

Lídia Cristina Almeida Picinin

**RESÍDUOS DE PRODUTOS DE USO VETERINÁRIO E
CONTAMINANTES EM LEITE**

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos da Universidade Federal de Santa Catarina para obtenção do grau de Doutor em Ciência dos Alimentos.

Orientadora: Profa. Dra. Marilde T. Bordignon Luiz

Co-orientadora: Profa. Dra. Mônica Maria Oliveira Pinho Cerqueira

Florianópolis
2013

Ficha catalográfica elaborada pela Bibliotecária Tatiana Rossi - CRB 14/1186

P593r

Picinin, Lúcia Cristina Almeida,
Resíduos de produtos de uso veterinário e contaminantes em
leite / Lúcia Cristina Almeida Picinin. -- Florianópolis, 2013.
172 p. : il. algumas color. ; 21 cm.

Tese (Doutorado em Ciência dos Alimentos)-
Universidade Federal de Santa Catarina, Programa de Pós-
Graduação em Ciência dos Alimentos, 2013.

Inclui bibliografia.

1. Resíduos de produtos de uso veterinário. 2.
Aflatoxinas. 3. Pesticidas. 4. Qualidade do leite cru. 5.
Avaliação de risco. I. Universidade Federal de Santa
Catarina. II. Título.

CDD: 637.1

CDU: 637.13

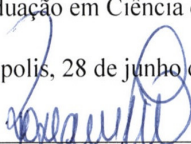
RESÍDUOS DE PRODUTOS DE USO VETERINÁRIO E CONTAMINANTES EM LEITE

Por

Lídia Cristina Almeida Picinin

Esta Tese foi julgada adequada para obtenção do Título de “Doutora em Ciência dos Alimentos”, e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós Graduação em Ciência dos Alimentos.

Florianópolis, 28 de junho de 2013.

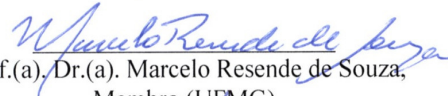


Prof.ª Dr.ª Roseane Fett
Coordenador

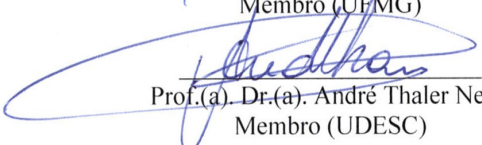
Banca Examinadora:



Prof.(a). Dr.(a). Marilde Terezinha Bordignon Luiz,
Orientador



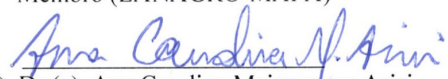
Prof.(a). Dr.(a). Marcelo Resende de Souza,
Membro (UFMG)



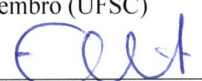
Prof.(a). Dr.(a). André Thaler Neto,
Membro (UDESC)



Dr.(a). Heitor Daguer,
Membro (LANAGRO-MAPA)



Prof.(a). Dr.(a). Ana Carolina Maisonnave Arisi,
Membro (UFSC)



Prof.(a). Dr.(a). Edna Regina Amante,
Membro (UFSC)

*Dedico à Pat, presente sempre tão
presente em minha vida, e ao nosso
anjo da guarda Cléo!!!*

AGRADECIMENTOS

A concretização de um sonho passa por um laboroso percurso do qual muitos fazem parte e sem os quais nada seria possível, sendo esse o resultado da contribuição de todos que ao meu lado estiveram e nesse trabalho acreditaram. Essa conquista é nossa!

Agradeço a Deus que guiou e iluminou cada passo e deu-me força, fé, coragem, saúde e amor, essenciais para chegar até aqui e querer ir além.

Aos meus amados pais, Ricardo e Cleusa, por toda educação, cuidados e amor dedicados com tanta constância em minha vida e que acompanharam bem de pertinho os trabalhos práticos e ininterruptos nas propriedades rurais, oferecendo auxílio das mais diversas e inimagináveis formas e sendo sempre tão compreensivos, amorosos, dedicados e pacientes mesmo com todo barulho toda madrugada, caixas e mais caixas por toda casa, centenas de gelos recicláveis, amostras e material de coleta, muita lama, roupa e carro sujos, carrapatos, ataque de formigas e cheirinho de fazenda, enfim... Obrigada por serem sempre tão presentes em minha vida, mesmo quando estamos distantes! Estendendo esse agradecimento especial à alegre, iluminada e adorável Tina e também aos peludinhos da casa.

À sempre vó Lídia, melhor colo do mundo e motivo de grande orgulho do nome que tenho, grande modelo de amor incondicional, que alimenta minha fé na vida, confiança, amor, bondade, paz e perseverança, buscando ser sempre uma pessoa melhor. Não esquecendo de meus outros avós que também contribuíram em meu crescimento pessoal de forma tão singular e especial!

Ao meu porto seguro e grande modelo de resiliência, Pat, que estive ao meu lado e lutou junto cada segundo, tornando essa caminhada mais leve, iluminada, gostosa, alegre e compensadora. Obrigada pela constante motivação, inspiração, torcida, apoio, exemplo, compreensão, paciência, dedicação e carinho... Se sacrificando muitas vezes, superando obstáculos que algumas vezes pareciam intransponíveis com total maestria e sempre pronta a seguir em frente, rumo ao 100% e sem esmorecer, buscando ser cada vez melhor e mais forte. Também comemorando vitórias e recarregando as energias em busca de mais conquistas e novas superações nesse caminho de transformação de um grande sonho numa gratificante realidade! Obrigada por tudo sempre!!!

À minha querida e inseparável irmã Ju, que acompanhou diversos momentos de minha vida de longe e de pertinho também, transpondo

algumas dificuldades juntas, sempre unidas e numa torcida constante de uma pelo melhor da outra. Valeu por tudo irmã! “Tamo junto sempre e bora lá!” Ao meu irmão Ale, cunhadinha Caru e amada sobrinha Leleca, que sempre me apoiaram e estiveram presentes em inesquecíveis e deliciosos momentos. Carrego vocês sempre comigo e com muito amor!

Aos queridos e inestimáveis amigos que fazem parte da família que a gente escolhe: Nara, Luís, Ladice, Ton, Carlos, Gabriel, Carlos André, Jairo, Soninha, Gilson, Camilla, Cris Cattani, Cássia, Charli, Eduardo, Cris Muller, Cláudio, Malu, Paulo, Sandra, Da. Stella e Sr. Gaudêncio, Sr. Aparício e Da. Elhedir, Ninha, Francis, Bianca, Isadora e o mais recente integrante Pedro Henrique, o meu eterno carinho especial a todos vocês, sempre presentes, queridos, divertidos, companheiros e também tão compreensivos nas ausências que uma pós-graduação provoca algumas vezes.

À toda minha família e amigos, sempre presentes em diversos momentos de maneira tão única e especial, admirável e edificante, tendo muitos como grandes e eternos modelos.

À toda minha segunda família constituída pelos colegas de jornada e novos amigos do Lab da UFSC, presentes nos mais diversos momentos. Um agradecimento especial, ao meu braço direito, sempre mestre e querida Bela, que tanto agregou nesse desafio que assumimos juntas desde o início, com certeza uma grande profissional, guerreira e amiga. Àqueles que bem de perto participaram e compartilharam de todos os momentos desde o início: Vivi, Nayla, Pri, Eliana, Estela, Stefani, Lu, Clarinha, Gabriel, Vinícius, Cláudia e Tri. E os mais recentes integrantes também muito queridos, agregadores e companheiros. Parabéns a todos vocês por suas conquistas, em que minha torcida por seus sucessos não findará por aqui.

Às minhas sábias orientadoras o meu agradecimento mais que especial. À Profa. Marilde por sua constante orientação, confiança, parceria, experiência e aprendizado contínuo. Obrigada pelo apoio e compreensão em todos os momentos desse trabalho realizado em conjunto. À Profa. Mônica pela co-orientação, amizade, prestatividade, apoio, compreensão e ensinamentos transmitidos com tamanha dedicação, competência e carinho, sendo uma verdadeira “mãe científica” para mim, desde a minha graduação, acompanhando de perto todos os trabalhos e participando ativamente de tudo. Tenho muito orgulho de ter sido orientada por essas grandes mestras, registrando aqui minha eterna gratidão, carinho, respeito e admiração.

Ao relator e professores da banca examinadora, pelo gentil aceite do convite para participar desse trabalho com suas valiosas

contribuições, o meu muito obrigada pela grande honra e prazer de poder contar com suas presenças, apoio, interesse, colaboração, competência e respeito.

Aos presentes e prestativos coordenadores da Pós-Graduação, ao estimado secretário, Sérgio Souza, e ao querido Sr. Bento, o meu agradecimento especial por toda constante atenção, auxílio, colaboração, apoio e alegria durante todo esse tempo de convívio. Lembrarei de vocês sempre, com muito carinho e consideração.

A todos os professores, colegas e mestres do PGCAL da UFSC e do DTIPOA da Escola de Veterinária da UFMG, que de uma forma ou de outra sempre me incentivaram a seguir em frente e a crescer pessoal e profissionalmente.

Ao CNPq e MAPA pelo auxílio financeiro para realização de parte dessa pesquisa.

À CCPR/MG e em especial ao Alexandre Cota Lara e sua equipe, extensivo aos produtores de leite envolvidos nesse trabalho, essenciais para esse estudo, muito obrigada por toda colaboração, dedicação, apoio logístico e boa vontade na realização e acreditação desse suado estudo.

Um agradecimento mais que especial ao Dr. Rodrigo Hoff e toda a equipe do LANAGRO/RS, em especial Gabriel Rubensam, Doriane Sacheto, Louise Jank e Magda Targa Martin, constantes parceiros em todo esse trabalho de pesquisa de resíduos de produtos de uso veterinário em leite, que desde o início acreditaram e toparam participar de todo o projeto, com grande empolgação, compromisso e *expertise*. Foi uma enorme honra trabalhar com vocês!

Aos ilustres colegas Dr. Marcelo Camargos e Dra. Eugênia Vargas e toda equipe do LANAGRO/MG que auxiliaram nas análises de aflatoxinas em leite. Acrescentando um agradecimento especial ao colega André Luis de Simone e Trialogix Diagnóstico Veterinário pela doação e importação dos kits comerciais para análise de inibidores e aflatoxinas em leite.

Aos estimados e sempre parceiros, colegas e amigos do MAPA que se prontificaram a ajudar e tanto auxiliaram nesse estudo e em diversas consultorias extras, em especial Leandro Feijó, Rodrigo Dantas, Maria Lia e Adriana Neves.

A todos os professores e funcionários do Laboratório de Qualidade do Leite da Escola de Veterinária da UFMG, agradeço o apoio, confiança, paciência, colaboração e parceria, se apresentando sempre amáveis, alegres e prestativos. Estendendo a sempre gratidão aos estimados professores Marcelo e Cláudia e funcionários do DTIPOA da UFMG, especialmente à Maura e Miltinho, que gentilmente confiaram,

autorizaram e cederam seus laboratórios, instrumentos e equipamentos para realização de parte das análises físico-químicas do leite, mesmo em feriados e finais de semana.

Aos professores e grandes colaboradores na árdua e desafiadora atividade de análise e processamento dos dados, os grandes e queridos mestres: da UNICAMP, Professores Joni e Paulo Tabares; da Palisade Corporation, Professor Marcos Huber Mendes; e, da UFMG, Professores João Paulo Haddad, Ângela Lana e Marcos Xavier, assim como, o sempre prestativo e alegre Danilo Bastos, que tanto contribuíram de forma complementar e enriquecedora para meu crescimento pessoal e profissional. Estendendo o reconhecimento e agradecimento especial aos competentes e prestativos colegas e colaboradores especiais: Fernando Souza e Soraia Diniz.

Aos estimados e sempre presentes Professores e funcionários da UDESC que ajudaram e auxiliaram durante todo meu período de afastamento, com total prestatividade e competência, especialmente Prof. Adil, Prof. Cleimon, Prof. Luiz Cláudio, Prof. Jorge, Prof. André, Profa. Sandra, Prof. Márcio, Prof. Felipe, Profa. Heloísa, Profa. Loredana, Prof. Carlos André, Prof. Cristiano, Sr. Antônio, Daniel, Tereza e Joyce.

Às bibliotecárias, Renata do CAV/UDESC e Tatiana Rossi do CCA/UFSC, consultoras sempre prestativas em assuntos relacionados a artigos, normalização, formatação e pedidos no COMUT.

Aos espetaculares Professores Marcos e Siobhan, da English Services, pelas aulas, consultorias e constante parceria nas versões e revisões do inglês em nossos trabalhos.

À UDESC, UFSC e Escola de Veterinária da UFMG, pelas quais tenho tanto admiração e me sinto orgulhosa de ter feito parte, agradeço a felicidade e grande honra de poder, por meio delas, realizar e cumprir todo esse trabalho.

À Thábata, Pantufa e Charlote, admiráveis e inseparáveis companhias, agradeço a alegria indispensável de suas presenças e a compreensão pelos vários momentos de ausências prolongadas, horas frente ao computador, faltando com a atenção merecida muitas vezes, sendo assim mesmo, sempre acompanhada de maneira tão singela, genuína e carinhosa.

A todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para a concretização deste sonho, o meu eterno e mais sincero **MUITO OBRIGADA!!!**

A maior revolução de nossos tempos é a descoberta de que, ao mudar as atitudes de suas mentes, os seres humanos podem mudar os aspectos externos de suas vidas.

William James

RESUMO

O presente estudo objetivou realizar um diagnóstico de situação em relação à qualidade do leite em propriedades leiteiras do estado de Minas Gerais, Brasil, implementar as Boas Práticas Agropecuárias (BPA) e avaliar seu efeito na qualidade e volume do leite produzido a partir do monitoramento dos principais fatores de risco identificados por meio da aplicação de lista de verificação padrão e controle analítico do leite em diferentes tempos e condições climáticas. Foram selecionadas de forma aleatória, 43 propriedades do estado de Minas Gerais, Brasil, com produção de leite diário de até 500 L/dia (60%), 501 a 1.000 L/dia (10%) e acima de 1.000 L/dia (30%). O trabalho foi realizado em três etapas subsequentes com intervalos de aproximadamente 48 dias, sendo: I etapa, um diagnóstico de situação com coleta de amostras e aplicação da lista de verificação padronizada e posterior treinamento para implementação das BPA; II etapa, nova coleta de amostras e reaplicação da lista de verificação com primeira avaliação do efeito do treinamento sobre os procedimentos diários e qualidade do leite produzido em curto prazo; III etapa, repetição da II etapa em médio prazo. Para cada uma das etapas foram coletadas amostras de leite cru refrigerado de tanques de expansão refrigeradores, sendo realizadas análises físico-químicas (teor de gordura, proteína, extrato seco total e desengordurado); Contagem Bacteriana Total (CBT); Contagem de Células Somáticas (CCS) e pesquisa de resíduos de produtos de uso veterinário e contaminantes utilizando testes quali e quantitativos, contemplando os principais ingredientes ativos dos grupos de antimicrobianos, lactonas macrocíclicas, piretróides e aflatoxinas em leite cru. A partir dos resultados obtidos para pesquisa de resíduos de produtos de uso veterinário nas amostras de leite cru analisadas, foram detectados 12 analitos dentre os 42 pesquisados, sendo os piretróides aqueles que mais ofereceram risco de possíveis danos à saúde do consumidor, com 6,8% das amostras positivas e acima dos respectivos limites máximos permitidos pela legislação brasileira. O treinamento para implementação das BPA diminuiu significativamente a ocorrência de resíduos de produtos de uso veterinário no leite cru, representando, em média, mais de 60,0% de diminuição do risco de produção de leite com presença de resíduos de produtos de uso veterinário. Sua eficácia foi ainda mais significativa em relação aos grupos de antimicrobianos e lactonas macrocíclicas, porém não apresentando a mesma eficácia em relação aos resíduos de piretróides. O uso de uma estratégia de prevenção baseada no risco para diminuir e/ou eliminar a presença de resíduos de produtos

de uso veterinário no leite na produção primária é possível no Brasil a partir da adoção das BPA na atividade. A implementação das BPA demonstraram resultados positivos para o aumento do volume de produção e qualidade do leite produzido, especialmente no que se refere a CBT e, indiretamente a CCS. Algumas práticas isoladas foram significativas em relação ao treinamento para implementação das BPA, no entanto, o conjunto dessas práticas apresentou melhor resultado e correlação positiva para produção de leite livre de resíduos de produtos de uso veterinário, sendo considerada uma ferramenta eficaz para produção de leite seguro para o consumo e útil na prevenção de possíveis danos à saúde do consumidor, prejuízos, descartes e/ou contaminações ambientais. Para pesquisa de aflatoxinas no leite, foi observada presença em todas as amostras analisadas, no entanto, dentro dos padrões especificados pela legislação brasileira, com maior frequência e concentrações médias nos períodos climáticos mais secos. O treinamento com conscientização da mão-de-obra associada à identificação e priorização dos principais fatores de risco e de sua adequação com constante monitoramento e controle analítico do leite se mostraram essenciais para prevenção de riscos e produção de leite de melhor qualidade e em maior quantidade, disponibilizando no mercado um produto seguro para a saúde do consumidor.

Palavras-chave: Resíduos de produtos de uso veterinário. Aflatoxinas. Pesticidas. Qualidade do leite cru. Avaliação de risco.

ABSTRACT

The aim of this study was to carry out a diagnosis of the situation in relation to the quality of milk at dairy farms in Minas Gerais State, Brazil, to implement Good Farming Practices (GFP) and to evaluate their effect on the quality and volume of the milk produced based on the monitoring of the main risk factors. These factors were identified through the application of a standard verification list and analytical control of the milk at different times and under varying meteorological conditions. Forty-three dairy farms in the state of Minas Gerais, Brazil, with a daily milk production of up to 500 L/day (60%), 501 to 1000 L/day (10%) and over 1000 L/day (30%) were randomly selected. The study was carried out in three consecutive stages with intervals of approximately 48 days. In stage I a diagnosis of the situation regarding the collection of samples and application of a standardized verification list with subsequent training for the implementation of the GFP was carried out. In stage II, sample collection was once again carried out and the verification list was reapplied with the first evaluation of the effect of the training on the daily procedures and the quality of milk produced in the short term. In stage III, stage II was repeated in the medium term. For each of the stages samples of raw milk cooled in refrigerant expansion tanks were collected. Physico-chemical analysis of the samples was carried out (fat, protein, total and skimmed dry extract contents) and the total bacterial count (TBC) and somatic cell count (SCC) were determined. The residues of products used for veterinary purposes and contaminants were investigated using qualitative and quantitative tests, considering the main active ingredients of the antimicrobial, macrocyclic lactone, pyrethroid and aflatoxin groups in raw milk. In relation to the results obtained in the determination of residues of veterinary products in the raw milk samples analyzed, 12 of the 42 analytes investigated were detected, the pyrethroids posing the greatest potential health risk to the consumer with 6.8% of the samples being positive and above the maximum limits established by Brazilian legislation. The training for the implementation of GFP significantly reduced the occurrence of residues of veterinary products in the raw milk, representing, on average, over 60.0% reduction in the risk of the production of milk with the presence of such residues in general. Its efficiency was even more significant in relation to the antimicrobial and macrocyclic lactone groups; however, it did not show the same efficiency in relation to residues of pyrethroids. The use of a prevention strategy based on risk to minimize or eliminate the presence of residues

of veterinary products in milk during primary production in Brazil is possible based on the adoption of GFP. The implementation of GFP provided positive results in terms of increasing the volume of production and improving the quality of the milk produced, particularly in relation to the TBC and, indirectly, the SCC. Some isolated practices were significant in relation to the training for the implementation of GFP, although the combination of these practices provided a better result and a positive correlation with the production of milk free from the residues of veterinary products. This can thus be considered an effective tool for the safe production of milk for consumption and useful in the prevention of possible negative effects on consumer health, financial losses, discarding of product lots and/or environmental damage. In the study on aflatoxins in milk, their presence was detected in all samples analyzed, however, within the standards specified by Brazilian legislation, with greater frequency and average concentrations during periods of drier weather. The training to enhance the awareness of the workers in relation to the identification and prioritization of the main risk factors and their control through constant monitoring and analytic control of the milk was found to be essential for risk prevention and the production of better quality milk in greater quantity, providing a safe product for the market in terms of consumer health.

