



UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DE LONDRINA

---

MARCIA SASSAHARA

**AVALIAÇÃO DA QUALIDADE DO LEITE PASTEURIZADO  
PRODUZIDO E COMERCIALIZADO NO ESTADO DO  
PARANÁ, BRASIL, NO PERÍODO DE MARÇO/2005 A  
SETEMBRO/2007**

---

Londrina  
2008

MARCIA SASSAHARA

**AVALIAÇÃO DA QUALIDADE DO LEITE PASTEURIZADO  
PRODUZIDO E COMERCIALIZADO NO ESTADO DO  
PARANÁ, BRASIL, NO PERÍODO DE MARÇO/2005 A  
SETEMBRO/2007**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciência Animal, área de concentração Sanidade Animal, da Universidade Estadual de Londrina como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor.

Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Daisy Pontes Netto

Londrina  
2008

**Catálogo na publicação elaborada pela Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central da Universidade Estadual de Londrina.**

**Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)**

S252m	<p>Sassahara, Marcia.</p> <p>Avaliação da qualidade do leite pasteurizado produzido e comercializado no Estado do Paraná, Brasil, no período de março/2005 a setembro/2007 / Marcia Sassahara. – Londrina, 2008. 62 f. : il.</p> <p>Orientador: Daisy Pontes Netto.</p> <p>Tese (Doutorado em Ciência Animal) – Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, 2008.</p> <p>Inclui bibliografia.</p> <p>1. Leite – Qualidade – Teses. 2. Laticínios – Microbiologia – Teses. 3. Antibióticos – Resíduos – Teses. I. Pontes Netto, Daisy. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal. III. Título.</p> <p>CDU 641:579</p>
-------	---

MARCIA SASSAHARA

**AVALIAÇÃO DA QUALIDADE DO LEITE PASTEURIZADO  
PRODUZIDO E COMERCIALIZADO NO ESTADO DO PARANÁ,  
BRASIL, NO PERÍODO DE MARÇO/2005 A SETEMBRO/2007**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em  
Ciência Animal, área de concentração Sanidade  
Animal, da Universidade Estadual de Londrina como  
requisito parcial para a obtenção do título de doutor.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Daisy Pontes Netto  
UEL – Londrina – PR

---

Prof. Dr. Miguel Machinski Junior  
UEM – Maringá – PR

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Márcia de Aguiar Ferreira Barros  
UNB – Brasília – DF

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Mara Regina Stipp Balarim  
UEL – Londrina - PR

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Vanerli Beloti  
UEL – Londrina – PR

Londrina, 29 de setembro de 2008.

O presente trabalho foi realizado nos Laboratórios de Toxicologia Veterinária e Plantas Tóxicas e de Inspeção de Produtos de Origem Animal, Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Estadual de Londrina como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor pelo Programa de Pós-graduação em Ciência Animal, área de concentração Sanidade Animal, sob a orientação da Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Daisy Pontes Netto.

Os recursos financeiros para a realização do projeto foram obtidos junto às agências e órgãos de fomento a pesquisa abaixo relacionados:

1. CAPES: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
2. CNPq: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
3. PROPPG: Pró-reitoria de Pesquisa e Pós-graduação da Universidade Estadual de Londrina
4. Fundação Araucária de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Paraná

Os artigos para publicação foram padronizados de acordo com as normas requeridas pelas revistas SEMINA: Ciências Agrárias (artigo 1 – Anexo G) e Food and Chemical Toxicology (artigo 2 – Anexo H)

## AGRADECIMENTOS

À Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Daisy Pontes Netto, por sua orientação, por me acolher e apoiar durante momentos difíceis de minha vida, pelo convívio harmonioso dentro e fora do ambiente de trabalho, e por muito mais do que poderia citar nestas linhas.

À minha família, pelo apoio incondicional durante toda minha vida.

Aos integrantes da banca de qualificação, Dr<sup>a</sup> Luciene Garcia Pretto Giordano, Dr<sup>a</sup> Kerlei Cristina Médici e Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Roberta Lemos Freire, pelas contribuições a este trabalho.

Aos integrantes da banca de defesa, Prof. Dr. Miguel Machinski Junior, Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Márcia de Aguiar Ferreira Barros, Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Mara Regina Stipp Balarim e Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Vanerli Beloti, pelas sugestões e informações oferecidas para a melhoria deste trabalho.

À funcionária Aparecida Maria de Oliveira, a dona Cidinha, que me ensinou muito sobre o que é a vida, dentro e fora de um laboratório ("São coisas de mãe!").

À Secretaria da Saúde do Estado do Paraná, que forneceu insumos, materiais e auxílio na coleta das amostras analisadas.

Ao Laboratório de Inspeção de Produtos de Origem Animal, principalmente o colega de pós-graduação Ronaldo Tamanini, pelo auxílio na análise físico-química e microbiológica das amostras.

Aos colegas da pós-graduação, pelo convívio e amizade durante esta etapa de minha formação acadêmica.

A todos aqueles que contribuíram para este trabalho, e que fazem parte de  
minha vida.

SASSAHARA, Márcia. **Avaliação da qualidade do leite pasteurizado produzido e comercializado no Estado do Paraná, Brasil, no período de março/2005 a setembro/2007.** 2008. 62 f. Tese (Doutorado em Ciência Animal) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2008.

## RESUMO

O leite é um alimento que apresenta elevado valor nutricional, desempenhando importante papel na economia nacional. Por ser passível de adulterações e contaminações, é necessário o monitoramento de sua qualidade, a fim de assegurar ao consumidor e à indústria um produto final com qualidade adequada. Durante o período de março de 2005 a setembro de 2007 foram coletadas 252 amostras de leite pasteurizado produzido no Estado do Paraná, em laticínios locais e pontos de comércio varejista. Deste total de amostras, 246 foram submetidas a análises físico-químicas, sendo que 190 (77,2%) das amostras apresentaram alteração de pelo menos um dos itens avaliados. A avaliação microbiológica foi efetuada em 123 amostras, das quais 68 (55,3%) apresentaram alterações nos valores observados. A pesquisa de resíduos de antibióticos foi realizada em 252 amostras de leite quanto à presença de  $\beta$ -lactâmicos, tetraciclina e gentamicina (método SNAP<sup>®</sup>), estreptomicina e neomicina (ELISA), apresentando positividade de 5 (2,0%), 60 (23,8%), 4 (1,6%), 7 (2,8%) e 25 (9,9%), respectivamente. Os valores encontrados neste estudo indicam que as amostras de leite analisadas apresentam-se fora dos padrões de qualidade adequados, refletindo falhas na cadeia produtiva do leite.

**Palavras-chave:** Leite pasteurizado. Análise físico-química. Avaliação microbiológica. Resíduos de antibióticos.

SASSAHARA, Marcia. **Laboratorial monitoring of quality and presence of antimicrobial residues in pasteurized milk produced and commercialized in Paraná State, Brazil.** 2008. 62 f. Thesis (Doctorate Degree in Animal Science) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2008.

### **ABSTRACT**

Milk is a food of high nutritional value and important role in national economy. It is also susceptible to tampering and contamination, which makes quality monitoring a necessity, to ensure an adequate final product both to the consumer and industry. During the period between March 2005 and September 2007, 252 samples of pasteurized milk produced and commercialized in Parana State were collected from dairy plants and local commerce. 190 (77.2%) from 246 samples showed alterations in at least one physicochemical value and 68 (55.3%) of 123 samples on the microbiological quality. 252 samples were analyzed for the presence of  $\beta$ -lactam, tetracycline and gentamicin (SNAP<sup>®</sup> test), streptomycin and neomycin (ELISA), presenting positivity of 5 (2.0%), 60 (23.8%), 4 (1.6%), 7 (2.8%) and 25 (9.9%), respectively. This shows that the samples analyzed were beyond quality standards, indicating errors during milk production steps.

**Keywords:** Pasteurized milk. Physicochemical quality. Microbiological evaluation. Antibiotic residues.

## LISTA DE TABELAS

### ARTIGO A

- Tabela 1** – Percentagem de alterações nos valores de parâmetros físico-químicos<sup>1</sup> em 246 amostras de leite pasteurizado coletadas no Estado do Paraná entre março de 2005 e outubro de 2006 .....22
- Tabela 2** – Características físico-químicas<sup>1</sup> de 246 amostras de leite pasteurizado coletadas entre março de 2005 a outubro de 2006 no Estado do Paraná, analisadas de acordo com a metodologia indicada na Instrução Normativa 22/2003 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (BRASIL, 2003)..... 23
- Tabela 3** - Percentagem de alterações microbiológicas<sup>1</sup> em 123 amostras de leite pasteurizado coletadas no Estado do Paraná no período de março de 2005 a outubro de 2006, analisadas de acordo com a metodologia indicada na Instrução Normativa 62/2003 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (BRASIL, 2003) ..... 24

### ARTIGO B

- Tabela 1** - Porcentagem de resíduos de antimicrobianos em amostras de leite pasteurizado produzido e comercializado no Estado do Paraná, analisadas durante o período de março de 2005 a setembro de 2007, e Limites Máximos de Resíduos (LMRs) permitidos para cada substância no leite ..... 32

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	10
1.1 QUALIDADE FÍSICO-QUÍMICA E MICROBIOLÓGICA DO LEITE .....	10
1.2 ANTIMICROBIANOS: UTILIZAÇÃO, FATORES DE CONTAMINAÇÃO E RESÍDUOS EM LEITE .....	11
1.3 VIGILÂNCIA SANITÁRIA DE ALIMENTOS .....	14
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	17
2.1 OBJETIVO GERAL .....	17
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	17
<b>3 ARTIGOS PARA PUBLICAÇÃO</b> .....	18
<b>ARTIGO A – AVALIAÇÃO DE PARÂMETROS DA QUALIDADE FÍSICO- QUÍMICA E MICROBIOLÓGICA DO LEITE PASTEURIZADO PRODUZIDO E CONSUMIDO NO ESTADO DO PARANÁ, BRASIL</b> .....	18
RESUMO .....	18
ABSTRACT .....	18
INTRODUÇÃO .....	19
MATERIAL E MÉTODOS .....	20
RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	21
CONCLUSÕES .....	25
REFERÊNCIAS .....	25
<b>ARTIGO B – DETERMINAÇÃO DE RESÍDUOS DE ANTIBIÓTICOS EM LEITE PASTEURIZADO PRODUZIDO E CONSUMIDO NO ESTADO DO PARANÁ, UTILIZANDO-SE MÉTODOS SNAP TEST E ELISA</b> .....	28
RESUMO .....	28
ABSTRACT .....	28
INTRODUÇÃO .....	29
MATERIAL E MÉTODOS .....	30
RESULTADOS .....	31

DISCUSSÃO .....	32
REFERÊNCIAS .....	34
<b>4 CONCLUSÕES .....</b>	<b>36</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>37</b>
<b>ANEXOS .....</b>	<b>42</b>
ANEXO A .....	43
ANEXO B .....	44
ANEXO C .....	47
ANEXO D .....	48
ANEXO E .....	49
ANEXO F .....	51
ANEXO G .....	53
ANEXO H .....	55

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 QUALIDADE FÍSICO-QUÍMICA E MICROBIOLÓGICA DO LEITE

O leite é definido como o produto oriundo da ordenha completa e ininterrupta, em condições de higiene, de vacas sadias, bem alimentadas e descansadas (BRASIL, 2002). É um alimento que apresenta em sua composição alto teor de proteínas, cálcio, vitaminas e sais minerais. Além de sua importância nutricional, o leite também representa um papel importante na economia brasileira, por sua alta comercialização e consumo, especialmente por crianças e idosos (GARRIDO *et al.*, 2001). Somente no Estado do Paraná, houve uma produção de mais de 2,7 bilhões de litros de leite no ano de 2006 (IBGE, 2008).

Na avaliação da qualidade do leite deve-se considerar características sensoriais, nutricionais, físico-químicas e microbiológicas, como sabor, valor nutritivo, ausência de agentes patogênicos e contaminantes, baixa contagem de células somáticas e carga microbiana (ZOCHE *et al.*, 2002).

Os fatores mais relevantes quanto à qualidade físico-química do leite são o estado de conservação, tratamento térmico e integridade do produto, que podem ser alterados devido a fatores nutricionais, ambientais, sanitários ou mesmo fraudes. A contaminação por altas contagens de microrganismos deterioradores e/ou patogênicos pode ser atribuída a deficiências no manejo e higiene durante a ordenha, sanidade dos animais, elevadas taxas de mastites, problemas com a correta desinfecção e manutenção de equipamentos e falta de treinamento para os colaboradores (SANTOS *et al.*, 1981; FROEDER *et al.*, 1985; PADILHA; FERNANDEZ, 1999).

Diversos microrganismos patogênicos podem ser veiculados pelo leite, destacando-se *Mycobacterium tuberculosis*, *Brucella* spp., *Listeria monocytogenes*, *Campylobacter* spp., *Salmonella* spp., *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* (ROBINSON, 1990; RIEDEL, 1992). Os microrganismos não patogênicos veiculados pelo leite podem causar degradação e alteração do produto, tornando-o impróprio para o consumo ou industrialização, causando perdas econômicas (FRANCO; LANDGRAF, 2004).

O controle microbiológico do leite pode ser realizado pela pesquisa de microrganismos indicadores, principalmente os aeróbios mesófilos e os coliformes. A

contagem de aeróbios mesófilos é comumente empregada para indicar a qualidade sanitária dos alimentos, pois a presença de um número elevado de microrganismos, mesmo não patogênicos, demonstra a insalubridade de um alimento, exceto os alimentos fermentados (FRANCO; LANDGRAF, 2004).

Os coliformes podem ser divididos em dois grupos, coliformes totais (CT) e coliformes termotolerantes (CTT). Os coliformes totais são bactérias da família *Enterobacteriaceae*, principalmente bactérias dos gêneros *Escherichia* sp., *Enterobacter* sp., *Citrobacter* sp. e *Klebsiella* sp.. São encontrados nas fezes, mas também estão presentes no ambiente. Portanto, a presença de coliformes totais em um alimento pode indicar uma contaminação ambiental, mas não necessariamente, ocorrência de enteropatógenos. A presença de coliformes termotolerantes, principalmente a *E. coli* e algumas cepas de *Enterobacter* sp. e *Klebsiella* sp., indica uma possível contaminação fecal e eventual presença de enteropatógenos (FRANCO; LANDGRAF, 2004).

Diversos trabalhos realizados com leite pasteurizado em diferentes regiões do país têm enfatizado o elevado percentual de amostras fora dos padrões microbiológicos e físico-químicos estabelecidos pela legislação em vigor (FREITAS *et al.*, 2002; MARQUES, COELHO; SOARES, 2005). É fundamental o controle higiênico-sanitário, desde a obtenção de leite cru nas fazendas até a embalagem do produto final, pois a sua produção sob condições inadequadas de higiene torna-o veículo de transmissão de doenças à população consumidora (OLIVEIRA *et al.*, 1999).

