluindo padrões, diretrizes e guias. Seus principais objetivos são proteger a saúde dos consumidores e garantir práticas justas de comércio entre os países. Atualmente, participam do *Codex Alimentarius* 187 países membros e a União Europeia, além de 238 observadores (57 organizações intergovernamentais, 165 organizações não governamentais e 16 organizações das Nações Unidas) (ANVISA, 2016).

Assim, embora as normas, diretrizes e recomendações adotadas pelo *Codex* não sejam vinculantes no contexto das legislações alimentares nacionais, os membros da

Organização Mundial do Comércio (OMC) são incentivados a harmonizar suas legislações nacionais com as normas internacionais. Além disso, essas normas podem ser usadas como referência para a dissolução de controvérsias em disputas do comércio de alimentos, conforme arbítrio pela OMC (ANVISA, 2016).

As reuniões e discussões conduzidas pelos Comitês do *Codex* são acompanhadas por delegações dos países membros, formadas geralmente por autoridades regulatórias e por observadores. Há, ainda, órgãos subsidiários de especialistas FAO/OMS, que são interdisciplinares e estruturados por cientistas de notório saber nas áreas de conhecimento afetas, encarregados das avaliações demandadas pelos comitês do *Codex*, com base em princípios da Análise de Risco devidamente estabelecidos (ANVISA, 2016).

Um das dessas comissões, o JECFA - Comitê para Aditivos Alimentares da FAO para definição de Limites Máximos de Resíduos (LMRs) em alimentos, determinados a partir de estudos toxicológicos, de curto e médio prazo, realizados em animais de laboratórios, microrganismos e genomas celulares. Esses limites podem ser definidos como sendo a concentração máxima de resíduos presentes no alimento, resultante do uso de drogas veterinárias, pesticidas) ou de contaminantes. Por sua vez, os valores de LMR são derivados da Ingestão Diária Aceitável (IDA) obtidos a partir de ensaios que avaliam, sobretudo, a toxicidade, teratogenicidade e carcinogenicidade desses compostos (CODEX ALIMENTARIUS, 1996). As Tabelas 1 à 7 mostram os Limites de Referência para resíduos de antimicrobianos em leite vigente no Brasil que observa o *Codex alimentarius*.

Tabela 1: Limites de Referência e Plano de amostragem para o grupo dos β -lactâmicos na matriz Leite – PNCR 2017.

| Antimicrobianos (β-lactâmicos) | Limites de Referência ($\mu\text{g/L}$) | Amostragem |
|--|---|-------------------|
| Cloxacilina | 30 | 600 |
| Dicloxacilina | 30 | |
| Nafcilina | 30 | |
| Ampicilina | 4 | |
| Amoxicilina | 4 | |
| Trimetropim | 50 | |
| Bromexina | 50 | |
| Oxacilina | 30 | |
| Penicilina G | 4 | |
| Penicilina V | 4 | |

Fonte: Adaptado de (BRASIL, 2017).

Tabela 2: Limites de Referência e Plano de amostragem para o grupo das Tetraciclina na matriz Leite – PNCR 2017.

| Antimicrobianos (Tetraciclina) | Limites de Referência ($\mu\text{g/L}$) | Amostragem |
|---|---|-------------------|
| Clortetraciclina | Soma igual a 100 | 600 |
| Oxitetraciclina | | |
| Tetraciclina | | |
| Doxiciclina | | |

Fonte: Adaptado de (BRASIL, 2017).

Tabela 3: Limites de Referência e Plano de amostragem para o grupo das Sulfonamidas na matriz Leite – PNCR 2017.

| Antimicrobianos (Sulfonamidas) | Limites de Referência (µg/L) | Amostragem |
|---|---|-------------------|
| Sulfatiazol | Soma igual a 100 | 600 |
| Sulfametazina | | |
| Sulfadimetoxina | | |
| Sulfaclorpiridiazina | | |
| Sulfadiazina | | |
| Sulfadoxina | | |
| Sulfamerazina | | |
| Sulfametoxazol | | |
| Sulfaquinoxalina | | |
| Sulfisoxazol | | |

Fonte: Adaptado de (BRASIL, 2017).

Tabela 4: Limites de Referência e Plano de amostragem para o grupo das Quinolonas na matriz Leite – PNCR 2017.

| Antimicrobianos (Quinolonas) | Limites de Referência (µg/L) | Amostragem |
|---|---|-------------------|
| Ácido oxolínico | 20 | 600 |
| Ácido nalidíxico | 20 | |
| Flumequina | 50 | |
| Ciprofloxacina | Soma igual a 100 | |
| Enrofloxacina | | |
| Sarafloxacina | 20 | |
| Danofloxacina | 30 | |
| Difloxacina | 100 | |
| Norfloxacino | 10 | |

Fonte: Adaptado de (BRASIL, 2017).

Tabela 5: Limites de Referência e Plano de amostragem para o grupo das Cefalosporinas na matriz Leite – PNCR 2017.

| Antimicrobianos (Cefalosporinas) | Limites de Referência (µg/L) | Amostragem |
|---|---|-------------------|
| Ceftiofur | 100 | 600 |
| Cefquinoma | 20 | |
| Cefalônio | 20 | |
| Cefapirina | 60 | |
| Cefalexina | 100 | |
| Cefoperazona | 50 | |

Fonte: Adaptado de (BRASIL, 2017).

Tabela 6: Limites de Referência e Plano de amostragem para o grupo dos Macrolídeos na matriz Leite – PNCR 2017.

| Antimicrobianos (Macrolídeos) | Limites de Referência (µg/L) | Amostragem |
|--|---|-------------------|
| Eritromicina | 40 | 600 |
| Espiramicina | 200 | |
| Lincomicina | 150 | |
| Tilosina | 100 | |
| Clindamicina | 10 | |
| Tilmicosina | 50 | |
| Azitromicina | 25 | |

Fonte: Adaptado de (BRASIL, 2017).

Tabela 7: Limites de Referência e Plano de amostragem para o grupo dos Anfenicóis na matriz Leite – PNCR 2017.

| Antimicrobianos (Anfenicóis) | Limites de Referência (µg/L) | Amostragem |
|---|---|-------------------|
| Cloranfenicol | 0,30 ⁽¹⁾ | 600 |
| Tianfenicol | 10 | |
| Florfenicol | 10 | |

⁽¹⁾ Substância de uso proibido. O valor indicado na tabela corresponde ao Limite Mínimo de Desempenho Requerido (LMDR) de referência para a análise. O LMDR é o limite de referência para tomada de ação.

Fonte: Adaptado de (BRASIL, 2017).

Os LMRs dos diferentes compostos são submetidos à consideração dos países membros do *Codex Alimentarius* - Programa das Nações Unidas Sobre Harmonização de Normas para alimentos gerenciado pela FAO/WHO (BRASIL, 1999).

O Brasil é membro do *Codex Alimentarius* desde a década 70, é um dos países da América Latina que tem maior tradição de participação nos trabalhos do programa. Cabe mencionar que, o Ministério das Relações Exteriores é o Ponto Focal do Comitê Brasileiro com o Comitê do *Codex Alimentarius* (CAC). Desde 1980 o país exerce sua participação no *Codex Alimentarius* pelo Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia (Inmetro), quando foi criado o Comitê do *Codex Alimentarius* do Brasil (CCAB), instituído pela Resolução CONMETRO – Conselho Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial nº 01, de 17 de março de 1980 e reestruturado por meio das Resoluções CONMETRO nº 07, de 26 de julho de 1988, nº 01 de 16 de junho de 1989, nº 12 de 24 de agosto de 1992 e nº 05 de 26 de maio de 1993 (ANVISA, 2016).

Foram criados no âmbito do CCAB, à semelhança da estruturação do *Codex*, grupos técnicos específicos cuja função básica é identificar os segmentos interessados nos vários temas, que possam fornecer subsídios ou pareceres sobre os documentos específicos resultantes dos trabalhos do *Codex Alimentarius*. Às coordenações dos Grupos Técnicos (GT) do CCAB, exercidas pelo Inmetro, pela ANVISA e pelo MAPA, compete analisar e avaliar as matérias submetidas a exame pelos respectivos Comitês a fim de elaborar posições a serem submetidas ao CCAB para as reuniões internacionais dos Comitês do *Codex Alimentarius*. Nesse contexto, com o passar dos anos, as pautas desses grupos, que refletem a agenda das reuniões do *Codex Alimentarius*, tem crescido em quantidade de temas e na relevância destes, tanto para a saúde como para a economia (ANVISA, 2016).

O PNCR para produtos de origem animal teve suas diretrizes instauradas pela Instrução Normativa nº 42 em 1999, assim como avanço progressivo do escopo de resíduos e contaminantes químicos e biológicos em carne, leite, mel e pescado de forma a atender a demanda nacional e internacional. No entanto, somente em 2010, o Programa Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes (PNCRC), depois intitulado de Plano Nacional de Controle de Resíduos Biológicos em Produtos de Origem Animal – PNCRB, foi solidamente instituído e tem sido constantemente expandido, conforme demonstração no gráfico abaixo (Gráfico 1) (BRASIL, 2017).

Gráfico 1: Descrição da quantidade de antimicrobianos constantes do Plano de amostragem para o Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes em Produtos de Origem Animal, entre os anos de 2010 a 2017.



Fonte: Adaptado de (BRASIL, 2017).

Institucionalmente, este programa foi subdividido em programas setoriais, de acordo com a origem e objetivo das análises, sendo eles: Subprograma de Monitoramento, no qual são analisadas as amostras para monitoramento de resíduos de substâncias de interesse nacional objetivando gerar as informações sobre a frequência, níveis e distribuição dos resíduos no país, ao longo do tempo, a amostragem é anual e aleatória; Subprograma Exploratório, em que são realizadas análises para se estudar a ocorrência de resíduos de substâncias para as quais não há limites máximos de resíduos estabelecidos, podendo adotar amostragem aleatória ou dirigida, sendo que resultados não levam a ações regulatórias; Subprograma de Investigação, que é iniciado a partir de violações identificadas no Subprograma de Monitoramento ou de denúncias de uso de substâncias de uso proibido e que consiste na intensificação de amostragem dirigida da propriedade de origem dos animais que geraram a referida violação ou denúncia até que não ocorram mais violações consecutivas nessa propriedade e investigação das causas dessa violação; Subprograma de Controle de Produtos Importados, no qual está prevista a análise de resíduos e contaminantes em alimentos importados pelo Brasil (BRASIL, 1999).

Consoante ao Programa, o critério para inclusão de resíduos para inspeção de alimentos de origem animal em programas de diversos países deu-se sob as seguintes

conjunturas: geração de resíduos pela substância; o grau de toxicidade do resíduo para a saúde do consumidor; o potencial de exposição da população ao resíduo (considerando-se hábitos alimentares, poder aquisitivo, tecnologia para a produção de alimentos para consumo animal), poluição ambiental; mau emprego das drogas formadoras de resíduos (com a consequente aplicação das boas práticas agrícolas e pecuárias); uso de métodos apropriados para análise, que sejam confiáveis, exequíveis e compatíveis com os recursos laboratoriais existentes (BRASIL, 1999).

A gestão do PNCR é gerenciada pelo Sistema de Controle de Resíduos e Contaminantes (SISRES), que consiste em um sistema de gestão online. Ele viabiliza o sorteio de amostras de forma aleatória, administrando informações relacionadas à coleta (dados amostrais), análise (realizada por laboratórios da Rede de Laboratórios Agropecuários - composta por laboratórios oficiais e laboratórios privados credenciados no MAPA) e resultados. (BRASIL, 1999).

Os planos amostrais adotados no PNCR são definidos com base em um modelo estatístico de distribuição binomial, onde o número de amostras coletado de uma população é dado pelo sucesso ou insucesso de detecção de não conformidades, dados uma prevalência assumida a priori e o desejado nível de probabilidade (BRASIL, 2011).

Considerando a adoção de um cenário alternativo, utilizando ensaios de triagem em complemento aos ensaios confirmatórios, seria possível focar ensaios confirmatórios em uma subpopulação de amostras com alta probabilidade de serem de fato positivas. Gera-se, assim, uma massa substancialmente maior de dados e melhor qualidade de informação, em particular de concentrações de eventuais resíduos de antibióticos no leite brasileiro sob SIF. Além de permitirem intervenções corretivas a campo mais focadas e específicas, séries históricas robustas podem ser geradas com mais rapidez, de forma a se avaliarem tendências referenciadas no tempo e no espaço, subsidiando solidamente políticas públicas e privadas (DERETI, 2017).

3.4.1 Análise de risco na pesquisa de resíduos de antimicrobianos em leite cru

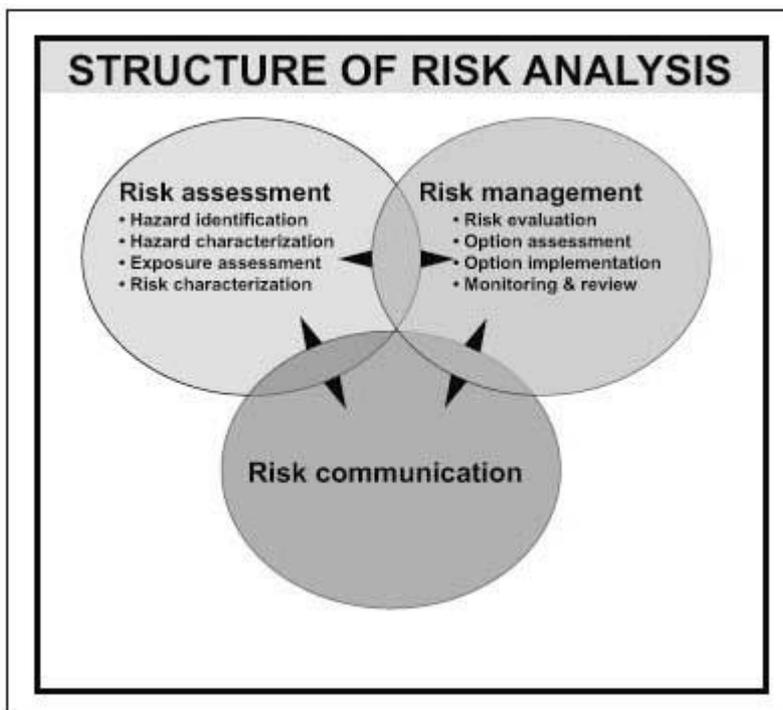
Ainda que alguns esforços nesse sentido sejam evidenciados, há visível necessidade de atender requisitos internacionalmente preconizados e mantê-los ativos, assegurando a consistente credibilidade do País perante o agronegócio mundial. O uso de antibióticos, requer mais atenção da academia e de representantes legais, uma vez

que o tema é configurado como elemento pivotal no progresso mundial para o aumento da segurança dos alimentos (ROLLIN, 2001). Entretanto, a aparente estagnação e a persistente ausência de interesse regulatório em preencher certas lacunas, específicas deste cenário, é notável por uma série de razões, dentre elas, satisfazer exclusivamente, no caso dos lácteos, o mercado interno (menos exigente), em detrimento ao externo (ROLLIN, 2001).

Atendendo a mudanças quanto à complexidade dos riscos, decorrentes das grandes transformações tecnológicas e científicas vivenciadas pela sociedade, surge na década de 80, o método científico de análise de risco cuja aplicação inicial dirigiu-se à segurança industrial, ao meio ambiente e à saúde (FREITAS; GOMEZ, 1997). Fundamenta-se em uma abordagem científica com caráter multidisciplinar e integrador para identificar, quantificar as relações entre os perigos e riscos associados e respaldar a tomada de decisão, coletivamente, pelos diversos atores envolvidos (PORTO; FREITAS, 1997).

A análise de risco consiste em um processo formado por em três componentes: avaliação, gestão e comunicação de risco (CODEX ALIMENTARIUS, 2007). A avaliação do risco fundamenta-se em conhecimentos científicos sobre os perigos e riscos em toda a extensão da cadeia produtiva, os métodos de controle, os efeitos prejudiciais à saúde, tanto agudos quanto crônicos, acumulativos e ou combinados, e os grupos da população vulneráveis ou expostos a alto risco. O objetivo das avaliações de risco é fornecer informação abrangente aos gerentes de risco, os decisores políticos e reguladores, para que eles possam tomar as melhores decisões possíveis (PAUSTENBACH, 2002). As subetapas de avaliação de risco são: identificação do perigo, caracterização do perigo, avaliação da exposição, e caracterização do risco (Figura 1) (CODEX ALIMENTARIUS, 2007).

Figura 1: Estrutura da análise de risco.



Legenda: Da esquerda para direita: Avaliação do risco: Identificação do perigo, caracterização do perigo, avaliação de exposição, caracterização do risco; Gerenciamento do risco: Avaliação do risco, avaliação, implementação, monitoramento e revisão; Comunicação do risco.

Fonte: (CODEX ALIMENTARIUS, 2007).

O gerenciamento do risco é um processo de decisão sobre as opções de gerenciamento, o qual deve contemplar as incertezas, as consequências econômicas, a viabilidade técnica, política e econômica, além dos resultados da avaliação de riscos para definir regulamentação adequada a um potencial perigo para a saúde (PAUSTENBACH, 2002), a partir da ponderação em consulta as partes interessadas (CODEX ALIMENTARIUS, 2007). No que se refere aos medicamentos e aditivos veterinários, essa etapa inclui definição de períodos de carência dos medicamentos em animais que produzem carne, leite, ovos e outros alimentos após terapia com esses medicamentos e monitoramento de resíduos nesses alimentos (GAYLOR *et al.*, 1998) .