Keywords: Residues of veterinary products. Aflatoxins. Pesticides. Raw milk quality. Risk assessment.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1 - Rotas de transmissão dos antimicrobianos e de microorganismos resistentes na cadeia alimentar e no meio ambiente.....	49
Figura 2.1 - Resíduos de produtos de uso veterinário detectados em amostras de leite cru contaminadas com dois analitos diferentes	82
Figura 2.2 - Cromatograma de amostra positiva para resíduo de cipermetrina (CYP), com $34,79 \mu\text{g L}^{-1}$. Bifentrina foi utilizada como padrão interno.....	82
Figura 2.3 - Cromatogramas com extração iônica de amostras positivas. Amostra de leite com $39,37 \mu\text{g L}^{-1}$ de CIPRO (A) e $5,98 \mu\text{g L}^{-1}$ de ENRO (B). Cromatograma com extração iônica de amostra de leite com $7,95 \mu\text{g L}^{-1}$ de PNV. A transição mais intensa corresponde a $m/z > 160$. Qualificação da transição (em cinza) corresponde a $m/z > 114$ (C). Cromatograma de extração iônica para amostra de leite com $18,3 \mu\text{g L}^{-1}$ de ABA. Segundo pico é o padrão interno de EMA em $5,0 \mu\text{g L}^{-1}$ (D)	83
Figura 2.4 - Volume total de leite cru contaminado com cipermetrina, abamectina e penicilina V em concentrações acima de seu limite máximo de resíduos conforme produção diária nas fazendas selecionadas em Minas Gerais, Brasil.....	84
Figura 4.1 - Médias mensais da contagem de células somáticas (CCS) e contagem bacteriana total (CBT) avaliadas em três anos (2009 a 2011) em amostras de leite cru refrigerado coletadas mensalmente em 43 propriedades leiteiras de Minas Gerais, Brasil.....	123
<i>Figure 1 - HPLC-FD confirmatory analysis of AFM₁ in milk. Chromatograms: (A) blank sample; (B) fortified milk sample (AFM₁ at $0.20 \mu\text{g/L}$; (C) contaminated milk sample with AFM₁ concentration at $0.14 \mu\text{g/L}$</i>	<i>134</i>

LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1 - Critérios de desempenho dos métodos de análise de resíduos de drogas veterinárias e pesticidas em leite	76
Tabela 2.2 - Valores ($\mu\text{g kg}^{-1}$) de limites máximos de resíduos (LMR) estabelecidos para os analitos pesquisados em amostras de leite cru de 45 propriedades leiteiras de Minas Gerais, Brasil	78
Tabela 2.3 - Resíduos de produtos de uso veterinário em 132 amostras de leite cru refrigerado de tanque de expansão de propriedades leiteiras de Minas Gerais, Brasil	81
Tabela 2.4 - Número de amostras de leite cru de propriedades leiteiras de Minas Gerais, Brasil, positivas para resíduos de produtos de uso veterinário contidas em diferentes intervalos de concentração	85
Tabela 3.1 - Dados de entrada (<i>input</i>) e saída (<i>output</i>) utilizados para o modelo estocástico de simulação do risco de ocorrência de resíduos de produtos de uso veterinário no leite de propriedades leiteiras de Minas Gerais, Brasil.....	94
Tabela 3.2 - Resíduos de produtos de uso veterinário em amostras de leite cru refrigerado antes e após aplicação de treinamento teórico-prático <i>in loco</i> para implementação das Boas Práticas Agropecuárias (BPA) na atividade leiteira de 43 propriedades rurais do estado de Minas Gerais, Brasil.....	97
Tabela 3.3 - Índice de conformidade obtido para as principais categorias avaliadas antes e após o treinamento para implementação das Boas Práticas Agropecuárias (BPA) em 43 propriedades leiteiras de Minas Gerais, Brasil.....	101
Tabela 3.4 - Correlação (Teste de Pearson) entre as diferentes categorias avaliadas por meio da lista de verificação das Boas Práticas Agropecuárias (BPA) aplicada em 43 propriedades leiteiras de Minas Gerais, Brasil, e sua associação com amostras em conformidade para resíduos de antimicrobianos e antiparasitários nas amostras de leite cru analisadas ($P < 0,05$).....	101
Tabela 3.5 - Principais variáveis avaliadas que foram influenciadas pelo treinamento ($P < 0,05$) para implementação das Boas Práticas Agropecuárias (BPA) em propriedades leiteiras, com seus respectivos valores de <i>Odds ratio</i> (OR) em relação à ocorrência de resíduos de produtos de uso veterinário nas amostras de leite cru analisadas, caso a variável se apresente “não conforme” (NC).....	106
Tabela 3.6 - Estimativa dos parâmetros utilizados no modelo de simulação das perdas em volume e percentual de leite produzido com	

presença de resíduos de produtos de uso veterinário na região estudada no estado de Minas Gerais, Brasil..... 109

Tabela 4.1 - Condições climáticas na região central de Minas Gerais e suas respectivas médias, no período de três anos consecutivos (2009 a 2011), para classificação das diferentes etapas estabelecidas para fins desse estudo 118

Tabela 4.2 - Correlação de Pearson entre variáveis ($P < 0,05$) referentes aos dados analíticos de qualidade de leite de 3.096 amostras de leite cru refrigerado coletadas durante o período de 2009 a 2011 em 43 propriedades leiteiras de Minas Gerais, Brasil..... 122

Tabela 4.3 - Comparação entre médias dos teores percentuais de composição de leite, volume de produção, contagem de células somáticas (CCS), contagem bacteriana total (CBT) de leite cru refrigerado coletado no mesmo período do ano anterior ao estudo realizado (2009/2010), o período de diagnóstico e treinamento para implementação das boas práticas no manejo de ordenha (2010/2011) e após aproximadamente um ano do treinamento realizado (2011/2012) 126

Tabela 4.4 - Correlação de Pearson ou Spearman ($P < 0,05$) para análises de qualidade do leite e índice de conformidade das boas práticas para manejo de ordenha em propriedades leiteiras de Minas Gerais, Brasil..... 127

Table 1 - Climate conditions of the studied periods. Samples were collected from August 2009 to February 2010 at dairy farms in Minas Gerais State, Brazil 131

Table 2 - ELISA screening analysis of AFM₁ in raw milk samples from Minas Gerais, Brazil collected during different climatic periods and the estimated daily intake 132

Table 3 - Aflatoxin M₁ (AFM₁) in 18 samples of raw milk at concentrations above 0.05 µg/L obtained in the screening test (ELISA) and confirmed by HPLC analysis 133

Table 4 - HPLC confirmatory analysis of 18 samples with AFM₁ concentration above 0.05 µg/L in the ELISA screening test 133

Table 5. Estimated daily intake of AFM₁ from Brazilian raw milk produced during different climate periods analyzed by Elisa screening and HPLC-FD confirmatory method 134

LISTA DE ABREVIATURAS

ABA: abamectina
ACN: acetonitrila
AFB₁: aflatoxina B₁
AFM₁: aflatoxina M₁
ANVISA: Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AOAC: *Association of Official Analytical Chemists*
APHA: *American Public Health Association*
APPCC: Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle
BLMR: limite máximo de resíduo estabelecido pela legislação brasileira
BPA: boas práticas agropecuárias
CBT: contagem bacteriana total
CCD: cromatografia em camada delgada
CCS: contagem de células somáticas
CC α : limite de decisão
CC β : capacidade de detecção
CFT: ceftiofur
CG-DCE: cromatografia gasosa com detector de captura de elétrons
CIPRO: ciprofloxacina
CLAE-MS/MS: cromatografia líquida de alta eficiência e espectrometria de massas *in tandem*
CLX cloxacilina
CNPq: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
CTC: clortetraciclina
CYF: ciflutrina
CYP: cipermetrina
DCX: dicloxacilina
DEL: deltametrina
DIFLO: difloxacina
DNA: ácido desoxirribonucléico
DOR: doramectina
DOXI: doxiciclina
EDI: *estimate daily intake* (ingestão diária estimada)
ELISA: *enzyme-linked immunoabsorbent assay*
EMA: emamectina
EMEA: *European Agency for the Evaluation of Medicinal Products*
ENRO: enrofloxacina
EPI: equipamentos de proteção individual
EPR: eprinomectina

ESD: extrato seco desengordurado
EST: extrato seco total
EUA: Estados Unidos da América
FAO: *Food and Agriculture Organization of the United Nations*
FDA: *Food and Drug Administration*
FEV: fenvalerato
FLU: flumequina
HPLC: *high performance liquid chromatography*
HPLC-FD: *high performance liquid chromatography with fluorescence detector*
IBGE: Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IDA: ingestão diária aceitável
IDF: *International Dairy Federation*
IVR: ivermectina
JECFA: *Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives*
LMDR: limite mínimo de desempenho requerido
LMR: limite máximo de resíduo
LMT: limite máximo tolerado
LOD: limite de detecção
LOQ: limite de quantificação
MAPA: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
MeOH: metanol
MOX: moxidectina
MRL: *maximum residue limit*
Na₂EDTA: ácido etilenodiaminotetraacético dissódico
NALIDIX: ácido nalidíxico
NaOH: hidróxido de sódio
NAP: nível adequado de proteção
NOR: norfloxacina
OIE: Organização Internacional de Saúde Animal
OMS: Organização Mundial de Saúde
OPAS: Organização Pan-Americana de Saúde
OR: *odds ratio*
OTC: oxitetraciclina
OXA: oxacilina
OXO: ácido oxolínico
PAMVet: Programa de Análise de Resíduos de Medicamentos Veterinários em Alimentos expostos ao consumo
PARA: Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos
PCC: Ponto Crítico de Controle
PER: permetrina

PNCRC: Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes
PNG: penicilina G
PNV: penicilina V
RIISPOA: Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal
SARA: sarafloxacina
SCP: sulfaclopiridazina
SDMX: sulfadimetoxina
SDX: sulfadoxina
SDZ: sulfadiazina
SFX: sulfisoxazol
SIF: Serviço de Inspeção Federal
SIMGE: Sistema de Meteorologia e Recursos Hídricos de Minas Gerais
SMA: sulfametoxazol
SMR: sulfamerazina
SMZ: sulfametazina
SPY: sulfapiridina
SQX: sulfaquinoxalina
STZ: sulfatiazol
TC: tetraciclina
TMP: trimetoprim
UAT: ultra alta temperatura
URA: umidade relativa do ar
USA: *United States of America*
WHO: *World Health Organization*
 γ -CYH: γ -cialotrina
 λ -CYH: λ -cialotrina

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	27
CAPÍTULO 1	31
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	31
1 PRODUÇÃO E QUALIDADE DE LEITE	32
1.1 QUALIDADE DO LEITE CRU REFRIGERADO.....	33
1.1.1 Qualidade físico-química.....	33
1.1.2 Contagem de Células Somáticas (CSS).....	35
1.1.3 Qualidade microbiológica do leite	38
1.1.4 Micotoxinas em leite	40
1.1.5 Resíduos de produtos de uso veterinário em leite	42
1.2 AVALIAÇÃO DE RISCO	61
CAPÍTULO 2	65
RESÍDUOS DE PIRETRÓIDES, LACTONAS MACROCÍCLICAS E ANTIMICROBIANOS EM LEITE CRU DE PROPRIEDADES LEITEIRAS DE MINAS GERAIS, BRASIL	65
1 INTRODUÇÃO	66
2 MATERIAIS E MÉTODOS	68
2.1 PROCEDIMENTO DE AMOSTRAGEM.....	68
2.2 DETERMINAÇÃO DE RESÍDUOS DE PRODUTOS DE USO VETERINÁRIO.....	69
2.2.1 Reagentes e soluções padrão.....	69
2.2.2 Procedimentos de preparo de amostra.....	70
2.2.3 Equipamentos e condições cromatográficas	73
2.2.4 Critérios de desempenho dos métodos confirmatórios	75
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	77
4 CONCLUSÕES	86
CAPÍTULO 3	87
BOAS PRÁTICAS AGROPECUÁRIAS E SUA INFLUÊNCIA NO RISCO DE PRODUÇÃO DE LEITE COM RESÍDUOS DE PRODUTOS DE USO VETERINÁRIO	87
1 INTRODUÇÃO	89
2 MATERIAIS E MÉTODOS	90
2.1 SELEÇÃO DAS PROPRIEDADES LEITEIRAS E COLETA DE DADOS.....	90
2.2 AMOSTRAS DE LEITE CRU REFRIGERADO.....	91
2.3 ANÁLISES LABORATORIAIS.....	92

2.4	ANÁLISE ESTATÍSTICA	92
2.4.1	Simulação do risco de produção de leite com presença de resíduos de produtos de uso veterinário por modelo estocástico	93
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	96
3.1	SIMULAÇÃO DO RISCO DE PRODUÇÃO DE LEITE COM PRESENÇA DE RESÍDUOS DE PRODUTOS DE USO VETERINÁRIO POR MODELO ESTOCÁSTICO.....	108
4	CONCLUSÕES	110
CAPÍTULO 4	113	
QUALIDADE DO LEITE: INFLUÊNCIA DAS CONDIÇÕES CLIMÁTICAS E PRÁTICAS NO MANEJO DE ORDENHA.....		
1	INTRODUÇÃO.....	115
2	MATERIAL E MÉTODOS.....	116
2.1	AMOSTRAGEM E ANÁLISES.....	116
2.2	INFLUÊNCIA DAS CONDIÇÕES CLIMÁTICAS NA QUALIDADE DO LEITE CRU.....	117
2.3	INFLUÊNCIA DO TREINAMENTO E DAS BOAS PRÁTICAS DE MANEJO DE ORDENHA NA QUALIDADE DO LEITE CRU..	118
2.4	ANÁLISES ESTATÍSTICAS	119
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	119
3.1	INFLUÊNCIA DAS CONDIÇÕES CLIMÁTICAS NA QUALIDADE DO LEITE CRU.....	119
3.2	INFLUÊNCIA DO TREINAMENTO E DAS BOAS PRÁTICAS DE MANEJO DE ORDENHA NA QUALIDADE DO LEITE CRU..	123
4	CONCLUSÕES	127
CAPÍTULO 5	129	
INFLUÊNCIA DAS CONDIÇÕES CLIMÁTICAS SOBRE A CONTAMINAÇÃO POR AFLATOXINA M1 NO LEITE CRU PRODUZIDO EM MINAS GERAIS, BRASIL		
129		
CONSIDERAÇÕES FINAIS		137
REFERÊNCIAS.....		139
ANEXO A – LISTA DE VERIFICAÇÃO PADRÃO		161

INTRODUÇÃO

Segurança alimentar é assunto de interesse mundial, o que faz com que paradigmas do desenvolvimento sustentável e métodos de planejamento e controle de qualidade sejam necessários e desejáveis em todos os elos que compõem a cadeia agro-alimentar. As empresas têm se voltado para a origem de seus problemas, buscando produção e tecnologias mais seguras que substituam os tratamentos convencionais (destruição de produtos, penalização de produtor, descarte de produtos, recolhimento de produtos no mercado, dentre outros). A prevenção é preferível por se tratar de medida mais efetiva especialmente em relação à presença de resíduos químicos e contaminantes em alimentos, visto que não há tecnologia que seja capaz de minimizar ou reduzir os impactos causados por estes resíduos e/ou contaminantes à saúde do consumidor, assim como, indústria e meio ambiente.

Produtos de uso veterinário são utilizados na produção animal para prevenção ou tratamento de doenças, controle de parasitas e como aditivo alimentar, promoção de crescimento dos animais e melhoria da eficiência na utilização dos alimentos. Antimicrobianos são preconizados para tratamento de doenças infecciosas agudas, geralmente por períodos relativamente curtos, de até uma semana. Períodos mais longos são utilizados para promoção do crescimento, para aumentar ganho de peso e conversão alimentar, ou como medida profilática contra uma ou mais doenças. Neste processo, os antimicrobianos ou seus derivados metabólicos podem acumular, depositar ou serem estocados nas células, tecidos ou órgãos do animal (BRITO, 2000). Quando vestígios destas substâncias são detectados nos alimentos, são denominados resíduos.

Para garantia de produção de alimentos seguros é necessário reduzir e prevenir o desperdício durante o processo de produção e não somente a tomada de ações corretivas após sua detecção. Especialmente, quando se considera que análises e verificação laboratorial muitas vezes não podem ser utilizadas em caráter preventivo, pois detectam o problema instalado. O processo produtivo eficaz resulta da aplicação de medidas eficientes no uso de matéria-prima selecionada e de boa qualidade, recursos naturais e energéticos sustentáveis e seguros, redução e eliminação de substâncias tóxicas e perigosas, uso responsável de substâncias químicas e produtos de uso veterinário na cadeia produtiva agroalimentar como um todo, e, desta forma, mitigar os impactos econômicos, sanitários, ambientais, além de proteger a saúde do consumidor (BRASIL, 1999).

Grande parte dos programas internacionais que visam garantia da segurança alimentar se baseia no controle de remanescentes residuais nos alimentos, em decorrência do uso de produtos de uso veterinário, micotoxinas ou por acidentes envolvendo contaminantes ambientais. O Brasil, como um dos mais importantes parceiros comerciais no fornecimento de alimentos, necessita desse controle, onde essa prática é quase imposição no contexto do comércio internacional de produtos pecuários *in natura* e processados (BRASIL, 1999).

O Brasil como um dos maiores produtores e exportadores de proteína animal, tem grande responsabilidade no fornecimento de alimentos de qualidade, para suprir a demanda não somente da população brasileira, como também, mundial, sendo o quarto maior produtor de leite do mundo (EMBRAPA, 2013). No entanto, uma alta produção de leite com elevada produtividade, muitas vezes leva à utilização de produtos químicos na produção animal podendo acarretar em sérias implicações na saúde pública. Assim, acredita-se que a adoção e padronização de procedimentos com foco na prevenção e controle do uso de produtos de uso veterinário no campo, especialmente as Boas Práticas Agropecuárias (BPA), sejam de grande importância para garantia da saúde animal e humana, com rastreabilidade, proteção ambiental, abertura de novos mercados, e também, maior produtividade e rentabilidade com segurança, qualidade e responsabilidade.

Segundo McCluskey e Winfree (2009), sugere-se a adoção de programas proativos por parte das empresas antecipadamente às normas, adotando padrões internos mais rigorosos. Porém, não divergentes buscando sempre consonância com recomendações internacionalmente reconhecidas. Portanto, torna-se interessante a utilização de incentivos privados, buscando pagamento diferenciado, melhor custo-benefício, maior garantia de segurança e qualidade, assim como, conquista de novos e mais exigentes mercados consumidores. Tal fato se apresenta atualmente necessário, visto que os consumidores demonstram percepções crescentes a respeito dos riscos em relação aos produtos adquiridos, promovendo implicações diretas na saúde pública, procurando cada vez mais uma alimentação saudável.

Esta tese é apresentada em forma de capítulos, sendo o capítulo 1 uma breve revisão bibliográfica sobre os principais fatores que interferem e determinam a qualidade do leite, assim como, a importância e o impacto dos resíduos de produtos de uso veterinário e contaminantes no leite, com apresentação das principais regulamentações e programas de fiscalização vigentes no Brasil e no mundo, assim como, estratégias propostas para o controle e a prevenção

de resíduos químicos em alimentos, acrescentando a importância da avaliação de risco para a garantia da segurança dos produtos de origem animal. Os demais capítulos foram elaborados no formato de artigos científicos.

O Capítulo 2 apresenta um diagnóstico de situação em relação à pesquisa de 42 analitos de produtos de uso veterinário em amostras de leite cru de propriedades leiteiras de Minas Gerais, Brasil, analisadas no presente estudo, segundo a legislação vigente no Brasil.

No capítulo 3, uma abordagem é apresentada do impacto das BPA sobre a ocorrência de resíduos de produtos de uso veterinário no leite, com uma avaliação da influência do treinamento para implementação das BPA sobre o risco de se produzir leite com presença de tais resíduos.

O capítulo 4 apresenta uma análise da influência de diferentes condições climáticas associada às Boas Práticas no manejo de ordenha, na qualidade físico-química, microbiológica, contagem de células somáticas (CCS) e volume diário de produção de leite nas propriedades rurais selecionadas nesse estudo.

O capítulo 5 relata a influência de diferentes condições climáticas sobre a estimativa de ingestão diária e ocorrência de resíduos de aflatoxina M₁ no leite, segundo as legislações nacional e internacional vigentes.

O objetivo deste estudo foi avaliar o volume e a qualidade do leite produzido em propriedades leiteiras de Minas Gerais, Brasil, em diferentes tempos e condições climáticas. Além disso, foi realizado treinamento para implementação das BPA buscando avaliar sua influência sobre a qualidade e quantidade do leite produzido a partir do monitoramento dos principais fatores de risco identificados por meio da aplicação de listas de verificação padrão e amplo controle analítico do leite produzido.

CAPÍTULO 1

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1 PRODUÇÃO E QUALIDADE DE LEITE

O Brasil possui o segundo maior rebanho bovino do mundo e ocupa o quarto lugar em relação à produção, com estimativa de 32 bilhões de litros de leite (EMBRAPA, 2013). No País, os maiores produtores estão na região Sudeste e, Minas Gerais lidera a produção nacional com aproximadamente 30% de toda produção. Em seguida, tem-se o Rio Grande do Sul (RS), Paraná (PR), Goiás (GO), Santa Catarina (SC) e São Paulo (SP) (IBGE, 2011).

Os parâmetros que definem a qualidade do leite variam entre países, regiões, rebanhos, aspectos técnicos, sanitários e as condições higiênicas para obtenção e preservação da matéria-prima. Alguns parâmetros são indicadores internacionais de qualidade do leite e incluem, a contagem bacteriana total (CBT), os teores de gordura e proteína, a contagem de células somáticas (CCS), resíduos de produtos de uso veterinário e contaminantes e, o controle de tuberculose e brucelose. Variações nas características físico-químicas e microbiológicas do leite afetam consideravelmente o processo de produção de queijos e qualidade do produto final. Os principais pontos a serem considerados são: variações nos teores de proteína e gordura do leite devido a fatores genéticos ou de alimentação do gado (principalmente no que se refere ao suprimento de energia); concentração de cetona e ureia no leite e desordens metabólicas; CCS e saúde do úbere; e, qualidade microbiológica do leite refletido pelas condições de ordenha, coleta e estocagem do leite (TRONCO, 2008).

A presença de resíduos e/ou contaminantes no leite, tais como antimicrobianos, antiparasitários, contaminantes inorgânicos (metais pesados), tireostáticos, beta-agonistas, promotores de crescimento, poluentes ambientais, dentre outros, acarretam não somente danos à saúde do consumidor, como também, sérios prejuízos às exportações no agronegócio internacional, importante para o desenvolvimento brasileiro (GOMES, 2004).

Diversas indústrias laticinistas no Brasil adotam sistemas de pagamento por qualidade buscando bonificar os produtores utilizando padrões de qualidade do leite desejáveis e/ou penalizar baixa qualidade com base em resultados obtidos a partir de análises realizadas na rotina. Os principais critérios utilizados nestes sistemas incluem parâmetros de avaliação físico-química, microbiológica, CCS e resíduos e/ou contaminantes. Tal ferramenta é útil e vantajosa a todos os setores da cadeia láctea, pois beneficia a indústria, aumentando o rendimento industrial; o produtor rural, possibilitando remuneração mais vantajosa;

o mercado varejista, aumentando vida útil dos produtos lácteos; e, o consumidor, com aquisição de produtos de qualidade, além de mais seguros.

1.1 QUALIDADE DO LEITE CRU REFRIGERADO

De acordo com o Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal (RIISPOA), em seu Art. 475 (BRASIL, 1952), entende-se por leite, sem outra especificação, o produto oriundo da ordenha completa, ininterrupta, em condições de higiene, de vacas sadias, bem alimentadas e descansadas. Trata-se de um alimento de grande valor nutritivo, que no entanto, constitui também, excelente meio de cultura para o desenvolvimento de micro-organismos patogênicos e deteriorantes (TEUBER, 1992; CHAMBERS, 2002; RUEGG, 2003). Os micro-organismos contaminantes podem causar alterações físico-químicas e sensoriais, além de problemas econômicos e de saúde pública, limitando a durabilidade do leite e seus derivados (JAYARAO et al., 2004; ELMOSLEMANY et al., 2010).

A qualidade dos derivados lácteos depende diretamente da qualidade intrínseca da matéria-prima e de sua adequada conservação (refrigeração até 4 °C), tempo de armazenamento e transporte até seu processamento na indústria, sendo o tempo e a temperatura de refrigeração um ponto crítico na produção de leite. Problemas podem ocorrer a partir de um longo tempo de estocagem e/ou processo de refrigeração inadequado, afetando irreversivelmente a qualidade do produto final (CHAMBERS, 2002; JAYARAO et al., 2004; BAVA et al., 2011), onde as práticas de manejo adotadas no campo influenciam na qualidade do produto final (ELMOSLEMANY et al., 2010).

1.1.1 Qualidade físico-química

De acordo com o Art. 476 do RIISPOA (BRASIL, 1952), considera-se leite normal, o produto que apresente: caracteres normais; teor de gordura mínimo de 3,0%; acidez em graus Dornic entre 15 e 20; densidade a 15 °C entre 1.028 e 1.033; lactose - mínimo de 4,3%; extrato seco desengordurado (ESD) - mínimo 8,5%; extrato seco total (EST) - mínimo 11,5%; e, índice crioscópico mínimo de -0,55 °C.

Além do RIISPOA, outra legislação vigente no Brasil é a Instrução Normativa nº 62 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) (BRASIL, 2011a) que estabelece parâmetros físico-químicos de qualidade para o leite cru refrigerado. Dentre os

quais, o mínimo de 3,0% de gordura, 8,4% de ESD e 2,9% de proteína, além de 0,14 a 0,18 g/100mL em ácido lático, para acidez titulável.

De acordo com Harding (1995) a composição química média do leite é de 87,4% de água e 12,6% de sólidos totais, 3,9% gordura; 3,2% proteína; 4,6% lactose e 0,9% minerais. Segundo Santos, Rodrigues e Rubinich (1989), esta composição varia devido a diversos fatores, tais como: fisiologia individual, alimentação, estágio de lactação, porção da ordenha, idade, raça, estação do ano, quantidade de leite produzido, estado de saúde da vaca, intervalo entre as ordenhas, persistência da lactação, tamanho da vaca, variação entre os quartos, temperatura ambiental e efeito de doenças.