## 1.2 ANTIMICROBIANOS: UTILIZAÇÃO, FATORES DE CONTAMINAÇÃO E RESÍDUOS EM LEITE

A palavra “antibiótico” é derivada do termo *antibiosis*, que literalmente significa “contra a vida” (*anti* = contra; *bios* = vida). Os antimicrobianos incluem os compostos naturais (antibióticos) e seus derivados e também os compostos sintéticos (ROBBERS *et al.*, 1997).

São substâncias químicas produzidas pelo metabolismo de determinadas linhagens de bactérias, de fungos e de actinomicetos, e que, em soluções diluídas, podem impedir temporária ou definitivamente as funções vitais de outros microrganismos, determinando efeitos bacteriostático e/ou bactericida. O uso seguro e correto dessas drogas

para o tratamento e prevenção de doenças e no incremento e eficiência da ração animal, está amplamente difundido na pecuária (BRASIL, 1999).

Os mecanismos de ação dos antimicrobianos incluem inibição da parede celular do microrganismo-alvo, inibição da biossíntese protéica, rompimento do metabolismo do ácido desoxirribonucléico (DNA), alteração da função normal da membrana celular e inibição da síntese de alguns metabólitos essenciais (ROBBERS *et al.*, 1997).

Pontes Netto *et al.* (2005) realizaram um levantamento, em 160 estabelecimentos comerciais do Estado do Paraná, para determinação dos antibióticos mais utilizados nos rebanhos leiteiros do estado. Os mais mencionados foram os  $\beta$ -lactâmicos (penicilinas), seguidos dos aminoglicosídeos (estreptomicina, neomicina e gentamicina) e das tetraciclinas (oxitetraciclinas, tetraciclinas e clortetraciclinas).

Os antibióticos  $\beta$ -lactâmicos têm como característica comum um anel de  $\beta$ -lactama. Agem impedindo a síntese da parede celular, acarretando a morte das bactérias suscetíveis. Os aminoglicosídeos apresentam um espectro intermediário de atividade, abrangendo a maioria dos bacilos Gram-negativos e algumas bactérias Gram-positivas, e atuam inibindo a formação de proteínas bacterianas essenciais. As tetraciclinas possuem amplo espectro de ação, abrangendo bactérias Gram-positivas e Gram-negativas e rickettsias, também atuando sobre a formação protéica.

A antibioticoterapia tem sido amplamente empregada no tratamento de doenças infecciosas no gado leiteiro, principalmente nos casos de mastite, uma das doenças mais comuns nesses animais (SILVA; SENA, 1984). Os antibióticos podem ser administrados aos animais por via oral, intramuscular, intravenosa, subcutânea ou por infusão intramamária ou intrauterina, e todas essas vias podem levar ao aparecimento de resíduos nos produtos originados dos animais tratados (MITCHELL *et al.*, 1998).

Segundo Brito (2006), a contaminação do leite geralmente ocorre após o tratamento de vacas em lactação por problemas de mastite, metrite ou outras doenças infecciosas, ou como resultado do tratamento no início do período seco para controlar mastite. Os antibióticos podem persistir no leite por períodos variados, dependendo de vários fatores, como por exemplo a droga utilizada, dose aplicada e via de administração. Outros fatores que podem contribuir para a presença de resíduos no leite são a higienização de equipamentos e utensílios da indústria. Shitandhi e Sternesjö (2004) afirmaram que a falta de informação dos pequenos produtores estudados no Quênia acarretou uma falha no conhecimento de riscos, utilização inadequada de antibióticos e conseqüentemente uma maior contaminação do leite. Raia Júnior (2006) sugere que a intensidade da produção do animal também é um fator, pois

segundo o autor animais com produção leiteira acima de 20L/dia apresentaram menor ocorrência de resíduos se comparados a animais de menor produção diária de leite.

O período de carência de um antibiótico é o prazo de eliminação deste no leite, após a última aplicação. Este período deve ser respeitado para prevenir resíduos de drogas e aditivos nos alimentos provenientes dos animais tratados (BRITO, 2006).

A presença de antibióticos no leite resulta em grande preocupação tanto para o consumidor quanto para a indústria. Costa (1996), Brito (2000), Folly e Machado (2001), Nascimento *et al.* (2001), e Nero *et al.* (2007) relataram vários problemas que podem ocorrer devido a esta contaminação: seleção de cepas bacterianas resistentes no ambiente, por uso indiscriminado de antibióticos no tratamento de animais e por ingestão por parte dos consumidores de alimentos contaminados por resíduos, o que acarretaria uma pressão seletiva sobre a flora intestinal; reações de hipersensibilidade e possível choque anafilático em indivíduos mais sensíveis, que podem ser desencadeadas por doses mínimas de resíduos presente nos alimentos; interferência nos processos fermentativos na indústria de laticínios, como a produção de queijos, iogurtes e outros; modificação de resultados de análises laboratoriais, induzindo uma falsa idéia de alimento de boa qualidade, entre outros.

Segundo Gallina (1997), Gigante (2004) e Tenório (2007) uma vez que o leite contaminado com resíduo de antibiótico entra na indústria, é praticamente inevitável sua presença no leite beneficiado ou nos derivados, pois os tratamentos aos quais é usualmente submetido, como filtração, resfriamento e tratamento térmico surtem pouco ou nenhum efeito sobre os antibióticos.

Além da Organização Mundial da Saúde (OMS), existem diversas organizações internacionais envolvidas nos mecanismos de controle de substâncias químicas utilizadas na produção animal, como antibióticos, hormônios, praguicidas e parasiticidas. Esses mecanismos incluem o controle da distribuição e uso das substâncias nos animais, determinação de períodos de carência e níveis seguros de resíduos, assim como as tecnologias para detecção de resíduos (MITCHELL *et al.*, 1998; BRITO, 2000).

Com o objetivo de garantir a qualidade e segurança do leite e produtos lácteos, foi determinado o Limite Máximo de Resíduos (LMR), que é a concentração máxima de resíduos em alimentos legalmente permitida ou reconhecida como aceitável (MITCHELL *et al.*, 1998; BRASIL, 1999). Esse limite serve como parâmetro para estudos e monitoramentos dos produtos destinados ao consumo.

A determinação de resíduos de antibióticos em leite pode ser realizada por métodos microbiológicos, físico-químicos e imunoenzimáticos. Cada um deles apresenta

vantagens e desvantagens quanto a custo, tempo de resposta e especificidade, devendo a escolha do método ser baseada em um conjunto de critérios que permita a realização do trabalho adequadamente (TENÓRIO, 2007).

Segundo Mitchell *et al.* (1988) e Cerqueira (2003), os testes microbiológicos baseiam-se na inibição de crescimento de microrganismos conhecidos, reconhecida pela mudança de cor de um indicador de pH no meio de cultivo. As bactérias mais utilizadas nesses testes são *Bacillus stearothermophilus*, *Streptococcus salivarius*, *Bacillus cereus* e *Micrococcus luteus*, onde o inóculo padrão de um organismo-teste é incubado em amostras de leite por um período determinado. Se o leite contiver substâncias inibidoras em concentração suficiente, o crescimento bacteriano é reduzido ou eliminado.

No entanto, existem fatores que interferem nos resultados dos testes microbiológicos, como por exemplo a composição da amostra, que pode influenciar a sensibilidade do teste. Uma taxa elevada na contagem de células somáticas também pode interferir no resultado do teste, assim como uma possível interferência por drogas de outras classes e fatores antibacterianos presentes no leite de vacas, induzindo a um resultado falso positivo (CULLOR, 1992; MITCHELL *et al.*, 1998; CERQUEIRA, 2003; BRITO, 2006).

Embora os métodos microbiológicos possam avaliar um grande número de amostras ao mesmo tempo, esses métodos necessitam de um tempo maior (horas) para a determinação do resultado, e detectam somente a presença de substâncias inibidoras e não necessariamente seus metabólitos ou seus produtos de degradação (TENÓRIO, 2007).

Por outro lado, existem vários kits comerciais para a pesquisa de resíduos, que permitem fácil realização das análises, de uma forma rápida e mecanizada para análises em massa, sendo possível identificar diferentes substâncias, individualmente. No entanto, os custos para a sua aquisição são elevados, uma vez que são necessários diferentes kits para a identificação de diferentes princípios ativos, e em alguns casos, como os baseados no sistema ELISA, é preciso analisar uma grande quantidade de amostras ao mesmo tempo, para otimizar o seu uso.

### 1.3 VIGILÂNCIA SANITÁRIA DE ALIMENTOS

Embora as atividades de vigilância sanitária de alimentos no Brasil datem do século XVI, as atribuições e competências relacionadas a produtos de origem animal

somente foram estabelecidas em 1950, através da Lei nº 1.283 (BRASIL, 1950). Após a instauração do regime militar, vários decretos e decretos-lei foram publicados. O Decreto-Lei nº 986/69 (BRASIL, 1969) entendeu as atividades fiscalizadoras das autoridades federais, estaduais ou municipais de saúde a todos os estabelecimentos industriais ou comerciais envolvidos na fabricação, manipulação, beneficiamento, acondicionamento, conservação, transporte, depósito, distribuição ou venda de alimentos (SPISSO *et al.*, 2007).

Para se controlar os resíduos de substâncias de uso na agropecuária, bem como de poluentes ambientais em produtos de origem animal, foi criado o Programa Nacional de Controle de Resíduos Biológicos em Carnes (PNCRBC) do Ministério da Agricultura, através da Portaria nº 86/79 (SPISSO *et al.*, 2007).

Na década de 80, com a retomada da democracia, os PROCONs e o Instituto Brasileiro de Defesa do Consumidor (IDEC) começaram a modificar a percepção de risco dos consumidores, transformando-se em fortes aliados da vigilância sanitária na proteção à saúde. Na década de 90, a partir do Código de Defesa do Consumidor e da Lei Orgânica da Saúde as regulamentações incorporaram novas ações e o conceito de “risco” pela vigilância.

A criação do Mercosul em 1991 estimulou a atividade regulatória e em 1992 foi criado o grupo *Ad Hoc* “Resíduos de Medicamentos Veterinários em Alimentos” para subsidiar a Comissão de Alimentos, subordinada ao Subgrupo de Trabalho (SGT) Nº 3, “Regulamentos Técnicos e Avaliação da Conformidade”. Atualmente a coordenação da Comissão de Alimentos vem sendo feita de forma conjunta entre a Secretaria de Defesa Agropecuária do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) e a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). As recomendações dos SGTs são encaminhadas ao Grupo Mercado Comum (GMC) como Resoluções para aprovação, após o instrumento de consulta interna nos Estados Partes. Uma vez aprovadas, as resoluções GMC devem ser incorporadas ao ordenamento jurídico de cada país (SPISSO *et al.*, 2007).

Em 2000 a ANVISA instituiu um Grupo de Trabalho (GT) sobre medicamentos veterinários em alimentos (ANVISA, 2000). Dois programas de monitoramento, o Programa Nacional de Controle de Resíduos de Medicamentos Veterinários em Alimentos Expostos ao Consumo (PAMVet) e o Programa Nacional de Monitoramento e Controle de Resistência Microbiana em Alimentos de Origem Animal Expostos ao Consumo (PREBAF) foram delineados. O GT sugeriu ainda a implementação de uma comissão técnica interministerial para avaliar o potencial impacto à saúde humana decorrente do uso de medicamentos veterinários, o desenvolvimento de iniciativas para a execução de programas de farmacovigilância e farmacoepidemiologia, a promoção de ações educativas voltadas para

a adesão e aplicação das Boas Práticas Veterinárias e o incentivo à realização de pesquisas científicas sobre resíduos de medicamentos veterinários e resistência microbiana (SPISSO *et al.*, 2007).

O PAMVet-PR foi criado pela Secretaria de Estado da Saúde do Paraná pela Resolução SESA n.º 337 de 30 de julho de 2003 (PARANÁ, 2003b). O programa é coordenado pela Divisão de Vigilância Sanitária de Alimentos do Departamento de Vigilância Sanitária e pelo Laboratório Central de Saúde Pública do Paraná, pertencentes a Superintendência de Vigilância em Saúde. Com o objetivo de implantar, acompanhar e avaliar as ações do Programa foi instituído o Grupo Técnico-Científico - GTC- PAMVet-PR, pela Resolução SESA n.º 338 de 30 de julho de 2003. O GTC é composto por representantes das seguintes Regionais de Saúde: 2ª (Metropolitana), 3ª (Ponta Grossa), 10ª (Cascavel), 14ª (Paranavaí), 15ª (Maringá), 16ª (Apucarana) e 17ª RS (Londrina) e pelas Universidades Estaduais de Londrina (UEL), Maringá (UEM), Oeste do Paraná (UNIOESTE) e Ponta Grossa (UEPG).

A partir de 2007, ingressaram no GTC, representantes da Divisão de Defesa Sanitária Animal (DDSA), do Serviço de Inspeção do Paraná (SIP) e do Centro de Diagnóstico Marcos Enriette (CDME) vinculados ao Departamento de Fiscalização e Defesa Agropecuária (DEFIS) da Secretaria de Estado da Agricultura e do Abastecimento e representante do Instituto Paranaense de Assistência Técnica e Extensão Rural (EMATER/PR). O objetivo geral do PAMvet-PR é avaliar continuamente os níveis de resíduos de medicamentos veterinários nos alimentos de origem animal, fortalecendo a capacidade do Governo no que se refere a atender a segurança alimentar, evitando possíveis danos à saúde da população. Na seleção de alimentos, levou-se em conta critérios de consumo alimentar, sendo prioritizados o leite bovino, carne de frango, carne bovina, carne suína, pescado, ovo de galinha e mel de abelha. Os critérios adotados na seleção dos medicamentos a serem investigados pelo programa são: medicamentos que deixam resíduos nos alimentos; cuja presença nos alimentos ofereçam um risco potencial à saúde humana; medicamentos utilizados na medicina veterinária que impliquem em alto potencial de exposição ao consumidor; e que haja disponibilidade de metodologia analítica confiável, sensível, prática e de custo acessível para a implantação de programas de controle (ANVISA, 2003).

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

- Avaliar a qualidade do leite pasteurizado produzido e comercializado no Estado do Paraná quanto a suas características físico-químicas, microbiológicas e presença de resíduos de antibióticos, em relação à legislação brasileira vigente.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar os parâmetros físico-químicos de amostras de leite pasteurizado de acordo com a metodologia preconizada pela Instrução Normativa 22/2003 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento;
- Avaliar os valores microbiológicos de leite pasteurizado de acordo com a metodologia preconizada pela Instrução Normativa 62/2003 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento;
- Analisar amostras de leite pasteurizado quanto à presença de resíduos dos antibióticos beta-lactâmicos, tetraciclinas e gentamicina utilizando os ensaios imunoenzimáticos tipo snap: New SNAP<sup>®</sup> Beta-Lactam Test, SNAP<sup>®</sup> Tetracycline Test e SNAP<sup>®</sup> Gentamicin Test, respectivamente;
- Analisar amostras de leite pasteurizado quanto à presença de resíduos dos antibióticos estreptomicina/diidroestreptomicina e neomicina utilizando os ensaios imunoenzimáticos comerciais Ridascreen<sup>®</sup> Streptomycin - R-Biopharm e Neomycin EIA<sup>®</sup> - Euro-Diagnostica, respectivamente.