A comunicação do risco consiste na troca interativa das informações à partes interessadas, de forma transparente, a fim de garantir a sua adequada participação e o gerenciamento eficaz dos riscos. O objetivo global da análise de risco aplicada à segurança dos alimentos é assegurar a proteção da saúde dos consumidores e a promoção de práticas de comércio justo (CODEX ALIMENTARIUS, 2007).

Girardi e Odore (2008) relatam que a falta de dados epidemiológicos nesse cenário pode ser decorrente da insuficiência de relatórios, ausência de diagnósticos definitivos de intoxicação alimentar, dificuldade na determinação do alimento contaminado ou pelo fato de, atualmente, muitos dos riscos potenciais relacionados à presença de resíduos de drogas e/ou metabólitos não terem sido elucidados.

Controles de processo ao longo de toda a cadeia produtiva e métodos de controle estatístico são os meios preferenciais para prevenir não conformidades na gestão da qualidade e geração de expressivas informações. Um sistema de controle de processo eficaz também pode ser usado para fornecer informações na avaliação e verificação da qualidade dos produtos. Faz-se pertinente empregar procedimentos de controle estatístico na prática cotidiana de produção, a fim de ser ter domínio do processo e mais efetividade na garantia da qualidade do leite (LI *et al.*, 2011).

3.5 AVALIAÇÃO E VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS EMPREGADOS NA DETECÇÃO DE ANTIMICROBIANOS EM LEITE CRU

É patente que possíveis riscos à saúde decorrentes do emprego de antimicrobianos na prática veterinária (especialmente em animais produtores de alimentos) estão associados a resíduos destes compostos em níveis acima dos LMRs (LIOUSIA *et al.*, 2015).

O monitoramento da presença de resíduos de antimicrobianos é também fundamental para a indústria de produtos lácteos, devido a certos prejuízos causados pela interferência que estes compostos apresentam (MOELLER *et al.*, 2007). Tais perturbações poderão causar falhas tecnológicas na produção de determinados subprodutos, causando transtornos, por exemplo, no processo de fermentação de bebidas lácteas, iogurtes, queijos, entre outros problemas (MARTINS; VAZ, 2000). À vista disso, reafirma-se a importância do constante aperfeiçoamento das ferramentas para controle de qualidade e segurança da cadeia produtiva de alimentos, visando atender, de maneira inteligente, os padrões para identidade, qualidade e segurança dos alimentos (TOLDRÁ; REIG, 2006).

Variados métodos têm sido empregados para verificação e avaliação de resíduos e contaminantes, e podem ser categorizados em três grupos: métodos cromatográficos, métodos microbiológicos e imunoensaios (HOFF *et al.*, 2012). O Método cromatográfico pode ser aplicado para análise qualitativa ou quantitativa de resíduos de

antimicrobianos. Este ensaio inclui, principalmente, a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), eletroforese capilar (CE), espectrometria de massa (MS ou MS/MS) e demais ensaios de desempenho similar (VERA-CANDIOTI *et al.*, 2010). A cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (LC-MS ou LC-MS/MS) é a técnica analítica mais empregada na detecção e quantificação de resíduos, em consequência da sua alta sensibilidade e seletividade, a qual é capaz de apontar limites de quantificação (LoQ) na ordem de $\mu\text{g}/\text{kg}$ para a maioria dos compostos (CHIARADIA *et al.*, 2008).

Outros métodos qualitativos ou semi-quantitativos têm sido considerados importantes recursos na investigação da presença de resíduos de medicamentos veterinários em várias matrizes. Técnicas com fundamentações microbiológicas baseiam-se na inibição do crescimento de microrganismos indicadores em meio específico, onde a provável presença do analito favorece determinada reação de reconhecimento entre antimicrobianos e organismos sensíveis (CHÁFER-PERICÁS, 2010). Tais modelos qualitativos figuram nesse contexto como métodos alternativos aceitáveis para o controle de qualidade de rotina, por serem, principalmente, mais baratos e de simples operação, além de serem capazes de ampliar a quantidade amostral (SAVIANO *et al.*, 2014).

O receptor é uma substância macromolecular que pode identificar e se ligar seletivamente ao ligando. O papel dos receptores e ligandos atendem a três características principais: especificidade, saturação e alta segurança. Atualmente, a maioria das tecnologias que vem sendo desenvolvidas fundamentam-se em receptores de antibióticos e, principalmente delas, estão avançando estudos acerca de métodos de purificação da proteína receptora para obter receptores (AHMED *et al.*, 2017).

A elegante reação entre enzima, anticorpo e antígeno é o princípio básico das técnicas imunológicas. Entre as técnicas, as mais comuns são o ELISA (do inglês *enzyme-linked immuno sorbent assay*), o radioimunoensaio (RIA) e biosensores (PACHECO-SILVA *et al.*, 2014). O imunoensaio, por sua atividade enzimática específica, resulta em uma variação de cor que pode ser medida por técnicas colorimétricas, que apesar de categorizado como método qualitativo, é mais sensível, além de mais preciso, que o método microbiológico e de manuseio mais inteligível. Ademais, o imunoensaio é eficaz para detecção simultânea de compostos diferentes (SAI, 2010). Outra abordagem interessante para a detecção de resíduos de antimicrobianos são os biosensores, em expansão na área de alimentos nos últimos anos.

O ensaio de biosensor utiliza elementos de reconhecimento como proteínas, células, enzimas, ácidos nucleicos, tecidos, que combinados a um analito, podem transduzir os sinais bioquímicos em sinais elétricos (GUSTAVSSON, 2006). Ainda no tocante a metodologias biológicas de triagem, há também, o RIA o qual atua na medida da radioatividade de um complexo imunológico a partir de um contador específico (HORNBECK, 1991).

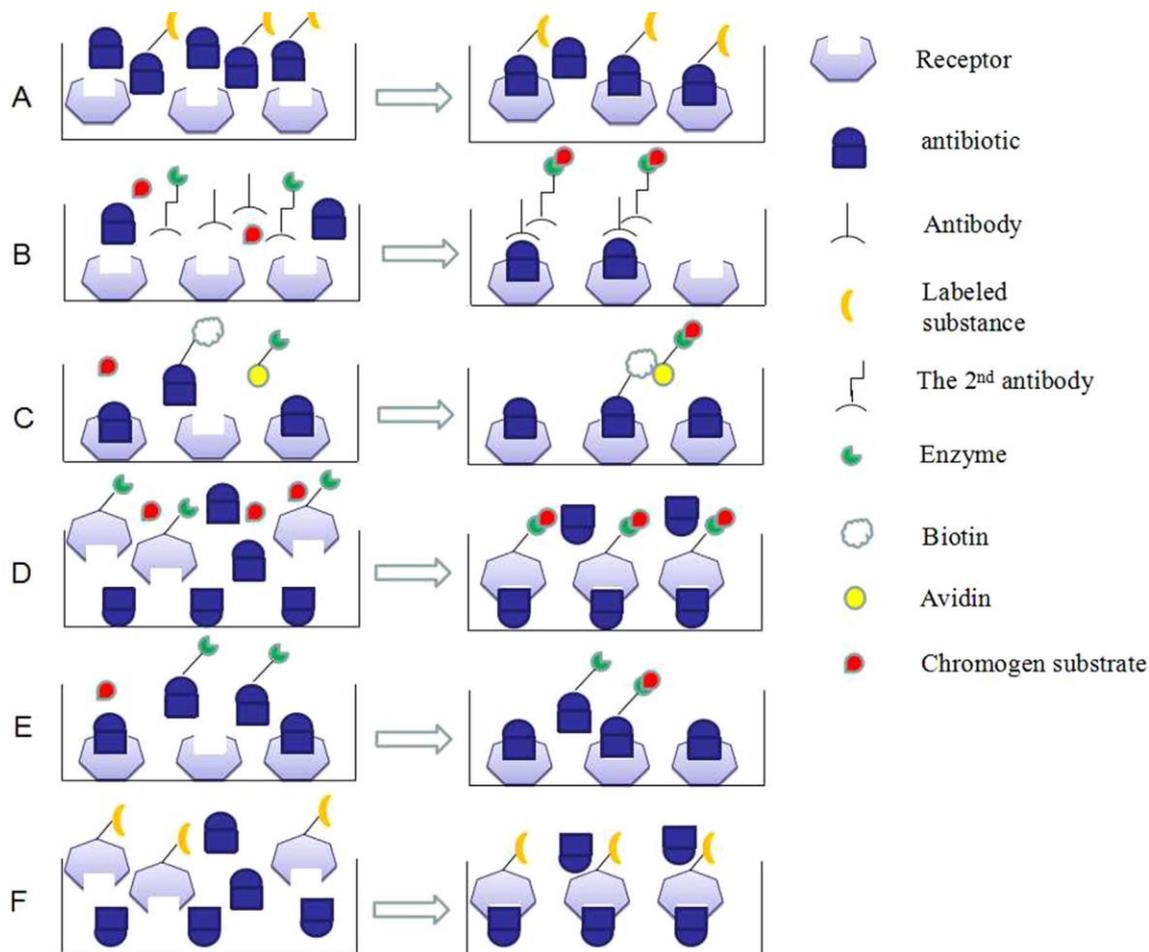
O ensaio de receptor de ouro coloidal utiliza partículas coloridas de ouro coloidal para rotular a proteína receptora na detecção de resíduos de antimicrobianos. Degelaen e colaboradores (1985) já empregavam a proteína BlaR-CTD como receptora, alinhada à biotina e ouro coloidal. Tal mecanismo pode ser empregado para detectar antibióticos β -lactâmicos, a título de exemplo, em minutos, adotando limite de detecção menor do que os valores de LMR adotados pelo Brasil. BetaStar® (Neogen Corporate) e Twinsensor BT® (Cap Lab), além do Charm® Rosa (Charm Science), núcleo deste trabalho, são produtos que dispõem de ensaio coloidal do receptor de rotulagem de ouro. É descomplicado e rápido, e o analito alvo pode ser detectado apenas em alguns minutos (AHMED *et al.*, 2017).

O cumprimento dos requisitos para garantia da segurança do alimento já evidencia a importância da utilização de métodos rápidos e eficientes como ferramentas robustas em regime laboratorial e que, preferencialmente, possuam características necessárias para serem empregados em controles oficiais. Tais produtos são capazes de encurtar o tempo total de análise para 30 minutos ou, até mesmo, 5 a 8 minutos, a depender de características intrínsecas, as quais irão contribuir em melhoria contínua da qualidade, no tocante a segurança do produto e da competitividade do setor leiteiro (VESTERLUND, 2004).

Os métodos qualitativos de triagem fornecem respostas binárias, que assinalam se o analito de interesse está presente em concentração abaixo, dependendo da sensibilidade inerente a cada instrumento, limitante ou acima do limite estabelecido pelo *Codex* (VALCÁRCEL *et al.*, 1999). Dentre as principais características dessas técnicas, elencadas por Valcárcel e colaboradores (1999), que os diferenciam de métodos analíticos clássicos, destaca-se a contingência agregada à cada resposta que pode, e deve, nesse contexto, influenciar na tomada de decisões e ações imediatas.

Em estudo realizado por Ahmed e colaboradores (2017) e demonstrado figurativamente os princípios dos métodos analíticos de triagem, a figura 2 demonstra cada um dos mecanismos citados:

Figura 2: Princípios dos métodos de triagem baseados em receptores para a detecção de antibióticos.



Princípio A: Usando o medicamento marcado com enzima; Princípio B: O anticorpo reconhece o composto, e é adicionado o 2º anticorpo marcado pela enzima, o resultado foi mostrado pelo substrato do cromogênio; Princípio C: Usando medicamentos marcados com biotina, os resultados mostraram a identificação de biotina e avidina; Princípio D: Usando o receptor marcado com enzima, os resultados foram mostrados pelo substrato do cromogênio; Princípio E: Usando o medicamento marcado com enzima, os resultados foram similares ao princípio anterior; Princípio F: Usando o receptor marcado com enzima, o composto foi detectado a partir da ligação da substância rotulada.

Fonte: Adaptado de (AHMED *et al.*, 2017).

Os métodos analíticos utilizados no PNCR são adotados em função da disponibilidade de métodos validados, principalmente, aqueles recomendados pelo Comitê do *Codex Alimentarius* no tocante a Resíduos de Drogas Veterinárias nos Alimentos (BRASIL, 1999).

A ABNT NBR ISO/IEC 17025:2005 é a norma internacional na qual são tratados os requisitos para implementação de sistemas de gestão da qualidade em laboratórios de ensaio e calibração. Neste documento fica estabelecido que métodos normalizados utilizados fora dos escopos para os quais foram concebidos, ampliados ou modificados; métodos não normalizados e métodos criados ou desenvolvidos pelos laboratórios devem ser validados (ABNT, 2005).

Ainda segundo a Norma ABNT NBR ISO/IEC 17025 (2005), validação denota a confirmação por exame e fornecimento de evidência objetiva de que os requisitos para um determinado uso pretendido são atendidos. Ou seja, que variáveis e parâmetros de desempenho avaliados atendem aos critérios de aceitação preconizados.

A validação de um método, então, visa garantir a qualidade metrológica dos resultados analíticos, conferindo-lhes rastreabilidade, comparabilidade e confiabilidade para a tomada de decisões (MAPA, 2011). Os estudos para determinação das variáveis e parâmetros de validação devem ser realizados com equipamentos e instrumentos dentro das especificações, funcionando corretamente e adequadamente calibrados, sendo conduzidos por pessoal competente na área, com conhecimento suficiente para tomar decisões apropriadas (INMETRO, 2010).

Em 2011, a Coordenação Geral de Apoio Laboratorial (CGAL/ MAPA) publicou o Guia de Validação e Controle de Qualidade Analítica – Fármacos em Produtos para Alimentação Animal e Medicamentos Veterinários, utilizado e legitimado por laboratórios oficiais e credenciados, onde demonstra os parâmetros a serem avaliados na validação dos procedimentos analíticos, bem como os critérios mínimos a serem atendidos para que o método seja considerado adequado ao fim ao qual se propõe (MAPA, 2011). Até a publicação deste documento, as duas agências nacionais que disponibilizavam guias de validação para métodos analíticos eram a ANVISA, por meio da Resolução RE 899 de 2003, cuja publicação é direcionada para fármacos de uso humano, e o Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial (INMETRO) por meio de orientações descritas no DOQ-CGCRE-008 (INMETRO, 2010).

Posto que há concordância entre guias internos no que diz respeito a parâmetros requisitados para avaliação e validação desses métodos, inexistente padronização quanto compêndio exclusivo disponível para validação de métodos qualitativos. Pesquisa para verificar a robustez de um método é observada nos documentos do Inmetro (2010) e da União Europeia (EC, 2002), não sendo previsto no guia Eurachem (1998), citando caso

análogo. De acordo com Thompson e colaboradores (2002), não há diferenciação entre métodos qualitativos e quantitativos na apresentação das variáveis e parâmetros de desempenho da validação no guia publicado pela AOAC/ISO/IUPAC. Isso se distingue, entretanto, da Decisão da União Européia, a qual, integralmente, estabelece o critério de desempenho especificidade/ seletividade como aplicável como indispensável a métodos qualitativos (Tabela 8) (EC, 2002).

Tabela 8: Classificação dos métodos analíticos com as características do desempenho que devem ser determinadas

| | | <i>Limite de Detecção</i> <i>CCβ</i> | <i>Limite de Decisão</i> <i>CCα</i> | <i>Veracidade</i> | <i>Precisão</i> | <i>Seletividade</i> | <i>Robustez</i> |
|------------------------------|----------|--|--|-------------------|-----------------|---------------------|-----------------|
| Métodos Qualitativos | T | + | - | - | - | + | + |
| | C | + | + | - | - | + | + |
| Métodos Quantitativos | T | + | - | - | + | + | + |
| | C | + | + | + | + | + | + |

T = Métodos de triagem; C = Métodos de confirmação; + = A determinação é obrigatória

Fonte: Adaptado de (EC, 2002).

Laboratórios com alta taxa de processamento de amostras devem dispor de método de triagem para detecção de compostos regulamentados e/ou proibidos. Atinente a este cenário, a Decisão 2002/657/CE introduziu uma nova variável de desempenho, a qual deve ser considerada para fins de triagem: a capacidade de detecção (*CC β*) (SCORTICHINI *et al.*, 2005). Um dos méritos desse documento é ampliar alguns conceitos gerais para um painel muito grande de técnicas de detecção, sugerindo variáveis comuns para a validação de métodos analíticos correspondentes (NAVRÁTILOVÁ, 2008; ANTIGNAC *et al.*, 2003).

A Decisão da Comunidade Europeia (EC, 2002) define o *CC β* , como sendo:

“teor mais baixo de substância que pode ser detectado, identificado e/ou quantificado numa amostra com uma probabilidade de erro de β . Em caso de substâncias relativamente às quais não se encontre definido um limite permitido, a capacidade de detecção é a concentração mais baixa a que o método é capaz de detectar amostras realmente contaminadas com uma

certeza estatística de $1 - \beta$. No caso de substâncias com um limite permitido estabelecido, isto significa que a capacidade de detecção é a concentração a que o método é capaz de detectar concentrações no limite permitido com uma certeza estatística de $1 - \beta$.”

Por sua vez, erro β é definido pela Decisão como “a probabilidade de que a amostra testada seja realmente não conforme, apesar de se ter obtido um resultado conforme (decisão falso conforme). Isso significa, objetivamente, que a capacidade de detecção é a concentração do analito para a qual o ensaio o detecta com probabilidade estatística de $1 - \beta$ (ANTIGNAC *et al.*, 2003).