A água é o componente mais abundante no qual se encontram em solução os demais constituintes do leite, que têm demonstrado crescente sinergismo. O extrato seco total (EST) engloba todos os componentes do leite, exceto a água. O extrato seco desengordurado (ESD) compreende todos os elementos do leite, menos a água e o teor de gordura (TRONCO, 2008).

A composição do leite e sua qualidade têm papel fundamental para a agroindústria, pois a produção de derivados depende da quantidade de constituintes específicos presentes no leite cru, como os teores de gordura e ESD. No Brasil, a produção total de leite e o teor de gordura são as características mais enfatizadas pelos serviços de controle leiteiro. A gordura é o componente do leite que mais varia dentre todos os constituintes e pode ser facilmente modificado por fatores nutricionais (TRONCO, 2008; GONZÁLEZ et al., 2011).

A gordura do leite é quase totalmente constituída por triglicerídeos (99%), apresenta-se na forma de glóbulos, sendo revestida por uma membrana e composta de fosfolipídeos e proteínas. O triglicerídeo possui quantidade significativa de ácidos graxos saturados de cadeia curta, enquanto os fosfolipídeos apresentam também baixo teor de ácidos graxos insaturados (6%). Embora os principais ácidos graxos presentes na gordura sejam o palmítico, oléico e esteárico, esta diferencia-se das demais gorduras animais pela quantidade significativa de ácido graxo de cadeia curta (C_4 a C_{12}) que apresenta (ARAÚJO, 2008).

A proteína é o nutriente mais valorizado nos atuais sistemas de pagamento por qualidade do leite, sendo a caseína seu principal componente (GONZÁLEZ et al., 2011). O teor de proteína, varia de 2,8 a 4,0% do total de leite produzido, sendo também proporcional ao teor de gordura presente. As caseínas correspondem mais de 80% do total de proteínas, sendo o restante, composto por α -lactoalbuminas, β -

lactoalbuminas, albumina sérica, imunoglobulinas (IgG₁, IgG₂, IgA e IgM), componentes secretores e lactoferrina (FARRELL et al., 2004).

A lactose é responsável por 52% dos sólidos totais do leite e 70% dos sólidos encontrados no soro do leite e o seu teor regula a água presente na glândula mamária e, assim, o volume de leite produzido (SANTOS; FONSECA, 2007). A síntese de lactose é um dos mecanismos críticos para sustentar a produção de leite, uma vez que é responsável pela drenagem de água para o alvéolo mamário. Essa é, provavelmente, a razão de ser o componente do leite que menos varia em função do ambiente (GONZÁLEZ et al., 2011). As mudanças na concentração de lactose durante a mastite podem ocorrer devido à passagem de lactose do leite para o sangue, o que pode ser comprovado pelas concentrações elevadas de lactose no sangue e urina de vacas com mastite (SHUSTER et al., 1991). Adicionalmente, a lesão tecidual ocasionada pela mastite reduz a capacidade de síntese de lactose pelo epitélio glandular, o que afeta significativamente a quantidade de leite produzida, devido ao papel central da lactose como agente regulador osmótico do volume do leite (MEPHAN, 1993).

O leite contém todos os minerais biologicamente importantes, incluindo microelementos. As substâncias minerais representam cerca de 0,6 a 0,8% do peso do leite e, nas análises, são designadas como cinzas, representando o resíduo que fica depois que o leite foi submetido ao processo de incineração. Entre os minerais do leite, o cálcio e o fósforo representam um papel importante para a saúde humana. O leite contém ainda diversas vitaminas (mesmo que algumas estejam presentes apenas como traços), classificadas em lipossolúveis (A, D, E e K) e hidrossolúveis (B e C), todas susceptíveis à destruição por diversos fatores: tratamentos térmicos, ação da luz e oxidações (TRONCO, 2008).

De acordo com Santos e Fonseca (2007), a qualidade do leite é determinada por dois aspectos básicos: a composição físico-química e o nível higiênico-sanitário, os quais definem seu potencial nutricional, industrial e de segurança alimentar.

1.1.2 Contagem de Células Somáticas (CSS)

A mastite, inflamação da glândula mamária, caracteriza-se por mudanças físico-químicas na composição do leite e aumento na CCS, especialmente de leucócitos. Trata-se de uma das mais preocupantes enfermidades do rebanho leiteiro, capaz de provocar consideráveis prejuízos, pela redução de produção de leite decorrente da diminuição

da capacidade secretora do úbere, pelo comprometimento das características físico-químicas e microbiológicas do leite. Além disso, essa enfermidade pode resultar em problemas de saúde pública, em algumas circunstâncias. A CCS é um parâmetro diretamente relacionado com a saúde da glândula mamária do rebanho e intimamente relacionada à qualidade industrial do leite. Pesquisas comprovaram que a CCS afeta as características sensoriais do leite e de seus derivados, rendimento industrial para fabricação de lácteos e tempo de prateleira dos produtos finais (KITCHEN, 1981; HARDING, 1995; TRONCO, 2008).

As células somáticas do leite são compostas basicamente por dois tipos celulares principais: células de descamação do epitélio secretor e células de origem do sangue. Em vacas sadias, 65 a 80% do total de células somáticas são de origem epitelial, enquanto que este número diminui para 50% em animais com mastite crônica e para 10 a 45%, em casos mais graves. O aumento da CCS do leite nos casos de mastite ocorre pela maior passagem de leucócitos do sangue para a glândula mamária aliada a maior descamação do epitélio lesado. Entre os leucócitos, os neutrófilos polimorfonucleares são aqueles que apresentam maior aumento percentual, tornando-se predominantes entre células somáticas nos animais acometidos pela mastite (ZACHOS; POLITIS; GOREWIT, 1992).

Com base na importância da CCS sobre a qualidade do leite, alguns países estabeleceram seus limites máximos permitidos no leite para consumo humano. No Brasil, o limite máximo vigente para CCS é de 600.000 células/mL, parâmetro que será alterado para 500.000 e 400.000 células/mL a partir de julho de 2014 e 2016 nas regiões Sul, Sudeste e Centro-Oeste, respectivamente (BRASIL, 2011a), aproximando-se progressivamente aos padrões de países e mercados mais exigentes.

Vários fatores fisiológicos e ambientais podem influenciar a CCS do leite, tais como estágio de lactação, idade da vaca, número de lactações, estação do ano, práticas de manejo, qualidade e eficiência da ordenha e intervalos entre ordenhas. No entanto, está bem esclarecido que a infecção da glândula mamária é o principal fator que afeta a CCS (HARDING, 1995; DUFOUR et al., 2011).

De acordo com Tronco (2008), a mastite provoca uma série de alterações físico-químicas no leite: modificações do pH; diminuição nos teores percentuais de EST, caseína, gordura e lactose; aumento dos teores percentuais de minerais como sódio e cloro e diminuição do cálcio e fósforo; aumento da atividade de algumas enzimas (catalase, fosfatase ácida entre outras). Também podem ocorrer problemas

relacionados às características sensoriais do leite, fermentações anormais, demora na coagulação, dificuldade de separação do soro do leite no processo de fabricação dos queijos, diminuição no rendimento de produção e diminuição da estabilidade térmica do leite, constituindo os principais problemas tecnológicos observados na indústria, decorrentes do uso de leite proveniente de animal com mastite. Além disso, alta CCS pode ser indicativo de maior risco da ocorrência de resíduos de antimicrobianos no leite, pois demanda maior uso de produtos veterinários. Assim, o cuidado com a saúde pública deve dar ênfase especial aos resíduos de antimicrobianos, pois os mesmos não são inativados pelos processamentos térmicos industriais tradicionais (DUFOUR et al., 2011).

A CCS e CBT são internacionalmente utilizadas como padrões de qualidade do leite. Para os produtores de leite em todo o mundo, a CCS não é apenas uma medida de saúde do úbere e desempenho do rebanho, mas também, fator determinante de mercado, segundo Dufour et al. (2011). No Brasil, presume-se que 50% das vacas leiteiras possuem quartos infectados por mastite subclínica. Sendo que o risco da presença da mastite é uma soma de diversos fatores individuais, de manejo, alimentação, clima, tipos de ordenha e higiene em geral (TRONCO, 2008).

Em termos econômicos, valores elevados de CCS trazem grandes prejuízos tanto ao produtor de leite, quanto à indústria de laticínios. Com relação ao produtor, as maiores perdas estão relacionadas à redução na produção pelos animais infectados. As perdas econômicas associadas à incidência de mastite, podem ser quantificadas da seguinte forma, de acordo com dados de Blosser (1979): valor da produção de leite não produzido (70% do total de perdas); descarte prematuro de vacas (14% do total); valor do leite descartado (8% do total) e despesas com veterinário e tratamentos (8% do total). Com relação aos prejuízos envolvendo as indústrias de laticínios, pode-se dizer que estes são causados pelas alterações físico-químicas e microbiológicas do leite com alta CCS, que acarretam diminuição da qualidade e rendimento industrial dos derivados lácteos. Adicionalmente ao impacto econômico da mastite, há perdas econômicas significativas para as indústrias devido à baixa qualidade do leite.

Utilizando modelo estatístico, Schällibaum (2000a) estimou que um aumento na média nacional da CCS de leite de tanques de expansão na Suíça de 100.000 para 200.000 células/mL resultaria em perda de aproximadamente 880 toneladas de queijo por ano. Isto significaria perda financeira aos produtores de queijo de aproximadamente 14

milhões de francos suíços (cerca de US\$7.750.000,00). Segundo Politis e Ng-Kwai-Hang (1988), o queijo produzido com leite contendo 600.000 células/mL apresenta reduções de 0,5% no teor de gordura, de 0,4% de proteína e de 0,9% de sólidos totais do que aquele produzido com leite contendo 100.000 de CCS. Assim, CCS superior a 100.000 células/mL, significa pior qualidade do leite e rendimento dos derivados lácteos na indústria.

Ainda que a presença de células somáticas no leite não apresente riscos diretos à saúde do consumidor, a CCS é uma medida da qualidade do leite relacionada com as condições higiênicas e sanitárias de produção. De forma geral, as condições higiênicas das fazendas que produzem leite com baixa CCS são melhores que aquelas que produzem leite com alta CCS (BARKEMA et al., 1999; DUFOUR et al., 2011). Estas propriedades, cujo leite possui menor CCS, apresentam menor risco quanto à presença de resíduos de inibidores e contaminantes em leite.

1.1.3 Qualidade microbiológica do leite

A microbiota do leite é importante e reflete a saúde da vaca, a produtividade da fazenda, o valor do leite para a indústria e influencia na avaliação do leite pelo consumidor, sendo portanto, de grande importância econômica para a cadeia produtiva. Métodos adequados e estratégias estão disponíveis para a produção de leite inócuo e legalmente de boa qualidade. A produção de leite seguro beneficia o animal, o produtor, a indústria, meio ambiente e o consumidor. A sobrevivência de todos os participantes da cadeia produtiva do leite depende de produção com a melhor qualidade possível (TRONCO, 2008).

A ordenha das vacas de forma higiênica, atestado sanitário do rebanho, saúde do ordenhador, condições sanitárias do ambiente de ordenha, tipo de equipamento utilizado e suas condições desde a colheita até o transporte e entrega do leite à indústria, assim como, condições e formas de beneficiamento industrial interferem de forma direta na qualidade final do produto. Portanto, cada etapa de produção exige o controle rigoroso de toda operação visando assegurar boa qualidade físico-química e microbiológica do leite. Assim, a manutenção da qualidade depende da produção higiênico-sanitária, condições de armazenamento na propriedade e de transporte do leite até a indústria (CERQUEIRA et al., 1999a).

De acordo com Santos e Fonseca (2007), os critérios relacionados com qualidade higiênica do leite são bastante diversos e adotados em praticamente todos os países que apresentam indústria láctea minimamente desenvolvida para efeito de pagamento. Cabe destacar que tais parâmetros, e, especialmente, aqueles relacionados com a qualidade microbiológica do leite, são utilizados como critério mínimo para aceitação da matéria-prima por parte da indústria e inseridos dentro da legislação oficial de cada país ou região. No Brasil, o atual parâmetro para contagem bacteriana total (CBT) é de no máximo 600.000 UFC/mL, sendo que novos e mais rigorosos valores, tais como, 300.000 e 100.000 UFC/mL serão exigidos para as regiões Sul, Sudeste e Centro-Oeste, a partir de julho de 2014 e 2016, respectivamente (BRASIL, 2011a).

A baixa qualidade do leite cru é conhecida em todo o território brasileiro, e como consequência resulta em produtos beneficiados de qualidade inferior (NERO et al., 2004; NERO et al., 2005; ARCURI; BRITO; PINTO, 2006; NERO; VIÇOSA; PEREIRA, 2009). O principal parâmetro utilizado para se verificar a qualidade desse produto é seu perfil microbiológico, determinado principalmente pela forma de obtenção, armazenamento e transporte do leite. Grupos específicos de micro-organismos como os aeróbios mesófilos, coliformes e psicrotróficos são pesquisados para esse fim. A presença de elevada contaminação microbiana em leite e derivados compromete a vida útil desses produtos, já que promove a deterioração de alguns componentes, como proteínas, gordura e açúcares (CHAMBERS, 2002).

Elmoslemany et al. (2010) realizaram estudo no Canadá buscando determinar os fatores de risco (dados demográficos e climáticos, limpeza e higiene dos animais, procedimentos de ordenha e controle de mastite, assim como manutenção e limpeza de equipamentos) associados à má qualidade microbiológica do leite armazenado sob refrigeração em tanques de expansão. Os dados foram coletados a partir de 235 produtores de leite, dos quais 153 responderam à pesquisa (taxa de resposta de 65%). Observou-se que a CBT pode ser considerada como indicador das condições higiênicas de produção de leite, que, no entanto, sofre grande variação sazonal, observando-se melhor qualidade de leite durante o inverno (período seco).

A qualidade industrial também está intrinsecamente relacionada com a qualidade microbiana da matéria-prima. Pesquisas demonstraram que características sensoriais dos produtos finais, vida de prateleira e rendimento industrial são afetados de forma significativa pela qualidade microbiológica do leite. As bactérias fermentadoras de lactose levam ao

aumento da acidez do leite que compromete, dentre outros aspectos, o processamento industrial e qualidade dos produtos finais, tais como, leite tratado termicamente pelo processo de Ultra Alta Temperatura (UAT) e queijos. Os micro-organismos psicrotróficos podem produzir enzimas, que ao degradarem as frações proteicas e lipídicas no leite e derivados, reduzem sua vida de prateleira, provocando “geleificação” do leite UAT e queda no rendimento industrial para fabricação de derivados lácteos (BEZERRA, 2008).

1.1.4 Micotoxinas em leite

O leite é altamente susceptível a contaminações microbianas tornando-o facilmente deteriorável, podendo ser veículo de toxinfecção alimentar. Existe, ainda a contaminação ocasionada por substâncias e/ou resíduos químicos entre os quais as micotoxinas, com grande destaque para o grupo das aflatoxinas, produzidas por algumas espécies de *Aspergillus* que crescem em alguns tipos de grãos, cereais e rações. As condições ambientais que mais favorecem o desenvolvimento de fungos nos alimentos são a umidade relativa do ar (URA) entre 50 e 85% e temperatura ambiente próxima de 28 °C (JAY, 1992).

Aflatoxinas são compostos altamente tóxicos, mutagênicos, teratogênicos e carcinogênicos. A Aflatoxina B₁ (AFB₁) é considerada a mais potente toxina hepatocarcinogênica, destacando-se nesse grupo a Aflatoxina M₁ (AFM₁), considerada metabólito da AFB₁ devido a sua hidroxilação, secretada no leite de mamíferos que ingerem alimentos contaminados (BAKIRCI, 2001; LOPEZ et al., 2001). Como a contaminação tem início na alimentação animal, os controles devem ser rigorosos nos processos de fabricação de rações animais, especialmente. Além disso, torna-se necessário investimentos em educação para conscientização dos produtores rurais, indústrias de laticínios e consumidores, em relação às perdas econômicas e efeitos tóxicos advindos da presença de aflatoxinas no leite (SADIA et al., 2012).

Segundo Creppy (2002), o consumo de 1 a 3% de AFB₁ no alimento já é suficiente para que se detecte AFM₁ no leite produzido, podendo ocorrer variação individual por animal, tempo de ordenha e outros fatores. Após cessar o consumo de alimento contaminado com a toxina, em até 72 horas são reduzidos os níveis de concentração de AFM₁ no leite, se tornando indetectável. A AFM₁ está classificada no Grupo 1 de risco (carcinogênicos para humanos) pela Agência Internacional de Pesquisa do Câncer (IARC, 2002). Assim, a exposição

à AFM₁ por produtos lácteos contaminados pode ser considerada sério problema de saúde pública (RUANGWISES; RUANGWISES, 2010).

Os humanos podem ser expostos à AFM₁ pelo consumo de produtos lácteos contaminados. Bebês e crianças sofrem maior exposição e risco, devido ao maior consumo desse gênero alimentício. No entanto, não se pode eliminar o risco da toxina ser excretada pelo leite de lactantes contaminadas (TURCONI et al., 2004). A aflatoxina é um composto termoestável, não sendo modificada completamente ou inativada pelos tratamentos térmicos pelo calor, como utilizados na pasteurização do leite, podendo estar presente em produtos lácteos pasteurizados, esterilizados e fermentados (PIETRI et al., 1997).

Estudos mostram que a contaminação do leite e seus derivados lácteos por aflatoxinas, assim como sua concentração nos produtos, variam conforme a posição geográfica, nível de desenvolvimento do país e estação climática (TAJKARIMI et al., 2008). Em pequenas propriedades de produção de leite extensiva, na primavera e verão (período chuvoso), são oferecidos alimentos mais frescos aos animais, com maior disponibilidade de pastagens e volumoso. No entanto, em meses mais frios e secos (período seco) são preparados e fornecidos alimentos concentrados e silagem aos animais, que se estocados de maneira inadequada podem ser contaminados por aflatoxinas (KAMKAR, 2005; TAJKARIMI et al., 2008; HESHMATI; MILANI, 2010). Para eficaz controle da contaminação por aflatoxinas em leite, deve-se monitorar o suprimento de alimentos para os animais visando redução de contaminação obedecendo às boas práticas de manejo e estocagem dos alimentos (KAMKAR, 2005; BILANDZIC; VARENINA; SOLOMUN, 2010).

Variações sazonais são reportadas em relação às concentrações de AFM₁ em leite cru, sendo que níveis maiores são observados no inverno (período seco) e menores no verão (período chuvoso) (KAMKAR, 2005; HUSSAIN E ANWAR, 2008; NEMATI et al., 2010; RUANGWISES; RUANGWISES, 2010). Ruangwises e Ruangwises (2010) propuseram revisão para modificação dos limites de referência para AFM₁ em leite cru e seus derivados na Tailândia, por encontrar AFM₁ em 240 amostras de leite coletadas de tanque de expansão de 80 fazendas tailandesas. Nas amostras coletadas no inverno, as concentrações de AFM₁ foram significativamente superiores (0,089 µg/L) do que aquelas observadas em amostras de leite coletadas em períodos secos e chuvosos, com médias de 0,071 e 0,05 µg/L, respectivamente.

A União Europeia estabeleceu limite de referência máxima para AFM₁ em leite e produtos lácteos de 0,05 µg/L, sendo que produtos lácteos para alimentação de bebês devem atender ao máximo de 0,025 µg/L (COMMISSION REGULATION, 2010). No Brasil, o limite máximo tolerado (LMT) em leite, estabelecido pelo Ministério da Saúde, é de 0,50 µg/L (BRASIL, 2011b). No entanto, os níveis de micotoxinas deverão ser tão baixos quanto razoavelmente possível, devendo ser aplicadas as melhores práticas e tecnologias na produção, manipulação, armazenamento, processamento e embalagem, de forma a evitar que um alimento contaminado seja comercializado ou consumido (BRASIL, 2011b).

Algumas pesquisas de prevalência de AFM₁ em leite e derivados foram realizadas no Brasil. Em Minas Gerais, Souza, Vargas e Junqueira (1999) observaram 27 amostras positivas em 110 amostras analisadas, correspondendo a 24,5% do total de amostras utilizando o método ELISA. No entanto, AFM₁ foi confirmada em cinco amostras (18,5%) por cromatografia em camada delgada (CCD).

1.1.5 Resíduos de produtos de uso veterinário em leite

Os antimicrobianos são substâncias químicas produzidas pelo metabolismo de determinadas cepas bacterianas, fungos e actinomicetos. Podem, em soluções diluídas, impedir temporária ou definitivamente as funções vitais de outras bactérias, determinando os conhecidos efeitos bacteriostáticos e/ou bactericidas. O uso seguro e correto dessas substâncias para tratamento e prevenção de doenças e para melhorar a eficiência alimentar está amplamente difundido na produção animal e, em alguns casos, até mesmo dependente e intimamente relacionado ao aumento na atividade de produção (SHAIKH, 2011).

O desenvolvimento e identificação precoce de agentes antimicrobianos para uso na medicina veterinária estão sujeitos a muitos desafios técnicos como aqueles encontrados no uso destas substâncias para tratamento de doenças infecciosas humanas. No entanto, há consciência de que algumas classes de antimicrobianos utilizados na medicina veterinária são as mesmas utilizadas na medicina humana, podendo contribuir para o problema da resistência microbiana de patógenos em humanos e, também em animais, especialmente no que diz respeito às doenças de origem alimentar, como salmonelose e campilobacteriose. Assim, a interface entre medicina veterinária e humana ao uso de antimicrobianos e resistência microbiana, especialmente no que diz respeito à segurança alimentar, começou a

redirecionar a conduta da indústria em busca de novos agentes antimicrobianos a serem comercializados para uso em medicina veterinária. Para tanto, a utilização de ferramentas para gestão de risco, com uso apropriado dos antimicrobianos assegurando sua eficácia e minimizando o desenvolvimento de resistência bacteriana, devem ser enfatizados (SHRYOCK; RICHWINE, 2010).

A preocupação relacionada com a possível presença de antimicrobianos no leite é constante por parte das indústrias de laticínios, especialmente em relação ao seu impacto no processamento de produtos lácteos fermentados e riscos de saúde pública. Dentre as drogas apontadas, a classe dos antimicrobianos é aquela que tem monitorização mais frequente, conjunta ou paralelamente com o controle de inibidores de forma geral. Isto em decorrência dos métodos disponíveis para análise serem mais acessíveis e baratos do que aqueles aplicados para vermífugos, carrapaticidas e hormônios. Assim, a presença de substâncias inibidoras está mais relacionada ao uso de antimicrobianos, sendo mais provável devido aos tratamentos de animais com doenças, em especial, mastite e doenças do trato reprodutivo (SANTOS; FONSECA, 2007).