### **3 ARTIGOS PARA PUBLICAÇÃO**

#### **ARTIGO A - AVALIAÇÃO DA QUALIDADE FÍSICO-QUÍMICA E MICROBIOLÓGICA DO LEITE PASTEURIZADO PRODUZIDO E COMERCIALIZADO NO ESTADO DO PARANÁ, BRASIL.**

##### **Resumo**

O leite é um item presente na dieta do consumidor, seja consumido de forma direta ou na forma de derivados lácteos, e também apresenta importante papel na economia nacional. Portanto, a qualidade do leite deve ser monitorada com a finalidade de garantir um produto adequado ao consumidor e à indústria. Durante o período de março de 2005 a outubro de 2006 foram coletadas 246 amostras de leite pasteurizado produzidas e comercializadas no Estado do Paraná, sendo 62 tipo C, 47 tipo B e 137 tipo Integral. As coletas foram realizadas nos laticínios produtores ou em entrepostos de comércio varejista, e enviadas para análise físico-química (n=246) e microbiológicas (n=123) de acordo com as normas estabelecidas pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (Instrução Normativa 22/2003 e 62/2003). Das 246 amostras analisadas para valores físico-químicos, 190 (77,2%) apresentaram alteração em pelo menos um dos valores, assim como 68 (55,3%) de 123 amostras quanto à qualidade microbiológica; estes apresentaram valores alterados principalmente quanto à presença de coliformes totais (49,5%). Com os resultados obtidos observa-se que a qualidade das amostras analisadas mostrou-se insatisfatória.

**Palavras-chave:** Leite pasteurizado. Análises físico-químicas. Avaliação microbiológica.

#### **EVALUATION OF PHYSICOCHEMICAL AND MICROBIOLOGICAL PARAMETERS OF PASTEURIZED MILK PRODUCED AND CONSUMED IN PARANÁ STATE, BRAZIL.**

##### **Abstract**

Milk features prominently in the diet of consumers, whether in liquid or industrialized dairy products, and it also has an important role in national economy. Therefore, milk quality must be monitored to guarantee an appropriate product to both consumers and industry. 246 samples of pasteurized milk produced and commercialized in Parana State were collected between March 2005 and October 2006, being 62 type C milk, 47 type B milk and 137 whole milk. The samples were collected from dairy plants or directly from markets, and sent for both physicochemical (n = 246) and microbiological (n = 123) analysis, in accordance with

Brazilian regulations (IN 22/2003 and IN 62/2003). 190 (77.2%) of 246 samples showed alterations in at least one physicochemical value and 68 (55.3%) of 123 samples on the microbiological quality, which had altered values especially regarding the presence of total coliforms (49.5%). These results prove the quality of the samples to be unsatisfactory.

**Keywords:** Pasteurized milk. Physical-chemical analyses. Evaluate microbiological.

## INTRODUÇÃO

O leite é definido como o produto oriundo da ordenha completa e ininterrupta, em condições de higiene, de vacas sadias, bem alimentadas e descansadas (BRASIL, 2002). É um alimento que apresenta em sua composição alto teor de proteínas, cálcio, vitaminas e sais minerais. Além de sua importância nutricional, o leite também representa um papel importante na economia brasileira, por sua alta comercialização e consumo, especialmente por crianças e idosos (GARRIDO *et al.*, 2001). No Estado do Paraná, no ano de 2006, a produção foi acima de 2,7 bilhões de litros de leite, levando o Estado à posição de segundo maior produtor brasileiro, seguindo o Estado de Minas Gerais, que apresentou produção de mais de sete bilhões de litros de leite (IBGE, 2006).

Na avaliação da qualidade do leite deve-se considerar características sensoriais, nutricionais, físico-químicas e microbiológicas, como sabor, valor nutritivo, ausência de agentes patogênicos e contaminantes, baixa contagem de células somáticas e carga microbiana (ZOCHE *et al.*, 2002). Os fatores mais relevantes quanto à qualidade físico-química do leite estão relacionados ao estado de conservação, tratamento térmico e integridade do produto, que podem ser alterados devido a fatores nutricionais, ambientais ou mesmo fraudes. Já a contaminação por altas contagens de microrganismos deterioradores e/ou patogênicos pode ser atribuída a deficiências no manejo e higiene durante a ordenha, a elevadas taxas de mastites, problemas com a correta desinfecção e manutenção de equipamentos e à falta de treinamento para os colaboradores (SANTOS *et al.*, 1981; FROEDER *et al.*, 1985; PADILHA; FERNANDES, 1999).

Trabalhos realizados com leite pasteurizado em diferentes regiões do país têm enfatizado o elevado percentual de amostras fora dos padrões microbiológicos e físico-químicos estabelecidos pela legislação em vigor (FREITAS *et al.*, 2002; MARQUES, COELHO; SOARES, 2005). É fundamental o controle higiênico-sanitário, desde a obtenção

de leite cru nas fazendas até a embalagem do produto final, pois a sua produção sob condições inadequadas de higiene torna-o veículo de transmissão de doenças à população consumidora (OLIVEIRA *et al.*, 1999).

A avaliação da qualidade físico-química e contaminação microbiológica de alimentos são parâmetros importantes para determinar sua vida útil, e também para que os mesmos não ofereçam riscos à saúde dos consumidores. Portanto, o presente trabalho objetivou avaliar as características físico-químicas e microbiológicas de amostras de leite pasteurizado produzido e consumido no Estado do Paraná e compará-las com os padrões estabelecidos pela legislação em vigor, visando verificar a qualidade do leite consumido pela população.

## MATERIAL E MÉTODOS

Durante o período de março de 2005 a outubro de 2006 foram coletadas 246 amostras de leite pasteurizado produzido e comercializado no Estado do Paraná, sendo 62 tipo C, 47 tipo B e 137 tipo Integral. As coletas foram realizadas nos laticínios produtores ou comércio varejista, por agentes de 14 Regionais da Secretaria da Saúde do Estado do Paraná: 1<sup>a</sup> (Paranaguá), 2<sup>a</sup> (Metropolitana), 3<sup>a</sup> (Ponta Grossa), 4<sup>a</sup> (Irati), 5<sup>a</sup> (Guarapuava), 6<sup>a</sup> (União da Vitória), 7<sup>a</sup> (Pato Branco), 9<sup>a</sup> (Foz do Iguaçu), 12<sup>a</sup> (Umuarama), 16<sup>a</sup> (Apucarana), 17<sup>a</sup> (Londrina), 18<sup>a</sup> (Cornélio Procópio), 19<sup>a</sup> (Jacarezinho) e 22<sup>a</sup> (Ivaiporã).



## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Das 246 amostras analisadas, 190 (77,2%) apresentaram pelo menos um dos parâmetros físico-químicos alterados. É um resultado acima do encontrado por Hoffmann *et al.* (1999) que, analisando leite pasteurizado tipo C comercializado em São José do Rio Preto - SP, constataram que 57% do total de amostras estavam em desacordo com a legislação. Garrido *et al.* (2001) e Santos *et al.* (1999) também apresentam valores menores de irregularidades nas amostras de leite avaliadas (30% e 25%, respectivamente).

A tabela 1 apresenta o número de amostras com parâmetros alterados, de acordo com o exame realizado. Nas amostras analisadas, os parâmetros com maior frequência de valores alterados em relação à legislação vigente foram ESD (42,68%), seguida de crioscopia (28,04%), acidez (21,54%), peroxidase (15,85%) e EST (15,44%).

**Tabela 1** – Percentagem de alterações nos valores de parâmetros físico-químicos<sup>1</sup> em 246 amostras de leite pasteurizado coletadas no Estado do Paraná entre março de 2005 e outubro de 2006.

Análise realizada	Nº de amostras alteradas
Acidez	53 (21,54%)
Gordura	22 (8,94%)
Densidade	8 (3,25%)
Extrato Seco Total	38 (15,44%)
Extrato Seco Desengordurado	105 (42,68%)
Crioscopia	69 (28,04%)
Fosfatase	5 (2,03%)
Peroxidase	39 (15,85%)
Proteína	15 (6,09%)
Lactose	0 (0%)

<sup>1</sup>parâmetros preconizados pela Instrução Normativa 51/2002.

Das amostras analisadas, 69 (28,04%) amostras apresentaram alteração na crioscopia (ponto de congelamento do leite), o que sugere uma alteração na quantidade de água permitida no leite. Padilha *et al.* (1999) e Zocche *et al.* (2002), analisando este mesmo parâmetro, encontraram valores de 62,1% e 37,5% de alteração, respectivamente.

A acidez do leite é ocasionada principalmente pela multiplicação de coliformes e bactérias ácido-lático, que degradam a lactose e liberam ácido lático como substrato. Deste modo, a acidificação do leite poderia estar associada a baixas condições de manejo higiênico-sanitárias durante a ordenha. Foram encontradas 53 (21,54%) amostras alteradas na análise da acidez do leite. Este resultado é superior aos 15% encontrados por Beloti *et al.* na cidade de Londrina, PR (1996) e à média de 12,5% encontrada por Zocche *et al.* (2002)

Os parâmetros de peroxidase apresentaram-se alterados em 39 (15,85%) amostras. É um resultado menor que descrito por Lima *et al.* (2001), que encontraram 42,1% para leite tipo B; Sena *et al.* (2001) encontraram até 47% de alterações neste parâmetro, e Zocche *et al.* (2002), 30%. Tal resultado indica uma falha no processo de pasteurização, ocorrendo um superaquecimento do leite. Zoche *et al.* (2002) sugerem ainda que em alguns casos o superaquecimento do leite é uma fraude intencional, com o objetivo de mascarar uma alta carga microbiana da matéria-prima, podendo ser em outros acidental, causada por desregulagem do pasteurizador. Cinco (2,03%) das amostras analisadas apresentaram fosfatase positiva, indicando também uma falha na pasteurização, porém neste caso o leite não atinge a temperatura devida. Com isso, microrganismos que deveriam ser inativados pelo processo térmico permanecem no leite, podendo causar menor vida de prateleira do produto ou infecções no consumidor.

**Tabela 2** – Características físico-químicas<sup>1</sup> de 246 amostras de leite pasteurizado coletadas entre março de 2005 a outubro de 2006 no Estado do Paraná, analisadas de acordo com a metodologia indicada na Instrução Normativa 22/2003 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (BRASIL, 2003)

Análise	Leite tipo C (n=62)		Leite tipo B (n=47)		Leite tipo Integral (n=137)	
	Média	Desvio padrão	Média	Desvio padrão	Média	Desvio padrão
Acidez	18,81	2,54	16,57	1,67	16,54	1,94
Gordura	3,46	0,48	3,51	0,57	3,45	0,62
Densidade	1030,66	1,14	1030,95	1,31	1030,35	1,62
EST	11,94	0,57	11,98	0,74	11,81	0,65
ESD	8,49	0,27	8,50	0,35	8,35	0,35
Crioscopia	-0,534	0,01	-0,530	0,01	-0,532	0,01
Proteína	3,06	0,09	3,26	0,12	3,09	0,30
Lactose	4,59	0,14	4,61	0,19	4,56	0,45

<sup>1</sup>parâmetros preconizados pela Instrução Normativa 51/2002.

A tabela 2 apresenta as características físico-químicas das amostras analisadas de acordo com o tipo de leite. Observa-se que ocorrem valores alterados nos três tipos de leite. No entanto, apenas 12 amostras de leite tipo C (19%), 13 de leite tipo B (27%) e 31 de leite integral (22,6%) estão dentro dos padrões para todos os itens analisados. O número de amostras alteradas é superior ao encontrado por Garrido *et al.* (2001), que encontraram maiores alterações em leite tipo B (37,2%) e Integral (30,9%).

O resultado das análise microbiológicas também indica um elevado número de amostras fora dos parâmetros aceitáveis pela legislação. Das 123 amostras analisadas, 68 (55,3%) apresentaram pelo menos uma das contagens microbianas alteradas. É um resultado preocupante, pois indica uma falha na cadeia produtiva do leite que pode ter sérias repercussões ao consumidor e à indústria. Nader Filho *et al.* (1989) sugerem que, como o processo de pasteurização não elimina totalmente os microrganismos mesófilos, amostras que apresentam alterações nos índices deste grupo de microrganismos são provavelmente

provenientes de matéria prima contaminada, já que a carga microbiana final é influenciada pela carga microbiana inicial.

**Tabela 3** - Percentagem de alterações microbiológicas<sup>1</sup> em 123 amostras de leite pasteurizado coletadas no Estado do Paraná no período de março de 2005 a outubro de 2006, analisadas de acordo com a metodologia indicada na Instrução Normativa 62/2003 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (BRASIL, 2003)

Análise	Leite tipo C (n=30)	Leite tipo B (n=30)	Leite tipo Integral (n=63)	Total (n=123)
Aeróbios Mesófilos	5 (16%)	5 (16%)	22 (34%)	32 (26,0%)
Coliformes Totais	15 (50%)	14 (46%)	32 (50%)	61 (49,5%)
Coliformes Termotolerantes	5 (16%)	3 (10%)	10 (15%)	18 (14,4%)

<sup>1</sup>parâmetros preconizados pela Instrução Normativa 51/2002.

As alterações microbiológicas encontradas neste estudo são superiores aos encontrados por Garrido *et al.* (2001), que encontraram valores de 32,5%, 32,6% e 31,0% para leite tipo C, B e integral, respectivamente, em leites provenientes de mini e micro-usinas da região de Ribeirão Preto (SP). Nader Filho *et al.* (1996) observaram que 18,75% e 41,25% de amostras de leite tipo B e C estavam fora dos padrões em usinas do Estado de São Paulo.

Avaliando amostras de leite tipo C, Belmont e Lago (2004) detectaram 18,6%, 25,6%, e 30,2% de amostras fora do padrão microbiológico para aerófilos mesófilos (AM), coliformes totais (CT) e coliformes termotolerantes (CTT), respectivamente. Pereira *et al.* (2006), encontraram alterações de 3,3%, 23,3% e 35% para AM, CT e CTT. Já Carvalho *et al.* (2004) encontraram 83,3% para AM e 10% para CT. Silva *et al.* (2008) analisaram 348 amostras e encontraram alterações em 87 (25,0%), 182 (52,3%) e 194 (55,7%) para AM, CT e CTT, respectivamente.

Embora a falha na pasteurização seja uma das causas prováveis da presença de microrganismos no leite, acima dos limites tolerados, deve-se também considerar a possibilidade de recontaminação do leite após a pasteurização, que pode ocorrer devido a deficiências na limpeza dos equipamentos, qualidade inadequada da água usada para limpeza ou falta de treinamento dos operadores de equipamentos. Outra possibilidade a ser considerada é a falha na inspeção do leite durante a cadeia de produção.

## CONCLUSÕES

A qualidade físico-química e microbiológica do leite analisado neste estudo não foi satisfatória, pois grande porcentagem das amostras apresentou-se fora dos padrões estabelecidos.