Em teoria, $CC\alpha$ e $CC\beta$ podem ser calculados para cada sinal diferente que caracteriza o analito. No entanto, algumas considerações adicionais são necessárias dependendo da finalidade de seleção do método. Métodos de triagem são capazes de processar elevado número de amostras, sendo utilizados para detectar amostras apresentando resultados potencialmente não conformes. Devem objetivar evitar resultados falsos conformes (controle de erro β), priorizando, desse modo, a proteção da saúde pública, em relativo detrimento à sua capacidade de decisão (controle do erro α). Cabe mencionar que esta última característica é avaliada obrigatoriamente apenas para os ensaios confirmatórios, mediante a determinação de seu $CC\alpha$, além, evidentemente, do sempre imprescindível $CC\beta$ (ANTIGNAC *et al.*, 2003; GOWICK, 2003).

Resultados falsos conformes podem acarretar sérias consequências de saúde pública, como já discorrido, e no âmbito econômico em toda a cadeia produtiva. A validação desses métodos analíticos, sempre associada a protocolos de amostragem consistentes e o emprego inteligente na agenda analítica de rotina faz-se indispensável na seleção da estratégia para avaliação adequada da presença de resíduos de antimicrobianos em leite cru, bem como a instantânea interpretação dos resultados. Isso assegura bom acompanhamento sobre o perfil brasileiro quanto à segurança de alimentos. Entretanto, apesar da otimização recursos de toda ordem através do uso de métodos de triagem, no Brasil ainda é premente a necessidade de mais investimentos para adoção dos mecanismos de autocontrole e gestão de risco desde a produção primária (ROMERO *et al.*, 2016; DERETI, 2017).

4 MATERIAL E MÉTODOS

O presente projeto foi realizado a partir de importante demanda nacional, liderada pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento - MAPA, à Embrapa Gado de Leite, de forma a gerar elementos técnicos, científicos e estratégicos fundamentais para a eventual inclusão destes ensaios nos programas oficiais de controle de resíduos de antibióticos em leite.

A adesão ao estudo foi feita de forma voluntária pela empresa, conforme competente contrato publicado no Diário Oficial da União (DOU), em sua edição de 25 de outubro de 2013.

4.1 PADRÕES ANALÍTICOS

Para a avaliação de resíduos de antibióticos no leite cru e validação de métodos analíticos qualitativos, utilizou-se o guia *Commission Decision* da Comunidade Europeia (2002/657/EC), adotado e internalizado pelo MAPA.

30 padrões analíticos certificados e rastreáveis (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) foram obtidos, de acordo com o escopo analítico relevante do Plano Nacional de Controle de Resíduos Biológicos em Produtos de Origem Animal - PNCR/Leite, de 2013. Nesse escopo, foram obtidos oito padrões analíticos representantes da classe de antibióticos β -lactâmicos (ampicilina, amoxicilina, ceftiofur, cloxacilina, dicloxacilina, oxacilina e penicilinas G e V); quatro padrões analíticos da classe dos antibióticos tetraciclínicos (tetraciclina, clortetraciclina, doxiciclina e oxitetraciclina) nove da classe das sulfonamidas (sulfaclopiridazina, sulfadoxina, sulfamerazina, sulfatiazol, sulfametazina, sulfadimetoxina, sulfaquinoxalina, sulfadiazina e sulfametoxazol); sete da classe das quinolonas (enrofloxacina, ciprofloxacina, difloxacina, sarafloxacina, ácido nalidixico, ácido oxolínico e flumequina) e dois da classe dos anfenicóis (cloranfenicol e florfenicol). Todos os padrões foram conservados segundo as instruções específicas, e em qualquer caso mantidos em ambiente apropriadamente dessecado.

4.2 REAGENTES E SOLUÇÕES

Soluções de estoque foram preparadas individualmente, em área independente e exclusiva. Foram observados os Procedimentos Operacionais Padrão para a seleção,

preparo, conservação e uso dos padrões adotados no Laboratório Nacional Agropecuário – LANAGRO de Minas Gerais, do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento - MAPA.

Em síntese, massas em torno de 10 miligramas de cada padrão foram pesadas com precisão mínima de décimo de miligrama ($\pm 0,1$ mg) e e, para o caso dos padrões de antibióticos β -lactâmicos, dissolvidas quantitativamente com água ultrapura Milli-Q, gerada em purificador certificado (Elix Advantage 15, Millipore, Billerica, MA, EUA), ou, para os demais padrões de antibióticos, com metanol de grau cromatográfico (Merck, Darmstadt, Alemanha). Para o analito ceftiofur, exclusivamente, foi empregada solução (1:1) de água:acetonitrila (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) como diluente.

Os padrões devidamente dissolvidos foram avolumados primariamente a 100,00 ml utilizando-se balões volumétricos certificados (Deltex, Laborglas, SP, Brasil) segundo a norma ISO 1042, e, quando requerido, subsequentemente diluídos 50 vezes (1000 microlitros do padrão em 50,00 ml de solução) antes de serem empregados para dopagem de porções de 50,00 ml de leite qualificado aos níveis de 0,50; 0,75 e 1,00 do Limite Máximo (LMR) do respectivo analito, expressos no PNCR em $\mu\text{g/L}$. Realizadas as diluições, os recipientes contendo soluções primárias e secundárias dos padrões, identificados e datados, eram hermeticamente fechados e devidamente acondicionados.

A adição do padrão em volumes-alvo ao leite qualificado, decorria de correção estequiométrica para título efetivo do analito, e também, correção de pureza do padrão conforme dados constantes de cada respectivo certificado.

4.3 AMOSTRAGEM

O estudo foi conduzido com amostras de leite cru, obtidas de vacas leiteiras do Campo Experimental José Henrique Bruschi (CEJHB), da Embrapa Gado de Leite, na região de Coronel Pacheco, Estado de Minas Gerais, ao longo de três anos.

Os animais foram selecionados conforme registros de tratamento médico-veterinário pelo responsável técnico do CEJHB, observando a não utilização de tratamento com antibióticos nos 60 (sessenta) dias anteriores à coleta do leite.

A coleta, acondicionamento e transporte das amostras de leite foram executados conforme protocolos e Procedimentos Operacionais Padrão convencionado pelo Laboratório de Qualidade do Leite (LQL) da Embrapa Gado de Leite, em consonância com os parâmetros estabelecidos Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

(MAPA), ressaltando-se a isenção dos conservantes Bronopol® e Azidol® nas amostras coletadas.

As amostras tiveram sua codificação inequívoca registrada por sistema implementado no Laboratório de Qualidade do Leite (LQL), no momento do recebimento no setor de recepção de amostras, sendo avaliadas primariamente conforme as Instruções Normativas 51/2002 e 62/2011.

4.4 INSTRUMENTAÇÃO

As amostras de leite coletadas foram analisadas, preliminarmente, para Contagem Total Bacteriana (CTB) por citometria automatizada de fluxo (BactoCount IBC, Bentley Instruments, Chaska, MN); para Contagem de Células Somáticas (CCS) por citometria automatizada de fluxo (Somacount FCM, Bentley Instruments, Chaska, MN); para teores em peso de componentes principais (lactose, proteína, gordura e extrato seco), por espectroscopia de absorção no infravermelho por Transformada de Fourier – FTIR (Bentley FTS, Bentley Instruments, Chaska, MN); e acidez titulável, em conformidade com a Instrução Normativa do MAPA nº 68 (BRASIL, 2006), método B (prova decisória).

4.5 CRITÉRIOS DE DESEMPENHO

Os produtos comerciais (insumos e equipamentos de teste) testados nessa etapa foram fornecidos pelo fabricante segundo as necessidades previamente programadas para o estudo, seguido de treinamento oferecido por técnicos da empresa aos analistas envolvidos no projeto.

Foram avaliados os produtos baseados em reação com imunoreceptores com rápida resposta (em menos de 10 minutos – 5 a 8 minutos, mais especificamente), acompanhados dos respectivos incubadores e leitores automatizados (ROSA® Reader) - Charm® ROSA®. Foi também avaliado o teste baseado em inibição de crescimento de microrganismo indicador, e, portanto, de resposta mais lenta (em torno de 3 horas) - Charm® COWSIDE II®. Para ambos produtos, como parte do controle experimental, os lotes utilizados neste experimento foram identificados e registrados, de forma a tentar minimizar quaisquer possíveis interferências externas ao processo de avaliação de desempenho.

De forma descritiva, os lotes dos respectivos produtos utilizados, são apresentados a seguir:

- Charm® MRL BL Test®: lote 084
- Charm® MRL BL TET Test®: lote 019
- Charm® SULFA Test®: lote 013
- Charm® QUINOLONE Test®: lote 001
- Charm® CHLORAMPHENICOL Test®: lote 001
- Charm® CowSideII® Test: lote 027 A e lote 028 D

O Nível de Resposta Regulatória (NRR) constituiu etapa inicial e exploratória na avaliação de desempenho e validação de ensaios qualitativos de triagem. O exame de NRR objetivou descrever o perfil de resposta de cada produto comercial de teste a concentrações conhecidas e relevantes de cada analito adicionadas a leite cru. Protocolarmente, o ensaio contou com no mínimo cinco testes independentes para dada amostra de leite qualificado (controle negativo), bem como para cada amostra de leite adicionada de três níveis de concentrações conhecidas de cada antibiótico a ser testado (0,50, 0,75 e 1,00 do respectivo LMR).

Subsequente à etapa anterior, avaliou-se a capacidade de detecção ($CC\beta$) de cada ensaio. Foram testados todos os analitos individuais previstos no corrente PNCRB-Leite, salvo nos raros casos em que os resultados previamente obtidos de NRR indicaram que um dado produto não foi responsivo ao respectivo analito testado para quaisquer níveis empregados.

Consoante à Decisão (2002/657/CE), a determinação da capacidade de detecção ($CC\beta$) do ensaio foi conduzida mediante a fixação inicial de uma concentração alvo de triagem para cada analito equivalente ao valor de 50% do respectivo LMR, conforme previsto pelo PNCRB. O mínimo de vinte amostras de material fortificado ao nível requerido foi empregado para determinar o $CC\beta$ de cada analito, ao nível testado, devendo haver nenhuma (0%) ou no máximo uma ($1/20 = 5\%$) resposta negativa (ou falso-conforme). O aumento no número de amostras para 40 ocorre quando são observadas duas respostas negativas ou, no máximo, três respostas negativas em 60 avaliações. Dessa maneira, à medida que seja necessário recorrer ao aumento das avaliações para determinação do $CC\beta$, níveis mais altos da concentração equivalente de cada analito (eg., 0,75 ou 0,90 do LMR) também são necessários.

Estabelecida a capacidade de detecção de cada produto testado, a terceira etapa deste projeto teve-se ao exame da característica de especificidade/seletividade dos ensaios.

Para tanto, foi adotada como concentração teste do analito de referência o equivalente a 1,00 LMR, combinado a 10 vezes o LMR de um analito de referência de outra classe - salvo no caso do produto baseado em inibição de microrganismo, para o qual esse delineamento não se aplica. O critério de escolha adotado para o analito representante de cada classe foi baseado no analito associado à menor capacidade de detecção (maior $CC\beta$) pelo respectivo produto comercial ou, a maior frequência de seu uso em formulações no Brasil. Para o caso dos ensaios empregando os conservantes Azidiol® ou Bronopol® como potenciais interferentes, optou-se por dobrar sua concentração de ensaio, na medida em que esse fator de segurança é suficientemente amplo para o caso.

A quarta e última etapa deste projeto, objetivou determinar as características de robustez dos produtos avaliados. A robustez foi avaliada experimentalmente impondo-se algumas pequenas variações às condições de ensaio que possam interferir na obtenção de resultados satisfatórios. As variações foram impostas uma a uma, seguindo-se, também, procedimento estabelecido por Youden & Steiner, conforme protocolo descrito na Decisão 2002/657/CE e exposto abaixo.

Sejam *A, B, C, D, E, F, G* os valores padrão de sete fatores diferentes capazes de influenciar os resultados quando os seus valores forem alterados ligeiramente. Sejam os respectivos valores alterados dos fatores designados pelas mesmas letras *a, b, c, d, e, f, g*. Destaca-se que, as variáveis foram estabelecidas segundo resultados até então obtidos neste projeto, ensaios de robustez efetuados por outros laboratórios e, especialmente, condições prevalentes no Brasil. Foram os seguintes fatores relacionados de *A* a *G*:

A - Acidez Titulável da Amostra: A acidez titulável de referência foi estabelecida como 14 a 16°D e, para a acidez alterado, foi considerado o valor de 18°D, limite de acidez de leite segundo a legislação em vigor. Para alcançar a variação esperada, utilizou-se quantidade conhecida de ácido láctico;

B - Volume da Alíquota da Amostra: A sub-mensuração de alíquota de teste foi mais provável que a sobre-mensuração, por apresentar maior potencial para influenciar os resultados de teste, observando as recomendações do fabricante, bem como, rotina de ensaio. Foi, então, estabelecido sub-mensuração de 10% e 20% em volume segundo as recomendações experimentais de cada teste;

C - Tempo de Incubação do Teste: Seguindo o protocolo de ensaio do fabricante, foi estabelecida incubação com erro de 10% para menos, com arredondamento para o próximo minuto inteiro; ou para o teste que já utilizava de tempo de leitura inferior, foi estabelecido o arredondamento para a fração próxima de meio-minuto;

D - Temperatura de Armazenamento do Teste: A respectiva alteração foi assim considerada para temperatura aumentada e 4°C para 10°C, que é o valor máximo permitido para recebimento de amostras refrigeradas pelos laboratórios da RBQL.

E - Percentual de Gordura da Amostra: Nessa avaliação, o teor de gordura médio das amostras de leite (ca. de 4 %) foi aumentado para valores de aproximadamente 6%, em peso por volume (g.L⁻¹). As amostras destinadas à esta etapa eram coletadas na porção mais superficial dos tanques e não eram uniformizadas após a coleta, sendo, posteriormente, adicionadas do analito alvo para ensaio;

F - Temperatura Ambiente de Teste: A temperatura reduzida escolhida foi em torno de 19°C, que reflete o valor medido em nossos laboratórios de instrumentação avançada, rigorosamente refrigerados;

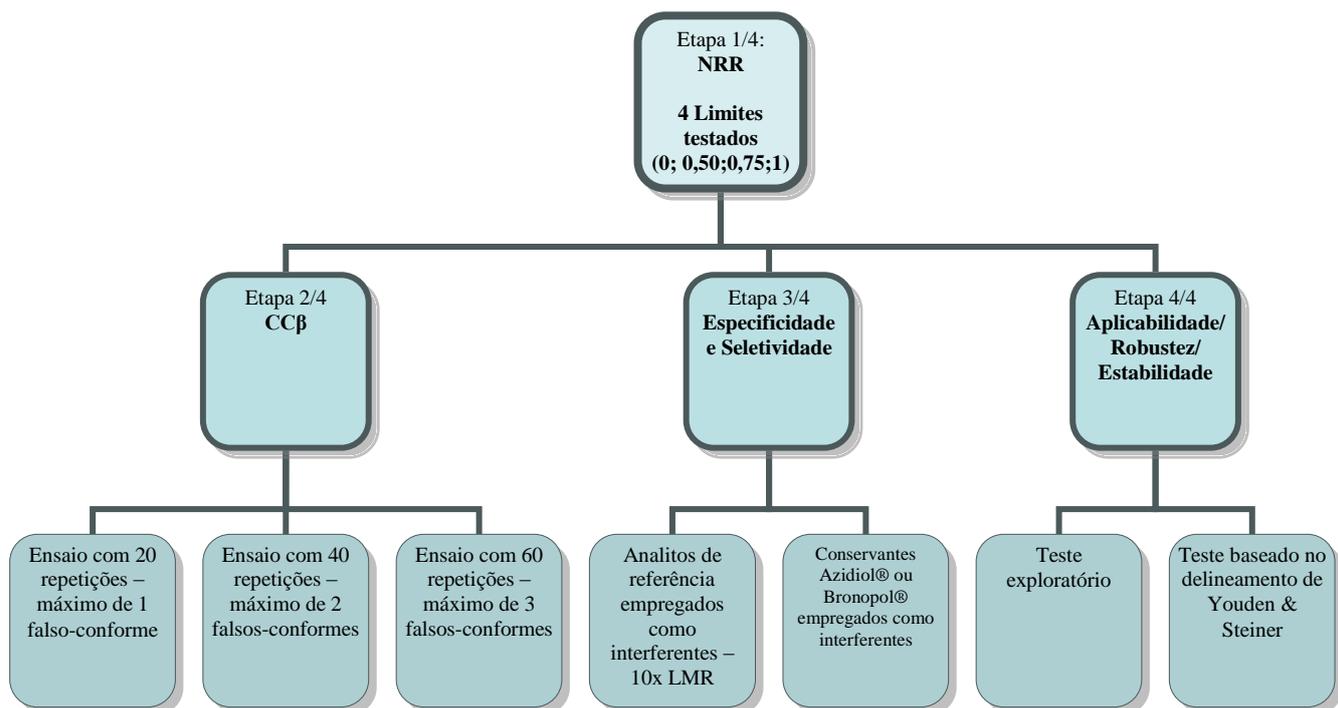
G – Analista: Nessa etapa, supôs-se que o suprimento de indivíduos minimamente treinados do que aqueles treinados em procedimentos laboratoriais, poderia influir na resposta dos testes.

A abordagem preconizada por Youden & Steiner (EC, 2002) é particularmente útil por reduzir substancialmente a carga de trabalho quando comparada a um experimento fatorial completo, ao mesmo tempo em que permite amplo exame da robustez de métodos analíticos mediante a análise de vários fatores concomitantemente. Por essa razão, os resultados obtidos segundo essa abordagem são considerados prevalentes sobre os resultados exploratórios.

Por motivos de viabilidade experimental, e conforme previsto nas diretrizes em vigor, foram escolhidos para este ensaio um analito representante de cada uma das cinco classes de analitos detectáveis pelos produtos avaliados, seguindo os mesmos critérios já reportados anteriormente.