De acordo com Tronco (2008), os testes para detecção de resíduos e/ou conservantes no leite devem buscar a avaliação de resíduos de antimicrobianos, vermífugos, carrapaticidas, hormônios e desinfetantes com crescente importância nos programas de monitoramento e pagamento do leite. Para tanto, a maioria dos países estabeleceu limites máximos de resíduos (LMR) na legislação para cada droga específica, pois há preocupação crescente por parte dos consumidores, o que leva a uma pressão de mercado para que o risco da presença dessas drogas nos alimentos seja minimizado.

Segundo Mitchell et al. (1998) e Schäellibaum (2000b), o emprego de antimicrobianos em animais de produção é uma ferramenta fundamental para o tratamento e prevenção de doenças, sendo que os primeiros usos destas substâncias em rebanho leiteiro estão relacionados ao tratamento de mastite. Outro emprego de antimicrobianos em animais de produção é sua adição em rações, com objetivos de aumento do desempenho do animal. Com a disseminação de sistemas intensivos de produção de leite, o emprego de antimicrobianos se tornou essencial para a manutenção da saúde animal, produtividade, conforto e bem estar dos animais.

Em outro estudo realizado por Pontes-Netto et al. (2005) foram levantados os principais produtos de uso veterinário na atividade leiteira a partir de informações geradas por estabelecimentos comerciais

(cooperativas, distribuidoras e revendedoras de medicamentos veterinários). Os resultados evidenciaram que os antimicrobianos (beta-lactâmicos, aminoglicosídeos e tetraciclina) e os antiparasitários (avermectinas, piretróides e organofosforados) foram os grupos de maior destaque no estado do Paraná, Brasil. Nesse trabalho, foram identificadas 255 marcas comerciais mais utilizadas e 152 princípios ativos, usados associadamente ou não.

As mais altas concentrações de antimicrobianos no leite ocorrem depois da aplicação intramamária (SCHÄELLIBAUM, 2000b). De acordo com Smith e Hogan (1998), que pesquisaram resíduos de antimicrobianos em mais de 8.346 fazendas dos EUA, há relação entre CCS e ocorrência de resíduos de antimicrobianos no leite. Segundo os autores, cerca de 60% dos casos com presença de resíduos ocorreram em fazendas que produziam leite com CCS acima de 400.000 células/mL.

Schäellibaum (2000b) afirma que a maioria dos casos de contaminação do leite por antimicrobianos é devida à inobservância do período de carência, ordem de ordenha e limpeza insuficiente dos equipamentos de ordenha. A análise de 4.628 casos de leite contaminado enviado para indústria processadora de queijos na Suíça revelou que 95,2% dos casos foram advindos de tratamento intramamário (sendo 83,2% durante lactação e 12% no período seco); 3,34% devido ao tratamento parenteral; 0,6% devido ao tratamento intra-uterino; e, 0,4% aplicações de uso tópico de antimicrobianos.

O fator que mais influencia na detecção de resíduos de antimicrobianos no leite é o fator humano, uma vez que a contaminação do leite por esses resíduos pode ocorrer, por falta de informação ou mesmo, intencionalmente em caráter fraudulento, pelo não descarte do leite de animais em tratamento e/ou adição direta ao leite para diminuir contaminação microbiana. Tal fraude pode ser evitada pela identificação do animal, respeito ao período de carência do medicamento utilizado e eliminação do leite do animal sob tratamento (SCHÄELLIBAUM, 2000b; SHAIKH, 2011).

Com o intuito de garantir a segurança dos alimentos em relação aos resíduos de produtos de uso veterinário, a aprovação de medicamentos para animais de produção está em muitos países relacionada ao período de carência. Esse período baseia-se em relação aos níveis aceitáveis (estabelecido pela legislação vigente em cada país e/ou região) e indica o período de tempo em que o leite do animal tratado não pode ser destinado ao consumo humano. Esses períodos de carência são geralmente especificados para vacas em lactação. Em caso

de tratamentos de vacas secas (fora do período de lactação), o tempo de descarte é mais longo (SCHÄELLIBAUM, 2000b).

A presença de resíduos de produtos de uso veterinário no leite está relacionada principalmente: (1) não observação do período de carência dos produtos utilizados em vacas ordenhadas, com envio do leite com resíduos para consumo humano; (2) mistura acidental do leite contaminado com resíduos ao não contaminado; (3) excreção prolongada do produto de uso veterinário e/ou uso pela via incorreta de administração; (4) parições antes do período esperado; (5) contaminação dos equipamentos de ordenha; (6) ordenha acidental de vacas no período seco; (7) descarte somente do leite dos quartos tratados; (8) deficiência ou falta de anotação dos tratamentos realizados; (9) não identificação das vacas tratadas ou perda da identificação; (10) falha de notificação do período de retirada do leite para consumo; e, (11) uso de produtos veterinários para vacas secas durante a lactação (McEWEN; BLACK; MEEK, 1991). É importante destacar que pode haver migração de resíduos de antimicrobianos do(s) quarto(s) tratado(s) para aquele(s) não tratado(s) de um mesmo animal, segundo Folly et al. (2008).

Além do uso de antimicrobianos, observa-se o uso constante e/ou concomitante de antiparasitários nos animais para controle e tratamento de endo e ectoparasitas. No entanto, o quadro atual do controle químico do carrapato tem demonstrado aumento progressivo de resistência e, conseqüentemente, maior frequência na aplicação de acaricidas, com presença de resíduos desses produtos no leite e carne, de acordo com Mendes, Lima e Prado (2007). Segundo a FAO (2009), o combate ao carrapato está direcionado a pesquisas de estratégias de controle, combinado ao uso prudente e racional dos parasiticidas disponíveis como alternativas de controle, que levam à manutenção de populações parasitárias abaixo do seu limiar econômico com mínimo impacto ambiental. Como métodos alternativos não-químicos, incluem-se uso de animais geneticamente resistentes aos ectoparasitas, desenvolvimento de vacinas, gerenciamento de pastagem com alternância de espécies e controle biológico (LEAL; FREITAS; VAZ JÚNIOR, 2003).

A) Impactos provocados pelo uso de produtos veterinários na atividade leiteira

A presença de resíduos de produtos de uso veterinário no leite pode levar a sérios danos à produção animal, à saúde do consumidor final, assim como, perdas de rendimento industrial devido aos

problemas tecnológicos acarretados no processamento de derivados lácteos, mesmo em pequenas quantidades.

• *Impactos relacionados à indústria de laticínios:*

A presença de resíduos de produtos de uso veterinário no leite pode causar inibição na multiplicação de sua microbiota, interferindo nos resultados de análises laboratoriais de controle de qualidade, bem como na fabricação de derivados como queijos e iogurtes (VAN SCHAIK; LOTEM; SCHUKKEN, 2002). Antimicrobianos também podem ser utilizados de forma ilegal como agentes na preservação e redução da carga microbiana do leite (KANG ETHE et al., 2005). O tratamento térmico do leite tem mostrado pequena ou nenhuma influência sobre a atividade dos resíduos no leite (PAIGE; TOLLEFSON; MILLER, 1999; SCHÄELLIBAUM, 2000b; ROCA et al., 2011).

As substâncias antiparasitárias, também consideradas produtos de uso frequente na medicina veterinária para controle de endo e ectoparasitas, incluem produtos comerciais como vermífugos, larvicidas, acaricidas, inseticidas e outros. Mais estudos são necessários para avaliar seus efeitos sobre o processamento tecnológico de derivados do leite. Para o rebanho leiteiro, existem diversas restrições para o uso em vacas durante a lactação pela eliminação e persistência geralmente prolongada do produto no leite, como é o caso do levamisole e mebendazole (FAGUNDES, 1997).

• *Impactos relacionados à saúde pública e ao meio ambiente:*

Dentre os problemas de saúde advindos do consumo de leite com a presença de resíduos de antimicrobianos, pode-se ressaltar o desenvolvimento de resistência bacteriana, devido ao comprometimento da microbiota intestinal, assim como, efeitos teratogênicos de alguns princípios ativos, intoxicações, problemas auditivos (estreptomicina), anemia aplástica (cloranfenicol), reações de hipersensibilidade ao princípio ativo (urticárias, dermatites, rinite e asma brônquica), podendo levar até mesmo a casos de choque anafilático e morte (PAIGE; TOLLEFSON; MILLER, 1999; SCHÄELLIBAUM, 2000b).

Segundo Brito e Portugal (2003), resíduos de antimicrobianos encontrados em produtos de origem animal podem estar relacionados a reações de hipersensibilidade e, no caso das tetraciclinas, reações de

fotosensibilização. As tetraciclina são frequentemente utilizadas como aditivos alimentares para animais produtores de alimentos e possuem ação sobre bactérias Gram-positivo e Gram-negativo, com perfil de baixo custo. Dentre as mais de 20 tetraciclina existentes no mercado, a tetraciclina, clortetraciclina, oxitetraciclina e doxiciclina são as mais comumente utilizadas na medicina veterinária. Entretanto, resíduos de tais antimicrobianos nos alimentos podem ser encontrados devido a falhas em sua administração e emprego na produção animal (IBARRA et al., 2011, ÖNAL, 2011).

Os antimicrobianos apresentam amplo espectro de variação em relação à sua toxicidade, níveis seguros de resíduos e intervalos de segurança bem definidos. No leite, a presença de resíduos pode causar alergias em indivíduos sensibilizados, frequentemente associadas aos antimicrobianos beta-lactâmicos (penicilinas). De acordo com Weaver (1992), estima-se que aproximadamente 3,5% das pessoas tratadas com doses terapêuticas de sulfonamidas exibem reações adversas e que mais de 10% sejam alérgicas às penicilinas e seus metabólitos. Estas reações incluem desde episódios de asma, transtornos digestórios e crises de urticária, até a possibilidade de choque anafilático (NASCIMENTO; MAESTRO; CAMPOS, 2001).

Dependendo do nível de resíduos de antimicrobianos, sérios danos à saúde humana podem ser esperados. Estudos de farmacocinética demonstraram que tetraciclina não são bem absorvidas pelo trato gastrointestinal. No caso da oxitetraciclina, a taxa de absorção para condição de estômago vazio é de, aproximadamente, 60% do total ingerido. A absorção é afetada pela ingestão conjunta de produtos lácteos, hidróxido de alumínio, bicarbonato de sódio e sais de cálcio e magnésio devido à formação de quelatos e alterações no pH estomacal. Após a absorção, a oxitetraciclina é largamente distribuída pelo corpo e eliminada, principalmente, pela urina. No entanto, o risco para saúde pública resultante da utilização desses medicamentos veterinários sempre foi uma questão ainda sem resposta para as autoridades de saúde em todo o mundo (ÖNAL, 2011).

Os resíduos das sulfonamidas são preocupação devido à sua potencial toxicidade, pois seus resíduos e metabólitos podem levar a reações alérgicas em pessoas sensíveis, distúrbios no sistema hematopoiético e efeitos carcinogênicos, já demonstrados em ratos. Além destes efeitos, os resíduos destas substâncias antibacterianas podem contribuir para o desenvolvimento de resistência nas bactérias patogênicas, reduzindo a efetividade do seu uso como substâncias terapêuticas humanas (SHERIDAN et al., 2008).

As concentrações da maioria dos resíduos químicos com possibilidade de serem detectadas nos produtos de origem animal são suficientemente baixas para que, com raras exceções, provoquem efeitos nocivos durante uma única exposição, ou em pequena frequência. Tal fato aumenta a importância da pesquisa de resíduos em leite, afinal se trata de um dos alimentos mais consumidos e por maior período, e está presente na mesa do consumidor desde a infância até os últimos anos de vida. Exceção aos indivíduos sensibilizados a compostos específicos, como penicilina, cloranfenicol e sulfonamidas, a um grau tal, que até uma pequena exposição em baixas concentrações desses resíduos poderia desencadear reação de hipersensibilidade, com variações individuais desde leve erupção até efeitos mais graves e potencialmente mortais (GOMES, 2004).

Os efeitos neurotóxicos dos piretróides são amplamente conhecidos e se caracterizam por tremores, hiperatividade, irritação, aumento da temperatura corpórea, hiper-salivação, diarreia, midríase entre outros. Neste contexto, Lazarini et al. (2001) relataram que a exposição aos inseticidas piretróides induz alterações comportamentais em ratos, bem como, em outras espécies, incluindo humano. Há descrição de diminuição da atividade motora, alterações sexual, social e de coordenação motora, aumento da agressividade, deficiência na aprendizagem e memória, como alguns dos efeitos comportamentais em ratos expostos aos inseticidas piretróides (WOLANSKY; HARRILL, 2008). Alguns relatos de associação do uso de pesticidas com doenças como Alzheimer e Parkinson têm sido relatadas (CASIDA; DURKIN, 2013).

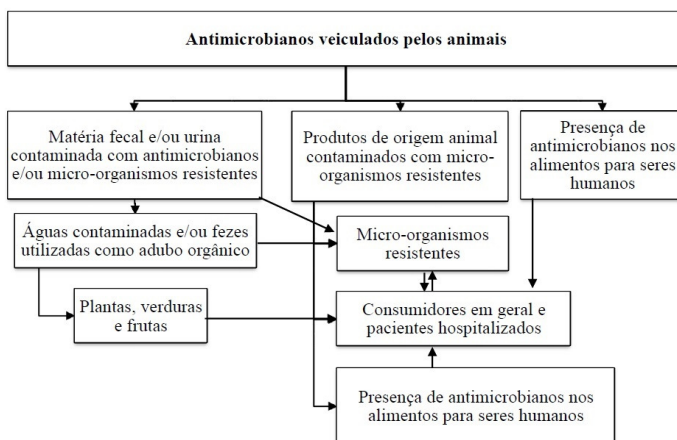
A ocorrência de bactérias com resistência múltipla no ambiente é um fenômeno frequente e atribuído ao intenso uso de antimicrobianos tanto em medicina humana como na produção animal. Sabe-se que a administração de quantidades subterapêuticas de antimicrobianos ocasiona aumento na frequência de bactérias resistentes, tanto no homem quanto nos animais. Nesse sentido, a presença de resíduos no leite pode ter efeito adverso na microbiota intestinal humana, o que pode prejudicar sua ação protetora local. Além disso, o leite com resíduos de antimicrobianos pode propiciar a formação de microbiota resistente. Assim, o risco para a saúde humana decorre de infecções por micro-organismos resistentes ou por transferência de resistência a bactérias patogênicas, podendo prejudicar tratamentos médicos necessários (PAIGE; TOLLEFSON; MILLER, 1999; MARTÍNEZ-MARTÍNEZ; CALVO, 2010; SHRYOCK; RICHWINE, 2010).

A resistência bacteriana tem impacto múltiplo sobre a defesa sanitária animal e humana, visto que diminui opções de tratamentos clínicos empíricos obrigando ao uso de antimicrobianos de amplo espectro e de última geração, exigindo em curto e médio prazos, o desenvolvimento de novos produtos comerciais que ajudem a controlar esse grave problema (MARTÍNEZ-MARTÍNEZ; CALVO, 2010; RODRÍGUEZ et al., 2010).

Para Spinosa, Górnaiak e Bernardi (2006), o uso inadequado dos agentes antiparasitários vem promovendo a presença de resíduos nos tecidos e no leite dos animais de produção. Muitas vezes, os valores detectados são superiores aos limites máximos toleráveis por tais produtos. Outra preocupação resultante do uso de endectocidas é o impacto ambiental, pois são excretados nas fezes de forma inalterada, podendo exercer efeitos adversos sobre populações de artrópodes e nematódeos colonizadores do bolo fecal.

Na Figura 1.1, são apresentadas algumas relações entre o uso de produtos veterinários, seus resíduos no ambiente e em alimentos para consumo humano, desenvolvimento de resistência nos micro-organismos e rotas de veiculação aos humanos. Como consequências do aparecimento de bactérias resistentes, pode haver a diminuição de eficácia dos tratamentos, aumento da gravidade da infecção, aumento do período de tratamento e uso de antimicrobianos mais tóxicos e caros (PERES; AIROLDI; REYES, 2007).

Figura 1.1 - Rotas de transmissão dos antimicrobianos e de micro-organismos resistentes na cadeia alimentar e no meio ambiente



Fonte: Peres, Airolidi e Reyes (2007)

A detecção de resíduos no leite é motivo para descarte do produto e, portanto, não pagamento do(s) produtor(es). Algumas indústrias adotam programas de incentivo na forma de bonificação para produtores que mantêm padrão de isenção de resíduos de produtos de uso veterinário por longo período, assim como, de penalização nos casos de presença. Além disso, os resíduos podem representar um problema ambiental, considerando que o destino usual do leite com presença de resíduos seja o descarte inadequado no meio ambiente.

B) Limites Máximos de Resíduos (LMR)

Os principais aspectos toxicológicos dos resíduos de antimicrobianos no leite estão relacionados à carcinogênese ou mutagênese, causando dano irreversível ao DNA celular. Alguns exemplos são apresentados que evidenciam a importância de estudos para avaliar níveis de resíduos aceitáveis no leite. Assim, a Organização Mundial da Saúde (OMS) e a *Food and Drug Administration* (FDA), através do *Codex Alimentarius*, estabeleceram Limites Máximos de Resíduos (LMR), para alimentos a fim de proteger a saúde dos consumidores e assegurar práticas comerciais justas no comércio internacional de alimentos (FAO, 2009).

Com o objetivo de definir níveis seguros para a ingestão de resíduos de produtos veterinários em alimentos, o comitê conjunto da Organização para Alimentação e Agricultura (FAO), OMS e peritos em aditivos de alimentos – *Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives* (JECFA), avaliaram os dados toxicológicos disponíveis para determinados medicamentos veterinários, e estabeleceram valores para a Ingestão Diária Aceitável (IDA) de determinadas drogas. O Comitê JECFA estabelece valores seguros para os níveis de ingestão diária de alguns antimicrobianos após avaliação dos estudos toxicológicos dos mesmos. As recomendações do JECFA podem ser adotadas pelo Comitê do *Codex Alimentarius* com o intuito de proteger a saúde dos consumidores e desenvolver o comércio global de alimentos. Essas recomendações são úteis para as agências governamentais e de saúde pública definirem medidas de vigilância sanitária a serem adotadas (PERES; AIROLDI; REYES, 2007).

A FAO/OMS conceitua resíduo como droga veterinária ou fração da droga, seus metabólitos, produtos da conversão ou reação e impurezas que permanecem no alimento originário de animais tratados. O termo LMR é definido como a concentração máxima do resíduo legalmente aceitável no alimento, expresso em ppm ou ppb. Este limite

é calculado baseando-se na IDA, que é a dose diária, que, se ingerida durante toda a vida do indivíduo não oferece risco apreciável à saúde, com base nos conhecimentos disponíveis até o momento. Assim, valores de IDA são sempre sujeitos a revisões, desde que novas informações se tornem disponíveis, sendo expressos em mg da droga/kg de peso corporal (FAO, 2009).

No Brasil, entrou em vigor em outubro de 2012 a Resolução RDC n.53 (BRASIL, 2012), internalizando o Regulamento técnico MERCOSUL, visando padronizar e estabelecer as metodologias analíticas, IDA e LMR para produtos de uso veterinário em alimentos de origem animal, com vigência em todo território nacional, ao comércio entre os Estados Parte e às importações extra zona.

C) Prevenção, controle e monitoramento de resíduos em leite

Para garantir a segurança tecnológica e alimentar faz-se necessário o desenvolvimento de um sistema integrado de boas práticas para prevenção e controle de resíduos em alimentos. As propriedades rurais têm, portanto, a responsabilidade primária de eliminar o leite contaminado; as indústrias de analisar o leite que chega das propriedades e aquele em processamento; assim como, a inspeção governamental de realizar suas próprias análises como método de controle, verificação e ação fiscal dos demais controles internos sob responsabilidade das empresas, com dever de garantir e promover a saúde do consumidor final (GOMES, 2004).

Pontes-Netto et al. (2005), em estudos realizados no Brasil, no estado do Paraná, constataram o uso indiscriminado de diversos medicamentos veterinários na atividade leiteira, sendo muitas vezes observada aplicação terapêutica incorreta ou não autorizada, reforçando a necessidade das Boas Práticas Agropecuárias (BPA) para melhoria da qualidade e segurança do leite produzido.

De acordo com Young et al. (2010a), o Grupo de Trabalho de Segurança Alimentar da Organização Internacional de Saúde Animal (OIE) preconiza o controle de perigos a partir da adoção das BPA, associada à análise de riscos, devendo ser implementada em cada fase do processo contínuo de exploração leiteira, isto é, do campo até a mesa do consumidor. Os programas de educação para melhorar o nível de exploração da segurança alimentar só terão êxito se fornecer aos produtores o conhecimento suficiente (VALEEVA et al., 2011).

De acordo com Rodríguez et al. (2010), devem ser adotadas ações alternativas quanto ao uso de antimicrobianos, especialmente

direcionadas à prevenção de enfermidades bacterianas, tanto de forma específica, mediante vacinação e melhoria da biossegurança, como de forma geral, melhorando instalações dos animais e bem estar animal, conduzindo à menor necessidade do uso de antimicrobianos em animais. Tais ações devem ser complementadas por ações educativas, informativas e de conscientização de todos os agentes envolvidos (médicos veterinários, produtores rurais, indústria farmacêutica, distribuidores de medicamentos e indústrias de alimentos), assim como, trabalho conjunto e cooperação mais eficaz entre medicina humana e veterinária.

A qualidade e segurança dos alimentos, bem como o sistema de produção envolvido e bem estar animal estão sendo acompanhados mais de perto pelo mercado consumidor. Parâmetros da qualidade do leite são cada vez mais usados para detectar problemas nas práticas de produção e para determinar o preço do leite. Países que desejam competir no mercado internacional de produtos lácteos devem comprovar a qualidade do produto que estão vendendo para ganhar novos mercados. Ao mesmo tempo, devem comprovar em seus mercados internos, que a qualidade do leite também obedece aos padrões de qualidade (RODRÍGUEZ et al., 2010).

Além das demandas dos consumidores por produtos de maior qualidade do leite, também está ocorrendo uma mudança de responsabilidades, do governo para os produtores de alimentos, para assegurar esta qualidade. Produtores e processadores de leite são responsáveis pelo contínuo monitoramento da produção e industrialização dos produtos lácteos, sendo que a empresa deve implementar um programa de educação continuada dos participantes, de acordo com a legislação em vigor (BRASIL, 2011a).

A adoção de práticas higiênicas de manejo de ordenha associada a métodos eficientes de higienização de utensílios e equipamentos, certamente acarretam maior rentabilidade para o produtor através dos programas de pagamento por qualidade, melhor qualidade de matéria-prima para as indústrias e produto final (derivados lácteos) de maior aceitabilidade pelos consumidores. Portanto, pode-se dizer que a integração dos três setores (produtor, indústria e consumidor) é benéfica a todos, refletindo em maior rentabilidade econômica para o setor leiteiro (CERQUEIRA et al., 1999b).

Para assegurar a sanidade, qualidade e integridade de leite e produtos derivados, algumas recomendações são importantes: boas práticas de higiene e desenvolvimento de qualidade; controle das boas práticas de higiene; sistemas de higiene e alimentos seguros; aplicação

do programa de Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle (APPCC); manejo higiênico de leite cru (coleta, recepção diária de leite cru e identificação de pontos críticos de controle (PCC); adoção das Boas Práticas Agropecuárias (BPA) com o uso responsável de produtos de uso veterinário, pasteurização e outros processos de tratamentos térmicos; prevenção de crescimento e contaminação microbianos, esporos e bactérias patogênicas no leite (BURGUESS et al., 1994).