ESD, crioscopia, acidez e peroxidase totais foram os principais parâmetros físico-químicos alterados, assim como o número de coliformes totais.

## REFERÊNCIAS

BELOTI, V. *et al.* Aspectos físico-químicos do leite pasteurizado tipo C consumido na cidade de Londrina. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA, 24. 1996. **Anais...** Goiânia: Sociedade Goiana de Veterinária, 1996, p. 205.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 51 de 18 de setembro de 2002. Regulamento Técnico de Produção, Identidade e Qualidade de Leite Tipo A, Tipo B, Tipo C e Cru refrigerado. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, 29 set. 2002, p.13, Seção 1.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 22 de 14 de abril de 2003. Oficializar os Métodos Analíticos Oficiais Físico-Químicos, para Controle de Leite e Produtos Lácteos. **Diário Oficial da União**, Brasília, 02 maio 2003, p.3, Seção 1.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 62 de 26 de agosto de 2003. Oficializar os Métodos Analíticos Oficiais para Análises Microbiológicas para Controle de Produtos de Origem Animal e Água. **Diário Oficial da União**, Brasília, 18 setembro 2003, p.14, Seção 1.

CARVALHO, M. G. X. *et al.* Análise microbiológica do leite in natura e pasteurizado tipo C proveniente de uma mini-usina da cidade de Patos, Paraíba. **Higiene Alimentar**, v.18 , n. 123, p. 62-66, 2004.

FREITAS, J. de A. *et al.* Características físico-químicas e microbiológicas do leite fluido exposto ao consumo na cidade de Belém, Pará. **Revista Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 16, n. 100, p. 89-96, 2002.

FROEDER, E; PINHEIR, A. J. R.; BRANDÃO, S. C. C. Variação da qualidade microbiológica de leite cru tipo "C" da Região de Viçosa. **Ver. Inst. Latic. Cândido Tostes**, v. 40, n. 241, p 55-68, 1985.

GARRIDO, N. S. *et al.* Avaliação da qualidade físico-química e microbiológica do leite pasteurizado proveniente de mini e micro-usinas de beneficiamento da região de Ribeirão Preto/SP. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 60, n. 2, p. 141-146, 2001.

HOFFMAN, F.L. *et al.* Microbiologia do Leite Pasteurizado Tipo “C” comercializado na região de São José do Rio Preto – SP. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 13, n. 65, p. 51-54, 1999.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Produção da Pecuária Municipal 2006**. Disponível em <<http://www.ibge.gov.br/estadosat/temas.php?sigla=pr&tema=pecuaria2006>>. Último acesso em 01 jul. 2008.

LIMA, J. G. P. *et al.* Detecção da peroxidase para avaliação da pasteurização recomendada para leite. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA, 21. 2001, Foz do Iguaçu. **Resumos...** Foz do Iguaçu: SBM, 2001, p.375.

MARQUES, M. da S.; COELHO, L. B. JR.; SOARES, P. C. Avaliação da qualidade microbiológica do leite pasteurizado tipo C processado no estado de Goiás. In: CONGRESSOS LATINO-AMERICANO, 2., Brasileiro de Higienistas de Alimentos, 8., 2005, Rio de Janeiro. **Anais...** São Paulo: Higiene Alimentar, 2005.

NADER FILHO, A.; JÚNIOR, O. D. R.; SCHOKEN-ITURRINO, R. P. Avaliação das características microbiológicas do Leite Tipo B em diferentes pontos do fluxograma de beneficiamento. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 41, n. 1, p. 7-16, 1989.

NADER FILHO, A. *et al.* Características microbiológicas do leite pasteurizado dos tipos B e C processado por algumas usinas de beneficiamento do Estado de São Paulo. **Higiene Alimentar**, n. 10, v. 43, p. 30-33, 1996.

OLIVEIRA, C. A. F.; FONSECA, L. F. L.; GERMANO, P. M. L. Aspectos relacionados à produção, que influenciam a qualidade do leite. **Higiene Alimentar**, v. 13, n. 62, p. 10-16, 1999.

PADILHA, M. R. F.; FERNADEZ, Z. F. Avaliação higiênico-sanitária do leite “C” comercializado no Recife – PE. **Higiene Alimentar**, v. 13, n. 61, p. 105-109, 1999.

PARANÁ. Secretaria da Saúde do Estado do Paraná. **(Mapa) Regionais de Saúde**. Disponível em <<http://www.saude.pr.gov.br/modules/conteudo/conteudo.php?conteudo=1546>>. Último acesso em 10 jul 2008.

PEREIRA, L. T. P. *et al.* Avaliação dos indicadores de qualidade do leite pasteurizado tipo C comercializado em Ponta Grossa, Paraná. **Higiene Alimentar**, v. 20, n. 147, p. 83-89, 2006.

SANTOS, E. C.; XAVIER, A. T. V.; PASSOS, L. A. S. Aparente deflexão sazonal de alguns constituintes do leite no início da primavera. **Ver. Inst. Latic. Cândido Tostes**, v. 36, n. 215, p. 9-15, 1981.

SANTOS, C. C. M. *et al.* Avaliação microbiológica e físico-química do leite pasteurizado e comercializado na região de São José do Rio Preto/SP. **Rev. Instituto Adolfo Lutz**, v. 58, n. 1, p. 85-89, 1999.

SENA, M. J. *et al.* Avaliação da qualidade do leite tipo B comercializado em Recife. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA, 21. 2001, Foz do Iguaçu. **Resumos...** Foz do Iguaçu: SBM, 2001, p.386.

SILVA, M. C. D. da *et al.* Caracterização microbiológica e físico-química de leite pasteurizado destinado ao programa do leite no Estado de Alagoas. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, Campinas, v.28, n.1, 2008.

TRONCO, V. M. **Manual para inspeção da qualidade do leite**. Santa Maria: Universidade Federal de Santa Maria, 1997. 166 p.

ZOCHE, F. *et al.* Qualidade microbiológica e físico-química do leite pasteurizado produzido na região oeste do Paraná. **Archives of Veterinary Science**, v. 7, n. 2, p. 59-67, 2002.

## **ARTIGO B - DETERMINAÇÃO DE RESÍDUOS DE ANTIBIÓTICOS EM LEITE PASTEURIZADO PRODUZIDO E CONSUMIDO NO ESTADO DO PARANÁ, UTILIZANDO-SE MÉTODOS SNAP TEST E ELISA**

### **Resumo**

O leite é um alimento de elevado valor nutricional e importante papel na economia brasileira. Por ser passível de adulterações e contaminações, é necessário um monitoramento de sua qualidade, para garantir um produto final adequado e sem riscos à população. Durante o período de março de 2005 a setembro de 2007 foram analisadas 252 amostras de leite pasteurizado produzido e pasteurizado no Estado do Paraná, como parte do Programa Estadual de Controle de Resíduos de Medicamentos Veterinários em Alimentos de Origem Animal – PAMVET/PR. As análises foram realizadas por meio de testes imunoenzimáticos SNAP<sup>®</sup> para detecção de resíduos de gentamicinas,  $\beta$ -lactâmicos e tetraciclinas, e por kits de ELISA comerciais para detecção de estreptomicinas e neomicinas. As amostras analisadas quanto à presença de  $\beta$ -lactâmicos, tetraciclinas e gentamicina apresentaram positividade de 5 (2,0%), 60 (23,8%) e 4 (1,58%) respectivamente. As estreptomicinas e neomicinas apresentaram positividade de 7 (2,8%) e 25 (9,9%), porém os níveis encontrados se apresentam dentro dos limites estabelecidos pela legislação brasileira.

**Palavras-chave:** Leite. Resíduos de antibióticos. ELISA. SNAP.

## **DETERMINATION OF ANTIBIOTIC RESIDUES IN MILK PRODUCED AND CONSUMED IN PARANA STATE, USING SNAP AND ELISA ASSAYS**

### **Abstract**

Milk is a food of high nutritional value and important role in Brazilian economy. It is also susceptible to tampering and contamination, which makes quality monitoring a necessity, to ensure an adequate and risk-free final product to the population. 252 samples of pasteurized milk produced in Parana State were examined between March 2005 and September 2007, as part of the National Program of Veterinary Drugs Residues Analysis in Food (PAMVet). The analyses were performed by immunoenzymatic assays. The samples were analyzed for the presence of  $\beta$ -lactam, tetracycline and gentamicin, of which 5 (2.0%), 60 (23.8%) and 4 (1.58%) were positive. Streptomycin and neomycin were positive in 7 (2.8%) and 25 (9.9%), of the samples respectively, but their values are within the limits set by Brazilian legislation.

**Keywords:** Milk. Antibiotic residues. ELISA. SNAP.

## INTRODUÇÃO

Segundo o *Codex Alimentarius*, resíduo de uma droga veterinária é a fração da droga, de seus metabólitos, produtos de conversão ou reação, e impurezas que permanecem no alimento originário de animais tratados com tais drogas (BRASIL, 1999).

O uso de antimicrobianos na produção animal tem sido motivo de preocupação das autoridades de diversos países, especialmente quanto aos aspectos da segurança dos alimentos de origem animal para a saúde pública e para a comercialização. O leite contendo tais resíduos é considerado impróprio para utilização, podendo acarretar em perda total para o produtor. Portanto, recomenda-se medidas de monitoramento quanto à presença de resíduos, tendo como referência os valores estabelecidos pela legislação brasileira e internacional.

Os antimicrobianos podem estar presentes no leite devido à introdução voluntária e/ou fraudulenta, visando melhorar a qualidade bacteriológica do leite cru. Mas o fato que mais contribui para o surgimento desses produtos no leite é o tratamento de doenças infecciosas do gado de leite, especialmente a mastite, sem respeitar o período de carência dos antimicrobianos. A utilização inadequada, a não-observação do período de carência desses produtos, a falta de informação de produtores e funcionários, a falta de assistência veterinária, a limpeza inadequada de equipamentos, a mistura de leites contaminados e não contaminados e a falha na fiscalização também são fatores que contribuem para a contaminação do leite (TENÓRIO, 2007).

A realização de testes de triagem apropriados para determinar resíduos, assim como a adoção de práticas sanitárias, podem ajudar na manutenção da segurança do leite. Devido à grande importância nutricional do leite e sua relação com a saúde do consumidor, é necessário o controle da presença de resíduos de antimicrobianos nesse produto, a fim de garantir sua qualidade (LOPES *et al.*, 1998).

O PAMVet-PR foi criado pela Secretaria de Estado da Saúde do Paraná pela Resolução SESA n.º 337 de 30 de julho de 2003. O programa é coordenado pela Divisão de Vigilância Sanitária de Alimentos do Departamento de Vigilância Sanitária e pelo Laboratório Central de Saúde Pública do Paraná, pertencentes a Superintendência de Vigilância em Saúde. O objetivo geral do PAMvet-PR é avaliar continuamente os níveis de resíduos de medicamentos veterinários nos alimentos de origem animal, fortalecendo a capacidade do Governo no que se refere a atender a segurança alimentar, evitando possíveis danos à saúde da população.

Este trabalho teve por objetivo analisar amostras de leite pasteurizado produzido e comercializado no Estado do Paraná, utilizando-se das técnicas imunoenzimáticas SNAP<sup>®</sup> e ELISA, para a detecção de resíduos de antibióticos, como parte do PAMVet-PR.

## MATERIAL E MÉTODOS

Durante o período de março de 2005 a setembro de 2007 foram analisadas 252 amostras de leite pasteurizado produzido no Estado do Paraná. As coletas foram realizadas nos laticínios produtores ou em entrepostos de comércio varejista, por agentes de 14 Regionais da Secretaria da Saúde do Estado do Paraná: 1<sup>a</sup> (Paranaguá), 2<sup>a</sup> (Metropolitana), 3<sup>a</sup> (Ponta Grossa), 4<sup>a</sup> (Irati), 5<sup>a</sup> (Guarapuava), 6<sup>a</sup> (União da Vitória), 7<sup>a</sup> (Pato Branco), 9<sup>a</sup> (Foz do Iguaçu), 12<sup>a</sup> (Umuarama), 16<sup>a</sup> (Apucarana), 17<sup>a</sup> (Londrina), 18<sup>a</sup> (Cornélio Procopio), 19<sup>a</sup> (Jacarezinho) e 22<sup>a</sup> (Ivaiporã).

As amostras foram embaladas em envelopes lacrados, acondicionadas em recipientes térmicos e enviadas para análise sob refrigeração, acompanhadas de um Termo de Apreensão de Amostras (TAA). Amostras recebidas em recipientes violados, ou fora da temperatura de resfriamento foram rejeitadas, procedendo-se uma nova coleta de material.

A determinação de resíduos do grupo dos  $\beta$ -lactâmicos (amoxicilina, ampicilina, cefapirina, ceftiofur e penicilina G), do grupo das tetraciclina (tetraciclina, oxitetraciclina e clortetraciclina) e de gentamicina foi realizada com os kits New SNAP<sup>®</sup> Beta-Lactam Test, SNAP<sup>®</sup> Tetracycline Test e SNAP<sup>®</sup> Gentamicin Test (Idexx Laboratories<sup>®</sup>, USA), respectivamente. É um teste qualitativo, com interpretação automatizada (SNAPshot Reader) ou visual, pela comparação de cores entre a amostra e um controle. Os limites de detecção para interpretação visual para os  $\beta$ -lactâmicos são amoxicilina: 6,9 $\mu$ g/Kg; ampicilina: 6,2 $\mu$ g/Kg; cefapirina: 11,9 $\mu$ g/Kg; ceftiofur: 5,9 $\mu$ g/Kg e penicilina G: 3,1 $\mu$ g/Kg.

Os limites de detecção para tetraciclina, oxitetraciclina, clortetraciclina e gentamicina são de 20, 30,50 e 30 $\mu$ g/Kg, respectivamente.

As análises para estreptomicinas foram realizadas com o kit de ELISA comercial Ridascreen<sup>®</sup> Streptomycin - R-Biopharm, com limite de detecção em leite de 20 $\mu$ g/L. Os exames foram realizados de acordo com as instruções do fabricante, e os cálculos para quantificação dos resultados são realizados no programa RidaSoft Win<sup>®</sup> (R-Biopharm), fornecido junto com os kits de ELISA.

As análises para neomicina foram realizadas com o kit de ELISA comercial Neomycin EIA<sup>®</sup> - Euro-diagnostica/The Netherlands, com limite de detecção de 18µg/L. Os exames também foram realizados de acordo com as instruções do fabricante, e os cálculos para quantificação dos resultados foram realizados em planilha de Excel<sup>®</sup> (Microsoft<sup>®</sup>). Ambos os kits de ELISA são ensaios competitivos.

## RESULTADOS

Entre os resíduos analisados, a maior ocorrência foi para o grupo das tetraciclinas, encontradas em 60 (23,8%) amostras. Em seguida foram encontradas 25 (9,9%) de neomicinas, 7 (2,8%) de estreptomicinas, 5 (2,0%) de β-lactâmicos e 4 (1,6%) de gentamicinas.