Os procedimentos de teste descritos acima, podem ser melhor visualizados no delineamento demonstrado na Figura 3.

Figura 3: Procedimentos de teste estabelecidos conforme a Decisão 2002/657/CE.



5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 TESTES COM PRODUTOS DE RESPOSTA RÁPIDA BASEADA EM IMUNORECEPTORES (ROSA®)

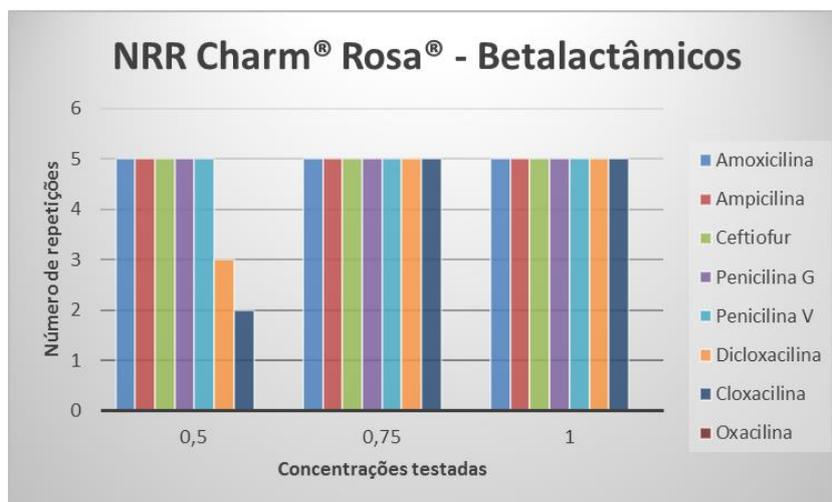
5.1.1 Nível de Resposta Regulatória (NRR)

Foram testados os produtos Charm® MRL BL Test®, Charm® MRL BL TET Test®, Charm® SULFA Test®, Charm® QUINOLONE Test®, Charm® CHLORAMPHENICOL Test®, observando os critérios, já citados, recomendados pela Decisão 2002/657/CE da União Europeia (EC, 2002).

Nesta primeira etapa (1/4), todos os produtos testados mostraram-se de uso consistentemente simples e operacionalmente convenientes para os fins propostos. Previamente aos ensaios, foram realizadas análises físico-químicas preconizadas pela Legislação vigente para qualificação do leite bovino cru (BRASIL, 2011).

Especificamente em relação aos antibióticos do grupo dos β -lactâmicos, o Charm® MRL BL Test® foi também capaz de detectar o analito penicilina V (Figura 4), ao nível de metade (0,50) do respectivo LMR., o qual não consta do escopo analítico declarado pelo fabricante. Nos dados fornecidos pelo fabricante, confirma-se a ausência do analito penicilina V em seu escopo declarado, conforme ilustrado na Figura 5.

Figura 4: Resultados obtidos para analitos β -lactâmicos constantes do PNCR para matriz leite, na avaliação de Nível de Resposta Regulatória (NRR).



Legenda: O eixo vertical contém o número de repetições executadas. O eixo horizontal contém as concentrações alvo em que testaram positivos aos analitos descritos. Os controles negativos- (dados não mostrados) foram realizados para cada analito descrito e, coletivamente, tais ensaios mostraram resultados negativos para leite branco qualificado.

Figura 5: Analitos β -lactâmicos e seus respectivos limites de referência, identificados como detectáveis pelo produto Charm® MRL BL Test®. Confirma-se a ausência do analito penicilina V em seu escopo declarado

Sensitivity in Milk

| Table 1. Sensitivity – Detection Ranges in Cow Milk at 0 to 7 °C | | |
|--|------------------------|-----------------------|
| Beta-lactam Drug | Detection Range (ppb*) | EU / CODEX MRL (ppb*) |
| Amoxicillin | 3-4 | 4 |
| Ampicillin | 3-4 | 4 |
| Cefacetile | 8-18 | 125 |
| Cefalexin | 30-60 | 100 |
| Cefalonium | 3-5 | 20 |
| Cefazolin | 12-20 | 50 |
| Cefoperazone | 5-9 | 50 |
| Cefquinome | 15-20 | 20 |
| Ceftiofur and Metabolite [^] | 10-20 | 100 |
| Cefuroxime | 3-5 | 50 |
| Cephapirin | 6-10 | 60 [§] |
| Cloxacillin | 25-35 | 30 |
| Dicloxacillin | 20-30 | 30 |
| Penicillin G | 2-3 | 4 |

* parts per billion

[^] Ceftiofur parent drug sensitivity is approximately 1/4 those reported in the table

[§] U.S. Tolerance is 20 ppb cephalosporin

Fonte: <https://www.charm.com/rosa-lateral-flow-antibiotic-strips/79-beta-lactams/175-rosa-mrlbl#documents>

Para a cloxacilina e também para dicloxacilina, analito β -lactâmico constante do escopo do produto Charm® MRL BL Test® bem como, do escopo do PNCR para matriz leite de 2012 (BRASIL, 2012) observou-se que os resultados tenderam a indicar detecções consistentes somente a partir de 0,75 do seu respectivo LMR. De fato, três das cinco observações a 0,50 LMR indicaram resultados negativos conforme confirmado também pelo leitor ROSA® *Reader*. Tal incerta observação foi analisada, todavia, via exame visual acurado por mais de um analista, onde constatou-se que ambos resultados positivos se mostraram, também, negativos, o que tende a reforçar maior confiabilidade de detecção do analito quando em concentração superior a 0,50 LMR.

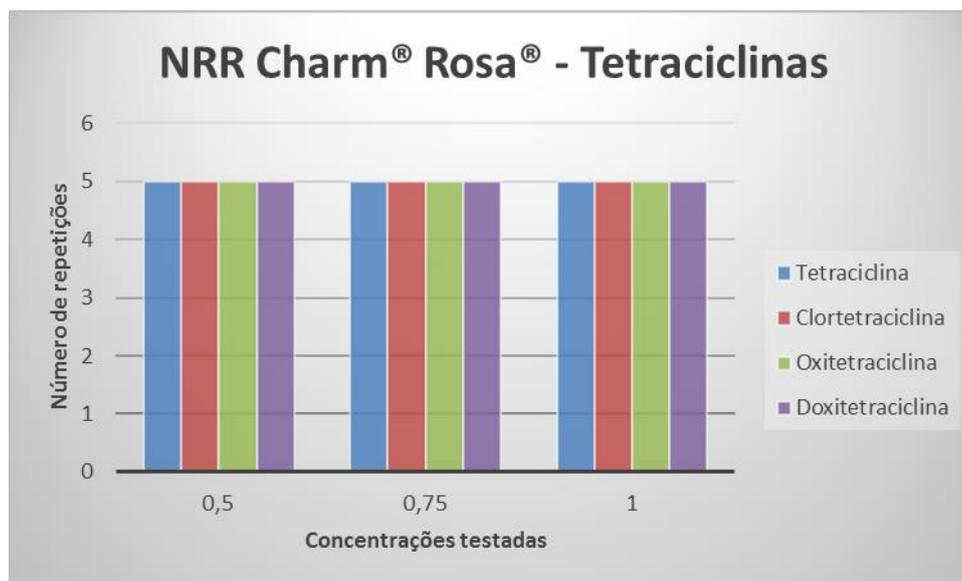
De fato, a oxacilina, outro antibiótico β -lactâmico constante no escopo corrente do PNCR, não foi detectada nos testes executados com o produto Charm® MRL BL Test® por não fazer parte do escopo analítico declarado do referido produto.

Em validação realizada por Win Reybroeck (2004), quando avaliou três imunoenaios quanto à presença de β -lactâmicos em leite bovino cru, embora o método utilizado não tenha sido baseado nos protocolos adotados neste estudo, cabe mencionar que os resultados observados por Reybroeck para os referidos analitos β -lactâmicos, corroboram a detecção do analito cloxacilina a 25 ppb, um pouco abaixo do seu respectivo LMR (30 ppb). Ratificando os resultados obtidos nesta etapa do projeto, Reybroeck também não avaliou o desempenho do produto quanto a detecção da oxacilina, bem como não foi pesquisada a penicilina V, por não fazerem parte do escopo analítico do fabricante.

Em síntese, o produto apresentou comportamento satisfatório quanto a seu NRR para todos os sete dentre os oito analitos β -lactâmicos constantes do PNCR.

Todos os quatro antibióticos tetraciclínicos (tetraciclina, oxitetraciclina, clortetraciclina, doxiciclina) constantes do escopo corrente do PNCR para matriz leite foram detectados já ao nível de 0,50 de seus respectivos LMR pelo produto Charm® MRL BL TET Test®, indicando desempenho satisfatório quanto ao NRR. Apesar de o produto testado apresentar apenas três desses quatro analitos tetraciclínicos em seu escopo analítico declarado pelo fabricante (tetraciclina, oxitetraciclina, clortetraciclina), os dados obtidos nessa etapa do estudo indicam que, também, o analito doxiciclina foi identificado ao mesmo nível testado dos demais analitos, conforme demonstrado na figura 6.

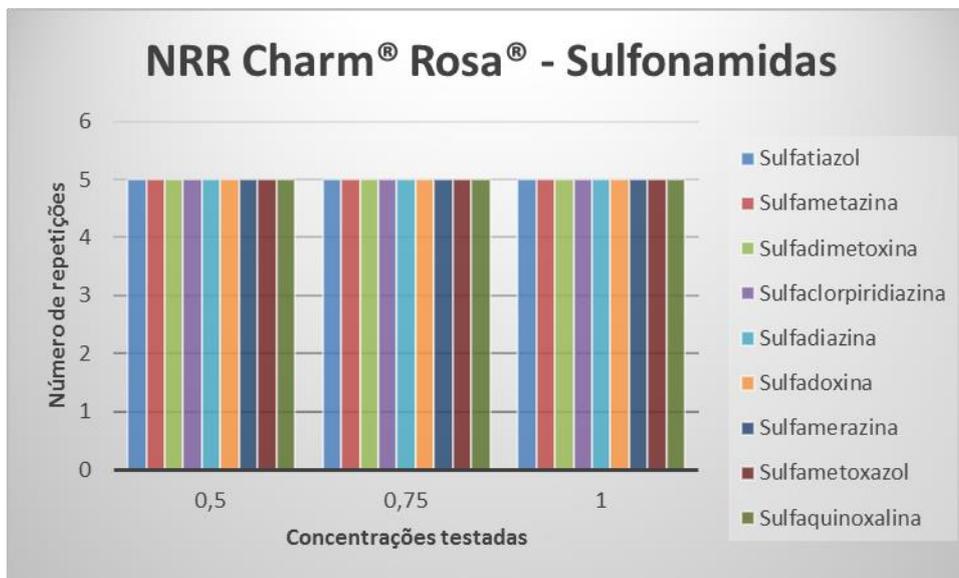
Figura 6: Resultados obtidos para analitos tetraciclínicos constantes do PNCR para matriz leite, na avaliação de Nível de Resposta Regulatória (NRR).



Legenda: O eixo vertical contém o número de repetições executadas. O eixo horizontal contém as concentrações alvo em que testaram positivos aos analitos descritos. Os controles negativos (dados não mostrados) foram realizados para cada analito descrito e, coletivamente, tais ensaios mostraram resultados negativos para leite branco qualificado.

O mesmo foi observado para o produto Charm® SULFA Test®, confirmando que o produto respondeu acertadamente a partir do equivalente a 0,50 LMR do limite máximo de resíduos de cada uma das nove sulfonamidas testadas (Figura 7).

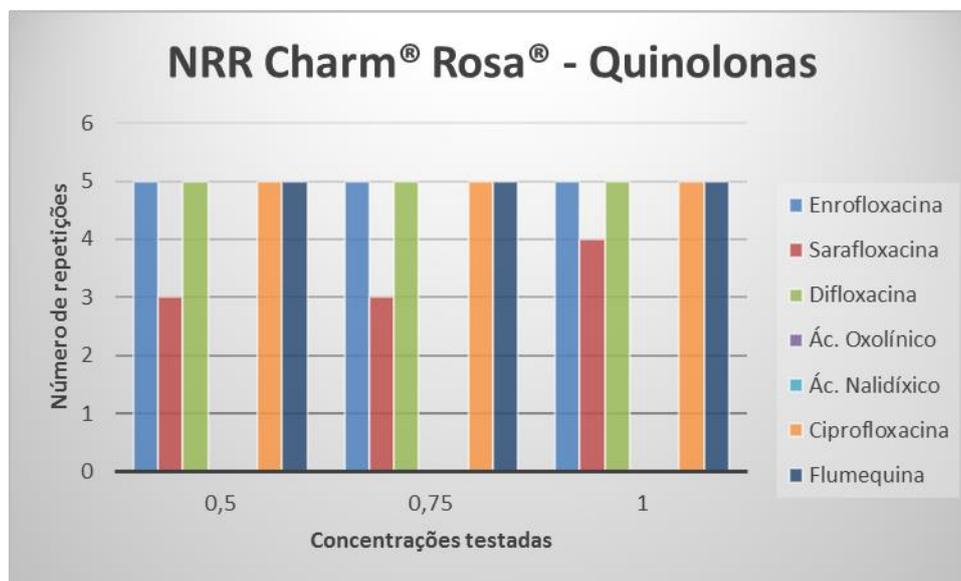
Figura 7: Resultados obtidos para analitos do grupo sulfonamidas constantes do PNCR para matriz leite, na avaliação de Nível de Resposta Regulatória (NRR).



Legenda: O eixo vertical contém o número de repetições executadas. O eixo horizontal contém as concentrações alvo em que testaram positivos aos analitos descritos. Os controles negativos (dados não mostrados) foram realizados para cada analito descrito e, coletivamente, tais ensaios mostraram resultados negativos para leite branco qualificado.

O produto Charm® QUINOLONE Test® também atendeu ao requerido ensaio NRR identificando relativos quatro antibióticos pertencentes ao grupo das quinolonas (enrofloxacina, difloxacilina, ciprofloxacina, flumequina) constantes no PNCR para matriz leite (Figura 8). Para todos os três analitos, resultados positivos ocorreram em 0,50 dos respectivos LMR. Analogamente, o analito sarafloxacina foi detectado com ao equivalente do seu respectivo LMR. Nos níveis anteriormente testados (0,50 LMR e 0,75 LMR), o produto apresentou instabilidade na reprodução dos resultados, sendo apenas 3 entre 5 repetições, positivas. Os ácidos oxolínico e nalidíxico não foram detectados em nenhuma das concentrações testadas.

Figura 8: Resultados obtidos para analitos do grupo quinolonas constantes do PNCR para matriz leite, na avaliação de Nível de Resposta Regulatória (NRR).



Legenda: O eixo vertical contém o número de repetições executadas. O eixo horizontal contém as concentrações alvo em que testaram positivos aos analitos descritos. Os controles negativos (dados não mostrados) foram realizados para cada analito descrito e, coletivamente, tais ensaios mostraram resultados negativos para leite branco qualificado.

Em atendimento ao desempenho de NRR requerido, o produto Charm® CHLORAMPHENICOL Test® foi capaz de detectar o analito cloranfenicol a 0,50 de seu LMR, imprescindível observação uma vez que o composto cloranfenicol tem seu limite (zero) rigorosamente controlado desde 1996, mediante decreto da Comunidade Europeia (COUNCIL DIRECTIVE, 1996). Entretanto, o produto não foi capaz de detectar o analito florfenicol, constante do PNCR, mas declaradamente ausente de seu escopo analítico.

5.1.2 Capacidade de Detecção ($CC\beta$)

Seguindo os critérios e argumentos desse estudo, para a determinação estimada da capacidade de detecção ($CC\beta$) e sua conformidade, foram testados todos os analitos individuais previstos no corrente PNCR-Leite de 2013, salvo raros casos em que os resultados previamente obtidos de NRR indicaram que um dado produto não foi responsivo a dado analito para quaisquer níveis testados.

Documentadamente, as diretrizes relevantes preconizam que a determinação da capacidade de detecção ($CC\beta$) de um ensaio seja conduzida mediante a fixação inicial de uma concentração alvo de triagem para cada analito equivalente ao valor de 50% do respectivo limite de referência (EC, 2002).

Tal recomendação visa oferecer ampla e razoável probabilidade de que o ensaio será capaz de detectar o analito em questão, e é particularmente útil em uma estratégia de controle e monitoramento baseada em ALARA, do inglês, *as low as reasonably achievable*, ou tão baixo quanto razoavelmente possível, preconizada pelo *Codex* e imediatamente inserida na agenda analítica de triagem.

A Comissão do *Codex Alimentarius* (1995), já previa embargos atinente a práticas e métodos que reduzissem a contaminação química nos alimentos:

“Os níveis de contaminantes nos alimentos e nos alimentos para animais devem ser tão baixos quanto razoavelmente possível através das melhores práticas, como Boas Práticas Agrícolas (GAP) e Boas Práticas de Fabricação (GMP), seguindo uma avaliação de risco apropriada.”

Entretanto, para alguns analitos em certos ensaios, os experimentos prévios de NRR desse estudo foram capazes de sugerir que um produto de teste não foi responsivo ao nível equivalente a 0,50 do LMR do respectivo analito, ao que se passa a testá-lo ao nível de 0,75 do LMR e, se ainda necessário, 0,90 do LMR do analito, com vistas a se procurar estabelecer a capacidade de detecção ($CC\beta$), conforme recomendado pela Decisão 2002/657/CE (EC, 2002). Ainda que tal ocorrência possa comprometer de certo modo um eventual exercício de ALARA na agenda de triagem, deve ficar claro que capacidades de detecção ($CC\beta$) iguais ou inferiores a 0,90 do LMR são consideradas adequadas para propósito de triagem segundo as diretrizes norteadoras desse estudo. Em contrapartida, deve ser observado que as diretrizes aplicáveis, em princípio, não preveem a execução de testes em concentrações superiores ao equivalente a 0,90 LMR de qualquer analito para tentativa de determinação do respectivo $CC\beta$ do ensaio, de forma que ofenderia os princípios estatísticos e argumentos analíticos já discutidos.