De acordo com Noal (2006), as empresas que não instituírem processos de aperfeiçoamento contínuo, voltados à otimização de processos e satisfação de seus clientes pela redução de riscos, vão perder competitividade e tenderão a desaparecer do mercado. O treinamento de pessoal é fator fundamental, pois de nada adianta a empresa ter instalações modernas e bem equipadas se não possuir equipe bem formada e adequadamente treinada.

Conforme GlobalGAP (2012) e IDF (2013), para obtenção de leite seguro para o consumidor é necessária a implementação das BPA na cadeia produtiva do leite. Para esses programas, os seguintes aspectos são priorizados:

- saúde do rebanho, com manejo sanitário que deve obedecer às normas da legislação em relação, especialmente, a doenças como aftosa, brucelose e tuberculose;
- controle de mastite, com adoção de programas de prevenção que prioriza a higiene antes, durante e após a ordenha;
- manejo nutricional, em que os alimentos oferecidos aos animais devem atender às exigências nutricionais e serem isentos de produtos que venham causar problemas aos mesmos e aos consumidores;
- manejo de ordenha, devendo ter cuidados especiais para garantir a qualidade do leite;
- proteção e infra-estrutura na construção rural, que considera localização, dimensionamento, ventilação, iluminação, pisos, paredes, escoamento sanitário, qualidade da água, controle de pragas, higiene pessoal e operacional, limpeza e sanificação dos equipamentos e treinamento de colaboradores; e
- bem estar animal, dentre outros.

De acordo com estudos realizados por Velthuis (2011), a avaliação por meio da aplicação de listas de verificação durante auditorias nas propriedades rurais é importante ferramenta auxiliar na melhoria da qualidade do leite produzido. Em seu estudo foram analisados 64.373 resultados de auditorias em 26.953 explorações leiteiras e correlacionados aos resultados analíticos obtidos nas amostras de leite coletadas durante período de 12 meses antes das auditorias. Os

resultados mostraram que animais limpos, manejo de ordenha higiênico e infra-estrutura adequada e limpa foram positivamente correlacionados com qualidade superior do produto, principalmente em relação à CCS e CBT. Animal sadio, manutenção de equipamentos e gestão adequada de medicamentos veterinários (registros, marcação dos animais tratados e armazenagem de produtos veterinários) foram relacionados com CCS.

Segundo Gomes (2004), mais importante, porém, é a implementação de programas de orientação e conscientização dos produtores quanto aos potenciais danos decorrentes do mau uso de produtos veterinários, tendo em vista que o conhecimento e a educação sempre demonstraram ser ferramentas mais eficazes que a legislação, adotando o uso responsável de produtos de uso veterinário. De acordo com Rodríguez et al. (2010), entende-se por uso responsável de produtos veterinários o emprego nos animais de produtos químicos somente sob prescrição veterinária e em casos de necessidade, respeitando as condições de aplicação especificadas conforme protocolo, ficha técnica e/ou bula do produto.

O controle de qualidade envolve mudança cultural em toda a cadeia produtiva, além de depender da conscientização dos agentes envolvidos, implica repensar todos os processos, práticas e hábitos estabelecidos. A explosão demográfica e globalização dos mercados transformaram irreversivelmente a maneira de produzir alimentos no mundo, e convivência com preocupações antes irrelevantes sobre a segurança dos alimentos (DÜRR, 2006).

D) Programas de fiscalização para verificar resíduos e contaminantes em alimentos de origem animal

A União Europeia publicou uma série de Diretivas desde a regulamentação dos LMR até proibição do uso de promotores de crescimento, hormônios e substâncias beta-agonistas, promovendo adoção de programas que monitoram as atividades farmacológicas de tais substâncias, como também, mensuram os níveis de contaminação ambiental ou mesmo dos alimentos de origem animal. Assim, tais regulamentações estabelecem controles de resíduos desde a produção primária de carne, leite, ovos e mel, promovendo coletas de animais a campo, como também, nos estabelecimentos abatedores e/ou processadores de tais alimentos (STOLKER; BRINKMAN, 2005). A partir do modelo internacional, foram adequados e direcionados os atuais programas brasileiros, visando segurança alimentar do campo à mesa do consumidor.

De modo geral, nos programas oficiais para controle e monitoramento de resíduos e contaminantes em diferentes países, os resíduos são incluídos nas fiscalizações considerando-se: se um princípio ativo deixa resíduo; a toxicidade do resíduo para a saúde do consumidor; o potencial de exposição da população ao resíduo, referenciado pelos hábitos alimentares e poder aquisitivo das populações, pelos sistemas de criação e de tecnologias utilizadas na produção de carne e alimentos para animais e, pela poluição ambiental; o potencial do emprego inadequado das drogas que resultam em resíduos, evitado pela utilização de boas práticas agrícolas e pecuárias, especialmente, quanto ao uso correto de agrotóxicos, tempo de carência e descarte de embalagens, entre outras; disponibilidade de metodologias analíticas adequadas, confiáveis, exequíveis e compatíveis com os recursos laboratoriais; superveniência de implicações do comércio internacional, participação do país em blocos econômicos e problemas que tragam riscos à saúde pública; e, os resíduos que possam constituir barreiras às exportações de produtos de origem animal, de acordo com Brasil (1999).

Em 1999, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), lançou o Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes em Produtos de Origem Animal (PNCRC), por meio da Instrução Normativa n.42, de 20 de dezembro de 1999 do MAPA (BRASIL, 1999). O PNCRC tem como função básica regulamentar, o controle e a vigilância. Suas ações estão direcionadas para se conhecer e evitar a violação dos níveis de segurança ou dos LMR de substâncias autorizadas, bem como, a ocorrência de quaisquer níveis de resíduos de compostos químicos de uso proibido no país. Amostras são coletadas de animais abatidos e vivos, de derivados industrializados e/ou beneficiados, destinados à alimentação humana, provenientes dos estabelecimentos sob o Serviço de Inspeção Federal (SIF).

A partir do ano de 2001, foi instituído pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), por meio do Ministério da Saúde (MS), o Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos (PARA) e, desde 2003, se encontra em execução o Programa de Análise de Resíduos de Medicamentos Veterinários em Alimentos expostos ao consumo (PAMVet) para pesquisa, monitoramento e fiscalização de alimentos diretamente no varejo (BRASIL, 2003). O objetivo do programa é avaliar o potencial de exposição do consumidor a resíduos de medicamentos veterinários pela ingestão de alimentos de origem animal adquiridos no comércio. O programa contempla leite bovino; carnes de frango, suíno e bovino; pescado; ovos de galinha e mel de

abelha. No caso do leite, são coletadas amostras de leite em pó e UAT nos mercados consumidores, realizados testes de triagem qualitativos (bioensaios, enzimoimunoensaios e radioimunoensaios), para posterior quantificação (BRASIL, 2003).

E) *Técnicas laboratoriais para pesquisa de resíduos e contaminantes em leite*

Várias são as técnicas existentes para pesquisa de resíduos químicos em alimentos, dentre elas se destacam a cromatografia líquida associada à espectrometria de massas; kits comerciais, testes físico-químicos e/ou microbiológicos, dentre outros. Assim, têm-se no mercado testes elaborados, laboriosos, rápidos, precisos, porém, de alto custo; assim como, testes mais baratos, no entanto, subjetivos, menos precisos e em alguns casos demorados. Percebe-se, atualmente, crescente demanda por estudos e pesquisas nessa área buscando melhores tecnologias e metodologias para se trabalhar e monitorar resíduos em alimentos, para garantia da segurança alimentar de forma cada vez mais eficiente, visto que uma vez presente resíduos em níveis inaceitáveis no alimento, não há tecnologia que permita uma ação corretiva, sendo para esse tipo de perigo primordial o trabalho focado na prevenção.

Depois do incremento e permissão do uso de produtos antimicrobianos de amplo espectro na medicina veterinária e, também, promotores de crescimento na produção animal, foram necessárias e, ainda são, muitas regulamentações para se melhorar os critérios de inspeção dos produtos de origem animal, pois atualmente muitos produtos são ilícitos, e estando presentes nos alimentos, podem comprometer a saúde humana. Muitas são as ferramentas analíticas disponíveis no mercado, no entanto, não são suficientes ainda, pois a demanda se torna cada vez maior em novas validações e técnicas mais eficientes para pesquisa de múltiplos resíduos em mesma amostra, precisando para isso mais pesquisas, assim como, novas metodologias oficiais e internacionalização de outras, pois os problemas são crescentes e desafiadores (STOLKER; BRINKMAN, 2005).

Para detecção de resíduos de antimicrobianos em leite, várias são as técnicas e metodologias recomendadas e reconhecidas pela *Association of Official Analytical Chemists* (AOAC) e *American Public Health Association* (APHA), estando muitas delas disponíveis comercialmente. Estas envolvem desde técnicas microbiológicas simples (JOHNSON et al., 1977; COCA, 1984), como também outras

mais complexas como cromatografia (HONG; KONDA, 1997; ANDERSON et al., 1998); imunoensaio (STANKER et al., 1998), espectrometria de massas (NAGATA; OKA, 1996), ressonância (STERNESJO et al., 1995) e eletroforese em gel de agarose (CUTTING et al., 1995).

Em princípio, a melhor maneira para detecção de resíduos em leite é o uso de um método-teste (kits comerciais ou métodos rápidos de triagem); um segundo passo, confirmação por método quantitativo, para identificar e quantificar os resíduos detectados e se atendem ao respectivo LMR. Sob condições industriais, geralmente são utilizados apenas testes para detecção de inibidores que são menos sensíveis, porém, mais rápidos e baratos do que a maioria dos testes confirmatórios, facilitando os controles de qualidade realizados pelas indústrias de laticínios, no entanto, tornando o controle de qualidade frágil para aqueles resíduos que necessitam de técnicas mais elaboradas, como os pesticidas e contaminantes.

- *Testes qualitativos mais utilizados em pesquisa de resíduos em leite*

Segundo Fonseca (2000), os métodos geralmente usados para detecção e identificação de inibidores e antimicrobianos no leite são:

- Métodos-testes: teste inibidor do *Bacillus stearothermophilus*, teste inibidor do *Streptococcus thermophilus*, teste inibidor do *Bacillus subtilis*, teste inibidor da *Sarcina lutea* e teste de inibição do iogurte.

- Testes confirmatórios e de identificação: teste enzimático para substâncias do grupo β -lactâmicos, imunoensaio (Spot Test), Teste Placa-3, Teste Placa-6, Receptor microbiológico (Charm Test) e eletroforese de alta voltagem.

Cullor (1995) inclui ainda métodos como a fluorimetria, tritimetria, polarografia, ressonância magnética e eletroforese de alta tensão. Dentre os testes de inibição microbiana existem o método de disco, o Delvo Test, o “Black Reduction Test” (BRT) e o “Charm Farm”.

Nos testes baseados na inibição do crescimento bacteriano, a amostra de leite é colocada em contato com um micro-organismo sensível, adicionando-se nutrientes, incubando e observando a presença de resíduos na amostra, observado pela ausência de crescimento microbiano. Na ausência de resíduo, o crescimento microbiano é evidenciado pela produção de ácido, pela redução de corantes ou pela formação de camada visível de crescimento na superfície do ágar. Esse

método da difusão em ágar utilizando discos de papel de filtro impregnados com amostras de leite tem sido adotado oficialmente em muitos países para triagem. A presença de antimicrobianos no leite é indicada pelo aparecimento de uma zona clara de inibição do crescimento bacteriano em volta do disco. O tamanho da zona depende da concentração da substância inibitória presente no leite.

De acordo com Booth e Harding (1986), embora os testes microbiológicos tenham papel destacado na detecção de resíduos de antimicrobianos no leite, eles apresentam limitações, pois requerem tempo para incubação e o resultado somente é conhecido após duas a cinco horas, na maioria dos casos.

Cullor (1992) observou grande variedade de testes no mercado, que tentam detectar resíduos de antimicrobianos no leite. Infelizmente, a especificidade de muitos destes é questionável. Segundo Fonseca (2000), os kits comerciais apresentam a vantagem de serem rápidos e práticos, com os resultados obtidos em algumas horas permitindo rápida tomada de decisões se o leite apresentar resíduos. No entanto, alguns estudos indicam que o uso destes kits para o leite de vacas individuais pode apresentar resultados falso-positivos, ou seja, o teste identifica resíduos em amostras de leite que não apresentam a presença dos mesmos. A principal explicação para estes resultados, que podem prejudicar o produtor, é a presença de antimicrobianos no leite de vacas com mastite que podem interferir no teste e determinar resultados falso-positivos. Para tanto, a maioria dos kits comerciais são recomendadas para leite de conjunto e não individual. Sendo que outro fator crítico, é detecção de resíduos que se encontram abaixo do LMR estabelecido legalmente.

De acordo com Fonseca (2000), para a detecção de inibidores microbianos no leite deve-se empregar o *Bacillus subtilis*, *Bacillus stearothermophilus* e *Streptococcus thermophilus* ao mesmo tempo, pois desta forma a maioria dos antimicrobianos, substâncias detergentes e saneantes presentes no leite poderão ser detectadas, já que a capacidade de detecção é variável dependendo do micro-organismo utilizado. Melhor seria empregá-los como método de triagem juntamente com um método de identificação e quantificação confirmatório. Porém, nas condições das indústrias brasileiras os testes do “swab” utilizados são impróprios, pois são demorados, os resultados são obtidos em 18 a 24 horas e onerosos, pois dependem de materiais importados para realização. Os testes do “swab” utilizados juntamente com o teste de identificação e quantificação podem ser usados por instituições

governamentais de inspeção e fiscalização, pois necessitam de testes mais sensíveis para a detecção dos resíduos de inibidores.

- *Testes quantitativos mais utilizados em pesquisas de resíduos em leite*

Para análises quantitativas de resíduos e contaminantes em alimentos são utilizados métodos especiais que incluem: cromatografia gasosa, em camada delgada, ou líquida de alta performance, eletroforese, imuno-ensaio (ELISA), biorradiografia, outros métodos enzimáticos e alguns métodos microbiológicos. Não são usados como rotina, mas para propósitos especiais, como por exemplo, confirmação para fins de verificação e/ou fiscalização. Na maioria dos casos há necessidade de equipamentos sofisticados e que demandam mão-de-obra especializada. Para alguns métodos, o leite necessita ser desengordurado e desproteínizado antes da avaliação (BOOTH; HARDING, 1986).

Os cuidados que devem ser tomados na interpretação da sensibilidade dos métodos utilizados, incluem alcance e campo de aplicação do teste. Além disso, referências para sensibilidades observadas não são completamente documentadas e devem ser consideradas preferivelmente como estimativas e não valores absolutos. Os testes são susceptíveis a influências de fatores externos ao método-teste, como aqueles devido à natureza do leite a ser testado. Amostras de leite exibindo consideráveis variações na composição e, especialmente, variações na qualidade microbiológica, CCS e conteúdo de substâncias naturais antimicrobianas como lisozima e lactoferrina, às vezes, afetam os resultados. A influência desses fatores é proporcionalmente maior quando a concentração de antimicrobianos é próxima do limite de detecção do teste (IDF, 2010).

Em geral, nos programas de fiscalização governamentais, as técnicas mais utilizadas para determinação de produtos de uso veterinário em alimentos são: cromatografia em camada delgada (CCD), cromatografia gasosa com detectores de captura eletrônica (CG-DCE) e espectrometria de massas (CG-MS), cromatografia líquida de alta eficiência com detecção ultravioleta (CLAE-UV), espectrometria de massas (CLAE-MS) e espectrometria de massas *in tandem* (CLAE-MS/MS). Também tem sido empregado o método de varredura e confirmação por ressonância de superfície por plasma (“surface plasmon resonance”), que utiliza biossensores específicos, providos com uma camada de antimicrobiano específico derivativo e um anticorpo que possui alta reatividade com o metabólito cloranfenicol glucoronídeo, por

exemplo. Este último método tem sido comparado com CLAE-MS/MS ou empregado em conjunto (MARTINS JÚNIOR, 2006).

De acordo com O'keeffe e Kennedy (2007), os procedimentos físico-químicos como cromatografia gasosa, cromatografia líquida de alta performance com coluna de fase reversa, cromatografia em camada delgada com detecção química ou microbiológica e, um tipo altamente específico de espectrometria de massas (CAD MIKES), proporcionam alto grau de especificidade, mas não apresentam em todos os casos alta sensibilidade. Procedimentos imuno-químicos dão bons resultados para certos antimicrobianos e parecem associar rapidez e alta especificidade de resultados.

De acordo com Booth e Harding (1986), foram desenvolvidos métodos que se baseiam na reação do antimicrobiano (antígeno) com um anticorpo específico. Os testes que se baseiam neste princípio empregam substâncias radioativas ou enzimas, na técnica conhecida como ELISA. Nesta, quando uma amostra é positiva, há alteração de cor, que pode ser visualizada e mensurada, obtendo-se resultados quali e quantitativos.

Diferente dos testes imunológicos que empregam anticorpos específicos para detectar um antimicrobiano específico, alguns testes usam receptores que detectam várias classes de antimicrobianos. Os receptores são adicionados à amostra de leite junto com um antimicrobiano da classe testada, marcado radioativamente. Quando a amostra não contém resíduos destes antimicrobianos, todos os sítios dos receptores serão ocupados com o antimicrobiano marcado, mas quando contém, alguns sítios serão ocupados com a droga não marcada. O número de sítios ocupados pela droga não marcada será proporcional à concentração do antimicrobiano na amostra.

A determinação de aflatoxinas pelo método ELISA apresenta alta sensibilidade, rapidez e simplicidade. Porém, o prazo de validade dos kits é limitado e há possibilidade de resultados “falso positivos” devido a diferença entre os limites de quantificação das técnicas, ou mesmo, reações cruzadas com outras aflatoxinas ou moléculas semelhantes, minimizadas pela utilização de anticorpos monoclonais de boa preparação. Esta possibilidade de resultados presuntivos positivos reafirma a necessidade de confirmação dos resultados após execução do ensaio de ELISA, sendo CLAE com detector de fluorescência a técnica mais empregada para confirmação e quantificação de resíduos de aflatoxinas em leite (SOUZA; VARGAS; JUNQUEIRA, 1999).

1.2 AVALIAÇÃO DE RISCO

Risco é a probabilidade da ocorrência de um evento adverso. Nessa teoria, a previsibilidade do evento é possível pelo conhecimento dos parâmetros da distribuição de probabilidades de acontecimentos futuros (OPAS, 2008). De acordo com a FAO (2009) o sistema tradicional de segurança alimentar (reativo, com responsabilidades centralizadas no governo do país, sem um processo de análise de risco estruturado) não tem capacidade para lidar com o panorama atual. A abordagem moderna inclui o conceito de proatividade, prevenção, responsabilidade compartilhada, integração, controle do processo de produção e aplicação da análise de risco, pois seus princípios e técnicas permitem o diagnóstico de problemas e a definição de soluções mais específicas e eficientes.

A análise de risco instrumentaliza os processos de tomada de decisão, contribuindo para a definição de metas e estratégias para redução da ocorrência de danos veiculados por alimentos, com embasamento científico, planejamento, implementação de intervenções adequadas e monitoramento de resultados (FAO, 2009).

Nesse contexto, as indústrias e órgãos governamentais trabalham no aprimoramento da metodologia científica de estimativa de riscos, utilizando análises quantitativas e métodos probabilísticos (FREITAS, 2009). Para tal, são desenvolvidos testes de laboratórios, métodos epidemiológicos, modelos ambientais e simulações em computadores, aprimorando-se a identificação e mensuração dos riscos (COVELLO, 1985). Porém, como todo tipo de previsão, a análise de risco envolve a “mensuração de algo não totalmente estabelecido” e, assim, agrega incerteza (ANDRADE, 2000; FAO, 2009), reconhecida e incluída na estimativa do risco. O nível de incerteza sugere a qualidade do conhecimento gerado, do resultado da avaliação (OPAS, 2008).

Porém, de acordo com O'Brien (2000), quando as relações de causa e efeito sobre determinada exposição e um efeito adverso à saúde ainda não estão cientificamente bem estabelecidos, deve ser aplicado o “princípio da precaução”. Tal princípio afirma que, mesmo na ausência da certeza científica formal sobre um risco que envolve dano sério ou irreversível, devem ser aplicadas medidas preventivas. A avaliação de risco constitui a primeira etapa do processo de Análise de Risco, estimando-se objetivamente a probabilidade de um perigo previamente identificado promover um resultado indesejado. Neste caso, refere-se a avaliação dos potenciais perigos à saúde humana quanto aos resíduos de

produtos de uso veterinário advindos do uso na produção animal (EMEA, 1999).

A avaliação de risco deve utilizar dados quantitativos, qualitativos e/ou semi-quantitativos, de alta qualidade (acurácia e confiabilidade), coletados e analisados de forma adequada com a aplicação de metodologia científica. As conclusões devem ser geradas a partir de evidências científicas bem apresentadas e fundamentadas, transformando os fatos e evidências em informações. Um princípio fundamental é que a avaliação de risco deve estar firmemente baseada nos dados científicos, agregando-os de forma sistemática. Os elementos descritivos e computacionais devem ser respaldados com referências científicas e metodologias científicas aceitas, de acordo com FAO (2009).

De acordo com OPAS (2008), os perigos químicos em alimentos incluem aditivos (usados direta ou indiretamente), resíduos de pesticidas e produtos fitofarmacêuticos, resíduos de produtos de uso veterinário e de substâncias químicas provenientes da manutenção de equipamentos, de contaminantes ambientais e ainda provenientes da migração de componentes químicos presentes nos locais de armazenagem e nos contêineres, no material das embalagens e nos utensílios, para os alimentos neles contidos. Os efeitos nocivos de substâncias químicas normalmente são avaliados em exposições em longo prazo. No caso de perigos como micotoxinas, toxinas marinhas, pesticidas e produtos de uso veterinário, é necessário considerar tanto os efeitos agudos como crônicos (FAO, 2009).

Segundo definição do *Codex Alimentarius*, a avaliação de risco é composta por quatro etapas: identificação do perigo, caracterização do perigo, avaliação da exposição e caracterização do risco. Não se trata de modelo fixo, pois, após a identificação do perigo, a ordem das demais etapas pode ser definida de acordo com hipóteses e dados obtidos, sendo possível repetir alguma etapa, se necessário (FAO, 2009).

A etapa de identificação do perigo tem como objetivo determinar se a exposição a uma substância química tem relação de causalidade com a ocorrência de um efeito adverso e a probabilidade da ocorrência do dano à saúde, é a avaliação da toxicidade do químico. Nessa etapa, são coletados e examinados dados sobre tipos de dano à saúde que podem ser provocados pelo agente químico em questão e sobre as condições de exposição a partir da qual é produzido o efeito nocivo. Da mesma forma, são analisadas informações sobre as propriedades tóxicas inerentes ao agente químico e o potencial para causar dano biológico, doença ou óbito, sob certas condições de exposição (FAO, 2009).