Das 7 amostras positivas para estreptomicina, apenas uma apresentou valor elevado, de 415,38µg/Kg, que é acima do Limite Máximo de Resíduos (LMR) determinado pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (BRASIL, 2003). E apesar do porcentual elevado de amostras positivas para neomicina, nenhuma delas apresentou níveis acima do LMR.

Das 252 amostras analisadas, 72 (28,6%) apresentam contaminação por pelo menos um tipo de antibiótico. Foi observada a presença de dois antibióticos (β-lactâmicos e tetraciclina) em três amostras (0,8%), e a presença de resíduos de quatro antibióticos (β-lactâmicos, tetraciclina, estreptomicina e neomicina) em uma amostra (0,4%).

**Tabela 1** - Porcentagem de resíduos de antimicrobianos em amostras de leite pasteurizado produzido e comercializado no Estado do Paraná, analisadas durante o período de março de 2005 a setembro de 2007, e Limites Máximos de Resíduos (LMRs) permitidos para cada substância no leite.

Antimicrobiano	Amostras avaliadas	Amostras positivas (%)	LMR ( $\mu\text{g}/\text{Kg}$ )*
Estreptomicinas	252	7 (2,8%)	200
Neomicina	252	25 (9,9%)	500
$\beta$ -lactâmicos	252	5 (2,0%)	4
Tetraciclinas	252	60 (23,8%)	100
Gentamicina	252	4 (1,6%)	-

\* BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. 2003. **Programa Nacional de Análise de Resíduos de Medicamentos Veterinários em Alimentos de Origem Animal: PAMVet**

## DISCUSSÃO

A presença de resíduos de antimicrobianos em leite constitui um risco à saúde do consumidor, além de poder causar prejuízos na indústria. Vários trabalhos estão sendo realizados ao longo do tempo, a fim de realizar um levantamento da qualidade do leite consumido no país.

Pereira (2006), pesquisando a presença de substâncias inibidoras, não encontrou resíduos em nenhuma das 60 amostras de leite pesquisadas. Lopes *et al.* (1998) analisaram 178 amostras de leite comercializados na cidade de Campinas (SP) utilizando o Delvotest-P, um kit com o princípio de inibição de crescimento bacteriano, encontrando 7,9% de amostras contaminadas. Borges *et al.* (2000) também encontraram valores baixos, pois ao investigar 533 amostras de leite no Estado de Goiás através do teste de difusão em ágar encontraram apenas 9,95% de positividade, assim como Nero *et al.* (2007) que observaram uma ocorrência de 11,5% nas amostras de leite provenientes de quatro estados, analisadas com o kit de inibição de crescimento Charm-test,. Por outro lado, Barros *et al.* (2001) encontraram valores mais elevados de amostras alteradas, 38,5%, com o teste de difusão em ágar. As diferenças entres os resultados podem ocorrer devido aos diferentes testes utilizados,

que apresentam diferentes sensibilidades. Nos trabalhos acima mencionados, embora a presença de inibidores seja verificada, não foi possível a identificação de princípios ativos específicos.

Os valores observados de  $\beta$ -lactâmicos são inferiores aos relatados por Folly e Machado (2001), que encontraram 4,33% amostras contaminadas, assim como Rosário (2002), que observou 8,2% de positividade. Couto e Tórtora (2005) encontraram 22% de amostras positivas para penicilina, valor este superior ao mencionado neste trabalho. Já Nascimento *et al.* (2001), encontraram valores elevados de contaminação por resíduos de  $\beta$ -lactâmicos (34,8%).

Assim como no presente estudo, Medeiros *et al.* (2004) observaram uma alta taxa de contaminação de amostras por antibióticos (43,33%), principalmente a tetraciclina, e um nível inexistente de contaminação por  $\beta$ -lactâmicos na Paraíba. Segundo os autores, essa diferença é explicada pelo comércio local, que fornece mais medicamentos à base de tetraciclinas que outras substâncias. Pontes Netto *et al.* (2005) observaram que as tetraciclinas estão entre os fármacos mais mencionados no uso junto ao rebanho leiteiro do Estado do Paraná. Segundo Folly *et al.* (1997), o nível de contaminação por resíduos de tetraciclinas pode ser relacionado com o amplo uso dessas drogas por via parenteral, principalmente em formulações de longa duração, em substituição a  $\beta$ -lactâmicos no tratamento de mastite. No entanto o programa PAMVet (BRASIL, 2005), ao analisar 307 amostras de leite, encontrou 7% de positividade, e Folly e Machado (2001) encontraram 1,66% de amostras positivas analisadas no Rio de Janeiro.

Neste estudo foram encontradas 25 (9,9%) de amostras positivas para neomicina, um valor inferior ao encontrado pelo PAMVet (BRASIL, 2005), que foi de 16%. No entanto, assim como o programa, os valores encontrados estavam abaixo dos LMRs. O PAMVet também analisou 276 amostras de leite UHT e 32 de leite em pó para detecção de estreptomicinas, mas não encontrou valores acima do LMR, assim como Haasnoot *et al.* (1999), que analisaram 776 amostras de leite, porém nenhuma amostra apresentou valores de resíduos de estreptomicina acima dos LMRs. Foi um resultado diferente do observado por Couto e Tórtora (2005), que encontraram 6% de positividade, e o presente estudo, que identificou uma amostra acima do LMR.

A legislação brasileira ainda não determinou o LMR para gentamicina, embora o *Codex Alimentarius* (1996) determine o valor de 200 $\mu$ g/Kg. Existem poucos relatos de contaminação do leite por resíduos de gentamicina, que está sendo introduzido ao programa PAMVet.

Os resultados obtidos neste estudo demonstram a presença de resíduos de antimicrobianos no leite pasteurizado produzido no Estado do Paraná. Isso reforça a necessidade de monitoramento constante durante toda a cadeia produtiva do leite, para assegurar um produto de qualidade e livre de resíduos para a população.

#### REFERÊNCIAS

- BARROS, G. M. S. *et al.*, 2001. Pesquisa de resíduos de antibióticos em leite pasteurizado tipo C, comercializado na cidade de Salvador. **Rev. Bras. de Saúde e Produção Animal**, v. 2, n. 3, p. 69-73.
- BORGES, G. *et al.*, 2000. Ocorrência de resíduos de antibióticos em leite pasteurizado integral e padronizado produzido e comercializado no Estado de Goiás. **Ciência Animal Brasileira**, v. 1, n. 1, p.59-63.
- BRASIL. ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. 2003. **Programa Nacional de Análise de Resíduos de Medicamentos Veterinários em Alimentos Expostos ao Consumo**: PAMVet. Brasília, nov/2003. Disponível em <<http://www.anvisa.gov.br/alimentos/pamvet/pamvet.pdf>> Último acesso em 01 jul. 2008.
- BRASIL. ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. 2005. **Programa Nacional de Análise de Resíduos de Medicamentos Veterinários em Alimentos de Origem Animal**: PAMVet. Relatório 2004/2005 - Monitoramento de Resíduos em Leite Exposto ao Consumo. Disponível em: <[https://www.anvisa.gov.br/alimentos/pamvet/relat%F3rio\\_leite\\_2004-05.pdf](https://www.anvisa.gov.br/alimentos/pamvet/relat%F3rio_leite_2004-05.pdf)> Acesso em: 01 jul. 2008.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 1999. **Instrução Normativa nº 42, de 20 de dezembro de 1999**, que altera o Plano Nacional de Controle de Resíduos em Produtos de Origem Animal – PNCR. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 22 dez 1999. Seção 1, página 13. Disponível em <<http://www.agricultura.gov.br/pls/portal/url/ITEM/2FA9F8BE3B86F344E040A8C0750275B7>> Acesso em: 01 jul. 2008.
- CODEX Committee on residues of veterinary drugs in food. 1996. IDF News - News from Codex. **Bulletin of the International Dairy Federation (IDF)**, n.317, 9 p.
- COUTO, C. R. A.; TÓRTORA, J. C. O., 2005. Leite, um alimento nem sempre perfeito: resíduos de antibióticos. **J. Bras. Med.**, n. 89, v. 2, p. 45-50
- FOLLY, M. M.; MACHADO, S. C. A., 2001. Determinação de resíduos de antibióticos, utilizando-se métodos de inibição microbiana, enzimático e imuno-ensaios no leite pasteurizado comercializado na Região Norte do Estado do Rio de Janeiro, Brasil. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 31, n. 1, p. 95-98.

FOLLY, M. M. *et al.*, 1997. **Controle da mamite subclínica no rebanho leiteiro da Região Norte e Noroeste do Estado do Rio de Janeiro**. Rio de Janeiro: L.S.A./C.C.T.A. Universidade Estadual do Norte Fluminense. 20 p. (Boletim Técnico, 4)

HAASNOOT, W. *et al.*, 1999. Immunochemical detection of aminoglycosides in milk and kidney. **Analyst**, v. 124, n. 3, p. 301-305.

LOPES, L. T. *et al.*, 1998. Detecção de resíduos de antibióticos em leite comercializado na cidade de Campinas. **Rev. Inst. Laticínios Cândido Tostes**, v. 53, n. 301-303, p. 64-67.

NASCIMENTO, G. G. F. *et al.*, 2001. Ocorrência de resíduos de antibióticos no leite comercializado em Piracicaba, SP. **Revista de Nutrição**. v. 14, n. 2, p. 119-124.

NERO, L. A. *et al.*, 2007. Resíduos de antibióticos em leite cru de quatro regiões leiteiras no Brasil. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 27, n. 2, p. 391-393.

PARANÁ (Estado) **Resolução SESA nº 0337, de 30 de julho de 2003**. Institui o Programa Estadual de Controle de Resíduos de Medicamentos Veterinários em Alimentos de Origem Animal – PAMVET/PR. Disponível em:  
<<http://www.saude.pr.gov.br/arquivos/File/pamvet/03RPR0337PAMvet.doc>>. Acesso em: 10 jul. 2008.

PEREIRA, L. T. P. *et al.*, 2006. Avaliação dos indicadores de qualidade do leite pasteurizado tipo C comercializado em Ponta Grossa, Paraná. **Higiene Alimentar**, v. 20, n. 147, p. 83-89.

PONTES NETTO, D. *et al.*, 2005. Levantamento dos principais fármacos utilizados no rebanho leiteiro do Estado do Paraná. **Acta Scientiarum: Animal Sciences**, v. 27, n. 1, p. 145-151.

ROSÁRIO, T. R. 2002. **Avaliação da presença de resíduos de antibióticos no leite comercializado no município de Pirassununga, SP**. 2002. 90f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) - Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2002.

TENÓRIO, C. G. M. S. C. **Avaliação da eficiência do teste COPAN (microplate e single) na detecção de resíduos de antimicrobianos no leite**. 2007. 71f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2007.

#### 4 CONCLUSÕES

- A alta porcentagem de alteração nos valores encontrados nas análises físico-químicas e microbiológicas demonstram que a qualidade do leite analisado está comprometida;
- Existe a contaminação por antibióticos beta-lactâmicos, tetraciclinas e gentamicinas no leite pasteurizado produzido no Estado do Paraná;
- Embora exista a contaminação por antibióticos estreptomicina e neomicina no leite pasteurizado produzido no Estado do Paraná, apenas 1 (14,28%) das amostras contaminadas por estreptomicina estava acima do LMR;
- É necessário um monitoramento constante para assegurar a qualidade do leite.

## REFERÊNCIAS

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (Anvisa). Resolução RDC nº 5. Cria Grupo de Trabalho sobre Medicamentos Veterinários em Alimentos. Diário Oficial da União, 27 jan 2000.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (Anvisa). **Programa Nacional de Análise de Resíduos de Medicamentos Veterinários em Alimentos Expostos ao Consumo - PAMVet**. Disponível em: <<https://www.anvisa.gov.br/alimentos/pamvet/pamvet.pdf>> Acesso em: 01 jul 2008.

BORGES, G. *et al.* Ocorrência de resíduos de antibióticos em leite pasteurizado integral e padronizado produzido e comercializado no Estado de Goiás. **Ciência Animal Brasileira**, v. 1, n. 1, p. 59-63, 2000.

BRASIL. Lei nº 1.283. Dispõe sobre a inspeção industrial e sanitária dos produtos de origem animal. Diário Oficial da União, 19 dez. 1950.

BRASIL. Decreto-lei nº 986. Institui normas básicas sobre alimentos. Diário Oficial da União, 21 out 1969.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Instrução Normativa nº 42, de 20 de dezembro de 1999**, que altera o Plano Nacional de Controle de Resíduos em Produtos de Origem Animal – PNCR. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 22 dez 1999. Seção 1, página 13. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/pls/portal/url/ITEM/2FA9F8BE3B86F344E040A8C0750275B7>> Acesso em: 01 jul. 2008.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Instrução Normativa nº 51 de 18 de setembro de 2002**. Regulamento Técnico de Produção, Identidade e Qualidade de Leite Tipo A, Tipo B, Tipo C e Cru refrigerado. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Brasília, 29 set. 2002, p.13, Seção 1.

BRITO, M. A. V. P. **Resíduos de antimicrobianos no leite**. Juiz de Fora: Embrapa Gado de Leite, 2000. 20 p.

BRITO, M. A. V. P. Resíduos de antibióticos no leite: um problema que tem solução. **Embrapa Gado de Leite**: artigos, 2006. Disponível em: <<http://www.cnp.gl.embrapa.br/nova/sala/artigos/artigolinha.php?id=20>>. Acesso em: 01 jul. 2008.

CERQUEIRA, M. M. O. P. Detecção de resíduos de antibióticos em leite - testes disponíveis e considerações. In: BRITO, J. R. F. **Diagnóstico da qualidade do leite, impacto para a indústria e a questão dos resíduos de antibióticos**. Juiz de Fora: Embrapa Gado de Leite, 2003, p. 77-87.

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

CULLOR, J. S. Tests for identifying antibiotic residues in milk: how well do they work? **Veterinary Medicine**, v. 87, n. 12, p. 1235-1241, 1992.

FOLLY, M. M.; MACHADO, S. C. A. Determinação de resíduos de antibióticos, utilizando-se métodos de inibição microbiana, enzimático e imuno-ensaios no leite pasteurizado comercializado na Região Norte do Estado do Rio de Janeiro, Brasil. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 31, n. 1, p. 95-98, 2001.

FRANCO, B. D. G. M. F.; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos Alimentos**. São Paulo: Livraria Atheneu, 2004. p. 83-92.

FREITAS, J. de A. *et al.* Características físico-químicas e microbiológicas do leite fluido exposto ao consumo na cidade de Belém, Pará. **Revista Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 16, n. 100, p. 89-96, 2002.

FROEDER, E; PINHEIR, A. J. R.; BRANDÃO, S. C. C. Variação da qualidade microbiológica de leite cru tipo "C" da Região de Viçosa. **Ver. Inst. Latic. Cândido Tostes**, v. 40, n. 241, p. 55-68, 1985.