Nesta etapa (2/4), para 20 dentre os 28 analitos ensaiados, o $CC\beta$ dos produtos avaliados mostrou-se igual ou inferior ao equivalente a 0,50 do LMR; conforme tabela abaixo (Quadro 1).

Quadro 1 - Pesquisa da capacidade de detecção e o número de observações negativas obtidas sob teste em cada concentração relevante do analito, subsidiadas pelo NRR associado.

| Analito | Limite de Referência (µg/L) | NRR | Charm ROSA® | | | CCβ ≤ |
|---------------------|-----------------------------|-------------|-------------------|----|------|--------------|
| | | Charm ROSA® | Quant. de observ. | | | Charm ROSA® |
| | | | 20 | 40 | 60 | |
| Amoxicilina | 4 | 0,50 | 0 | - | - | 0,50 |
| Ampicilina | 4 | 0,50 | 0 | - | - | 0,50 |
| Ceftiofur | 100 | 0,50 | 0 | - | - | 0,50 |
| Cloxacilina | 30 | 0,75 | 0 | - | - | 0,75 |
| Dicloxacilina | 30 | 0,50 | 8 | 0 | - | 0,75 |
| Oxacilina | 30 | - | - | - | - | - |
| Penicilina G | 4 | 0,50 | 0 | - | - | 0,50 |
| Penicilina V | 4 | 0,50 | 0 | - | - | 0,50 |
| Clortetraciclina | Soma igual a 100 | 0,50 | 0 | - | - | 0,50 |
| Oxitetraciclina | | 0,50 | 0 | - | - | 0,50 |
| Tetraciclina | | 0,50 | 0 | - | - | 0,50 |
| Doxiciclina | | 0,50 | 0 | - | - | 0,50 |
| Sulfatiazol | Soma igual a 100 | 0,50 | 0 | - | - | 0,50 |
| Sulfametazina | | 0,50 | 0 | - | - | 0,50 |
| Sulfadimetoxina | | 0,50 | 1 | - | - | 0,50 |
| Sulfaclopiridiazina | | 0,50 | 0 | - | - | 0,50 |
| Sulfadiazina | | 0,50 | 0 | - | - | 0,50 |
| Sulfadoxina | | 0,50 | 1 | - | - | 0,50 |
| Sulfamerazina | | 0,50 | 0 | - | - | 0,50 |
| Sulfametoxazol | | 0,50 | 4 | 3 | 1 | 0,90 |
| Sulfaquinoxalina | 0,50 | 0 | - | - | 0,50 | |
| Enrofloxacina | Soma igual a 100 | 0,50 | 0 | - | - | 0,50 |
| Ciprofloxacina | | 0,50 | 0 | - | - | 0,50 |
| Sarafloxacina | 20 | 0,50 | 20 | 23 | 0 | 0,90 |
| Difloxacina | 100 | 0,50 | 4 | 0 | - | 0,75 |
| Ác. oxolínico | 20 | 0,90 | 20 | - | - | Insuficiente |
| Ác. nalidíxico | 20 | 0,50 | 20 | 29 | 33 | Insuficiente |
| Flumequina | 50 | 0,50 | 1 | - | - | 0,50 |
| Cloranfenicol | 0,30 | 0,50 | 0 | - | - | 0,50 |
| Florfenicol | 10 | - | - | - | - | - |

Para os analitos β-Lactâmicos, tetraciclínicos, pertencentes ao grupo das sulfonamidas, quinolonas e anfenicóis, o CCβ foi ao equivalente a 0,50 do respectivo LMR. Entretanto, para os demais analitos dicloxacilina e cloxacilina, bem como, para difloxacina o CCβ foi constatado como igual ou menor a 0,75 do respectivo LMR (mas maior que 0,50 LMR), confirmando dados obtidos na etapa anterior, onde para os analitos β-Lactâmicos citados a detecção à metade do LMR não apresentou confiabilidade, onde embora a difloxacina tenha sido detectada satisfatoriamente em todos os níveis testados, sua capacidade de detecção ficou estabelecida em $\frac{3}{4}$ do LMR estabelecido. Notadamente, o CCβ para dois analitos (sulfametoxazol e sarafloxacina) apresentou valores iguais ou menores ao equivalente a 0,90 do respectivo LMR (mas maiores que 0,75 LMR), onde segundo a diretriz na qual este projeto se baseou (EC,

2002), foram necessárias 60 observações de amostra fortificada do analito em questão, na concentração a ser avaliada.

Ainda que, quando testado o NRR para os ácidos nalidíxico e oxolínico, o produto Charm® QUINOLONE Test® não foi capaz de detectar os analitos em quaisquer níveis testados.

5.1.3 Especificidade/ Seletividade

Conforme a Decisão 2002/657/CE, especificidade pode ser interpretada como sendo a capacidade de um método analítico de distinguir a substância pesquisada de outras substâncias. Ademais, essa característica depende, essencialmente, da técnica de medição, podendo, todavia, variar de acordo com o tipo de composto ou de matriz (EC, 2002).

A Decisão 2002/657/CE, priorizando a proteção da saúde pública, não prevê a determinação de falsos não-conformes, e tampouco do respectivo limite de decisão ($CC\alpha$) para ensaios analíticos de triagem, sejam eles qualitativos ou quantitativos.

Nesse sentido, os ensaios para a característica de especificidade/seletividade foram executados primariamente os produtos que identificam classes de analitos antimicrobianos em meio a antimicrobianos de outras classes não detectadas pelo produto – aqui denominados analitos potencialmente interferentes, como detalhado mais adiante. Ou seja, os testes de especificidade/seletividade foram focados nesses produtos de resposta rápida (baseados em imunoreceptores) na medida em que eles são intrinsecamente específicos/seletivos para as diferentes classes de analitos antibióticos.

Foi considerada, também nesta etapa, a possível interferência nos ensaios devido aos conservantes comerciais Azidol® e Bronopol®, pois tais conservantes são utilizados rotineiramente pela vasta maioria dos Laboratórios de Qualidade do Leite pertencentes à Rede Brasileira de Laboratórios de Controle de Qualidade do Leite (RBQL), instituída pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) e local onde foram realizados este projeto.

Como complemento, os conservantes em questão, ainda que não façam parte intrínseca da matriz leite, foram investigados quanto ao seu impacto nos ensaios. Operacionalmente, pastilhas padronizadas contendo Azidol® ou Bronopol® são previamente adicionadas em frascos estéreis para coleta de amostras de leite cru,

destinados à quantificação de células bacterianas e somáticas, respectivamente (BRASIL, 2011).

Conforme previsto nas diretrizes em vigor, foi escolhido como analito de referência um analito representante de cada uma das cinco classes de antimicrobianos detectáveis pelos produtos avaliados. O critério de escolha adotado para o analito representante de cada classe foi baseado no analito associado à menor capacidade de detecção (maior $CC\beta$) pelo respectivo produto comercial e, como critério eventual de desempate, à maior frequência de seu uso em formulações no Brasil. Por sua vez, os analitos potencialmente interferentes utilizados foram os mesmos escolhidos como analitos de referência, porém em concentração aumentada.

Adotou-se como concentração de teste do analito de referência o equivalente ao respectivo Limite Máximo de Resíduo ou 1,00 LMR (representado o valor real em μ/L do respectivo analito utilizado no ensaio), combinado ao equivalente a 10 vezes o LMR do analito potencialmente interferente. Tais maximizações educadas de concentrações dos analitos ensaiados permitem um exame seguro de potenciais interferências e outros problemas. Para o caso dos ensaios empregando os conservantes Azidiol® ou Bronopol® como potenciais interferentes, optou-se por dobrar sua concentração de ensaio, na medida em que esse fator de segurança é suficientemente amplo para o caso.

Os resultados indicaram que todos os produtos testados apresentaram especificidade satisfatória para cada um dos analitos de referência empregados, também quando testados em presença de analitos potencialmente interferentes, constantes do escopo dos produtos e o do PNCR. Todos os produtos também apresentaram os desejáveis resultados negativos para amostras de leite branco qualificado, o que confirma e reforça os resultados obtidos ao longo das etapas anteriores desse projeto. Além disso, os testes não detectaram os interferentes a 10 vezes os seus respectivos LMR quando dopados isoladamente.

Os produtos Charm® ROSA® também foram capazes de detectar os analitos de referência em concentração equivalente ao seu respectivo LMR, mesmo em presença dos conservantes Azidiol® ou de Bronopol®, adicionados em leite branco qualificado em dupla concentração.

Mediante exame com leite branco adicionados dos conservantes em questão que, o Charm® CHLORAMPHENICOL Test® mostrou resultados positivos para leite qualificado adicionado de Azidiol® ou Bronopol®. Tal observação pode ser explicada analisando a formulação das pastilhas de Azidiol®, atentando-se ao fato de que consta o

analito cloranfenicol como um dos compostos utilizados, e, putativamente, também na formulação de Bronopol®, que embora tenha sua composição desconhecida, foi detectado pelo teste. Leite (2006) ratifica a composição do Azidiol®, reforçando que o comprimido contém azida sódica, cloranfenicol, etanol, citrato de sódio e azul de bromofenol, acrescentando que, a título de curiosidade, seu efeito bacteriostático se deve a ação da azida sódica na inibição do processo de respiração aeróbia.

De forma geral, os resultados indicam que - à exceção do Charm® CHLORAMPHENICOL Test®, que somente deve ser empregado em leite não adicionado de Azidiol® ou de Bronopol® - os Laboratórios de Qualidade do Leite pertencentes à Rede Brasileira de Laboratórios de Controle de Qualidade do Leite (RBQL), estabelecida pelo MAPA, poderiam utilizar conveniente e satisfatoriamente as mesmas amostras, hoje recebidas com adição dos conservantes Azidiol® ou Bronopol® (destinadas respectivamente à quantificação de células bacterianas, e células somáticas / componentes principais), também para a pesquisa de resíduos de antibióticos em leite, dentro do escopo de cada produto listado nesse item (produtos Charm® ROSA®).

5.1.4 Aplicabilidade/ Robustez/ Estabilidade

Experimentalmente, os resultados obtidos serão observados sob duas óticas parecidas, embora distintas. Como já mencionado na descrição da metodologia deste projeto, utilizou-se o delineamento, denominado fatorial fracionado balanceado, previsto na Decisão 2002/657/CE, e também, visando a maximização dos dados e informações gerados a partir deste estudo, tal abordagem preconizada por Youden & Steiner, claramente descrita pela Decisão (EC, 2002), foi precedida de ensaios exploratórios, onde a variação individual, uma-a-uma, de cada uma das pequenas variações foi avaliada.

5.1.4.1 Exame exploratório

O quadro 2 ilustra os valores das variáveis de referência e de seus respectivos valores alterados, atentando-se também para as recomendações do fabricante.

Quadro 2 – Variáveis padrão de teste (A /G) e seus respectivos valores alterados de teste (a/g).

| VARIÁVEIS | CHARM® ROSA® | |
|---|---|---|
| | Valores padrões (A /G) | Valores alterados (a/g) |
| Acidez titulável | 14°D a 16°D | 18°D |
| Volume da alíquota | 300µL | 270µL |
| Tempo de incubação das fitas teste no incubador | 8 minutos *Charm® Quinolone® test: 4 minutos | 7 minutos *Charm® Quinolone® test: 3,5 minutos |
| Temperatura de armazenamento das fitas teste | 4°C | 10°C |
| Percentual de gordura da amostra de leite cru | ± 4% | ± 6% |
| Temperatura ambiente de análise | 25°C | 19°C |
| Analista | Experiente | Minimamente treinado |

De fato, mesmo em condições nas quais foram empregadas variáveis com valores ligeiramente alterados, os produtos, na maior parte dos casos, indicaram devidamente os analitos de referência em concentração equivalente ao respectivo valor máximo (conservativo) de $CC\beta$. Todos os ensaios utilizando as variáveis em seus valores padrão mostraram-se positivos, conforme observado no quadro 2.

Quadro 3: Quantificação de resultados negativos nos ensaios com produtos ROSA® por total de repetições.

| ANALITO | VARIÁVEL ALTERADA | | | | | | | TAXA DE NEGATIVOS |
|--------------------------|-------------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------------|
| | a | b | c | d | e | f | g | |
| Cloxacilina | 0/4 | 0/3 | 0/4 | 0/4 | 1/4 | 0/4 | 0/4 | 1/27 |
| Tetraciclina | 0/4 | 0/3 | 0/4 | 0/4 | 0/4 | 0/4 | 0/4 | 0/27 |
| Sulfametoxazol | 0/4 | 0/3 | 0/4 | 0/4 | 2/4 | 0/4 | 0/4 | 2/27 |
| Sarafloxacina | 1/4 | 0/3 | 1/4 | 0/4 | 1/4 | 0/4 | 0/4 | 3/27 |
| Cloranfenicol | 0/4 | 1/3 | 0/4 | 0/4 | 0/4 | 0/4 | 0/4 | 1/27 |
| TAXA DE NEGATIVOS | 1/20 | 1/15 | 1/20 | 0/20 | 4/20 | 0/20 | 0/20 | 7/135 |

Legenda: A taxa de negativos pode ser acumulada horizontalmente (taxa de negativos por analito ou teste) e verticalmente (taxa de negativos por variável).

Para o produto Charm® MRL BL Test®, no qual a cloxacilina foi utilizada como analito de referência, uma das quatro repetições (1/4) com a modificação no teor de gordura elevado, gerou resultado negativo.

Para o sulfametoxazol, analito pertencente do produto Charm® SULFA Test® a variação que emprega modificações do teor padrão de gordura também gerou resultado negativo para duas das quatro observações.

Notadamente, o produto Charm® QUINOLONE Test®, usando a sarafloxacina como analito de referência, também indicou um resultado negativo em quatro repetições para avaliação que altera o percentual de gordura da amostra, além de, apresentar um resultado negativo em quatro repetições para a modificação da acidez titulável da amostra, aumentada para 18°D e um negativo em quatro repetições para a variável tempo de incubação.

O produto Charm® CHLORAMPHENICOL Test®, indicou resultados negativos em três repetições para a variável volume da alíquota da amostra, diminuída em 10% do seu valor padrão estabelecido neste estudo.

Mesmo que decorrentes de experimentação apenas exploratória, os resultados acima analisados, coletivamente, sugerem que a variável teor de gordura deve merecer controles em valor ao redor de 4%, sugerindo-se limite precaucionário de 5%, para que se evitem resultados falsos-conformes. De fato, a referida variável alterada parece ser capaz de interferir em três dos cinco testes avaliados, interferências observadas também durante a análise, onde muitas vezes, a repetição do ensaio era necessária devido a dificuldade no carregamento da alíquota adicionada à fita de ensaio, resultando na não coloração da banda referente à detecção dos analitos do grupo ou formação irregular da cor.

Andrew (2000), observou o efeito do teor de proteína e gordura de vacas individuais (Jersey e Holstein) para avaliação da especificidade de produtos comerciais para triagem de antimicrobianos em leite cru, ficou comprovado que a seleção do leite que contém altas concentrações de proteína e também de gordura pode aumentar a taxa de resultados falsos-conformes para testes específicos de triagem na detecção desses resíduos, corroborando com os dados obtidos neste estudo.

Há indícios, contemplando os resultados obtidos nesta etapa, de que a acidez titulável aumentada (ainda que dentro do limite máximo previsto pela legislação vigente no Brasil) (BRASIL, 2011) e o volume de alíquota da amostra usado no teste, conforme

recomendações do fabricante, apresentam algum potencial para afetar a robustez do teste, gerando resultados falsos-conformes.

5.1.4.2 Exame segundo Youden & Steiner

Os fatores e seus respectivos valores apresentados anteriormente, avaliados independentemente, nesta etapa foram avaliados segundo delineamento apresentado por Youden & Steiner, conforme o Quadro 3 e discutido abaixo (EC, 2002).

Quadro 4: Combinações de tratamento segundo Youden & Steiner.

| Fatores | Combinação de Tratamento | | | | | | | |
|---------------------|--------------------------|---|---|---|---|---|---|---|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 |
| 1° Fator | A | A | A | A | a | a | a | a |
| 2° Fator | B | B | b | B | B | B | b | b |
| 3° Fator | C | c | C | c | C | c | C | c |
| 4° Fator | D | D | d | d | d | d | D | D |
| 5° Fator | E | e | E | e | e | E | e | E |
| 6° Fator | F | f | f | F | F | f | f | F |
| 7° Fator | G | g | g | G | g | G | G | g |
| Resultado Observado | S | T | U | V | W | X | Y | Z |

Fonte: Adaptado de (EC, 2002)

O produto Charm® MRL BL Test® manteve seu desempenho em todas as condições testadas. Resultados análogos foram obtidos para os produtos Charm® QUINOLONE Test® e Charm® CHLORAMPHENICOL Test®, utilizando os analitos de referência sarafloxacina e cloranfenicol, respectivamente. Esses resultados indicam que esses três produtos foram robustos à pequena modificação de condições de ensaio, conforme previsto pelo delineamento.