Um dos problemas dessa etapa da avaliação de risco é que, para algumas substâncias, pode haver boa base de dados na literatura sobre os efeitos em seres humanos e em animais de laboratório e sobre mecanismos biológicos básicos de toxicidade, no entanto, para outros agentes, pode haver poucos estudos, limitados aqueles experimentais em animais (SOUZA et al., 2001). Na prática, as pessoas estão expostas a múltiplos perigos, diferentes agentes químicos, porém os estudos de identificação de perigo analisam os efeitos dos compostos químicos isoladamente sem considerar os seus efeitos sinérgicos, segundo Souza et al. (2001) e Meek et al. (2011).

Segundo Meek et al. (2011), é necessário um esforço contínuo para avaliação de risco buscando-se adaptação em relação aos riscos potenciais, especialmente pela combinação de diversos perigos químicos em exposição. Para formulação do problema é necessária análise preliminar de caracterização do perigo e avaliação da exposição, para compor a base do planejamento de processo da análise de risco. Existem muitas razões pelas quais uma avaliação do risco combinando exposição a múltiplas substâncias químicas podem ser necessárias, visto que todo e qualquer perigo químico isolado ou em associação pode colocar em risco a saúde do consumidor.

Na caracterização de risco, é avaliada a relação entre a dose da substância química e a gravidade do efeito adverso (dose-resposta) e, a partir dela, calculados os valores de referência da toxicidade. Tais valores são os limites máximos de exposição a uma substância em que se supõe que não ocorre o efeito deletério; um limite de segurança, ponto de corte entre o risco aceitável e o não aceitável (HAAS; ROSE; GERBA, 1999; FAO, 2009). A relação dose-resposta, na maioria dos casos, é obtida por meio de experimentos com animais (espécies mais sensíveis à substância em estudo), em que as doses de exposição podem ser bem controladas (HAAS; ROSE; GERBA, 1999).

Para produtos químicos, a avaliação da exposição com frequência usa os valores em certos pontos no processo contínuo da exposição. Tais cálculos pontuais são denominados modelos determinísticos. Alguns modelos das exposições, como ingestão de resíduos de pesticidas, levam em consideração a distribuição do consumo de alimentos por uma população. Esses modelos, chamados probabilísticos, proporcionam mais detalhes sobre a distribuição de consumidores expostos, mas não são intrinsecamente mais apreciáveis que os modelos determinísticos (FAO, 2009).

Na etapa de caracterização do risco é realizada a estimativa do risco. Esse cálculo é obtido através da combinação entre a dose média a

que a população está exposta e os dados sobre dose-resposta. A caracterização de riscos químicos define, principalmente, um nível de exposição que apresenta um “risco zero especulativo”. Ou seja, o nível adequado de proteção (NAP) é fixado com uma dose associada a qualquer probabilidade significativa de dano à saúde. As normas são depois baseadas em cenários das exposições no “pior caso” para manter o risco abaixo do NAP (FAO, 2009).

Menéndez-González et al. (2011) implementaram um monitoramento com base no risco microbiológico em laticínios da Suíça, promovendo avaliação do risco, considerando a probabilidade de exceder os valores limites estabelecidos pela legislação do país. A análise qualitativa foi projetada para determinar o risco para a saúde humana a partir do consumo de produtos lácteos e a avaliação iniciou com a determinação da prevalência dos perigos microbiológicos em amostras de leite. A avaliação da exposição foi relacionada ao volume de produção e ingestão de leite no país. No entanto, as consequências não puderam ser plenamente avaliadas devido à falta de informações detalhadas sobre o número de casos de doenças causadas pelo consumo de produtos lácteos.

Kang'ethe et al. (2005) promoveram uma avaliação de risco para resíduos de antimicrobianos a partir do consumo de lácteos em mercados varejistas do Quênia e observaram 16% de prevalência de amostras positivas. Sugeriu-se que o risco médio era de até 5 vezes ao mês para o consumo de produtos lácteos com resíduos de antimicrobianos. No entanto, o risco foi maior em produções menores, pois não ocorreu o efeito “diluição” observado nas produções de maior porte a partir da mistura de leites sem presença de resíduos.

Assim, a qualidade de um produto possui relação direta com as condições em que são produzidos. Para tanto, é essencial identificar quais fatores de risco afetam a qualidade nas atividades produtivas e operacionais e, a partir de sua identificação, desenvolver diretrizes que converjam para a melhoria da qualidade planejada. Além disso, destaca-se que o sucesso no desenvolvimento e manutenção de um sistema de qualidade, depende da importância atribuída pela alta administração, bem como, de alguns fatores-chave, como as características culturais e cada serviço e, principalmente, de seus manipuladores os quais deverão estar motivados e envolvidos no processo (NOAL, 2006). Destacando-se a importância do embasamento científico adequado para a tomada de decisão por meio de um sistema de gestão estratégica dos riscos associados à produção de alimentos.

CAPÍTULO 2

RESÍDUOS DE PIRETRÓIDES, LACTONAS MACROCÍCLICAS E ANTIMICROBIANOS EM LEITE CRU DE PROPRIEDADES LEITEIRAS DE MINAS GERAIS, BRASIL

L. C. A. Picinin^{1*}, I. M. Toaldo¹, R. B. Hoff², F. N. Souza³, M. M. O. P. Cerqueira³ e M. T. Bordignon-Luiz¹

¹ Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC). Rod. Admar Gonzaga, 1346, Bairro Itacorubi, Florianópolis, SC, Brasil, CEP: 88.034-001.

² Laboratório Nacional Agropecuário (LANAGRO), Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). Porto Alegre, RS, Brasil.

³ Escola de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG). Belo Horizonte, MG, Brasil.

RESUMO

A ocorrência de pesticidas e resíduos de produtos de uso veterinário em leite cru da maior região produtora no Brasil é apresentada através de amplo escopo analítico. Um total de 132 amostras de leite cru foram coletadas em propriedades leiteiras no Estado de Minas Gerais, Brasil, e analisadas para pesquisa de 42 analitos, compreendendo piretróides, lactonas macrocíclicas e antimicrobianos, utilizando cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas *in tandem* e cromatografia gasosa com detector de captura de elétrons. Do total de amostras analisadas, 40 apresentaram-se positivas para pelo menos um analito (acima do limite de detecção) e 11 amostras apresentaram resultados não conformes (acima do limite máximo de resíduos permitido pela legislação brasileira). Os analitos apresentados em não conformidade foram: penicilina V (uma amostra), abamectina (uma amostra) e cipermetrina (nove amostras). O maior percentual de não conformidade foi verificado para presença de resíduos de piretróides, o que representa risco de toxicidade para a saúde humana e contaminação ambiental. Assim, é necessário o controle e prevenção de resíduos na fonte primária da cadeia produtiva leiteira como preocupação fundamental para garantia de sua segurança para o consumidor final.

Palavras-chave: resíduos, leite brasileiro, produtos de uso veterinário, pesticidas

1 INTRODUÇÃO

Produtos lácteos e derivados são largamente consumidos em todo o mundo e seus constituintes oferecem muitos benefícios à saúde humana (NEBOT et al., 2012). A produção de leite no Brasil possui extensa área de atividade, com a maior parte do leite produzido destinada ao consumo nacional. Atualmente, o Brasil ocupa a quarta posição no *ranking* internacional, com produção anual superior a 32 bilhões de litros de leite (EMBRAPA, 2013). Os maiores produtores estão situados na Região Sudeste do País, com o estado de Minas Gerais (MG) liderando a produção nacional, detendo praticamente 30% de todo o volume, com grande crescimento global em termos de exportações de lácteos (IBGE, 2011).

Na atividade leiteira, produtos de uso veterinário, principalmente antimicrobianos, são comumente utilizados, no controle e prevenção de diversas enfermidades em animais, devido à sua atividade de amplo

espectro e os baixos custos dos medicamentos. O uso intenso e inadequado destes princípios ativos pode levar à presença de seus resíduos no leite, provocando danos à saúde humana, perdas na produção industrial e problemas tecnológicos nos produtos lácteos derivados (TOALDO et al., 2012). Além disso, grande preocupação tem surgido com a utilização frequente de pesticidas na prática veterinária, tais como os piretróides e lactonas macrocíclicas. A persistência destes compostos no organismo dos animais tratados pode levar à presença de resíduos no leite e efeitos indesejáveis à saúde humana quando levados ao consumo. Como ocorre para outros produtos químicos, tais compostos farmacologicamente ativos podem ser inseridos em diferentes ecossistemas por meio da contaminação da água, mananciais e vegetação (PÉREZ et al., 2012; RÜBENSAM et al., 2013).

Para garantir a segurança do leite, são estabelecidos limites máximos de resíduos (LMR) para produtos de uso veterinário e outros compostos ativos em matrizes de alimentos, por autoridades governamentais ou comitês internacionais (EUROPEAN COMMISSION, 2010). Como o leite é um alimento essencial na alimentação humana, os limites máximos de resíduos de produtos de uso veterinário são mais baixos quando comparados com outras matrizes de alimentos, devido ao maior consumo e recomendação para crianças e idosos. Alguns relatos da presença de resíduos de antimicrobianos e pesticidas em leite e outras matrizes alimentares são reportados (AHMAD; SALEM; ESTAITIEH, 2010; BILANDŽIĆ et al., 2011), alertando para a urgência da adoção de medidas de controle efetivas.

A técnica de cromatografia líquida aliada a técnicas de detecção de alta sensibilidade e especificidade, como a espectrometria de massas, compreende uma ferramenta eficaz na pesquisa, verificação e fiscalização de resíduos em leite. O Brasil, como um dos parceiros comerciais mais importantes da oferta global de alimentos, deve exercer controle eficaz quanto à presença de resíduos na cadeia alimentar, a fim de prevenir possíveis danos à saúde humana e/ou de contaminação ambiental. Assim, com foco na segurança alimentar e utilizando como base métodos analíticos para monitoramento e fiscalização da ocorrência de resíduos em alimentos foi instaurado no Brasil, desde 1999, o Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes (PNCRC) do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). Considerando o elevado volume de leite produzido no Brasil e a elevada disponibilidade de produtos de uso veterinário no mercado, tornam-se essenciais os levantamentos sobre a ocorrência de resíduos de

produtos de uso veterinário em leite cru, para garantir a qualidade e segurança do leite produzido e a saúde do consumidor final.

No entanto, na literatura, a maior parte dos estudos reporta análises de resíduos de produtos de uso veterinário de uma única classe de compostos ativos em alimentos, ao passo que poucos avaliam um amplo escopo, especialmente no que se refere à matriz leite, veículo inicial de resíduos na cadeia láctea (NEBOT et al., 2012).

Com relação à segurança alimentar, o objetivo desse trabalho foi avaliar a ocorrência de resíduos de produtos de uso veterinário em leite cru produzido no estado de Minas Gerais, Brasil. Análises de amplo escopo foram realizadas, empregando as técnicas de cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa e cromatografia gasosa, para determinação de 42 analitos de três classes de compostos químicos de uso veterinário, compreendendo, antimicrobianos, piretróides e lactonas macrocíclicas, amplamente utilizados na pecuária leiteira.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 PROCEDIMENTO DE AMOSTRAGEM

A realização da coleta de 132 amostras de leite cru foi realizada a partir de agosto de 2010 a fevereiro de 2011, em 45 fazendas leiteiras selecionadas aleatoriamente em três municípios de Minas Gerais, compreendendo Paraopeba, Pará de Minas e Sete Lagoas, sendo 15 propriedades de cada município. Tais municípios estão localizados na região central do estado de Minas Gerais com expressiva atividade leiteira e grande representatividade nacional, sendo toda região composta por produtores de diferentes escalas de produção diária de leite.

O procedimento de seleção das propriedades foi realizado respeitando a proporção média de produção diária de leite na região, sendo 60% das propriedades selecionadas com produção diária de até 500 L de leite por dia, enquanto que 30% foram de propriedades com produção superior a 1.000 L ao dia, e 10% de propriedades com produção entre 500 e 1.000 L de leite ao dia. Do total de propriedades selecionadas, 35 (81,4%) apresentavam sistema de ordenha mecanizado e o restante (18,6%), ordenha manual.

As amostras de leite cru refrigerado foram coletadas em tanques de expansão, no período de agosto de 2010 a fevereiro de 2011, homogeneizadas e estocadas a $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ ($\pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$), sendo as análises quantitativas realizadas no período máximo de sete dias após a coleta.

Na análise das amostras, as concentrações determinadas para cada analito foram comparadas ao seu respectivo limite máximo de resíduo em leite estabelecido pela legislação brasileira (BLMR) de acordo com Brasil (2012).

2.2 DETERMINAÇÃO DE RESÍDUOS DE PRODUTOS DE USO VETERINÁRIO

2.2.1 Reagentes e soluções padrão

A) *Pesticidas*

Os padrões analíticos γ -cialotrina (γ CYH), λ -cialotrina (λ CYH), ciflutrina (CYF), cipermetrina (CYP), deltametrina (DEL), fenvalerato (FEV), e permetrina (PER), com 95% de pureza, foram obtidos da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, Estados Unidos). Soluções estoque individuais na concentração de 1 mg mL⁻¹ foram preparadas em acetonitrila (ACN) e armazenadas sob refrigeração a -20 °C, por até 30 dias. Previamente às análises, soluções trabalho contendo todos os piretróides foram preparadas em ACN, nas concentrações de 5,0 µg mL⁻¹ a 80,0 µg L⁻¹, a partir das soluções estoque.

B) *Lactonas macrocíclicas e antimicrobianos*

Padrões analíticos de penicilina G (PNG), penicilina V (PNV), ceftiofur (CFT), cloxacilina (CLX), dicloxacilina (DCX), oxacilina (OXA), clortetraciclina (CTC), doxiciclina (DOX), tetraciclina (TC), oxitetraciclina (OTC), ácido oxolínico (OXO), ácido nalidíxico (NALIDIX), flumequina (FLU), difloxacina (DIFLO), ciprofloxacina (CIPRO), enrofloxacina (ENRO), norfloxacina (NOR), sarafloxacina (SARA), trimetoprim (TMP), sulfadimetoxina (SDMX), sulfaquinoxalina (SQX), sulfadiazina (SDZ), sulfatiazol (STZ), sulfapiridina (SPY), sulfametoxazol (SMA), sulfametazina (SMZ), sulfaclopiridazina (SCP), sulfizoxazol (SFX), sulfadoxina (SDX), sulfamerazina (SMR), ivermectina (IVR), eprinomectina (EPR), emamectina (EMA), doramectina (DOR), abamectina (ABA) e moxidectina (MOX), todos com 95% de pureza analítica, foram obtidos da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, Estados Unidos).

Soluções estoque dos padrões de beta-lactâmicos foram preparadas nas concentrações de 0,5 a 3,75 mg mL⁻¹, através de dissolução em polipropilenoglicol 3000 em solução tampão de acetato

pH = 4,5. Para tetraciclina, sulfonamidas e quinolonas, soluções estoque individuais foram preparadas através da dissolução de 10 mg de padrão analítico em 10 mL de solvente adequado (acetonitrila para tetraciclina e sulfonamidas, metanol com duas gotas (~2) de NaOH 1M para quinolonas, metanol para TMP). As soluções estoque dos padrões foram diluídas individualmente nas concentrações de 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e 1 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e armazenadas a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Para lactonas macrocíclicas, soluções estoque individuais de 1,0 mg mL^{-1} foram preparadas através da dissolução de 10 mg do padrão analítico em 10 mL de ACN. Soluções trabalho foram preparadas através da diluição das soluções estoque em ACN, nas concentrações de 1 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para ABA, IVR e MOX, 1,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para DOR, e 2,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para EPR. O padrão EMA, na concentração de 1 $\mu\text{g mL}^{-1}$ em ACN, foi utilizado como padrão interno.

Todos os reagentes empregados são de pureza analítica. Ácido acético, ácido tricloroacético, acetonitrila (ACN), etanol e metanol (MeOH) foram adquiridos da Merck (Darmstadt, Alemanha). Ácido fórmico e trietilamina foram obtidos da J.T. Baker (Phillipsburg, NJ, Estados Unidos). Água ultra pura deionizada (resistividade $> 18,2\text{ M}\Omega\text{cm}$) foi gerada em sistema Milli-Q SP Water (Millipore, Bedford, Estados Unidos). Ácido etilenodiaminotetraacético dissódico (Na_2EDTA) foi obtido da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, Estados Unidos) e acetato de amônia foi obtido de Mallinckrodt-Baker (Phillipsburg, NJ, Estados Unidos).

2.2.2 Procedimentos de preparo de amostra

A) *Piretróides*

Alíquotas de 5,0 mL de leite foram homogeneizadas e transferidas para tubos de polipropileno para extração com 10 mL de ACN. A mistura foi submetida à agitação por 20 minutos e armazenada a temperatura de $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 12 horas. Após esse período, a fase orgânica líquida, contendo o solvente orgânico e os analitos, foi separada da fase aquosa e fração lipídica congeladas. O sobrenadante foi passado através de lã de vidro previamente refrigerada contendo 2 g de sulfato de sódio anidro. O extrato foi concentrado até à secura em banho termostático ($38\text{ a }40\text{ }^{\circ}\text{C}$) sob leve corrente de nitrogênio. O resíduo foi ressuspensão em 1,0 mL de ACN e analisado por CG-DCE.

B) Determinação multiresíduo de quinolonas, tetraciclinas, sulfonamidas e trimetoprim (TMP)

Alíquotas de 500 μL de leite cru foram extraídas em tubos de microcentrifugação (1,5 mL) por adição de 20 μL de EDTA 20 mM e 200 μL de etanol 3,0% ácido acético. As amostras foram misturadas durante aproximadamente 15 segundos em vortex e em seguida centrifugadas a 10.000 x g. Uma alíquota de 100 μL do sobrenadante foi diluída com 10 μL água 0,1% ácido fórmico: ACN 0,1% ácido fórmico (1:1, v/v) e 10 μL foram injetados no cromatógrafo para análise multiresíduo por CLAE-MS/MS.

C) Determinação quantitativa de antimicrobianos

• *Beta-lactâmicos*

A determinação de beta-lactâmicos foi realizada conforme descrito por Jank et al. (2011). Amostras constituídas de 2,0 mL de leite foram submetidas à extração com 1,0 mL de ACN sob agitação, sendo o procedimento repetido quatro vezes sucessivamente, seguido pela homogeneização da mistura em agitador de tubos durante 15 minutos. Em seguida, 1 g de cloreto de sódio foi adicionado e a mistura submetida novamente à agitação por 15 minutos. As amostras foram centrifugadas durante 5 minutos a 3.000 x g, e alíquotas de 100 μL do sobrenadante foram transferidas para frascos de HPLC (vials), sendo injetado um volume de 10 μL para análise no cromatógrafo.

• *Tetraciclinas*

Alíquotas de 500 μL de leite foram transferidas para tubos de microcentrifugação com a adição de 5 μL de EDTA 100 mM. Após agitação em vortex por 15 segundos, foram adicionados 200 μL de etanol 3% de ácido acético. As amostras foram novamente agitadas por 15 segundos e centrifugadas durante 10 minutos a 12.000 x g. Uma alíquota de 350 μL do sobrenadante foi diluída com 650 μL de água ultra pura em frasco de HPLC (vial) e submetida a análise por CLAE-MS/MS.

- *Quinolonas*

Para determinação de quinolonas, 500 μL de leite cru foram submetidos à extração com 20 μL de EDTA 20 mM e 200 μL de etanol 3% ácido acético. As amostras foram homogeneizadas sob agitação em vórtex por 15 segundos e em seguida centrifugadas a 10.000 x g. Uma alíquota de 100 μL do sobrenadante foi diluída com 10 μL água 0,1% ácido fórmico: ACN 0,1% ácido fórmico (1:1, v/v). Em seguida, 10 μL foram injetados para análise no cromatógrafo.

- *Sulfonamidas e TMP*

Alíquotas de 500 μL de leite foram homogeneizadas durante 15 segundos em vórtex, e a extração de analitos procedeu-se com a adição de 200 μL de etanol 3% de ácido acético. O extrato foi misturado durante 15 segundos, e centrifugado durante 10 minutos a 10.000 x g. Uma alíquota do sobrenadante (350 μL) foi diluída com água ultra pura (650 μL) em frasco de HPLC e 10 μL foram injetados para a análise por CLAE-MS/MS.

- *Lactonas macrocíclicas*

A extração das amostras foi realizada de acordo com Rübensam et al. (2011). Para o procedimento, 5,0 mL de leite foram extraídos com quatro alíquotas de 2,5 mL de ACN através de extração líquido-líquido com purificação em baixas temperaturas. Após agitação em vórtex, foram adicionados 2 g de cloreto de sódio, seguida por agitação até dissolução do sal e centrifugação a 10.000 x g por 10 minutos. O sobrenadante foi transferido para tubo de polipropileno e mantido em congelador por 12 horas à temperatura de $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. A fase líquida remanescente foi transferida para um novo tubo de polipropileno e evaporada em banho termostatzado ($50\text{-}55\text{ }^{\circ}\text{C}$) sob leve corrente de nitrogênio. O extrato foi reconstituído com 1 mL de ACN, e 10 μL foram retirados, procedendo-se a análise por CLAE-MS/MS.

2.2.3 Equipamentos e condições cromatográficas

A) *Determinação de piretróides por cromatografia gasosa com detector de captura de elétrons (CG-DCE)*

A análise de piretróides foi realizada em cromatógrafo gasoso Trace GC Ultra Gas Chromatograph (Thermo, Santa Clara, CA, Estados Unidos) equipado com amostrador automático AI 3000 e sistema de injeção com divisão de fluxo, acoplado ao detector de captura de elétrons (DCE) ^{63}Ni . Para a separação analítica dos compostos foi empregada coluna capilar de sílica OV-5 de dimensões 15,0 mm \times 0,25 mm, e 0,1 μm de espessura de filme, e coluna capilar de sílica OV-35 (15,0 mm \times 0,25 mm, 0,25 μm de espessura de filme). O programa de temperatura empregado na coluna OV-5 foi de 100 $^{\circ}\text{C}$ (1 min) a 250 $^{\circ}\text{C}$, com 20 $^{\circ}\text{C min}^{-1}$, para 260 $^{\circ}\text{C}$ (3 min) com 5 $^{\circ}\text{C min}^{-1}$, até 330 $^{\circ}\text{C}$ (5 min) com 20 $^{\circ}\text{C min}^{-1}$. As condições de separação dos analitos na coluna OV-35 foram similares às empregadas na coluna OV-5. O injetor e detector foram programados nas temperaturas de 240 $^{\circ}\text{C}$ e 340 $^{\circ}\text{C}$, respectivamente. Gás nitrogênio foi empregado como gás de arraste a 1,0 mL min^{-1} . O volume de amostra injetado foi 1,0 μL no modo de injeção sem divisão de fluxo. A identificação dos picos foi baseada na comparação dos tempos de retenção dos compostos em soluções padrão.