GALLINA, D. A. **Avaliação de tratamentos térmicos industriais sobre resíduos inibidores presentes no leite utilizando o teste de inibição de iogurte**. 1997. 69 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 1997.

GARRIDO, N. S. *et al.* Avaliação da qualidade físico-química e microbiológica do leite pasteurizado proveniente de mini e micro-usinas de beneficiamento da região de Ribeirão Preto/SP. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 60, n. 2, p. 141-146, 2001.

GIGANTE, M. L. Importância da qualidade do leite no processamento de produtos lácteos. In: DÜRR, J. W. (org.) **O compromisso com a qualidade do leite no Brasil**. Passo Fundo: Universidade de Passo Fundo, 2004. p. 235-254.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Produção da Pecuária Municipal 2006/MG**. Disponível em <<http://www.ibge.gov.br/estadosat/temas.php?sigla=mg&tema=pecuaria2006>>. Acesso em em: 01 jul. 2008.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Produção da Pecuária Municipal 2006/PR**. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br/estadosat/temas.php?sigla=pr&tema=pecuaria2006>>. Acesso em: 01 jul. 2008.

MARQUES, M. da S.; COELHO, L. B. JR.; SOARES, P. C. Avaliação da qualidade microbiológica do leite pasteurizado tipo C processado no estado de Goiás. In: CONGRESSOS LATINO-AMERICANO, 2., Brasileiro de Higienistas de Alimentos, 8., 2005, Rio de Janeiro. **Anais...** São Paulo: Higiene Alimentar, 2005.

MITCHEL, J. M. *et al.* Antimicrobial Drug Residues in Milk and Meat: Causes, Concerns, Prevalence, Regulations, Tests, and Tests Performance. **Journal of Food Protection**, v. 61, n. 6, p. 742-756, 1998.

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

NERO, L. A. *et al.* Resíduos de antibióticos em leite cru de quatro regiões leiteiras no Brasil. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 27, n. 2, p. 391-393, 2007.

OLIVEIRA, C. A. F.; FONSECA, L. F. L.; GERMANO, P. M. L. Aspectos relacionados à produção, que influenciam a qualidade do leite. **Higiene Alimentar**, v. 13, n. 62, p. 10-16, 1999.

PADILHA, M. R. F.; FERNADEZ, Z. F. Avaliação higiênico-sanitária do leite “C” comercializado no Recipe – PE. **Higiene Alimentar**, v. 13, n. 61, p. 105-109, 1999.

PARANÁ (Estado) **Resolução SESA nº 0337, de 30 de julho de 2003**. Institui o Programa Estadual de Controle de Resíduos de Medicamentos Veterinários em Alimentos de Origem Animal – PAMVET/PR. Disponível em: <<http://www.saude.pr.gov.br/arquivos/File/pamvet/03RPR0337PAMvet.doc>>. Acesso em: 10 jul. 2008.

PARANÁ. **Resolução SESA nº 0338, 30 de julho de 2003.** Institui o Grupo Técnico-científico para coordenação e execução do Programa Estadual de Controle de Resíduos de Medicamentos Veterinários em Alimentos de Origem Animal – PAMVET/PR, com o objetivo de implantar, acompanhar e avaliar as ações do Programa. Disponível em: <<http://www.saude.pr.gov.br/arquivos/File/pamvet/03RPR0338PAMvet.doc>>. Acesso em: 10 jul. 2008.

PONTES NETTO, D. *et al.* Levantamento dos principais fármacos utilizados no rebanho leiteiro do Estado do Paraná. **Acta Scientiarum: Animal Sciences**, v. 27, n. 1, p. 145-151, 2005.

RAIA JÚNIOR; R. B. **Fatores fisiológicos, clínicos e farmacológicos, determinantes de resíduos de antimicrobianos no leite, avaliados em protocolos terapêuticos de mastite em bovinos leiteiros.** 2006. 69f. Tese. (Faculdade de Ciências Farmacêuticas) – Universidade de São Paulo.

RIEDEL, G. **Controle Sanitário de Alimentos.** 2. ed. São Paulo: Atheneu, 1992. 320 p.

ROBBERS, J. E., SPEEDIE, M. K., TYLER, V. E. **Farmacognosia e Farmacobiotechnologia.** Baltimore: Editorial Premier, 1997, 372 p.

ROBINSON, R. Q. **Dairy microbiology: the microbiology of milk.** New York, v. 1, 301p., 1990.

SANTOS, E. C.; XAVIER, A. T. V.; PASSOS, L. A. S. Aparente deflexão sazonal de alguns constituintes do leite no início da primavera. **Rev. Inst. Latic. Cândido Tostes**, v. 36, n. 215, p. 9-15, 1981.

SHITANDI, A.; STERNESJÖ, A. Factors contributing to the occurrence of antimicrobial drug residues in Kenyan milk. **Journal of Food Protection**, v. 67, n. 2, p. 399-402, 2004.

SILVA, T. J. P.; SENA, M. C. Prevalência de antibióticos no leite pasteurizado tipo B e Especial 3,2% de gordura consumidos em Belo Horizonte, 1982-1983. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 39, n. 235, p. 7-12, 1984.


SPISSO, B. F.; NÓBREGA, A. W.; MARQUES, M. A. S. Resíduos e contaminantes químicos em alimentos de origem animal no Brasil: histórico, legislação e atuação da vigilância sanitária e demais sistemas regulatórios. **Revista Ciência & Saúde Coletiva.** 2007. Disponível em: <[http://www.abrasco.org.br/cienciaesaudecoletiva/artigos/artigo\\_int.php?id\\_artigo=1640](http://www.abrasco.org.br/cienciaesaudecoletiva/artigos/artigo_int.php?id_artigo=1640)>. Acesso em: 10 jul. 2008.

TENÓRIO, C. G. M. S. C. **Avaliação da eficiência do teste COPAN (microplate e single) na detecção de resíduos de antimicrobianos no leite.** 2007. 71f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2007.

ZOCHE, F. *et al.* Qualidade microbiológica e físico-química do leite pasteurizado produzido na região oeste do Paraná. **Archives of Veterinary Science**, v. 7, n. 2, p. 59-67, 2002.

**ANEXOS**

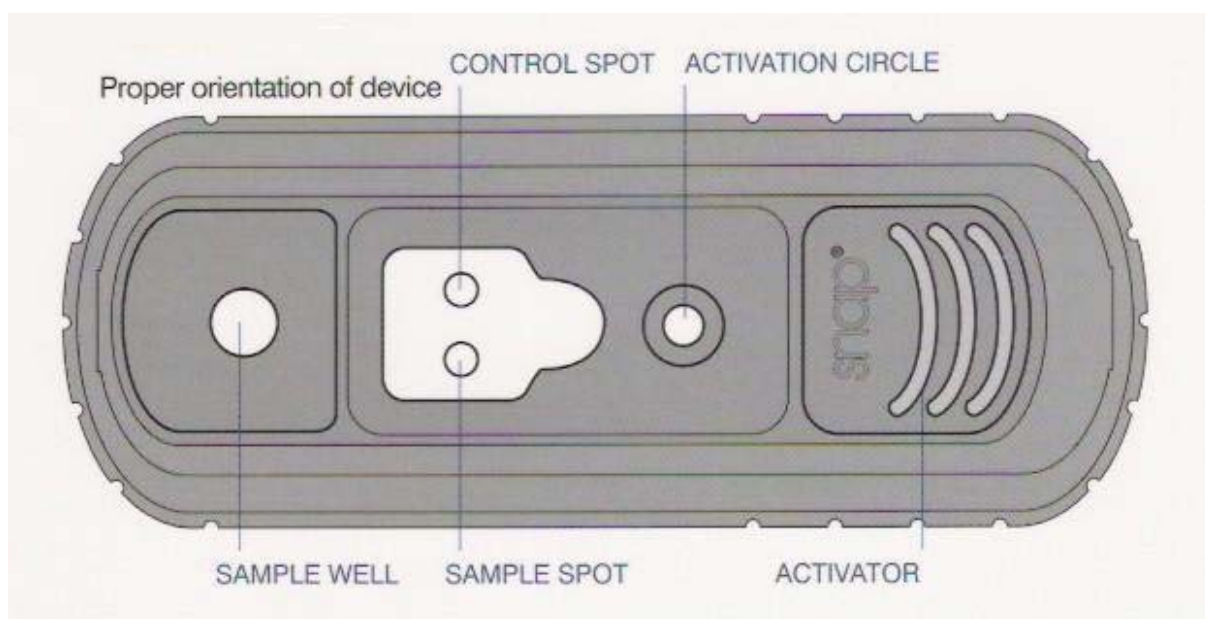
## ANEXO A - TERMO DE APREENSÃO DE AMOSTRAS

	ESTADO DO PARANÁ SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE FUNDAÇÃO CAETANO MUNHOZ DA ROCHA	
<b>TERMO DE APREENSÃO DE AMOSTRAS - TAA</b>		Nº _____
Campo 1 R.S.	UNIDADE SANITÁRIA Campo 2	MUNICÍPIO Campo 3
<b>CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA</b> PRODUTO: _____ MARCA: _____ APRESENTAÇÃO: _____ DATA DE FABRICAÇÃO: _____ Campo 4 _____ PRAZO VALIDADE: _____ LOTE OU PART.: _____ Nº DO REGISTRO: _____ PESO/UNIDADE: _____ AMOSTRAS (Nº UNIDADES): _____ FABRICANTE: _____ C.G.C.: _____ ENDEREÇO: _____ MUNICÍPIO: _____ ESTADO: _____		
<b>DETENTOR DO PRODUTO AMOSTRADO</b> NOME/RAZÃO SOCIAL: _____ Campo 5 _____ R.G./C.G.C.: _____ ENDEREÇO: _____ MUNICÍPIO: _____ ESTADO: _____ RAMO DE ATIVIDADE: _____ <input type="checkbox"/> PROPRIETÁRIO <input type="checkbox"/> RESPONSÁVEL <input type="checkbox"/> CONSUMIDOR		
<b>COLHEITA PARA FINS DE ANÁLISE DE</b> <input type="checkbox"/> REGISTRO Campo 6 <input type="checkbox"/> FISCAL <input type="checkbox"/> ROTINA <input type="checkbox"/> SURTOS <input type="checkbox"/> OUTROS (ESPECIFICAR) _____	<b>CONDIÇÕES DE ARMAZENAMENTO</b> <input type="checkbox"/> TEMPERATURA AMBIENTE Campo 7 <input type="checkbox"/> BALCÃO REFRIGERADOR _____ °C <input type="checkbox"/> FREEZER _____ °C <input type="checkbox"/> CÂMARA FRIA _____ °C <input type="checkbox"/> OUTRAS (ESPECIFICAR) _____	<b>ANÁLISES SOLICITADAS</b> Campo 8 <input type="checkbox"/> MICROBIOLÓGICA <input type="checkbox"/> FÍSICO-QUÍMICA <input type="checkbox"/> TOXICOLÓGICA <input type="checkbox"/> OUTRAS (ESPECIFICAR) _____
RECEBI, DE ACORDO COM OS ARTIGOS 338, 340 PARÁGRAFOS 1º, 2º E 3º DO DECRETO 3641/77, UMA DAS AMOSTRAS COLHIDAS EM TRIPLICATA, DOS PRODUTOS ESPECIFICADOS PARA EFEITOS DE POSSÍVEL CONTRA-PROVA E PERÍCIA, OBRIGANDO-ME A MANTÊ-LA E CONSERVÁ-LA ADEQUADAMENTE CONFORME O RECOMENDADO.		
Campo 9 _____ ASSINATURA AUTORIDADE SANITÁRIA	Campo 10 _____ ASSINATURA DO DETENTOR DO PRODUTO	Campo 11 _____ / _____ / _____ DATA      HORA DA COLHEITA
<b>TESTEMUNHAS:</b> _____ Campo 12 _____ NOME      R.G.      NOME      R.G. _____ ASSINATURA      ASSINATURA		
<b>OBSERVAÇÕES:</b> _____ _____ _____ Campo 13		
RECEBEMOS AMOSTRA(S) DESCRITA(S), ACOMPANHADA(S) DESTES TERMOS DE APREENSÃO DE AMOSTRAS ÀS _____ HORAS NA DATA _____ / _____ / _____ NAS SEQUENTES CONDIÇÕES: _____ NOME E ASSINATURA RESP. REC. LABORATÓRIO		<b>DATA DA ANÁLISE</b> _____ / _____ / _____ INÍCIO _____ / _____ / _____ TÉRMINO

## ANEXO B – Componentes e protocolo de análise do kit SNAP<sup>®</sup> Tetracycline Test

### Componentes

- Pipeta Pasteur descartável
- Tubo de prova contendo uma pastilha de reativo
- Dispositivo SNAP de leitura
- Bloco aquecedor capaz de manter a temperatura entre 40 e 50<sup>0</sup>C (não incluso)



### Procedimento

- Trazer os componentes do kit à temperatura ambiente
- Pré-aquecer o bloco aquecedor até que a temperatura se estabilize por cinco minutos
- Colocar o dispositivo SNAP sobre o bloco aquecedor (o dispositivo deve permanecer sobre o bloco durante todo o teste)
- Homogeneizar a amostra de leite e colocar entre 400 a 500 $\mu$ L da amostra (observando-se a linha indicadora na parede da pipeta Pasteur) no tubo de prova
- Agitar o tubo de prova até que a pastilha de reativo dissolva completamente
- Incubar o tubo de prova no bloco aquecedor durante dois minutos (a incubação deve ocorrer por no mínimo dois minutos e não deve ultrapassar três minutos)
- Após a incubação, colocar a amostra no dispositivo SNAP – a amostra escorrerá em através da janela de resultados até o círculo de ativação



- Quando a amostra chegar ao círculo de ativação, pressionar o ativador até que ele esteja completamente abaixado, no mesmo nível que o corpo do dispositivo SNAP



- Incubar o dispositivo por sete minutos e ler o resultado em seguida

### Interpretação dos resultados (leitura visual)

- Resultado negativo: o círculo da amostra (inferior) é igual ou mais escuro que o círculo controle (superior)
- Resultado positivo: o círculo da amostra (inferior) é mais claro que o círculo controle (superior)



Resultado positivo: círculo da amostra é mais claro que o círculo controle

## ANEXO C – Componentes e protocolo de análise do kit SNAP<sup>®</sup> Gentamycin Test

### Componentes

- Pipeta Pasteur descartável
- Tubo de prova contendo uma pastilha de reativo
- Dispositivo SNAP de leitura
- Bloco aquecedor capaz de manter a temperatura entre 40 e 50<sup>0</sup>C (não incluso)