A avaliação de robustez para o produto Charm® MRL BL TET Test® mostrou inconsistência apenas para uma combinação do tratamento em questão. O produto gerou resposta negativa para o tratamento de número 5, conforme preconizado no quadro 2. Tal tratamento combinou acidez titulável elevada (18°D), abuso de temperatura de conservação do teste, gordura elevada (ca. 6%) em peso por volume (g.L⁻¹) e emprego de analista minimamente treinado. Com exceção deste último e do segundo fator de desvio, as alterações de acidez e gordura, individualmente, também tenderam a influenciar o resultado dos testes quando da abordagem exploratória. Resultado equivalente foi observado quando utilizado o produto Charm® SULFA Test®,

Cumpra reiterar que, para uso adequado dos testes baseados em imunoreceptores, faz-se necessário observar a devida uniformização do leite antes da amostragem, sob o risco de se aumentar o teor de gordura da amostra, causando respostas não confiáveis. A acidez titulável do leite também deve ser observada, além do aperfeiçoamento constante do treinamento dos analistas.

5.2 TESTES COM PRODUTOS DE RESPOSTA RESPOSTA LENTA BASEADA EM INIBIÇÃO DE MICRORGANISMO INDICADOR (COW SIDE II®)

5.2.1 Nível de Resposta Regulatória (NRR)

Foi testado o produto Charm® CowSide II observando os critérios recomendados pela Decisão 2002/657/CE da União Europeia (EC, 2002).

Mediante ensaio que avaliou a resposta regulatória do produto, a detecção dos analitos alvo testados foram iguais ou inferiores a 0,50, 0,75 ou 0,90 dos LMR. A descrição dos analitos constantes do escopo do fabricante, bem como seus limites de referência, estão demonstrados na figura a seguir (Figura 9)

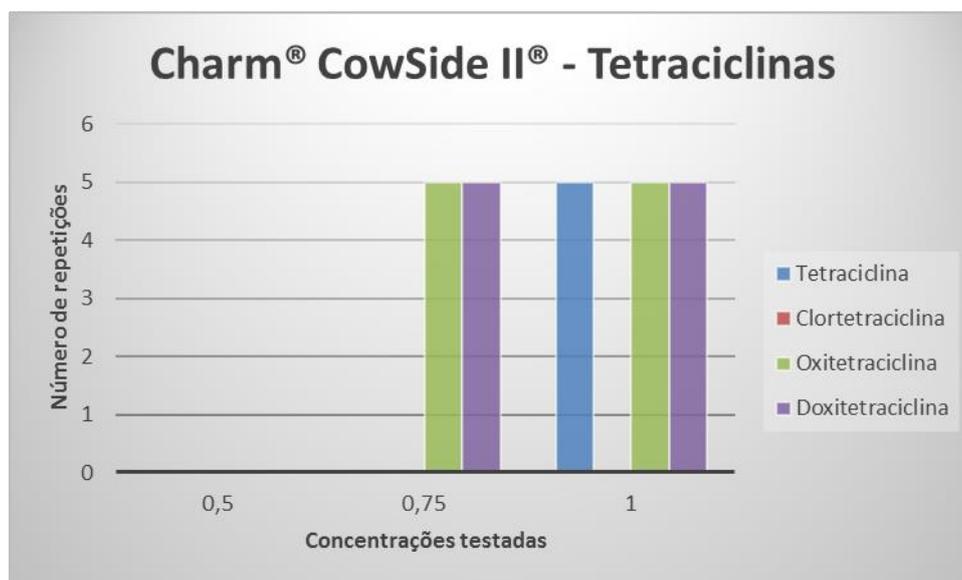
Figura 9: Analitos detectáveis pelo produto Charm® CowSide II® e seus respectivos limites de referência.

| Antibiotic | Cowside Sensitivity (ppb) | US Safe Level (ppb) | EU/ CODEX MRL (ppb) | Antibiotic | Cowside Sensitivity (ppb) | US Safe Level (ppb) | EU/ CODEX MRL (ppb) |
|---------------------------|---------------------------|---------------------|---------------------|--------------------------------|---------------------------|---------------------|---------------------|
| Amoxicillin | 3-4 | 10 | 4/ 4 | Erythromycin | 75-100 | 50 | 40 |
| Ampicillin | 3-4 | 10 | 4 | Gentamicin | 75-150 | 30 | 100/ 200 |
| Cefacetile | 10-15 | None | 125 | Nafcillin | 5-10 | None | 30 |
| Cefalexin | 75-100 | None | 100 | Neomycin | 100-150 | 150 | 1500/ 1500 |
| Cefalonium | 15-20 | None | 20 | Oxacillin | 5-10 | None | 30 |
| Cefazolin | 6-10 | None | 50 | Oxytetracycline | 75-100 | 300 | 100/ 100 |
| Cefoperazone | 20-30 | None | 50 | Penicillin G | 2-3 | 5 | 4/ 4 |
| Cefquinome | 40-60 | None | 20 | Pirlimycin | 25-50 | 400 | 100/ 100 |
| Ceftiofur and Metabolites | 50-100 | 100 | 100/ 100 | Spiramycin | 300-400 | None | 200/ 200 |
| Cefuroxime | 20-25 | None | None | Sulfadiazine | 40-60 | 10 | 100 |
| Cephapirin | 8-10 | 20 | 60 | Sulfadimethoxine | 25-50 | 10 | 100 |
| Chlortetracycline | 200-300 | 300 | 100/100 | Sulfamethazine (Sulfadimidine) | 75-125 | 10 | 100/ 25 |
| Cloxacillin | 10-25 | 10 | 30 | Tetracycline | 50-100 | 300 | 100/ 100 |
| Dapsone | 1-2 | None | 0 | Tilmicosin | 25-35 | None | 50 |
| Dicloxacillin | 5-10 | None | 30 | Trimethoprim | 200-300 | None | 50 |
| Doxycycline | 25-75 | None | 0 | Tylosin | 20-30 | 50 | 50/ 100 |

Fonte: <https://www.charm.com/products/antibiotics/cowside-ii#sensitivity>

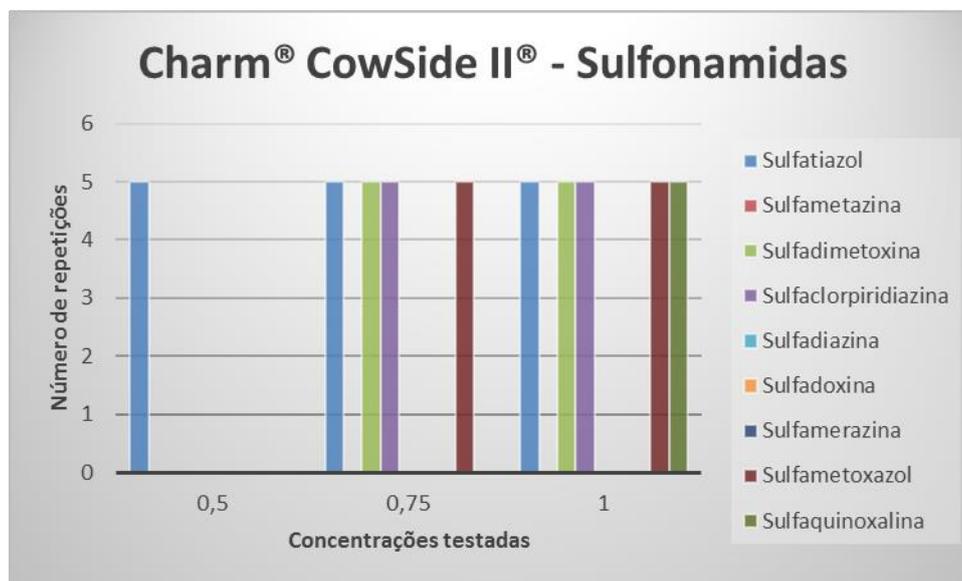
O produto não foi capaz de detectar os analitos sulfametazina e a clortetraciclina em nenhum dos níveis testados no NRR, e, portanto, não se procedeu à pesquisa de CC β para estes dois analitos, na etapa subsequente, conforme observado nas Figuras 10 e 11, respectivamente. Em se tratando do analito sulfametazina, cumpre notar que o produto apresentou todos os resultados negativos para NRR nas concentrações testadas entre 0 a 1,00 de seu respectivo LMR. Reportadamente, em informações fornecidas pelo fabricante, o produto seria capaz de detectar concentrações entre 0,75 e 1,25 do LMR deste analito, faixa cujo limite superior pode justificar os resultados encontrados. A ausência de responsividade do produto para qualquer nível de NRR testado, também foi constada para a clortetraciclina. De fato, o fabricante reporta concentração detectável de 200-300 microgramas/litro de leite desse analito pelo produto, faixa superior ao respectivo LMR preconizado pelo PNCR (100 microgramas/litro).

Figura 10: Resultados obtidos para analitos do grupo tetraciclina constantes do PNCR para matriz leite, na avaliação de Nível de Resposta Regulatória (NRR).



Legenda: O eixo vertical contém o número de repetições executadas. O eixo horizontal contém as concentrações alvo em que testaram positivos aos analitos descritos. Os controles negativos (dados não mostrados) foram realizados para cada analito descrito e, coletivamente, tais ensaios mostraram resultados negativos para leite branco qualificado.

Figura 11: Resultados obtidos para analitos do grupo sulfonamidas constantes do PNCR para matriz leite, na avaliação de Nível de Resposta Regulatória (NRR).



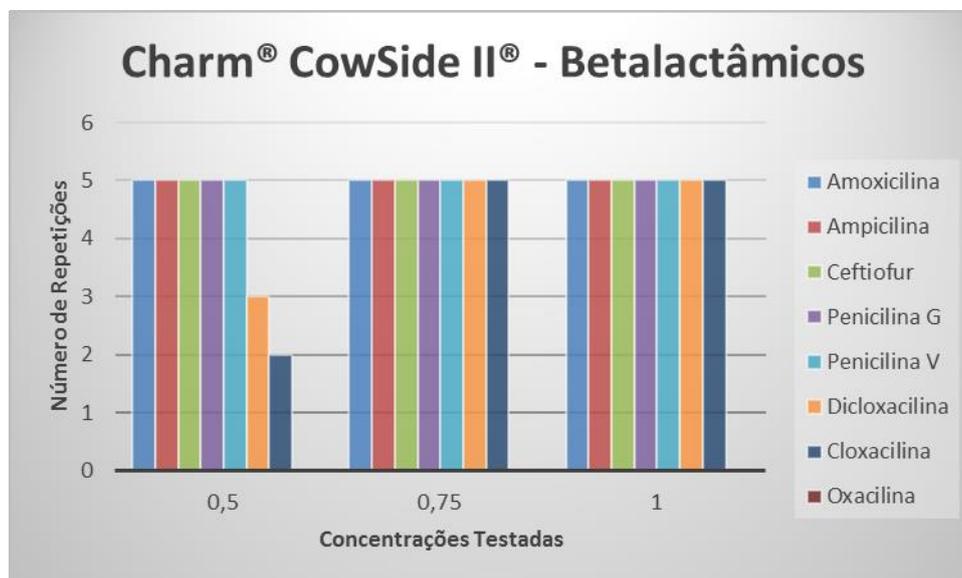
Legenda: O eixo vertical contém o número de repetições executadas. O eixo horizontal contém as concentrações alvo em que testaram positivos aos analitos descritos. Os controles negativos (dados não mostrados) foram realizados para cada analito descrito e, coletivamente, tais ensaios mostraram resultados negativos para leite branco qualificado.

Entretanto, observa-se que o Charm® CowSide II® detectou nos ensaios de NRR o analito sulfaclopiridiazina, conforme demonstrado nos dados apresentados na figura acima, previsto no PNCR e não pertecente ao escopo analítico declarado pelo fabricante. As evidências fornecidas sugerem que o analito pode ser detectado a partir de concentrações equivalentes a 0,75 de seu LMR, ou seja, igual ou inferior ao equivalente a 0,75 LMR, mas maior que 0,50 LMR.

Confirmou-se que todos os analitos dos grupos das quinolonas e dos anfenicóis, não figurados do escopo do produto declarado pelo fabricante, de fato não foram detectados em quaisquer concentrações de NRR testadas, bem como os analitos sulfadiazina, sulfadoxina e sulfamerazina.

O grupo dos β -lactâmicos foi detectado satisfatoriamente em todos os níveis testados. Como notado em ensaio com o produto Charm® ROSA®, no tocante a detecção de analitos deste mesmo grupo, a cloxacilina e a dicloxacilina foram detectáveis pelo produto Charm® CowSide II®, ao equivalente da metade dos seus respectivos LMR, apresentando, contudo, não responsividade para 3 e 2 repetições, respectivamente (Figura 12).

Figura 12: Resultados obtidos para analitos β -lactâmicos constantes do PNCR para matriz leite, na avaliação de Nível de Resposta Regulatória (NRR).



Legenda: O eixo vertical contém o número de repetições executadas. O eixo horizontal contém as concentrações alvo em que testaram positivos aos analitos descritos. Os controles negativos- (dados não mostrados) foram realizados para cada analito descrito e, coletivamente, tais ensaios mostraram resultados negativos para leite branco qualificado.

Coletivamente, o produto em questão forneceu evidências de ser capaz de detectar os referidos analitos, salvo aqueles já citados acima e os não pertencentes ao escopo declarado do produto, a partir de concentrações equivalentes a 0,50 de seu LMR, na maioria dos casos.

5.2.2 Capacidade de Detecção (CC β)

Dentro dos conceitos prevalentes para ensaios de triagem e com base nos experimentos prévios de NRR, o produto Charm® CowSide II® foi capaz de detectar satisfatoriamente, nesta segunda etapa, os analitos constantes de seu escopo e de interesse do PNCR, salvo algumas exceções, apresentando capacidades de detecção (CC β) iguais ou inferiores a 0,50 para 8 dos analitos testados; 0,75 para 7 dos analitos testados, ou 0,90 para apenas 2 dos analitos testados, conforme seus respectivos LMR. Os dados são mostrados no quadro abaixo (Quadro 4).

Quadro 5 - Pesquisa da capacidade de detecção e o número de observações obtidas sob teste em cada concentração relevante do analito, subsidiadas pelo NRR associado.

| Analito | Limite de Referência (µg/L) | NRR | Charm CowSide II® | | | CCβ ≤ |
|----------------------|-----------------------------|-------------------|-------------------|----|----|-------------------|
| | | Charm CowSide II® | Quant. de observ. | | | Charm CowSide II® |
| | | | 20 | 40 | 60 | |
| Amoxicilina | 4 | 0,50 | 0 | - | - | 0,50 |
| Ampicilina | 4 | 0,75 | 0 | - | - | 0,75 |
| Ceftiofur | 100 | 0,50 | 0 | - | - | 0,50 |
| Cloxacilina | 30 | 0,50 | 0 | - | - | 0,50 |
| Dicloxacilina | 30 | 0,50 | 0 | - | - | 0,50 |
| Oxacilina | 30 | 0,50 | 0 | - | - | 0,50 |
| Penicilina G | 4 | 0,50 | 0 | - | - | 0,50 |
| Penicilina V | 4 | 0,75 | 0 | - | - | 0,75 |
| Clortetraciclina | Soma igual a 100 | - | - | - | - | - |
| Oxitetraciclina | | 0,75 | 0 | - | - | 0,75 |
| Tetraciclina | | 0,90 | 0 | - | - | 0,90 |
| Doxiciclina | | 0,75 | 0 | - | - | 0,75 |
| Sulfatiazol | Soma igual a 100 | 0,50 | 0 | - | - | 0,50 |
| Sulfametazina | | - | - | - | - | - |
| Sulfadimetoxina | | 0,75 | 0 | - | - | 0,75 |
| Sulfaclorpiridiazina | | 0,75 | 0 | - | - | 0,75 |
| Sulfadiazina | | - | - | - | - | - |
| Sulfadoxina | | - | - | - | - | - |
| Sulfamerazina | | - | - | - | - | - |
| Sulfametoxazol | | 0,75 | 0 | - | - | 0,75 |
| Sulfaquinoxalina | | 0,90 | 0 | - | - | 0,90 |
| Enrofloxacina | | Soma igual a 100 | - | - | - | - |
| Ciprofloxacina | - | | - | - | - | - |
| Sarafloxacina | 20 | - | - | - | - | - |
| Difloxacina | 100 | - | - | - | - | - |
| Ác. oxolínico | 20 | - | - | - | - | - |
| Ác. nalidíxico | 20 | 0,50 | 0 | | | 0,50 |
| Flumequina | 50 | - | - | - | - | - |
| Cloranfenicol | 0,30 | - | - | - | - | - |
| Florfenicol | 10 | - | - | - | - | - |

Excetuando-se os resultados para os dois analitos, sulfametazina e clortetraciclina, e obviamente para aqueles que não pertencem ao escopo analítico do produto (grupos das quinolonas e dos anfenicóis, e algumas sulfonamidas), os dados obtidos de CCβ indicam que o produto Charm® CowSide II® foi capaz de detectar 17, dentre os 30 passíveis de controle oficial do MAPA em leite, analitos constantes de seu escopo comuns ao PNCRC-Leite, inclusive àquele que não constava no escopo analítico informado pelo fabricante, a sulfaclorpiridiazina.

5.2.3 Especificidade/ Seletividade

Por motivos de viabilidade experimental, e conforme previsto anteriormente, foi escolhido como analito de referência um analito representante de cada uma das cinco classes de antimicrobianos detectáveis pelos produtos avaliados - salvo no caso do produto baseado em inibição de microrganismo indicador Charm® CowSide II® Test, para o qual esse delineamento não se aplica, por se tratar de um produto elaborado sem mecanismos biológicos para distinção dos grupos de antimicrobianos testados.

Nesse ínterim, o produto apresentou desejáveis resultados negativos para amostras de leite branco qualificado, o que confirma os resultados negativos para leite branco qualificado consistentemente obtidos ao longo desse projeto.