B) *Análise qualitativa multiresíduo por cromatografia líquida de alta eficiência e espectrometria de massas 'in tandem' (CLAE-MS/MS)*

Previamente às análises quantitativas, foi empregado método de triagem multiresíduo por CLAE-MS/MS para análise qualitativa de quinolonas, tetraciclina, sulfonamidas e TMP em leite. A análise multiresíduo foi realizada em cromatógrafo líquido de alta eficiência Waters Alliance 2795 (Milford, Estados Unidos) acoplado ao espectrômetro de massas de triplo quadrupolo Micromass Quattro Micro (Waters, Milford, Estados Unidos) com fonte de ionização por electrospray. A separação dos analitos foi realizada em coluna Waters Symmetry C18 LC (Waters, Milford, Estados Unidos) de dimensões 75 mm \times 4,6 mm, e 3,5 μm de tamanho de partícula interna. A coluna Phenomenex C18 column (4,0 mm \times 3,0 mm, 3,5 μm) (Phenomenex, Torrance, Estados Unidos) foi empregada como pré-coluna. Um programa de eluição no modo gradiente foi utilizado empregando o

solvente A (água ultra pura 0,1% ácido fórmico) e solvente B (ACN 0,1% ácido fórmico). As condições cromatográficas e os parâmetros do espectrômetro de massas foram programados segundo Bittencourt et al. (2011). A detecção foi realizada no modo de monitoramento de reações múltiplas, com duas transições m/z monitoradas para cada analito. A identificação das transições dos analitos associada aos tempos de retenção permitiu a confirmação dos analitos, de acordo com os critérios requeridos na análise confirmatória de resíduos. Para resultados positivos, métodos quantitativos foram aplicados para determinação da concentração do analito, conforme descrito a seguir.

C) *Determinação quantitativa de lactonas macrocíclicas e antimicrobianos por cromatografia líquida de alta eficiência e espectrometria de massas 'in tandem' (CLAE-MS/MS)*

Na análise quantitativa foi empregado o cromatógrafo líquido de alta eficiência Agilent 1100 series LC (Santa Clara, CA, Estados Unidos) composto por bomba quaternária, degaseificador a vácuo e sistema amostrador automático, acoplado ao espectrômetro de massas de triplo quadrupolo API 5000 (Applied Biosystems, Foster City, Estados Unidos) com fonte de ionização por electrospray. A separação cromatográfica de beta-lactâmicos foi realizada em coluna analítica Phenomenex Synergy[®] C18 (150 x 3,0 mm, 4,0 μ m), acoplada à coluna de guarda Phenomenex C18 (4,0 x 3,0 mm, 5,0 μ m), no modo de eluição gradiente. Foi empregada fase móvel binária, com fluxo de 500 μ L min^{-1} , e tempo de corrida cromatográfica de 12 minutos. A fase móvel foi composta por fase aquosa A (água ultra pura 0,1% ácido fórmico) e fase orgânica B (ACN 0,1% ácido fórmico). As condições cromatográficas e os parâmetros do espectrômetro de massas foram programados segundo Jank et al. (2011).

Na análise de tetraciclinas, a separação cromatográfica foi realizada em coluna Xterra C18 (2,1 mm x 100 mm, 1,7 μ m) precedida por pré-coluna C18 (4,0 x 3,0 mm, 5,0 μ m) (Phenomenex, Torrance, Estados Unidos). A fase móvel foi composta por água ultra pura 0,05% ácido fórmico (solvente A) e ACN 0,05% ácido fórmico (solvente B). A separação analítica de quinolonas foi realizada em coluna Waters Symmetry C18 (75 mm x 4,6 mm, 3,5 μ m), com pré-coluna Phenomenex C18 (4,0 mm x 3,0 mm, 3,5 μ m), empregando o modo de eluição gradiente com fase móvel composta por fase aquosa A (água ultra pura 0,1% ácido fórmico) e fase orgânica B (ACN 0,1% ácido fórmico).

A separação analítica de sulfonamidas e TMP foi realizada em coluna Zorbax[®] XDB C18 (150 x 4,6 mm, 5,0 µm) (Agilent, Santa Clara, Estados Unidos). A fase móvel cromatográfica foi composta por acetato de amônio 10 mM 0,01% ácido acético (solvente A) e metanol (solvente B), em modo de eluição gradiente. Os parâmetros cromatográficos foram programados de acordo com Hoff, Barreto e Kist (2009). Na análise de lactonas macrocíclicas, a separação foi realizada em coluna Luna C18 (150 mm x 2,1 mm, 5,0 µm) precedida por pré-coluna C18 (4,0 mm x 3,0 mm, 5,0 µm) (Phenomenex, Torrence, CA, Estados Unidos). O tempo de corrida cromatográfica foi de 4 minutos, no modo de eluição isocrático, com fase móvel composta por tampão acetato de amônio 50 mM (pH 5,0): ACN (5:95, v/v), com fluxo de 0,2 mL min⁻¹.

2.2.4 Critérios de desempenho dos métodos confirmatórios

Todas as amostras foram submetidas aos métodos descritos. Inicialmente, as amostras foram analisadas através do método qualitativo multirésíduo por CLAE-MS/MS, para triagem de resíduos de antimicrobianos. Para os resultados positivos na triagem, os métodos quantitativos por CLAE-MS/MS foram aplicados. Todos os métodos empregados foram previamente validados e estão atualmente em uso rotineiro na rede de laboratórios oficiais do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento do Brasil (MAPA), a fim de realizar o PNCRC (LINS; CONCEIÇÃO; MAURÍCIO, 2012), estando os laboratórios oficiais certificados para ISO 17025. Nas análises das amostras, os resultados foram avaliados por meio de ensaios de recuperação. Todos os métodos aplicados atingiram os critérios de desempenho estabelecidos para análise de resíduos. Os dados de desempenho de todos os métodos de análise se encontram resumidos na Tabela 2.1.

Na determinação dos resíduos, as amostras com detecção de analitos foram consideradas positivas, e as amostras com concentrações de analitos superiores ao BLMR foram consideradas não conformes.

Tabela 2.1 - Critérios de desempenho dos métodos de análise de resíduos de drogas veterinárias e pesticidas em leite

Técnica	Analito	LOD	LOQ	CC α	CC β	Recuperação (%)	Linearidade ($\mu\text{g kg}^{-1}$)
<i>CLAE-MS/MS</i>							
	PNG	0,4	1,0	4,7	5,7	54,2	0,4 - 40
	PNV	0,4	1,0	4,7	6,1	63,7	0,4 - 40
	CFT	10,0	25,0	120,4	147,9	41,9	10 - 200
	CLX	3,0	7,5	35,6	52,8	79,3	3 - 100
	OXA	3,0	7,5	36,5	53,7	73,8	3 - 100
	DCX	3,0	7,5	36,3	56,6	81,3	3 - 100
	CTC	10,0	25,0	108,0	122,0	49,8	10 - 300
	DOX	25,0	50,0	135,0	174,0	46,3	25 - 300
	TC	10,0	25,0	112,0	148,0	60,3	10 - 300
	OTC	10,0	25,0	114,0	151,0	54,7	10 - 300
	OXO	10,0	20,0	117,6	135,2	76,0	10 - 200
	NALIDIX	10,0	20,0	114,4	128,7	79,0	10 - 200
	FLU	10,0	20,0	112,8	125,6	79,0	10 - 200
	DIFLO	10,0	20,0	115,4	130,8	73,0	10 - 200
	CIPRO	10,0	20,0	112,5	125,0	81,0	10 - 200
	ENRO	10,0	20,0	111,8	123,6	81,0	10 - 200
	NOR	10,0	20,0	113,6	127,3	80,0	10 - 200
	SARA	10,0	20,0	114,4	128,9	76,0	10 - 200
	TMP	10,0	20,0	109,7	118,0	89,0	10 - 200
	SDMX	15,0	25,0	112,0	125,0	84,0	10 - 200
	SQX	15,0	25,0	115,0	130,0	71,0	10 - 200
	SDZ	15,0	25,0	113,0	126,0	73,0	10 - 200
	STZ	15,0	25,0	115,0	128,0	65,0	10 - 200
	SPY	15,0	25,0	112,0	121,0	69,0	10 - 200
	SMA	15,0	25,0	119,0	134,0	74,0	10 - 200
	SMZ	15,0	25,0	121,0	138,0	77,0	10 - 200
	SCP	15,0	25,0	108,1	116,2	80,0	10 - 200
	SFX	15,0	25,0	ND	ND	63,5	10 - 200
	SDX	15,0	25,0	107,4	114,8	77,0	10 - 200
	SMR	15,0	25,0	106,6	113,2	74,5	10 - 200
	ABA	0,2	0,6	10,6	11,3	102,0	2,5 - 25
	DOR	0,6	1,9	16,0	17,3	101,4	3,75 - 37,5
	EPR	1,1	3,4	22,0	23,7	101,3	5 - 40
	IVR	0,3	0,9	10,7	11,6	101,8	2,5 - 25
	MOX	0,1	0,4	10,5	11,0	95,4	2,5 - 25
<i>GC-ECD</i>							
	γ CYH	2,0	10,0	32,4	38,4	86,8	2 - 100
	λ CYH	2,0	10,0	40,3	50,3	91,3	2 - 100
	CYF	5,0	20,0	94,1	135,7	101,7	5 - 100
	CYP	5,0	15,0	26,7	33,6	95,6	5 - 100
	DEL	2,0	5,0	27,4	34,5	73,9	2 - 100
	FEV	2,0	5,0	49,8	58,2	79,1	2 - 100
	PER	2,0	5,0	26,6	33,1	64,8	2 - 100

LOD: limite de detecção; LOQ: limite de quantificação; CC α : limite de decisão; CC β : capacidade de detecção; ND: não determinado.

PNG: penicilina G; PNV: penicilina V; CFT: ceftiofur; CLX cloxacilina, OXA: oxacilina; DCX: dicloxacilina; CTC: clortetraciclina; DOXI: doxiciclina; TC: tetraciclina; OTC: oxitetraciclina; OXO: ácido oxolínico; NALIDIX: ácido nalidíxico; FLU: flumequina; DIFLO: difloxacina; CIPRO: ciprofloxacina; ENRO: enrofloxacina; NOR: norfloxacina; SARA: sarafloxacina, TMP: trimetoprim; SDMX: sulfadimetoxina; SQX: sulfaquinoxalina; SDZ: sulfadiazina; STZ: sulfatiazol; SPY: sulfapiridina; SMA: sulfametoxazol; SMZ: sulfametazina;

SCP: sulfaclopiridazina; SFX: sulfisoxazol; SDX: sulfadoxina; SMR: sulfamerazina; ABA: abamectina; DOR: doramectina; EPR: eprinomectina; IVR: ivermectina; MOX: moxidectina; γ -CYH: γ -cialotrina; λ -CYH: λ -cialotrina; CYF: ciflutrina; CYP: cipermetrina; DEL: deltametrina; FEV: fenvalerato; e, PER: permetrina.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na Tabela 2.2 estão apresentados os parâmetros nacionais e internacionais estabelecidos para os analitos pesquisados nesse estudo, observando-se que o Brasil apresenta LMR equivalentes ou até mais exigentes para alguns dos analitos envolvidos.

No presente estudo foram identificados 12 resíduos de produtos de uso veterinário dentre os 42 investigados, indicando que o período de carência de algumas drogas não foi devidamente respeitado por todos os produtores de leite. Os analitos pesquisados e seus respectivos resultados se encontram resumidos e representados na Tabela 2.3.

Em 40 amostras analisadas (30,30%), foi detectado no mínimo um analito. Em 16 amostras (12,12%) observou-se detecção de múltiplos analitos, com quantificação de dois em cada amostra analisada (Figura 2.1). Considerando o BLMR de cada analito detectado (Tabela 2.1), 11 amostras (8,33%) apresentaram quantificação superior ao respectivo limite, apresentando-se, portanto, como não conformes.

Resíduos de piretróides foram detectados em 14 amostras, correspondendo a resíduos de CYP e DEL, com 12 e duas amostras positivas, respectivamente. Para a detecção de CYP, nove amostras apresentaram concentração de resíduos acima do BLMR. O cromatograma de uma amostra com CYP é mostrado na Figura 2.2. Picos múltiplos foram observados nos cromatogramas de CYP, devido à separação dos diastereo-isômeros. Além disso, é importante destacar que os piretróides, por possuírem propriedades lipofílicas, podem se acumular nos organismos, sendo considerados compostos altamente tóxicos e que levam a graves sintomas neurológicos (SPINOSA; GÓRNIK; BERNARDI, 2006).

Tabela 2.2 - Valores ($\mu\text{g kg}^{-1}$) de limites máximos de resíduos (LMR) estabelecidos para os analitos pesquisados em amostras de leite cru de 45 propriedades leiteiras de Minas Gerais, Brasil

(continua)

Classes	Analitos	Brasil ^a	Codex ^b	UE ^c	EUA ^d	Japão ^e	Austrália ^f	Canadá ^g	China ^h
Beta-lactâmicos	Penicilina G (PNG)	4	4	4	5	4	1.5	10	4
	Penicilina V (PNV)	4	---	---	---	---	---	---	---
	Ceftiofur (CFT)	100	100	100	100	100	100	100	100
	Cloxacilina (CLX)	30	---	30	10	20	10	---	30
	Oxacilina (OXA)	30	---	30	---	30	---	---	---
	Dicloxacilina (DCX)	30	---	30	---	10	---	---	---
Tetraciclinas	Clortetraciclina (CTC)	100	---	100	300	100	---	100	100
	Doxiciclina (DOXI)	100	---	---	---	---	---	---	---
	Tetraciclina (TC)	100	---	100	300	100	100	100	100
	Oxitetraciclina (OTC)	100	100	100	300	100	100	100	100
Quinolonas	Ácido oxolínico (OXO)	---	---	---	---	---	---	---	---
	Ácido nalidíxico (NALIDIX)	---	---	---	---	---	---	---	---
	Flumequina (FLU)	50	---	50	---	100	---	---	---
	Difloxacina (DIFLO)	---	---	---	---	---	---	---	---
	Ciprofloxacina (CIPRO)	100	---	100	---	---	---	---	100
	Enrofloxacina (ENRO)	100	---	100	---	50	---	---	100
	Norfloxacina (NOR)	---	---	---	---	---	---	---	---
	Sarafloxacina (SARA)	---	---	---	---	---	---	---	---
Sulfonamida sinérgica	Trimetoprim (TMP)	---	---	50	---	50	50	---	---
Sulfonamidas	Sulfadimetoxina (SDMX)	100	---	100	10	20	---	10	100
	Sulfaquinoxalina (SQX)	100	---	100	---	10	---	10	100
Sulfonamidas	Sulfadiazina (SDZ)	100	---	100	---	70	100	---	100
	Sulfatiazol (STZ)	100	---	100	---	90	---	10	100
	Sulfapiridina (SPY)	100	---	100	---	10	---	10	100

Tabela 2.2 - Valores ($\mu\text{g kg}^{-1}$) de limites máximos de resíduos (LMR) estabelecidos para os analitos pesquisados em amostras de leite cru de 45 propriedades leiteiras de Minas Gerais, Brasil

		(conclusão)							
Classes	Analitos	Brasil ^a	Codex ^b	UE ^c	EUA ^d	Japão ^e	Austrália ^f	Canadá ^g	China ^h
Sulfonamidas	Sulfametoxazol (SMA)	100	---	100	---	---	---	---	100
	Sulfametazina (SMZ)	100	---	100	---	25	---	10	25
	Sulfaclopiridazina (SCP)	100	---	100	---	---	---	---	100
	Sulfizoxazol (SFX)	100	---	100	---	---	---	---	100
	Sulfadoxina (SDX)	100	---	100	---	60	100	10	100
	Sulfamerazina (SMR)	100	---	100	---	---	---	---	100
Lactonas macrofílicas	Abamectina (ABA)	10	5	5	5	5	20	---	---
	Doramectina (DOR)	15	15	---	---	15	50	---	---
	Eprinomectina (EPR)	20	20	20	12	20	30	20	---
	Ivermectina (IVR)	10	10	---	---	10	50	---	---
	Moxidectina (MOX)	10	---	40	40	40	60 ^k	40	---
Piretróides	γ -Cialotrina (γ CYH)	25	20	50	200	30	50	---	---
	λ -Calotrina (λ CYH)	25	20	50	400	30	50	500	---
	Ciflutrina (CYF)	20	40	20	200	40	100	500	---
	Cipermetrina (CYP)	20	50	50	100	50	1000	---	---
	Deltametrina (DEL)	20	50	50	20	30	50	50	---
	Fenvalerato (FEV)	40	100	20	300	100	200	---	---
	Permetrina (PER)	50	100	50	880	100	50	200	---

^a Brasil (2012).

^b FAO/WHO (2011).

^c Medicamentos veterinários (Comission Regulation, 2010) e pesticidas (Sanco, 2008).

^d FDA MRL database (2011).

^e Japan Food Chemical Research Foundation (2011).

^f Australian government (2011).

^g Health Canada (2011).

^h China (2002).

^j LMR não estabelecido; valores para penicilina e tetraciclina são níveis mínimos de detecção.

^k LMR estabelecido para fração de gordura do leite (originalmente $2000 \mu\text{g kg}^{-1}$. Leite com 3% de gordura, corresponde a $60 \mu\text{g kg}^{-1}$ para o produto integral.

A maioria dos compostos β -lactâmicos foi detectada no leite, sendo as concentrações inferiores aos respectivos BLMR. No entanto, PNV foi detectada acima do limite máximo de concentração ($7,95 \text{ mg kg}^{-1}$) para uma amostra não conforme. É importante observar que apenas uma formulação farmacêutica contendo PNV está comercialmente disponível para vacas em lactação no Brasil. Análise dos compostos de tetraciclina, como CTC, DOXI, TC e OTC, apresentou detecção de OXT para três amostras, em concentrações inferiores ao BLMR. Para a análise de tetraciclina, nenhuma amostra foi considerada não conforme (Tabela 2.3). Resíduos de quinolonas como CIPRO e ENRO foram detectados em três amostras diferentes para cada analito, mas nenhuma com concentração acima do seu respectivo BLMR. Os cromatogramas com amostras positivas para ENRO e seu metabólito CIPRO, PNV e ABA estão apresentados na Figura 2.3.

A análise para pesquisa de resíduos de lactonas macrocíclicas em leite cru mostrou que 20 amostras foram positivas para avermectinas, sendo sete para ABA e três para DOR, enquanto IVR foi detectada em 12 amostras. Uma amostra apresentou valor superior ao BLMR para ABA.

Considerando o volume total de 94.000 litros para produção diária representada pelas propriedades selecionadas, no período avaliado, 6,4% do total de leite apresentou não conformidade para pesquisa de resíduos de acordo com os padrões de BLMR. Portanto, cerca de 6.000 litros de leite cru deveriam ser descartados diariamente, conforme os dados apresentados nesse estudo. O volume total de leite impróprio ao consumo devido à presença dos compostos farmacológicos (ABA, PNV, CYP) detectados acima do respectivo BLMR está representado na Figura 2.4.

Tabela 2.3 - Resíduos de produtos de uso veterinário em 132 amostras de leite cru refrigerado de tanque de expansão de propriedades leiteiras de Minas Gerais, Brasil

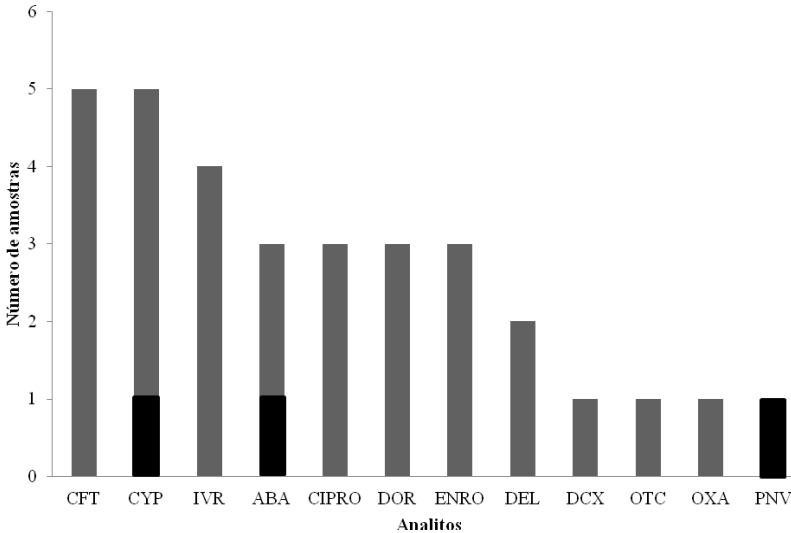
Classes	Analitos	Analitos positivos	Amostras positivas (%)	Mínimo - Máximo ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	Média \pm SE ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	Amostras não-conformes (%)
β -lactâmicos	PNG, PNV, CFT, CLX, OXA, DCX	PNV	1 (0,8)	8,0 - 8,0	$8,0 \pm 0,0$	1 (0,8)
		CFT	7 (5,3)	13,4 - 69,4	$21,8 \pm 1,8$	0 (0,0)
		OXA	2 (1,5)	4,2 - 4,4	$4,3 \pm 0,0$	0 (0,0)
		DCX	2 (1,5)	3,8 - 3,9	$3,8 \pm 0,0$	0 (0,0)
Tetraciclina	CTC, DOX, TC, OTC	OTC	3 (2,3)	16,3 - 25,0	$20,0 \pm 0,4$	0 (0,0)
Quinolonas	OXO, NALIDIX, FLU, DIFLO, CIPRO, ENRO, NOR, SARA	CIPRO	3 (2,3)	16,6 - 39,4	$31,6 \pm 1,1$	0 (0,0)
		ENRO	3 (2,3)	3,0 - 6,0	$4,0 \pm 0,2$	0 (0,0)
Sulfonamidas	SDMX, SQX, SDZ, STZ, SPY, SMA, SMZ, SCP, SFX, SDX, SMR	ND	ND	ND	ND	ND
Sulfonamida sinérgica	TMP	ND	ND	ND	ND	ND
Lactonas macrocíclicas	ABA, DOR, EPR, IVR, MOX	ABA	7 (5,3)	2,2 - 18,3	$5,2 \pm 0,5$	1 (0,8)
		DOR	3 (2,3)	0,9 - 2,5	$1,7 \pm 0,1$	0 (0,0)
		IVR	12 (9,1)	0,4 - 2,9	$1,5 \pm 0,1$	0 (0,0)
Piretróides	γ CYH, λ CYH, CYF, CYP, DEL, FEV, PER	CYP	12 (9,1)	1,6 - 251,0	$87,1 \pm 8,1$	9 (6,8)
		DEL	2 (1,5)	1,0 - 1,9	$1,5 \pm 0,1$	0 (0,0)

SE: erro padrão da média.

ND: não detectado.

PNG: penicilina G; PNV: penicilina V; CFT: ceftiofur; CLX cloxacilina, OXA: oxacilina; DCX: dicloxacilina; CTC: clortetraciclina; DOXI: doxiciclina; TC: tetraciclina; OTC: oxitetraciclina; OXO: ácido oxolínico; NALIDIX: ácido nalidíxico; FLU: flumequina; DIFLO: difloxacina; CIPRO: ciprofloxacina; ENRO: enrofloxacina; NOR: norfloxacina; SARA: sarafloxacina, TMP: trimetoprim; SDMX: sulfadimetoxina; SQX: sulfaquinoxalina; SDZ: sulfadiazina; STZ: sulfatiazol; SPY: sulfapiridina; SMA: sulfametoxazol; SMZ: sulfametazina; SCP: sulfaclorpiridazina; SFX: sulfisoxazol; SDX: sulfadoxina; SMR: sulfamerazina; ABA: abamectina; DOR: doramectina; EPR: eprinomectina; IVR: ivermectina; MOX: moxidectina; γ CYH: γ -cicalotrina; λ CYH: λ -cicalotrina; CYF: ciflutrina; CYP: cipermetrina; DEL: deltametrina; FEV: fenvalerato; e, PER: permetrina.