### Procedimento

- Trazer os componentes do kit à temperatura ambiente
- Pré-aquecer o bloco aquecedor até que a temperatura se estabilize por cinco minutos
- Colocar o dispositivo SNAP sobre o bloco aquecedor (o dispositivo deve permanecer sobre o bloco durante todo o teste)
- Homogeneizar a amostra de leite e colocar entre 400 a 500 $\mu$ L da amostra (observando-se a linha indicadora na parede da pipeta Pasteur) no tubo de prova
- Agitar o tubo de prova até que a pastilha de reativo dissolva completamente
- Incubar o tubo de prova no bloco aquecedor durante dois minutos (a incubação deve ocorrer por no mínimo dois minutos e não deve ultrapassar três minutos)
- Após a incubação, colocar a amostra no dispositivo SNAP – a amostra escorrerá em através da janela de resultados até o círculo de ativação
- Quando a amostra chegar ao círculo de ativação, pressionar o ativador até que ele esteja completamente abaixado, no mesmo nível que o corpo do dispositivo SNAP
- Incubar o dispositivo por sete minutos e ler o resultado em seguida

### Interpretação dos resultados (leitura visual)

- Resultado negativo: o círculo da amostra é igual ou mais escuro que o círculo controle
- Resultado positivo: o círculo da amostra é mais claro que o círculo controle

## **ANEXO D – Componentes e protocolo de análise do kit New SNAP<sup>®</sup> Beta-Lactam Test Kit**

### Componentes

- Pipeta Pasteur descartável
- Tubo de prova contendo uma pastilha de reativo
- Dispositivo SNAP de leitura
- Bloco aquecedor capaz de manter a temperatura entre 40 e 50<sup>0</sup>C (não incluso)

### Procedimento

- Trazer os componentes do kit à temperatura ambiente
- Pré-aquecer o bloco aquecedor até que a temperatura se estabilize por cinco minutos
- Colocar o dispositivo SNAP sobre o bloco aquecedor (o dispositivo deve permanecer sobre o bloco durante todo o teste)
- Homogeneizar a amostra de leite e colocar entre 400 a 500 $\mu$ L da amostra (observando-se a linha indicadora na parede da pipeta Pasteur) no tubo de prova
- Agitar o tubo de prova até que a pastilha de reativo dissolva completamente
- Incubar o tubo de prova no bloco aquecedor durante cinco minutos (a incubação deve ocorrer por no mínimo cinco minutos e não deve ultrapassar seis minutos)
- Após a incubação, colocar a amostra no dispositivo SNAP – a amostra escorrerá em através da janela de resultados até o círculo de ativação
- Quando a amostra chegar ao círculo de ativação, pressionar o ativador até que ele esteja completamente abaixado, no mesmo nível que o corpo do dispositivo SNAP
- Incubar o dispositivo por quatro minutos e ler o resultado em seguida

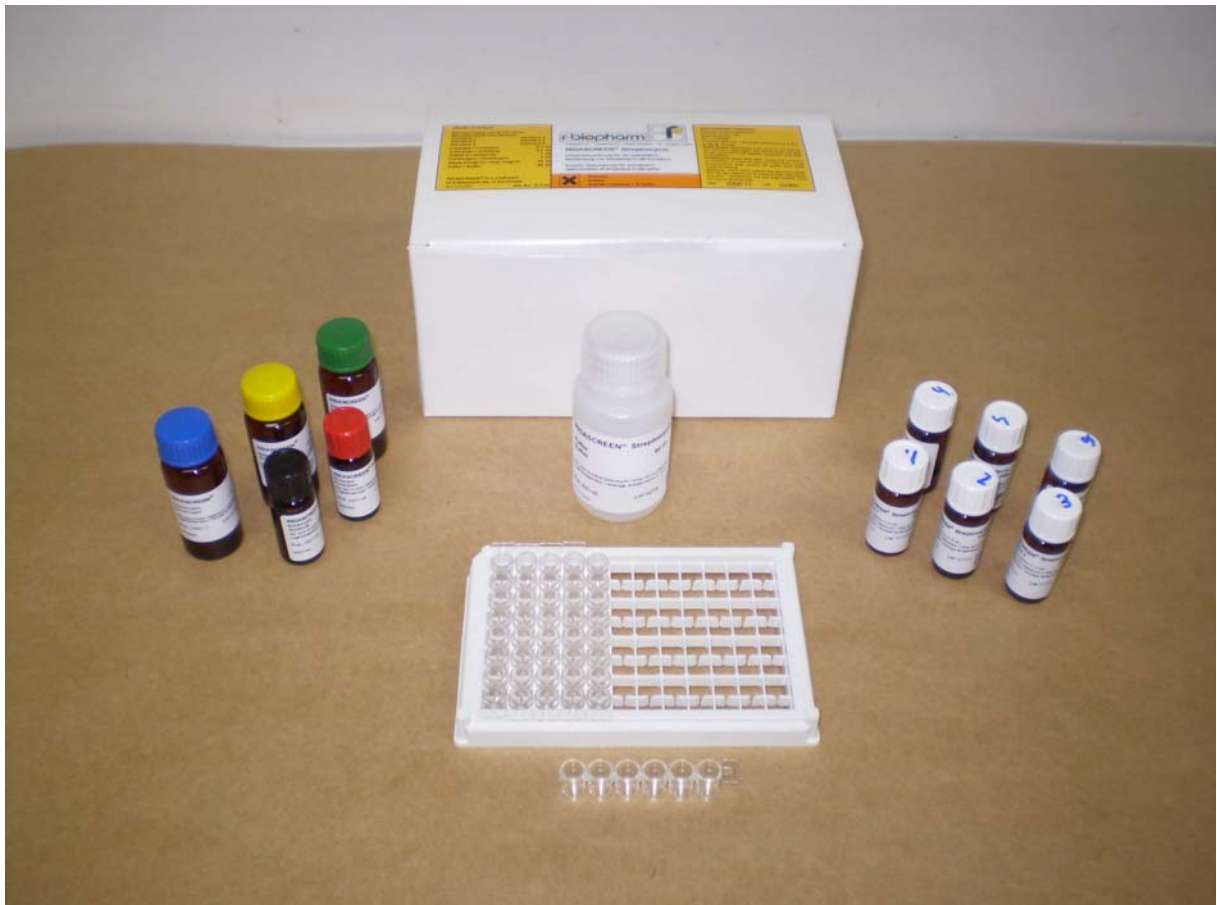
### Interpretação dos resultados (leitura visual)

- Resultado negativo: o círculo da amostra é igual ou mais escuro que o círculo controle
- Resultado positivo: o círculo da amostra é mais claro que o círculo controle

## ANEXO E – Componentes e protocolo de análise de estreptomicina por kit de ELISA comercial RIDASCREEN® Streptomycin – R-Biopharm

### Componentes

- 1 suporte para placas
- 96 poços (12 tiras de 8 poços cada) recobertos com anticorpos para captura de anticorpos anti-estreptomicina
- 6 soluções padrão concentradas de estreptomicina: 0ppb, 5ppb, 20ppb, 80ppb, 320ppb, 1280ppb
- 1 solução concentrada de anticorpo anti-estreptomicina
- 1 solução concentrada de conjugado estreptomicina-peroxidase
- 1 solução tampão para reconstituição de soluções padrão, anticorpo e conjugado
- 1 solução substrato
- 1 solução cromógena
- 1 solução “stop” (contendo 1N de ácido sulfúrico)



### Preparação das amostras

- Centrifugar as amostras de leite: 10min/3000g/15<sup>0</sup>C
- Retirar a gordura sobrenadante
- Diluir o leite na proporção 1:40 com solução tampão PBS-Tween
- Utilizar 50µL do leite diluído no teste

### Procedimento

- Colocar 50µL dos padrões e amostras em cada poço da placa de ELISA
- Adicionar 50µL da solução conjugado diluída em cada poço
- Adicionar 50µL da solução anticorpo diluída em cada poço
- Homogeneizar a placa e incubar por 2h à temperatura ambiente
- Remover o líquido dos poços
- Lavar a placa com água destilada (3 vezes)
- Adicionar 50µL de solução substrato e 50µL de solução cromógena
- Homogeneizar a placa e incubar por 30min à temperatura ambiente, no escuro
- Adicionar 100µL de solução “stop” em cada poço
- Homogeneizar a placa e realizar a leitura da placa em filtro de 450nm

### Resultados

- Os cálculos para quantificação dos resultados são realizados pelo programa RIDASOFT Win<sup>®</sup> (R-Biopharm), fornecido pelo fabricante

## ANEXO F – Componentes e protocolo de análise de neomicina por kit de ELISA comercial Neomycin EIA<sup>®</sup> - Euro-Diagnostica

### Componentes

- 1 suporte para placas
- 96 poços (12 tiras de 8 poços cada) recobertos com anticorpos de coelho anti-IgG de camundongo
- 7 soluções padrão de neomicina: 0ppb, 6,25ppb, 12,5ppb, 25ppb, 50ppb, 100ppb e 200ppb
- 1 solução liofilizada de anticorpo monoclonal de camundongo anti-neomicina
- 1 solução liofilizada de conjugado
- 1 solução de lavagem concentrada
- 1 solução tampão para reconstituição de soluções anticorpo, conjugado e lavagem
- 1 solução substrato
- 1 solução cromógena
- 1 solução “stop”



### Preparação das amostras

- Centrifugar as amostras de leite: 10min/2000g/4<sup>0</sup>C
- Retirar a gordura sobrenadante
- Diluir o leite na proporção 1:2 com solução tampão
- Utilizar 50µL do leite diluído no teste

### Procedimento

- Colocar 100µL de padrão zero na posição A1 e A2 (branco)
- Colocar 50µL do padrão zero (posição B1 e B2) e 50µL do restante dos padrões e amostras na placa de ELISA
- Adicionar 25µL de solução conjugado em cada poço, exceto A1 e A2
- Adicionar 25µL de solução anticorpo em cada poço, exceto A1 e A2
- Homogeneizar a placa e incubar por 1h, no escuro, em temperatura de refrigeração
- Remover o líquido dos poços
- Lavar a placa com solução de lavagem (3 vezes)
- Adicionar 50µL de solução substrato e 50µL de solução cromógena
- Homogeneizar a placa e incubar por 30min à temperatura ambiente
- Adicionar 100µL de solução “stop” em cada poço
- Homogeneizar a placa e realizar a leitura da placa em filtro de 450nm

### Resultados

- Os cálculos para quantificação dos resultados são realizados em planilha Excel<sup>®</sup> (Microsoft<sup>®</sup>)

## ANEXO G – Revista SEMINA – normas para publicação



· Agrárias ·

### Normas Editoriais para Publicação

#### Apresentação dos Trabalhos

1. Os originais devem ser enviados em disquete (3 ½ ), acompanhado de três cópias impressas, com entrelinhamento duplo. O trabalho deverá ser elaborado no editor de texto Microsoft Word for Windows, fonte Times New Roman, tamanho 11, normal; com margens de no mínimo 2cm, respeitando-se o número de páginas de acordo com a categoria do trabalho e devem estar devidamente numeradas.

2. Categorias dos Trabalhos:

a) artigos e revisões no máximo 40 páginas;

b) comunicações; divulgações e resenhas no máximo 20 páginas;

c) resenhas de livros e revistas no máximo 4 páginas; e

3. Na primeira lauda do original deverá constar o título do trabalho, nome completo do autor principal, minicurrículo, endereço postal, número do telefone e/ou fax e e-mail; categoria do trabalho; área de publicação da Semina e classificação das áreas/sub-áreas do CNPq/CAPES.

3.1. *Título do trabalho*: o título, acompanhado de sua tradução para o inglês, deve ser breve e suficientemente específico e descritivo, contendo as palavras-chave que representem o conteúdo do texto.

3.2. *Nome(s) completo(s) do(s) autor(es)*: Os demais dados como título e/ou credenciais, cargo(s) ocupado(s) pelo(s) autor(es) e local de realização do trabalho deverão constar em nota de rodapé.

3.3. *Resumo*: deve ser incluído um resumo informativo de aproximadamente 200 palavras, em português, acompanhado de sua tradução para o inglês, digitado com entrelinhamento duplo, na segunda lauda do original. (NBR 6028 da ABNT)

3.4. *Agradecimentos*: agradecimentos a auxílios recebidos para a elaboração do trabalho deverão ser mencionados no final do artigo.

3.5. *Notas*: notas referentes ao corpo do artigo devem ser indicadas com um asterisco alto, imediatamente depois da frase a que diz respeito. As notas deverão vir no rodapé do texto.

3.6. *Apêndices*: apêndices podem ser empregados no caso de listagens extensivas, estatísticas e outros elementos de suporte.

3.7. *Materiais gráficos*: fotografias nítidas e gráficos (estritamente indispensáveis à clareza do texto) poderão ser aceitos e deverão ser assinalados, no texto, pelo seu número de ordem, os locais onde devem ser intercalados. Se as ilustrações enviadas já tiverem sido publicadas, mencionar a fonte e a permissão para reprodução.

3.8. *Quadros e Tabelas*: os quadros e/ou tabelas deverão ser acompanhados de cabeçalho que permita compreender o significado dos dados reunidos, sem necessidade de referência ao texto. Assinalar, no texto, por seu número de ordem, os locais onde os quadros e/ou tabelas devem ser intercalados.

3.9. As grandezas, unidades e símbolos deverão obedecer às normas nacionais correspondentes (ABNT).

3.10. *Citações*: deverão seguir o sistema de chamada alfabética (NBR 10520 da ABNT).

3.11. *Referências bibliográficas*: as referências bibliográficas, redigidas segundo a norma NBR 6023/2000 da Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT), deverão ser listadas na ordem alfabética no final do artigo. A exatidão e adequação das referências a trabalhos que tenham sido consultados e mencionados no texto do artigo são da responsabilidade do autor.

4. O autor principal deverá enviar, junto com o original, autorização para publicação do trabalho na SEMINA, comprometendo-se a não publicá-lo em outro periódico.

5. A publicação dos trabalhos depende de parecer da Assessoria Científica "Ad hoc" da Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação da UEL.

6. Após impressa a revista, o autor principal receberá gratuitamente um (1) exemplar da revista.

7. Os trabalhos não aceitos para publicação serão devolvidos ao autor.

8. As questões e problemas não previstos na presente norma serão dirimidos pelo Comitê Editorial da área para a qual foi submetido o artigo para publicação.

9. Os trabalhos devem ser enviados para:

Universidade Estadual de Londrina  
Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação  
Edição da SEMINA  
Campus Universitário - Caixa Postal 6001  
86051-990 - Londrina, Paraná, Brasil.

Contatos com a Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação:

<b>Nome - Área - Ramal:</b>	<b>e-mail:</b>
Prof. Dr. Édison Miglioranza - PROPPG/DP - 4513	<a href="mailto:mfatima@uel.br">mailto:mfatima@uel.br</a>
Ivone Yurika Mizubuti - PROPPG/DCA - 4105	<a href="mailto:mizubuti@uel.br">mizubuti@uel.br</a>
Égile Maria de Souza - PROPPG/DCA - 4449	<a href="mailto:basoli@uel.br">mailto:basoli@uel.br</a>

Todos os direitos reservados. É proibida a reprodução do conteúdo das páginas em qualquer meio de comunicação, eletrônico ou impresso, sem autorização escrita dos autores.