Entretanto, os dados obtidos indicaram que o produto Charm® Cow Side II® sofre a mesma influência observada pelo produto Charm® ROSA®, tanto do conservante Azidiol® como do Bronopol® adicionados ao leite. Ensaio controles foram realizados utilizando leite branco qualificado adicionado de um ou de outro conservante em dupla concentração, sugerindo resultados falsos não conformes (“falsos-positivos”) para a inferência buscada. Observou-se também que quando o teste foi executado usando sarafloxacina ou cloranfenicol - analitos que não são, de fato, detectados pelo produto - houve a indicação de resultados positivos. Confirma-se, então, que na composição dos conservantes Azidiol® e Bronopol® há outros componentes além do cloranfenicol, como já reiterado em tópicos anteriores, que afetam e desenvolvem o microbiano, explicando os resultados observados.

5.2.4 Aplicabilidade/ Robustez/ Estabilidade

5.2.4.1 Exame exploratório

Os resultados para os testes exploratórios iniciais indicaram que na maioria dos casos esse produto se mostrou robusto às variações introduzidas (Quadro 5). De fato, mesmo em condições de variáveis com valores ligeiramente alterados, o produto, na maior parte dos casos (>75%), indicou devidamente os analitos de referência em concentração equivalente ao respectivo valor máximo (conservativo) de $CC\beta$. Todos os ensaios utilizando as variáveis em seus valores padrão mostraram-se positivos.

Quadro 6 – Quantidades de resultados negativos no ensaio Charm® Cow Side II® pelo total de repetições.

| ANALITO | VARIÁVEL ALTERADA | | | | | | | TAXA DE NEGATIVOS |
|--------------------------|-------------------|------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------------|
| | a | b | c | d | e | f | g | |
| Cloxacilina | 4/4 | 0/3 | 4/4 | 0/4 | 4/4 | 0/4 | 0/4 | 12/27 |
| Tetraciclina | 4/4 | 0/3 | 0/4 | 0/4 | 0/4 | 0/4 | 0/4 | 4/27 |
| Sulfametoxazol | 4/4 | 0/3 | 0/4 | 0/4 | 0/4 | 0/4 | 0/4 | 4/27 |
| TAXA DE NEGATIVOS | 12/12 | 0/9 | 4/12 | 0/12 | 4/12 | 0/12 | 0/12 | 20/81 |

A principal alteração observada nesta etapa de verificação da robustez do produto, apresentando maior interferência no ensaio, foi a acidez titulável aumentada (18°D), ainda que dentro do limite máximo previsto pela legislação vigente no Brasil (BRASIL, 2011). Tal alteração afetou severamente a detecção dos analitos de referência do grupo beta-lactâmicos, tetraciclinas e sulfonamidas, gerando resultados negativos, ou falsos conformes.

Analogamente aos resultados indicados pelo teste para o Charm® ROSA®, o teor de gordura da amostra requer atenção, quando tratado de forma isolada. De fato, com base nos ensaios usando a cloxacilina, o teor de gordura elevado a 6% em peso por volume (variável e), bem como o tempo de incubação do teste diminuído em ca. de 10% (variável c) influenciaram o teste em todas as quatro repetições executadas.

5.2.4.2 Exame segundo Youden & Steiner

De forma objetiva, nesta etapa, quando utilizado o exame segundo recomendações de Youden & Steiner (EC, 2002) ao analito cloxacilina, o produto acusou a presença do analito sob todas as condições testadas.

Entretanto, quando aplicado aos analitos tetraciclina ou sulfametoxazol, respectivamente analitos de referência para o grupo dos tetraciclínicos e das sulfonamidas, a capacidade de resposta do produto foi afetada tanto pela combinação de tratamento cinco como a combinação sete, conforme apresentado no quadro abaixo

(Quadro 7). Cabe mencionar que, para ambas combinações de tratamentos, são comuns as variáveis gordura e acidez aumentadas.

Quadro 7 - Resultados para robustez do produto Charm® CowSideII®.

| Combinações de Tratamentos | | | | | | | |
|----------------------------|---|---|---|---|---|---|---|
| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 |
| A | A | A | A | a | a | a | a |
| B | B | b | B | B | B | b | b |
| C | c | C | c | C | c | C | c |
| D | D | d | d | d | d | D | D |
| E | e | E | e | e | E | e | E |
| F | f | f | F | F | f | f | F |
| G | g | g | G | g | G | G | g |
| P | P | P | P | N | P | N | P |

Interessante notar que as combinações de tratamento identificadas como seis e oito, apesar de incluírem acidez elevada, geraram resultados positivos satisfatórios. Observa-se ainda que as únicas outras variáveis comuns a essas duas combinações de tratamentos são o tempo reduzido para leitura, o qual aparenta não comprometer os resultados dos testes, segundo a combinação de tratamento empregada, e o teor de gordura, este em valor padrão.

Tais resultados observados parecem indicar que o teor de gordura e acidez quando elevados, são fatores de complicações no tocante à detecção dos analitos representantes dos grupos das tetraciclina e sulfonamidas, mas não do grupo β -lactâmico, para o qual o teste foi robusto em todas as condições testadas preconizadas pelo delineamento de Youden & Steiner.

6 CONCLUSÃO

Dentre os produtos testados, os testes rápidos – baseados em reação com inumoreceptores- apresentam, de fato, maior especificidade, sendo capazes de atender a uma demanda maior de ensaios, com mais estabilidade quanto a detecção dos analitos.

Deve-se observar, para ambos produtos, a uniformização adequada de amostras de leite bovino cru utilizadas no ensaio, bem como a acidez titulável da amostra, conforme recomendações do fabricante e requisitos preconizados pela legislação vigente, de forma a garantir adequado e satisfatório desempenho do teste.

Apesar de os produtos testados apresentarem características fáceis de manuseio, é imprescindível o aperfeiçoamento constante do treinamento dos envolvidos na análise, principalmente, quanto à interpretação dos resultados.

Atinente às limitações analíticas de cada produto, seus resultados podem e devem ser empregados para orientar, complementar e direcionar políticas públicas e privadas de segurança química do leite no Brasil, como é feito em diversos países.

6.1 CONSIDERAÇÕES FINAIS

No ensejo de contribuir para preservar a legitimidade deste projeto, bem como a qualidade de seus argumentos técnicos, científicos e estratégicos, listam-se a seguir as seguintes observações e recomendações:

1. Os estudos executados neste projeto e aqui descritos dizem respeito apenas ao produto comercial aqui identificado, não devendo, em hipótese alguma, ser estendido a nenhum outro produto, salvo evidências documentadas obtidas nos devidos estudos complementares;
2. Eventuais contingências no processo de produção que possam impactar o desempenho dos produtos comercializados no país deverão ser prontamente documentadas pela empresa fabricante, ao MAPA e demais autoridades, para o devido tratamento da situação;
3. Recomenda-se fortemente que o MAPA verifique, ou solicite verificação à parte apropriada, aleatoriamente e sem conhecimento do fabricante, de que os referidos produtos de triagem eventualmente comercializados no país, e reconhecidos como possível parte complementar da agenda nacional de controle de resíduos de antibióticos em leite cru, mostram de fato desempenho

consistente e equivalente aos lotes de produtos examinados nesse trabalho. Tal verificação periódica deve ser focada na Capacidade de Detecção ($CC\beta$) dos produtos para um ou mais representantes da(s) classe(s) relevante(s) de analitos, mas outras características de desempenho (especialmente seletividade e robustez) previstas pelas normas vigentes poderão ser também avaliadas;

4. Tal iniciativa poderia contribuir substancialmente para fortalecimento da crucial agenda de avaliação, gerenciamento e comunicação de risco em alimentos ora conduzida pelo MAPA, permitindo também levantar as efetivas correlações estatísticas entre os resultados dos ensaios de triagem e os ensaios confirmatórios já em curso regular, referenciados no tempo e no espaço. Pode também verificar e validar o uso adequado dos ensaios de triagem por quaisquer partes, principalmente quando seus resultados são comparados aos achados nos ensaios confirmatórios.

REFERÊNCIAS

AARESTRUP, F. M. Veterinary drug usage and antimicrobial resistance in bacteria of animal origin. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**, n. 96 p.271– 281, 2005.

ABNT (Associação Brasileira de Normas Técnicas) ISO (International Standard Organization). ABNT NBR ISO/IEC 17025. Requisitos gerais para a competência de laboratório de ensaio e calibração. Rio de Janeiro: ABNT, 2005. 31 p.

AHMED, S.; NING, J.; CHENG, G.; AHMAD, I.; LI, J.; MINGYUE, L.; YUAN, Z. **Receptor-Based Screening Assays for the Detection of Antibiotics Residues—A Review**. *Talanta*, 2017.

ALLISON, J. R. D. Antibiotic residues in milk. **British Veterinary Journal**, v. 141, n. 1, p. 9-16, 1985.

ANDERSSON, D. I.; HUGHES, D. Antibiotic resistance and its cost: is it possible to reverse resistance?. **Nature Reviews Microbiology**, v. 8, n. 4, p. 260-271, 2010.

ANDREW, S. M. Effect of Fat and Protein Content of Milk from Individual Cows on the Specificity Rates of Antibiotic Residue Screening Tests. **Journal of dairy science**, v. 83, n. 12, p. 2992-2997, 2000.

ANDRIOLE, V.T. **The Quinolones**. 3.ed. Maryland Hights: Elsevier, 2000.

ANTIGNAC, J. P.; LE BIZEC, B.; MONTEAU, F.; ANDRE, F. Validation of analytical methods based on mass spectrometric detection according to the “2002/657/EC” European decision: guideline and application. **Analytica Chimica Acta**, v. 483, n. 1, p. 325-334, 2003.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Codex Alimentarius, 2016. Disponível em:

<<http://portal.anvisa.gov.br/documents/33916/388701/Codex+Alimentarius/10d276cf-99d0-47c1-80a5-14de564aa6d3>> Acesso em: 02 ago 2017.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Programa Nacional de Análise de Resíduos de Medicamentos Veterinários em Alimentos Expostos ao Consumo – PAMVet, 2009. Disponível em:

<<http://portal.anvisa.gov.br/documents/33916/395364/PAMVET.pdf/4777c371-e5b5-42e0-9c3f-43670009a802>> Acesso em: 23 jun 2017.

APPELBAUM, P.C.; HUNTER, P.A. The fluoroquinolone antibacterials: past, present and future perspectives. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v.16, p.5-15, 2000.

BERTOLINO, M. T. **Gerenciamento da qualidade na indústria alimentícia: ênfase na segurança dos alimentos**. Artmed Editora, p.10-41, 2009.

BOOTH, N. H.; MCDONALD, L. E. **Farmacologia e terapêutica em veterinária**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 199.

BOŽO, J. ANDEL, S. **Safety and fermentability of dairy products**. Food Feed 2011, 68-77, v. 80, 2008.

BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. **Instrução Normativa nº 42, de 20 de dezembro de 1999**. Altera o Plano Nacional de Controle de Resíduos em Produto de Origem Animal – PNCR. Diário Oficial da União de 22 de dezembro de 1999, Seção 1, p. 13.

BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA). **Instrução Normativa MAPA nº 51, de 18 de setembro de 2002**. Aprova os Regulamentos Técnicos de Produção, Identidade e Qualidade do Leite tipo A, do Leite tipo B, do Leite tipo C, do Leite Pasteurizado e do Leite Cru Refrigerado e o Regulamento Técnico da Coleta de Leite Cru Refrigerado e seu Transporte a Granel, em conformidade com os Anexos a esta Instrução Normativa. Diário Oficial da União, Brasília, 20 set. 2002. Seção 1, p. 13. MAPA, 2002.

BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. **Instrução Normativa Nº 68, de 12 de dezembro de 2006**. Oficializa os métodos analíticos oficiais físico-químicos, para controle de leite e produtos lácteos, em conformidade com o anexo desta Instrução Normativa, determinando que sejam utilizados nos Laboratórios Nacionais Agropecuários. Diário Oficial da União de 14/12/2006, Seção 1, Página 8.

BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA). **Instrução Normativa MAPA nº 62, de 29 de dezembro de 2011**. Altera a Instrução Normativa MAPA nº 51, de 18 de setembro de 2002. Diário Oficial da União, Brasília, 30 dez. 2011. Seção 1, p. 6. MAPA, 2011.

BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. **Instrução Normativa Nº 11, de 22 de maio de 2012**. Publica o plano de amostragem e limites de referência para o Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes em Produtos de Origem Animal - PNCRC de 2012 para as cadeias de carnes bovina, suína, caprina, ovina, equina, coelho, aves, avestruz, de leite, pescado, mel e ovos. Diário Oficial da União de 31 de dezembro de 2012.

BRASIL. **Lei nº 12.689, de 19 de julho de 2012**. Diário Oficial da União da República Federativa do Brasil, Brasília, 2012.

BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. **Instrução Normativa Nº 09, De 21 de Fevereiro de 2017**. Publica o plano de amostragem e limites de referência para o Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes em Produtos de Origem Animal - PNCRC de 2017 para as cadeias de carnes bovina, suína, caprina, ovina, equina, coelho, aves, avestruz, de leite, pescado, mel e ovos. Diário Oficial da União de 08 de março de 2017.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Instrução Normativa nº 26, de 9 de julho de 2009**. Diário Oficial da União da República Federativa do Brasil, Brasília, 2009.

BRITO, M.A.V.P.; BRITO, J.R.F. **Normas internacionais e exigências do Codex Alimentarius e comparação entre blocos comerciais sobre a adoção de testes para detecção de resíduos de antibióticos no leite. Diagnóstico da qualidade do leite, impacto para a indústria e a questão dos resíduos de antibióticos.** Juiz de Fora: Embrapa Gado de Leite, p. 65-76, 2003.

CAPANEMA, L. X. D. L.; SOUZA, J. O. B. D.; VELASCO, L. O. M. D.; NOGUTI, M. B. **Panorama da indústria farmacêutica veterinária.** BNDES Setorial, Rio de Janeiro, n. 25, p. 157-174, 2007.

CARVALHO, W. A. **Sulfonamidas e outros quimioterápicos empregados no tratamento de infecções do trato urinário.** In: SILVA, P. Farmacologia. 5. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1998. cap. 108.

CARVALHO, G. R.; COSTA, V. J. F. **Cenário continua adverso para a produção de leite.** 2016. Disponível em:
<http://www.cileite.com.br/sites/default/files/2016_02_PanoramaLeite_0.pdf>. Acesso em: 07 ago. 2017.

CHÁFER-PERICÁS, C.; MAQUIEIRA, A.; PUCHADES, R. Fast screening methods to detect antibiotic residues in food samples. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 29, n. 9, p. 1038-1049, 2010.

CHAMBERS, H. F. **Sulfonamidas, Trimetoprima & Quinolonas.** In: KATZUNG, B. G. Farmacologia básica & clínica. 8. Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2003. cap. 46.

CHIARADIA, M. C.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. **O estado da arte da cromatografia associada à espectrometria de massas acoplada à espectrometria de massas na análise de compostos tóxicos em alimentos.** Química nova, 2008.

CHIOU, J.; LEUNG, A. H. H.; LEE, H. W.; WONG, W. T. Rapid testing methods for food contaminants and toxicants. **Journal of integrative agriculture**, v. 14, n. 11, p. 2243-2264, 2015.

CODEX ALIMENTARIUS COMMISSION. **Codex general standard for contaminants and toxins in food and feed.** Codex standarts, v. 193, 1995.

CODEX ALIMENTARIUS. CAC/GL 62, 2007. **Working principles for Risk Analysis for Food Safety for application by governments.** Disponível em:<
http://www.fao.org/faowhocodexalimentarius/shproxy/en/?lnk=1&url=https%253A%252F%252Fworkspace.fao.org%252Fsites%252Fcodex%252Fstandards%252FCAC%2BGL%2B62-2007%252FCXG_062e.pdf>. Acesso em: 02 jul. 2017.

CODEX ALIMENTARIUS. CAC/GL n° 71, de 2009. **Guidelines for the design and Implementation of National Regulatory Food Safety Assurance Programmes Associated with the Use of Veterinary Drugs in Food Producing Animals.**

Disponível em: <http://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/sh-proxy/en/?lnk=1&url=https%253A%252F%252Fworkspace.fao.org%252Fsites%252Fcodex%252Fstandards%252FCAC%2BGL%2B712009%252FCXG_071e_2014.pdf>. Acesso em: 10 jun. 2017>

CODEX ALIMENTARIUS. **Committee on residues of veterinary drugs in food.** IDF News – News from Codex. Bulletin of the International Dairy Federation (IDF), n. 317, 1996, 9p.

COINF. **Comissão de Inteligência de Mercado.** In: SINDAN. Sindicato Nacional da Indústria de Produtos para Saúde Animal: o setor. Mercado, 2017. Disponível em: <<http://www.sindan.org.br/sd/base.aspx?controle=8>>. Acesso em: 23 jun. 2017.

COMMISSION DECISION 2003/181/EC of 30 January 2002; **Official Journal of the European Communities.** 2002, L30, 50.

COMMISSION REGULATION 1430/94 of 22 June 1994; **Official Journal of the European Communities.** 1994, L156, 6.

COUNCIL DIRECTIVE 96/23/EC of 29 April 1996; **Official Journal of the European Communities.** 1996, L125, 10.

COUNCIL DIRECTIVE 97/78/EC of 18 December 1997; **Official Journal of the European Communities.** 1997, L24, 9.

COURVALIN, P. **Antibiotic resistance: the pros and cons of probiotics.** Digestive and Liver Disease, v. 38, p. S261-S265, 2006.

DAVIES, S. C.; GIBBENS, N. **UK five year antimicrobial resistance strategy 2013 to 2018.** London: Department of Health, 2013.