**Universidade Estadual de Londrina**  
**Assessoria de Tecnologia de Informação**

Campus Universitário - Cx. Postal 6001 - CEP 86051-990 - Londrina-PR  
Fone: (43) 3371 4000 Fax: (43) 3328 4440

## ANEXO H – Food and Chemical Toxicology – normas para publicação



ELSEVIER

<http://www.elsevier.com>

### FOOD AND CHEMICAL TOXICOLOGY

#### Guide for Authors

**General Information:** *Food and Chemical Toxicology* publishes papers that fulfil the views as laid down in the Aims and Scope section. The Journal's main purpose is the publication of papers reporting and interpreting original unpublished toxicological research, particularly studies promoting an understanding of the mechanisms underlying toxic effects or improvements in methods for predicting adverse effects. Papers reporting the toxicological examination of specific foods, chemicals or consumer products will be published, irrespective of the positive or negative nature of the results, provided the tests and reporting meet current standards of acceptability. In addition, Brief Communications (see description below) will also be considered, as will concise interpretative Reviews of toxicological topics of contemporary significance. Letters to the Editor will be limited to comments on contributions already published in the journal; if a letter is accepted, a response (for simultaneous publication) will be invited from the authors of the original contribution.

**Manuscripts** are accepted for review with the understanding that they describe original research performed by authors, that all authors approve of the submission, and that the manuscript is not being considered for publication elsewhere. By submitting the manuscript, the authors agree that, if accepted for publication, copyright of the complete article will be assigned to the publisher.

**Furthermore, it is understood that with submission of this article the authors have complied with the institutional policies governing the humane and ethical treatment of the experimental subjects, and that they are willing to share the original data and materials if so requested.**

**Conflict of Interest and Source of Funding.** A conflict of interest exists when an author or the author's institution has a financial or other relationship with other people or organizations that may inappropriately influence the author's actions. All submissions to *Food and Chemical Toxicology* must include disclosure of all relationships that could be viewed as presenting a potential conflict of interest. *Food and Chemical Toxicology* may use such information as a basis for editorial decisions and may publish such disclosures if they are believed to be important to readers in judging the article.

**Conflict of Interest Statements for Authors.** *Food and Chemical Toxicology* requires full disclosure of all potential conflicts of interest.

Please download the disclosure from the *Food and Chemical Toxicology* web site, <http://ees.elsevier.com/fct> at the 'Attach Files' stage of manuscript submission or download the form directly [here](#). The corresponding author is responsible for downloading and sharing a copy of this form for each and every co-author listed on the manuscript. Each and every co-author must complete and sign their individual form and return to the corresponding author. The corresponding author is responsible for uploading their form and those of their co-authors (as one document) at the submission process.

Investigators should disclose potential conflicts to participants in clinical trials and other studies and should state in the manuscript whether they have done so. *Food and Chemical Toxicology* may decide not to publish on the basis of a declared conflict, such as the financial interest of an author in a company (or its competitors) that makes a product discussed in the paper.

**Submission of Manuscripts.** It is a condition of publication that all manuscripts must be submitted in English to *Food and Chemical Toxicology's* submission and review website, <http://ees.elsevier.com/fct>. Authors are requested to transmit the text and art of the manuscript in electronic form to this address. Each manuscript must also be accompanied by a cover letter outlining the basic findings of the paper and their significance. The Editors welcome submissions by the authors of the names and addresses of up to five individuals who could expertly review the paper, and who are not from the same institutions as the authors. The Editors, reserve the right to use these or other reviewers. Should you be unable to provide an electronic version, please contact the editorial offices prior to submission:

Managing Editor for North, Central and South America: Joseph F. Borzelleca  
[josephfborzelleca@comcast.net](mailto:josephfborzelleca@comcast.net)

Managing Editor for rest of the World: Alan Boobis  
[a.boobis@ic.ac.uk](mailto:a.boobis@ic.ac.uk)

### **Brief Communications**

Preliminary but exciting break-through findings may be published in this expedited review process. This manuscript must be limited to eight double-spaced pages and generally follow the same format as full papers. The need for rapid publication of the data must be clearly stated in the Introduction. Brevity is not a justification for Brief Communication status.

### **Reviews**

Informative reviews of contemporary topics in toxicology relevant to the scope of the journal are welcomed. They should be concise and, in any event, no longer than 80 pages double-spaced, including references, table and figures. Authors should follow the general advice given above for manuscripts, but reviews do not need to follow the sectional format recommended for research papers. Reviews should include a Title page, Abstract, Introduction and Discussion/Conclusions, in addition to the core of the review. A contents page

is not necessary unless the author(s) consider that would be helpful in a lengthy review.

### **Manuscript Format**

Manuscripts should be written in clear and concise English; incomprehensible manuscripts will be returned to the authors for rewriting. Manuscripts should be double spaced throughout, with at least 2.5-cm margins. All pages must be numbered, including the title page.

#### *Title page:*

- Title: Titles consisting of declarative or interrogative sentences are not acceptable. Titles may not include trademarked names or abbreviations.
- Authors: Provide surnames and initials of all authors
- Institution(s) where the work was done (with the affiliation of each author clearly indicated)
- Corresponding author: Provide full name and complete contact information including mailing address, telephone number, fax number and email.
- Running title: This will be printed at the top of each page of the manuscript; not to exceed 45 characters including spaces.
- Keywords: Please provide no more than six keywords
- Abbreviations: Any abbreviations used should be listed in alphabetical order under Abbreviations as a footnote to the title page.

#### *Abstract*

The abstract should be a self-contained summary of the objectives, results and significance of the study, not exceeding 200 words. Uninformative sentences such as "the significance of the results is discussed" are not acceptable.

#### *Introduction*

Provide a concise and clear statement on the background, purposes and significance of the work including objectives.

#### *Materials and Methods*

This section should be a description of the experimental design and of any new or improved methods. Provide sufficient detail such that experienced researchers would be able to duplicate the experiments. Well established methods and techniques may be identified by reference only.

Test substances must be adequately characterized and should include chemical name, CAS registry Number, EU Number, common or usual name and purity. If the test substance is an extract, the following information must be provided: scientific and common name of the source, detailed extraction procedure, concentration of active principle(s) (if known), standardization of batches, and stability. Details are necessary to permit clear identification and to allow replication of results by other investigators.

Animals must be specified by species, strain, sex, age, weight (mean  $\pm$  SD or SE), housing conditions and number per group.

It is recommended but not required that safety evaluation studies that conform to recognized existing guidelines (e.g. OECD) and follow GLP or GCP procedures should be so noted.

#### *Results*

Should be presented concisely, with the aid of tables or figures where appropriate. Tables should include indications of statistical significance. Duplication between this section and the Discussion must be avoided.

*Discussion*

A succinct interpretation of the data. Appropriate speculation and a brief discussion of further research are encouraged but must be brief. Extensive literature reviews and highly speculative comment are discouraged.

*Acknowledgements*

Provide recognition of sources of funding and donations of materials, and including any thanks the authors may wish to accord for advisory, technical or other assistance, since authorship should be limited to those who have made a major contribution to the study and to the preparation of the paper. Authors are advised to obtain approval for the wording of any acknowledgement from those whose help is noted.

All sources of funding (for example, contracts, grants, bequests and/or agencies) supporting the work are to be declared.

*Tables and Figures*

Each Figure should be in one of the following preferred formats: Tiff, JPEG, PDF, and EPS. Please refer to <http://www.elsevier.com/artworkinstructions> for detailed instructions on preparing electronic artwork.

These must be intelligible without reference to the text and should be planned to fit the page size of the Journal. Authors should indicate in the text where they would prefer each table and figure to appear (e.g. <Insert table 1 here>). Tables and figures should be numbered, in arabic numerals, in the sequence in which they are mentioned in the text. The same data may not be reproduced in both a table and a figure. Each table must have a title and on each column there should be a heading that clearly identifies the data therein. Data should be expressed as mean  $\pm$  SE or SD, and noted as such. Tables consisting of negative data only (no statistically significant dose-dependent effects) are strongly discouraged. Illustrations and diagrams should be avoided. For figures, no information that can be included in the legend should appear on the figure. The following standard symbols are preferred for line drawings: (closed triangle), (open triangle), (closed circle), (open circle), (circle with dot), (closed box), (square), (open box), (x), (diamond). The legends for photomicrographs must state the staining method and magnification. If figures that have already been published under copyright are to be reproduced in the Journal (e.g. in reviews), copies of letters from the first publisher and the original author giving permission for such reproduction must always accompany the submitted manuscript.

*Footnotes*

These should include the definitions of any abbreviations used in the text and any author's current address, if different from that given below the title. Other footnotes, as distinct from literature references, should be avoided in the text as far as possible. When they are essential, they should be identified by superscript numbers. All the footnotes except those for tables should be printed on a separate sheet, with an indication of the manuscript page to which the footnote refers.

**Nomenclature**

All measurements should be expressed in metric, preferably SI, units. Test chemicals and enzymes must be clearly identified, IUPAC and CAS names being used, wherever possible with the aid of CAS Registry and EC numbers. Pesticides should be referred to be their ISO names and human and veterinary drugs by their INNs.

**Gene accession numbers** In the electronic version of a published manuscript, gene accession numbers will be linked directly to the gene's description in NCBI's Nucleotide sequence database. The accession number should be formatted as follows:

Accession no. AJ315850

and in the text e.g. "... at the amino acid sequence level to the human IDN3 gene (Accession No. AJ315850)."

The production department will then link this reference when they find it in the text. Authors should DOUBLE-CHECK the number they use to make absolutely sure that it is correct before referring to it in their paper. Accession numbers in proofs should also always be checked for correctness. The number is an essential part of the link.

### **Abbreviations**

These should be used sparingly; they should be defined when first used in the paper but also listed in alphabetical order under *Abbreviations* as a footnote to the title page (see above).

**Preparation of Supplementary Material:** Elsevier now accepts electronic supplementary material to support and enhance your scientific research. Supplementary files offer the author additional possibilities to publish supporting applications, movies, animation sequences, high-resolution images, background datasets, sound clips and more. Supplementary files supplied will be published online alongside the electronic version of your article in Elsevier web products, including ScienceDirect <http://www.sciencedirect.com/>. In order to ensure that your submitted material is directly usable, please ensure that data is provided in one of our recommended file formats. Authors should submit the material in electronic format together with the article and supply a concise and descriptive caption for each file. For more detailed instructions please visit <http://www.elsevier.com/authors>.

**References** should be cited in the text by the authors' names and year of publication (Harvard system). • For books: authors' names and initials, year of publication, title of article, title of book preceded by 'In:', first and last page numbers.

- For edited volumes: Initial(s) and name(s), followed by '(Eds)', publisher's name and city, then first and last page numbers. Reference to a work by more than two authors should give the name of the first author only followed by 'et al.'

- References cited in the text should be given at the end of the paper, arranged in alphabetical order of first author. Citations must include names and initials of all authors, year, full title of paper, abbreviated title of periodical, and volume and first and last page numbers.

- More than one paper from the same author(s) in the same year should be identified by the letters a,b,c, etc., after the year of publication.

Examples:

- Pereira, M.A. and Chang, L.W., 1981. Binding of chemical carcinogens and mutagens to rat hemoglobin. *Chem.- Biol. Interact.* 22, 301-305.

- Weisburger, E.K., 1988. Carcinogenic halogenated aliphatic compounds. In: P. Politzer and F.J. Martin, Jr. (Eds), *Chemical Carcinogens. Activation Mechanisms, Structural and Electronic Factors, and Reactivity*, Elsevier,

Amsterdam, pp. 91-113.

**English language help service:** Upon request, Elsevier will direct authors to an agent who can check and improve the English of their paper (before submission). Please contact [authorsupport@elsevier.com](mailto:authorsupport@elsevier.com) for further information.

**Proofs, Reprints and Author Inquiries:** One set of proofs of accepted manuscripts will be sent to the corresponding author. No alteration of the substance of the text, tables or figures will be allowed at this stage. Corrected proofs should be returned to the publisher within two days of receipt. Twenty-five reprints are provided free of charge, and additional copies (minimum 100) can be ordered at prices shown on the price list accompanying the Reprint Order Form which will be sent with the proofs. Elsevier will do everything possible to get your article corrected and published as quickly and accurately as possible. Therefore, it is important to ensure that all of your corrections are sent back to us in one communication. Subsequent corrections will not be possible, so please ensure your first sending is complete.

US National Institutes of Health (NIH) voluntary posting ("Public Access") policy.

Elsevier facilitates author response to the NIH voluntary posting request (referred to as the NIH "Public Access Policy"; see <http://www.nih.gov/about/publicaccess/index.htm>) by posting the peer-reviewed author's manuscript directly to PubMed Central on request from the author, 12 months after formal publication. Upon notification from Elsevier of acceptance, we will ask you to confirm via e-mail (by e-mailing us at <mailto:NIHauthorrequest@elsevier.com>) that your work has received NIH funding and that you intend to respond to the NIH policy request, along with your NIH award number to facilitate processing. Upon such confirmation, Elsevier will submit to PubMed Central on your behalf a version of your manuscript that will include peer-review comments, for posting 12 months after formal publication. This will ensure that you will have responded fully to the NIH request policy. There will be no need for you to post your manuscript directly with PubMed Central, and any such posting is prohibited.

#### **Authors' rights:**

As an author you (or your employer or institution) may do the following:

- make copies (print or electronic) of the article for your own personal use, including for your own classroom teaching use
- make copies and distribute such copies (including through e-mail) of the article to research colleagues, for the personal use by such colleagues (but not commercially or systematically, e.g., via an e-mail list or list server)
- post a pre-print version of the article on Internet websites including electronic pre-print servers, and to retain indefinitely such version on such servers or sites
- post a revised personal version of the final text of the article (to reflect changes made in the peer review and editing process) on your personal or institutional website or server, with a link to the journal homepage

(on [elsevier.com](http://elsevier.com))

- present the article at a meeting or conference and to distribute copies of the article to delegates attending such a meeting
- for your employer, if the article is a 'work for hire,' made within the scope of your employment, your employer may use all or part of the information in the article for other intra-company use (e.g. training)
- retain patent and trademark rights and rights to any processes or procedure described in the article
- include the article in full or in part in a thesis or dissertation (provided that this is not to be published commercially)
- use the article or any part thereof in a printed compilation of your works, such as collected writings or lecture notes (subsequent to publication of your article in the journal)
- prepare other derivative works, to extend the article into book-length form, or to otherwise re-use portions or excerpts in other works, with full acknowledgement of its original publication to the journal.

- **Author enquiries:**

For enquiries relating to the submission of articles (including electronic submission where available), please visit

<http://www.elsevier.com/authors>.

Contact details for questions arising after acceptance of an article, especially those relating to proofs, are provided when an article is accepted for publication.

**Authors of *Food and Chemical Toxicology* please note: there is no page charge for this journal. The cost of printed colour pages will be the responsibility of the author(s), please note all illustrations are reproduced in colour on ScienceDirect.**

**Sponsored Articles:**

Food and Chemical Toxicology offers authors or their institutions the option to sponsor non-subscriber access to their articles on Elsevier's electronic publishing platforms. For more information please click [here](#).

---

---