DE QUEIROZ MAURICIO, A.; LINS, E. S. The National Agricultural Laboratories of Brazil and the control of residues and contaminants in food. **Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess**, v. 29, n. 4, p. 482-9, 2012.

DEGELAEN, J.; LOFFET, A.; DURIEUX, J. **Enzymatic process for the determination of beta-lactam antibiotics.** U.S. Patent n. 4,546,076, 8 out. 1985.

DERETI, R. M. **Diagnóstico de boas práticas agropecuárias e ajuste de não-conformidades em sistemas de produção leiteira.** 100 f. Tese (Doutorado) – Programa de Pós Graduação em Zootecnia, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel. Pelotas, 31 de maio de 2017. Universidade Federal de Pelotas/ Sistema de Bibliotecas.2017.

DURANTE-MANGONI, E.; GRAMMATIKOS, A.; UTILI, R.; FALAGAS, M. E. Do we still need the aminoglycosides?. **International journal of antimicrobial agents**, v. 33, n. 3, p. 201-205, 2009.

EC (European Commission). **Commission decision 2002/657/EC of 12 August 2002.** Implementing Council Directive 96/23/EC concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results. Official Journal of the European Communities, 2002, L 221/8.

EURACHEM. **The fitness for purpose of analytical methods, a laboratory guide to method validation and related topics.** Teddington: LGC Standards, 61 p.,1998.

FLETOURIS, D. J. **Drug Residues in Foods: Pharmacology, Food Safety and Analysis.** 2000.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS (FAO). **The FAO Action Plan on Antimicrobial Resistance 2016-2020.** Rome. Food and Agriculture Organization of the United Nations. 2016.

FORSYTHE, S. J. **Microbiologia da segurança dos alimentos.** Artmed Editora, p. 20-126, 2013.

GAYLOR, D.W., BOLGER, P.M. & SCHWETZ, B.A. U.S. **Food and Drug Administration perspective of the inclusion of effects of low-level exposures in safety and risk assessment.** Environmental Health Perspectives, v. 106, p. 391–394. 1998.

GEHLEN, I. **Pesquisa, tecnologia e competitividade na agropecuária brasileira.** Dossiê. Sociologias, Porto Alegre/RS, ano 3, nº 6, jul/dez, 2001, p.70-93.

GEHRING, R.; BAYNES, R. E.; RIVIERI, J. E. Application of risk assessment and management principles to the extralabel use of drugs in food-producing animals. **Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics**, v. 29, p.5-14, 2006.

GIRARDI, C.; ODORE, R. Pharmacological treatments and risks for the food chain. **Veterinary Research Communications**, Amsterdam, v. 32, n. 1, p. 11-18, 2008.

GOMES, E. J. Dados do Censo Agropecuário confirmam concentração da atividade leiteira no Brasil. **Boletim do Departamento de Estudos Socioeconômicos Rurais.** Curitiba, nov. 2009.

GUARDABASSI, L.; JENSEN, L. B.; KRUSE, H. **Guia de antimicrobianos em veterinária.** Artmed Editora, p.17-180, 2009.

GEHLEN, I. **Pesquisa, tecnologia e competitividade na agropecuária brasileira.** Dossiê. Sociologias, Porto Alegre/RS, ano 3, nº 6, jul/dez, 2001, p.70-93.

GUIMARÃES, D. O.; MOMESSO, L. D. S.; PUPO, M. T. **Antibióticos: importância terapêutica e perspectivas para a descoberta e desenvolvimento de novos agentes.** Química Nova, v. 33, n. 3, p. 667-679, 2010.

GUSTAVSSON, E. Biosensor analysis of lactams in milk using the carboxypeptidase activity of a bacterial penicillin binding protein. **Journal of AOAC International**, v. 89, n. 3, p. 832-837, 2006.

HIGGINS, P.G.; FLUIT, A.C.; SCHMITZ, F.J. **Fluoroquinolones: structure and target sites**. *Current Drug Targets*, v.4, p.181-189, 2003.

HOFF, R. **Análise de resíduos de sulfonamidas em alimentos por eletroforese capilar e espectrometria de massas**. 134 f. Dissertação (Mestrado) - Centro de Biotecnologia do estado do Rio Grande do Sul, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2008.

HOFF, R.; RIBARCKI, F.; ZANCANARO, I.; CASTELLANO, L.; SPIER, C.; BARRETO, F.; FONSECA, S. H. **Bioactivity-based screening methods for antibiotics residues: a comparative study of commercial and in-house developed kits**. *Food Additives & Contaminants: Part A*, v. 29, n. 4, p. 577-586, 2012.

HORNBECK, P. V. **Enzyme-linked immunosorbent assays**. *Current protocols in immunology*, p. 2.1. 1-2.1. 23, 1991.

INMETRO. Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial. **Orientações sobre Validação de Métodos de Ensaio Químicos**. DOQ-CGCRE-008, Rio de Janeiro: INMETRO, 2010. 35 p.

JONES, G. M.; SEYMOUR, E. H. Cowside antibiotic residue testing. **Journal of Dairy Science**, v. 71, p. 1691-1699, 1988.

JURAN, J. M. **A qualidade desde o projeto**. Thomson: Rio de Janeiro, 1992.

KOROLKOVAS, A.; LAIÑO LOPEZ, M. L.; MARANGONI, A. L.. Fluoroquinolonas: gênese, mecanismo de ação e uso terapêutico. **Revista Brasileira de Medicina**, v. 49, n. 6, p. 267-8, 270, 27, 1992.

KUIPERS, A.; VERHEES, F. J. H. M. Sustainable agriculture, good farming practices and application of quality assurance schemes in dairy sector. **18th International Farm Management Congress Methven**, Canterbury, New Zealand, 2011.

LAPPE, M. **Germs That Won't Die: Medical Consequences of the Misuse of Antibiotics**. 1982.

LIU, Y.; WANG, Y.; WALSH, T. R.; YI, L. X.; ZHANG, R.; SPENCER, J.; YU, L. F. Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism MCR-1 in animals and human beings in China: a microbiological and molecular biological study. **The Lancet infectious diseases**, v. 16, n. 2, p. 161-168, 2016.

LÓPEZ, H.S.; BRUMBAUGH, G.W.; TRIGOS, G.M. Bases farmacológicas Del tratamiento de la mastitis bovina. **Revista Veterinária México**. 27(1), 63-82, 1996.

MARSHALL, B. M.; LEVY, S. B. Food animals and antimicrobials: impacts on human health. **Clinical microbiology reviews**, v. 24, n. 4, p. 718-733, 2011.

MARTIN, B. **Agricultural antibiotics: features of a controversy**. In: Kleinman, D.L.; Handelsman, J.; Kinchy, A.J. *Controversies in Science and Technology: from Maize to Menopause*. University of Wisconsin Press, Madison, 2005.

MARTINS JUNIOR, H. A.; BUSTILLOS, O. V.; PIRES, M. A. F.; LEBRE, D. T.; WANG, A. Y. **Determinação de resíduos de cloranfenicol em amostras de leite e mel industrializados utilizando a técnica de espectrometria de massas em "tandem" (CLAE-EM/EM)**. *Química Nova*, São Paulo, v. 29, n. 3, p. 586-592, 2006.

MARTINS, M. A.; VAZ, A. K. Comparação entre o Delvotest® e o teste de coagulação pelo fermento lácteo para detecção de substâncias inibidoras no leite. **Revista Hora Veterinária**, v. 19, n. 113, p. 53-55, 2000.

MARTINS, M. A.; VAZ, A. K. Comparação entre o Delvotest® e o teste de coagulação pelo fermento lácteo para detecção de substâncias inibidoras no leite. **Revista Hora Veterinária**, v. 19, n. 113, p. 53-55, 2000.

MATSUBARA, M. T.; BELOTI, V.; TAMANINI, R.; FAGNANI, R.; DA SILVA, L. C. C.; MONTEIRO, A. A.; BATTAGLINI, A. P. P.; ORTOLANI, M. B. T.; BARROS, M. A. F. Boas práticas de ordenha para redução da contaminação microbiológica do leite no agreste Pernambucano. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 32, n. 1, p. 277-286, jan./mar. 2011.

MCDUGALL, S.; COMPTON, C. W.; BOTHA, N. Factors influencing antimicrobial prescribing by veterinarians and usage by dairy farmers in New Zealand. **The New Zealand Veterinary Journal**, p. 1-25, 2016.

MENSAH, S. E.; KOUDANDE O. D.; SANDERS P.; LAURENTIE M., MENSAH G. A.; ABIOLA, F. A. Antimicrobial residues in foods of animal origin in Africa: public health risks. **Revue Scientifique Et Technique**, v. 33, p. 987-996, 2014.

MAPA. Ministério Da Agricultura, Pecuária E Abastecimento. **Guia de Validação e Controle da Qualidade Analítica**. Fármacos em Produtos para Alimentação Animal e Medicamentos Veterinários, Secretaria de Defesa Agropecuária. MAPA/ACS. Brasília, 2011.

MILINSKI, C. C.; GUEDINE, P. S. M.; VENTURA, C. A. A. O sistema agroindustrial do leite no Brasil: uma análise sistêmica. In: **Congresso Brasileiro de Sistemas**. 2008. p. 01-17.

MOELLER, N.; MUELLER-SEITZ, E.; SCHOLZ, O.; HILLEN, W.; BERGWERFF, A. A.; PETZ, M. A new strategy for the analysis of tetracycline residues in foodstuffs by a surface plasmon resonance biosensor. **European Food Research and Technology**, v. 224, n. 3, p. 285-292, 2007.

MÜLLER, E. E. Qualidade do leite, células somáticas e prevenção da mastite. **Simpósio sobre Sustentabilidade da Pecuária Leiteira na Região Sul do Brasil**, v. 2, p. 206-217, 2002.

NAVRÁTILOVÁ, P. Screening methods used for the detection of veterinary drug residues in raw cow milk—a review. **Czech Journal Food Science**, v. 26, n. 6, p. 393-401, 2008.

FAO. Organização Das Nações Unidas Para A Alimentação E A Agricultura.; IDF. Federação Internacional De Lácteos. 2013. **Guia de boas práticas na pecuária de leite. Produção e Saúde Animal, Diretrizes**. 8. E-ISBN 978-92-5-006957-9. Roma, 2013.

FAO. Organização Das Nações Unidas Para A Alimentação E A Agricultura.; OIE. Organização Mundial De Sanidade Animal. 2010. **Guide to Good Farming Practices for Animal Production Food Safety**. Rome, 2010. OIE ISBN 978-92-9044-819-8.

PACHECO-SILVA, É.; SOUZA, J. R.; CALDAS, E. D. **Resíduos de medicamentos veterinários em leite e ovos**. Química Nova, São Paulo , v. 37, n. 1, p. 111-122, 2014.

PATRICK, G. L.; An Introduction to Medicinal Chemistry, Oxford University Press: New York, 2005, cap.16; Patrick, G. L.; An Introduction to Medicinal Chemistry, **Oxford University Press**: New York, 1995, cap. 10.

PAUSTENBACH, D.J. **Primer on human and environmental risk assessment**. In Human and Ecological Risk Assessment. New York, USA, p. 3–83. 2002.

PORTO, M.F.de S.; FREITAS, C.M. de. Análise de riscos tecnológicos ambientais: perspectivas para o campo da saúde do trabalhador. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 13, n. supl. 2, p. 59-72, 1997.

PUPO, M. T.; GUIMARÃES, D. O.; FURTADO, N. A. J. C.; BORGES, W. S. Modern Biotechnology in Medicinal Chemistry and Industry. Taft, C. A., ed. Research Signpost: Kerala, 2006, cap. 4.

RANG, H. P.; DALE, M. M.; RITTER, J. M. **Farmacologia**. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001. p. 577-594.

REYBROECK, W. Rapid screening for residues of antibiotics in milk at the factory. **Chemical hazards and control measures**, South Africa, Session 4, 2004.

ROLLIN, B. Ethics, science, and antimicrobial resistance. **Journal of Agricultural and Environmental Ethics**, v. 14, n. 1, p. 29-37, 2001.

ROMERO, T.; VAN WEYENBERG, S.; MOLINA, M. P.; REYBROECK, W. Detection of antibiotics in goats' milk: Comparison of different commercial microbial inhibitor tests developed for the testing of cows' milk. **International Dairy Journal**, v. 62, p. 39-42, 2016.

ROUGEMONT, A. J. Alimentos seguros—necessidade ou barreira comercial?. **Perspectivas OnLine**, 2007-2010, v. 1, n. 2, 2014.

SAI, N. CHEN, Y.; LIU, N.; YU, G.; SU, P.; FENG, Y.; NING, B. A. **Sensitive immunoassay based on direct hapten coated format and biotin–streptavidin system for the detection of chloramphenicol.** *Talanta*, v. 82, n. 4, p. 1113-1121, 2010.

SAVIANO, A. M.; FRANCISCO, F. L.; LOURENÇO, F. R. **Rational development and validation of a new microbiological assay for linezolid and its measurement uncertainty.** *Talanta*, v. 127, p. 225-229, 2014.

SCHOLAR, E. M. Fluoroquinolones: Past, present and future of a novel group of antibacterial agents. **American Journal of Pharmaceutical Education**, v. 66, p.164-172, 2002.

SCORTICHINI, G. ANNUNZIATA, L.; HAOUET, M. N.; BENEDETTI, F.; KRUSTEVA, I.; GALARINI, R. ELISA qualitative screening of chloramphenicol in muscle, eggs, honey and milk: method validation according to the Commission Decision 2002/657/EC criteria. **Analytica Chimica Acta**, v. 535, n. 1, p. 43-48, 2005.

SHLAES, D. M. **An update on tetracyclines. Current opinion in investigational drugs**, London, England: 2000, v. 7, n. 2, p. 167-171, 2006.

SOUZA, M.V.N. **New fluoroquinolones: A class of potent antibiotics.** Minireviews in Medicinal Chemistry, v.5, p.1019-1017, 2005.

SPEER, B S.; SHOEMAKER, N. B.; SALYERS, A. A. Bacterial resistance to tetracycline: mechanisms, transfer, and clinical significance. **Clinical microbiology reviews**, v. 5, n. 4, p. 387-399, 1992.

SPINOSA, H. S. **Considerações gerais sobre os antimicrobianos.** In: SPINOSA, H. S.; GÓRNIAC, S. L.; BERNARDI, M. M. Farmacologia Aplicada à Medicina Veterinária. 4ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006, cap. 37.

STOLTZ, E. I.; HANKINSON, D. J. Antibiotics and lactic acid starter cultures. **Applied microbiology**, v. 1, n. 1, p. 24, 1953.

TAMIME, A.Y. **Milk processing and quality management.** John Wiley & Sons, 2009.

TAVARES, W. **Manual de antibióticos e quimioterápicos antiinfeciosos.** In: Manual de antibióticos e quimioterápicos antiinfeciosos. Atheneu, 1990.

THANNER, S.; DRISSNER, D.; WALSH, F. Antimicrobial resistance in agriculture. **mBio**, v. 7, n. 2, p. e02227-15, 2016.

THOMPSON, M.; ELLISON, S.L.R.; WOOD, R. Harmonized guidelines for single-laboratory validation of methods of analysis (IUPAC Technical Report). **Pure and Applied Chemistry**, v. 74, n. 5, p. 835-855, 2002.

TOLDRÁ, F.; REIG, M. Methods for rapid detection of chemical and veterinary drug residues in animal foods. **Trends in Food Science & Technology**, v. 17, n. 9, p. 482-489, 2006.

VALCÁRCEL, M.; CÁRDENAS, S.; GALLEGO, M. Sample screening systems in analytical chemistry. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 18, n. 11, p. 685-694, 1999.

VALLIN, V. M.; BELOTI, V.; BATTAGLINI, A. P. P.; TAMANINI, R.; FAGNANI, R.; ANGELA, H. L.; SILVA, L. C. C. Melhoria da qualidade do leite a partir da implantação de boas práticas de higiene na ordenha em 19 municípios da região central do Paraná. **Semina: Ciências Agrárias**, 30:181-188, 2009.

VERA-CANDIOTI, L.; OLIVIERI, A. C.; GOICOECHEA, H. C. **Development of a novel strategy for preconcentration of antibiotic residues in milk and their quantitation by capillary electrophoresis**. *Talanta*, v. 82, n. 1, p. 213-221, 2010.

VERMELHO, A. B.; BASTOS, M. C. F.; SÁ, M. H. B. **Bacteriologia geral**. In: *Bacteriologia Geral*. Guanabara Koogan, 2007, cap. 9, 2007.

VESTERLUND, S.; PALTTA, J.; LAUKOVÁ, A.; KARP, M.; & OUWEHAND, A. C. Rapid screening method for the detection of antimicrobial substances. **Journal of microbiological methods**, v. 57, n. 1, p. 23-31, 2004.

WHO. World Health Organization. **Global strategy for containment of antimicrobial resistance**. 2001.

ZHANEL, G. G.; HOMENUIK, K.; NICHOL, K.; NOREDDIN, A.; VERCAIGNE, L.; EMBIL, J.; HOBAN, D. J. **The glycyliclins Drugs**, v. 64, n. 1, p. 63-88, 2004.

ZOOCAL, R. **Alguns números do leite**. *Revista Balde Branco*: online. 2016. Disponível em: <<http://www.baldebranco.com.br/alguns-numeros-do-leite/>> Acesso em: 28 de julho de 2017.

ZOOCAL, R. **Quantos são os produtores de leite no Brasil?** Panorama do leite on line, Centro de Inteligência do Leite, EMBRAPA Gado de Leite: Juiz de Fora, ano 6., n. 64, mar. 2012.