Figura 2.1 - Resíduos de produtos de uso veterinário detectados em amostras de leite cru contaminadas com dois analitos diferentes



BLMR: limite máximo de resíduo estabelecido pela legislação brasileira (Brasil, 2011b).

CFT: cefotiofur; CYP: cipermetrina; IVR: ivermectina; ABA: abamectina; CIPRO: ciprofloxacina; DOR: doramectina; ENRO: enrofloxacin; DEL: deltametrina; DCX: doxiciclina; OTC: oxitetraciclina; OXA: oxacilina e PNV: penicilina V.

Figura 2.2 - Cromatograma de amostra positiva para resíduo de cipermetrina (CYP), com $34,79 \mu\text{g L}^{-1}$. Bifentrina foi utilizada como padrão interno

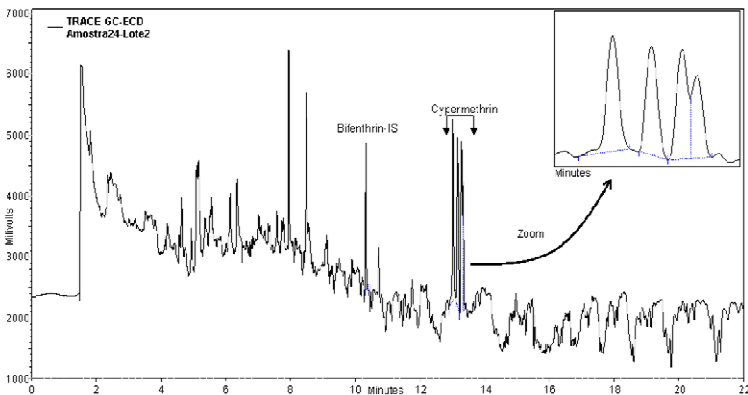
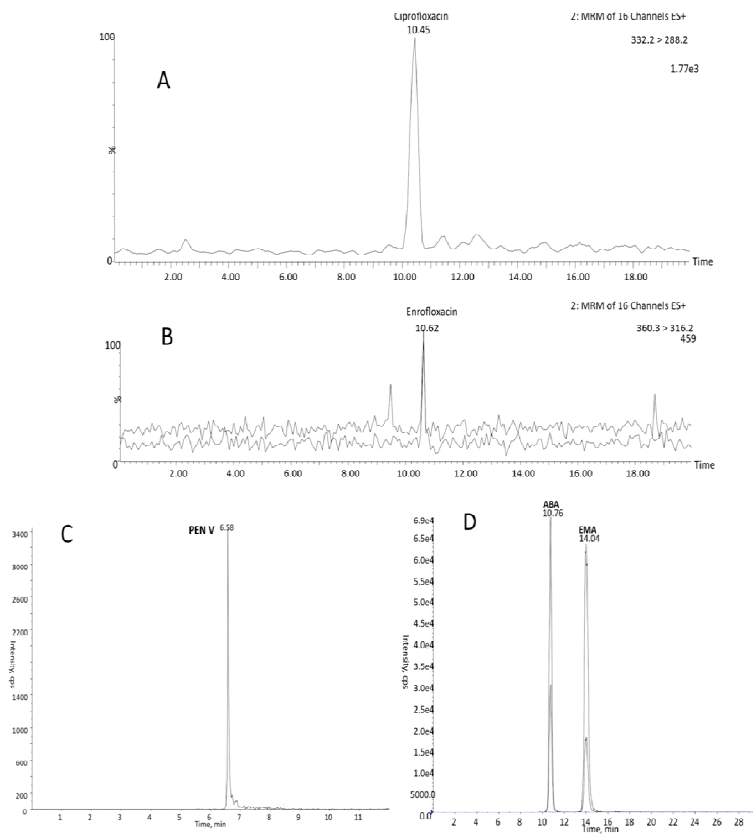
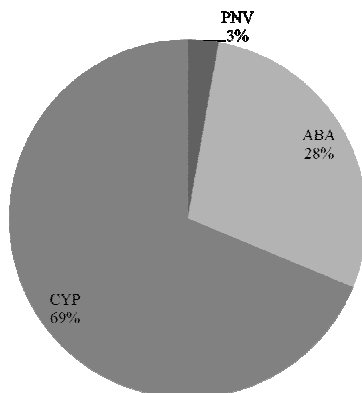


Figura 2.3 - Cromatogramas com extração iônica de amostras positivas. Amostra de leite com $39,37 \mu\text{g L}^{-1}$ de CIPRO (A) e $5,98 \mu\text{g L}^{-1}$ de ENRO (B). Cromatograma com extração iônica de amostra de leite com $7,95 \mu\text{g de L}^{-1}$ de PNV. A transição mais intensa corresponde a $m/z 351 > 160$. Qualificação da transição (em cinza) corresponde a $m/z 351 > 114$ (C). Cromatograma de extração iônica para amostra de leite com $18,3 \mu\text{g L}^{-1}$ de ABA. Segundo pico é o padrão interno de EMA em $5,0 \mu\text{g L}^{-1}$ (D)



PEN V: penicilina V; ABA: abamectina; EMA: emamectina.

Figura 2.4 - Volume total de leite cru contaminado com cipermetrina, abamectina e penicilina V em concentrações acima de seu limite máximo de resíduos conforme produção diária nas fazendas selecionadas em Minas Gerais, Brasil



CYP: cipermetrina; ABA: abamectina; PNV: penicilina V.

A contaminação por diferentes compostos químicos em leite de propriedades rurais de Minas Gerais confirma o grande número de produtos de uso veterinário aplicados em rebanho leiteiro. A presença de resíduos de antimicrobianos em leite se deve, provavelmente, ao tratamento terapêutico de vacas com algum tipo de infecção, ao passo que a mastite é mais frequentemente relacionada à bovinocultura de leite no País. É particularmente importante notar que não existe um tratamento tecnológico para suprimir a presença destes agentes químicos no leite e seus derivados, com esperadas perdas econômicas para a indústria de laticínios e risco de danos à saúde do consumidor por meio do consumo de leite contaminado com resíduos desses produtos. Além disso, o destino inadequado do leite com resíduos pode contaminar águas e vegetação, persistindo em ecossistemas, como já relatado na literatura (STUART et al., 2012; TORRE et al., 2012).

Lactonas macrocíclicas e piretróides foram os resíduos em leite cru brasileiro encontrados em maior número de não conformidade (Tabelas 2.3 e 2.4), provavelmente devido ao maior uso desses agentes na prática da atividade leiteira, para controle e tratamento de endo e ectoparasitas, principalmente. Os resíduos destes compostos também podem ser derivados de alimento contaminado por seus resíduos e fornecido ao rebanho leiteiro, ou até mesmo por contaminação ambiental nas pastagens.

Tabela 2.4 - Número de amostras de leite cru de propriedades leiteiras de Minas Gerais, Brasil, positivas para resíduos de produtos de uso veterinário contidas em diferentes intervalos de concentração

Analitos detectados	Amostras (n) em cada faixa de concentração					
	Não detectado (< LD)	< 0,01 $\mu\text{g kg}^{-1}$	0,01 – 0,5 $\mu\text{g kg}^{-1}$	0,5 – 1,0 $\mu\text{g kg}^{-1}$	1,0 – 20,0 $\mu\text{g kg}^{-1}$	> 20,0 $\mu\text{g kg}^{-1}$
PNV	131	-	-	-	1	-
CFT	125	-	-	-	6	1
OXA	130	-	-	-	2	-
DCX	130	-	-	-	2	-
OTC	129	-	-	-	2	1
CIPRO	129	-	-	-	1	2
ENRO	129	-	-	-	3	-
ABA	125	-	-	-	7	-
DOR	129	-	-	1	2	-
IVR	120	2	2	1	7	-
CYP	120	-	-	-	3	9
DEL	130	-	-	-	2	-
TOTAL	75	2	2	2	38	13

LD: limite de detecção.

PNV: penicilina V; CFT: ceftiofur; OXA: oxacilina; DCX: dicloxacilina; OTC: oxitetraciclina; CIPRO: ciprofloxacina; ENRO: enrofloxacina; ABA: abamectina; DOR: doramectina; IVR: ivermectina; CYP: cipermetrina; DEL: deltametrina.

Os resultados dessa pesquisa são de grande relevância e podem ser relacionados com as vendas de produtos veterinários no mercado brasileiro. As vacinas e produtos antiparasitários representam 24% do total de produtos comercializados e os antimicrobianos respondem por 18% das vendas totais. Isso é particularmente importante, uma vez que o Brasil está entre os cinco maiores mercados veterinários do mundo, enquanto que os animais ruminantes são responsáveis por 56% de todo o mercado consumidor de medicamentos veterinários no Brasil (SINDAN, 2011). Embora medicamentos antimicrobianos sejam amplamente utilizados no rebanho leiteiro para prevenção e tratamento de infecções, medidas mais controladoras estão disponíveis para a prevenção de seus resíduos na prática de laticínios. As indústrias de laticínios rotineiramente realizam testes de triagem (qualitativos) para pesquisa de resíduos de antimicrobianos em leite cru.

A maior frequência observada em relação à ocorrência de resíduos de pesticidas em leite cru, especialmente CYP, acima do respectivo BLMR (Tabela 2.3), apresenta-se como alerta para a indústria de laticínios, pois o leite em não conformidade deve ser descartado, sendo potencial contaminante ambiental, assim como para a saúde pública, pois os piretróides são tóxicos e cumulativos no organismo,

causando sintomas neurológicos graves, não existindo tecnologia corretiva para sua diminuição e/ou eliminação depois de sua presença no leite. Assim, torna-se essencial a implementação urgente das Boas Práticas Agropecuárias (BPA) na produção de leite, com foco no uso racional e responsável dos produtos de uso veterinário, com ênfase para o uso dos pesticidas.

4 CONCLUSÕES

A presença de resíduos de produtos de uso veterinário no leite cru foi verificada em 40 amostras, referentes a 12 diferentes analitos. Os analitos PNV, ABA e CYP foram detectados com concentrações acima dos respectivos BLMR (4,0, 10,0 e 20,0 $\mu\text{g kg}^{-1}$) em 11 amostras analisadas. Resíduos de agentes antimicrobianos e lactonas macrocíclicas foram detectados em 1,6% das amostras de leite acima dos respectivos BLMR. A frequência da ocorrência de resíduos de piretróides no leite foi superior à dos antimicrobianos e lactonas macrocíclicas, com 6,8% das amostras analisadas positivas e não conformes (acima do respectivo BLMR), representando possíveis prejuízos à sanidade animal, ao meio ambiente, à indústria de laticínios e/ou saúde pública.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao suporte financeiro fornecido pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA).

Gabriel Rubensam, Doriane Sacheto, Louise Jank e Magda Targa Martin pelos conhecimentos e assistência nas análises químicas.

Alexandre Cota Lara e equipe por todo auxílio logístico junto às propriedades leiteiras.

CAPÍTULO 3

BOAS PRÁTICAS AGROPECUÁRIAS E SUA INFLUÊNCIA NO RISCO DE PRODUÇÃO DE LEITE COM RESÍDUOS DE PRODUTOS DE USO VETERINÁRIO

L. C. A. Picinin^{1*}, M. M. O. P. Cerqueira², R. B. Hoff³, A. M. Q. Lana², J. P. A. Haddad², F. N. Souza², I. M. Toaldo¹ e M. T. Bordignon-Luiz¹

¹ Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC). Rod. Admar Gonzaga, 1346, Bairro Itacorubi, Florianópolis, SC, Brasil, CEP: 88.034-001.

² Escola de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG). Belo Horizonte, MG, Brasil.

³ Laboratório Nacional Agropecuário (LANAGRO), Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). Porto Alegre, RS, Brasil.

RESUMO

A presença de resíduos de produtos de uso veterinário no leite compromete sua segurança e rentabilidade em todo setor produtivo, além de causar sérios impactos diretos e/ou indiretos na saúde dos animais, do consumidor e no meio ambiente. O presente estudo teve por objetivo avaliar a influência do treinamento para implementação das boas práticas agropecuárias (BPA) na ocorrência de resíduos de produtos de uso veterinário no leite produzido em propriedades leiteiras da maior região produtora brasileira. Um total de 43 propriedades leiteiras foram selecionadas com 129 amostras de leite cru coletadas e analisadas para verificação de amplo escopo (42 analitos), compreendendo antimicrobianos, lactonas macrocíclicas e piretróides. Além disso, foi realizado monitoramento e identificação dos principais fatores de risco por meio da aplicação de lista de verificação padrão em cada propriedade em três diferentes momentos com intervalos regulares entre si. Observou-se que o treinamento para adoção das BPA afetou significativamente a qualidade do leite produzido em relação à ocorrência de resíduos de produtos de uso veterinário, especialmente em relação aos produtos aplicados individualmente nos animais, como os antimicrobianos e lactonas macrocíclicas. Antes da implementação das BPA observou-se que 51,3% das propriedades apresentavam amostras de leite positivas para resíduos, sendo essa frequência diminuída para 16,3% após implementação das BPA. As diferentes práticas recomendadas para adoção das BPA em propriedades leiteiras apresentaram forte correlação positiva entre si, demonstrando a importância não apenas da adoção de práticas isoladas e específicas para determinados fins, mas o conjunto de todas as ações concomitantemente. O risco de ocorrência de resíduos de produtos de uso veterinário no leite diminuiu em 51,8% após treinamento para implementação das BPA, sendo que para resíduos de antimicrobianos e lactonas macrocíclicas diminuiu em 84,9 e 42,2%, respectivamente. Assim, a adequada informação e orientação quanto ao uso racional, responsável e consciente de produtos químicos na atividade leiteira por meio da implementação das BPA torna-se uma ferramenta essencial e eficaz para produção de leite seguro, minimizando prejuízos em toda cadeia leiteira advindos da presença de resíduos de produtos de uso veterinário no leite, tornando-o impróprio ao consumo além de potencial contaminante ambiental.

Palavras-chave: resíduos, leite, produtos de uso veterinário, pesticidas, boas práticas agropecuárias, treinamento, risco

1 INTRODUÇÃO

Nenhum alimento pode ser considerado livre de risco e cada passo em todo seu processo de produção, do campo à mesa, deve ser constantemente monitorado para garantia de sua segurança (VOYSEY; BROWN, 2000). Com isso, os produtores de leite em seus sistemas de produção em todo mundo precisam ser, cada vez mais, capazes de aliar rentabilidade com responsabilidade na proteção e promoção da saúde humana, do meio ambiente, assim como da sanidade e do bem estar animal (RUEGG, 2003; FAO/IDF, 2011; IDF, 2013). O desenvolvimento de programas de garantia de qualidade está geralmente baseado na adoção de melhores práticas de manejo na atividade leiteira visando garantia da biosseguridade e sanidade do rebanho em geral, podendo aumentar a rentabilidade, melhorar a eficiência em toda produção e diminuir a incidência de diversas enfermidades (RUEGG, 2003; RODRIGUES; CARAVIELLO; RUEGG, 2005; HOE; RUEGG, 2006).

Antimicrobianos, lactonas macrocíclicas e piretróides são os produtos mais utilizados em rebanhos leiteiros para prevenção, controle e tratamento de infecções bacterianas e parasitárias, assim como, infestações parasitárias (BILANDZIC et al., 2011; TOALDO et al., 2012). O uso extensivo e irresponsável desses compostos ativos pode levar à presença de seus resíduos no leite produzido, podendo causar danos à saúde do consumidor, desenvolvimento de resistência, propagação de patógenos resistentes, perda de produção, diminuição no rendimento industrial e problemas tecnológicos em derivados lácteos (McEWEN et al., 1991; RUEGG; TABONE, 2000; TOALDO et al., 2012).

O incentivo e a aceitação da avaliação dos fatores de risco para promoção e avaliação holística da saúde e dos riscos está em consonância com as intenções da Organização Mundial de Saúde. Nesta abordagem, a cadeia alimentar é reconhecida como responsabilidade de todos os envolvidos desde a produção, processamento, comercialização e consumo de alimentos. Esta abordagem holística para a segurança alimentar ao longo da cadeia alimentar difere dos modelos anteriores em que a responsabilidade pela segurança alimentar tende a se concentrar no setor de processamento de alimentos (SHITANDI; KIHUMBU, 2004).

O trabalho de esclarecimento e informação junto aos produtores a respeito das boas práticas agropecuárias (BPA) na atividade leiteira torna-se, portanto, uma ferramenta indispensável para prevenção de

perigos, melhoria e garantia da qualidade do leite. Com informação adequada e conhecimento, o produtor apresenta melhores condições de interferir em seu próprio sistema de produção, atingindo metas de qualidade exigidas pelo mercado nacional e internacional (GORNI; CABRINI, 2003; RUEGG, 2003; YOUNG et al., 2010b).

A ampla implementação de melhores práticas de manejo requer entendimento das práticas usuais da produção de leite em cada região. As atitudes e características pessoais dos produtores rurais influenciam em suas escolhas e tomadas de decisões, que geralmente se baseiam em observações subjetivas, dificultando a sua motivação para adoção das boas práticas nas atividades rotineiras (CHASSAGNE; BARNOUIN; LE GUENIC, 2005).

Embora a importância das BPA na atividade leiteira para garantia da qualidade do leite produzido seja reconhecida internacionalmente (YOUNG et al., 2010b; OLIVEIRA et al., 2011), há pouca informação disponível sobre as principais práticas de manejo e gestão e sua influência na ocorrência de resíduos de produtos de uso veterinário no leite como antimicrobianos, lactonas macrocíclicas e piretróides, monitorados por métodos quantitativos e confirmatórios e não apenas por testes qualitativos de triagem.

Assim, o presente estudo objetivou avaliar a influência das principais práticas de manejo agropecuário utilizadas em conformidade com as BPA recomendadas internacionalmente para a atividade leiteira e sua associação e interferência na ocorrência de resíduos de produtos de uso veterinário no leite cru produzido em propriedades leiteiras brasileiras.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 SELEÇÃO DAS PROPRIEDADES LEITEIRAS E COLETA DE DADOS

O presente estudo foi realizado no período de agosto de 2010 a fevereiro de 2011 contemplando 43 propriedades leiteiras selecionadas aleatoriamente no estado de Minas Gerais, maior estado produtor de leite no Brasil (IBGE, 2011). A seleção das propriedades foi realizada proporcionalmente à frequência de produção diária de leite. Assim, 60% das propriedades selecionadas apresentavam produção diária de até 500 L de leite por dia, 30% com produção superior a 1.000 L ao dia, e 10% entre 500 e 1.000 L de leite produzidos diariamente.

Uma lista de verificação padrão foi elaborada e adaptada a partir de recomendações internacionalmente reconhecidas de boas práticas agropecuárias para a atividade leiteira de acordo com *Codex Alimentarius* (2004), Brasil (2008), GlobalGAP (2010), *Food and Agriculture Organization of the United Nations* (FAO), *International Dairy Federation* (IDF) (FAO/IDF, 2004). As 192 recomendações (variáveis) presentes na lista de verificação padrão utilizada nesse estudo foram agrupadas em seis categorias: (1) sanidade animal; (2) controle de resíduos de produtos de uso veterinário e contaminantes; (3) manejo ambiental; (4) manejo de ordenha; (5) segurança do trabalho; e, (6) bem estar animal, contendo 11, 93, 21, 18, 21 e 28 variáveis, respectivamente (Anexo I).

A aplicação da lista de verificação (Anexo I) foi realizada em cada uma das propriedades selecionadas visando obtenção de um diagnóstico de situação das principais práticas de manejo adotadas nas propriedades (tempo zero – I etapa). Em seguida a implementação das BPA na atividade de leiteira foi proposta por meio de treinamento teórico-prático *in loco*, em cada propriedade, buscando correção e/ou adequação individual dos principais fatores de risco identificados como não conformes. Além disso, nesse primeiro momento (etapa I, antes do treinamento) amostras de leite cru foram coletadas nos tanques de expansão refrigeradores de cada propriedade para pesquisa de amplo escopo analítico de resíduos de produtos de uso veterinário. Após o treinamento realizado no tempo zero (etapa I), foram realizadas repetições das coletas e análises de amostras e reaplicação da lista de verificação em cada propriedade, em torno de 48 e 96 dias após a etapa I, correspondendo às etapas II e III, respectivamente.

2.2 AMOSTRAS DE LEITE CRU REFRIGERADO

Um total de 129 amostras de leite cru foram coletadas no tanque de expansão refrigerador de cada uma das 43 propriedades leiteiras selecionadas, após a devida homogeneização. Todas as amostras coletadas em frascos de 500 mL e armazenadas congeladas (-16 ± 2 °C) até a realização das análises para pesquisa de 42 diferentes analitos (antimicrobianos, lactonas macrocíclicas e piretróides).

2.3 ANÁLISES LABORATORIAIS

Todas as análises para pesquisa dos 42 analitos contemplados nesse estudo foram realizadas conforme os métodos descritos no capítulo 2 desta tese.

2.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística foi realizada utilizando o software SAS/STAT® (Version 8, SAS® Institute Inc., Cary, NC, USA) (SAS, 1999). Para análises paramétricas foi realizada ANOVA com delineamento em blocos ao acaso e comparação de médias por teste t pareado (Teste t de Student). O teste de correlação de Pearson das variáveis quantitativas foi realizado ($P < 0,05$). Para variáveis não-paramétricas foi realizado o teste de Qui-quadrado e a comparação de médias por teste de Wilcoxon. O teste de correlação entre as variáveis quantitativas e qualitativas e/ou qualitativas entre si foi realizada por meio do teste de Spearman ($P < 0,05$). Para cálculo das chances de ocorrência de resíduos de produtos de uso veterinário em leite para as diferentes variáveis identificadas como fatores de risco ($P < 0,05$), antes e após o treinamento, foi realizado o cálculo do *Odds ratio* (OR).

Para fins desse estudo e tratamento estatístico dos dados, os resultados quantitativos obtidos por meio das análises confirmatórias e relativos às pesquisas de resíduos nas amostras foram convertidos em dados qualitativos, obedecendo à seguinte classificação, para fins de interpretação: amostras negativas (sem detecção de um ou mais analitos), amostras positivas (detecção de um ou mais analitos) e amostras não conformes (detecção de um ou mais analitos em concentração acima do limite máximo de resíduo estabelecido pela legislação brasileira – BLMR, segundo Brasil, 2012).

Para cada variável da lista de verificação aplicada, foram atribuídas três possíveis respostas: conforme (C), não conforme (NC) ou não se aplica (NSA). Ao final, foi gerado um índice de conformidade para cada categoria e, também no geral, em relação às BPA em cada propriedade, sendo calculada a frequência de conformidade pela fórmula: $[C / (C + NC) \times 100]$ (ANDRADE; OGLIARI, 2007).

Para cada categoria e variável avaliadas por meio da aplicação da lista de verificação, foi calculada a frequência de conformidade antes e após o treinamento e analisada sua significância estatística ($P < 0,05$) para facilitar a identificação dos principais fatores de risco nesse estudo. Para as variáveis identificadas como fatores de risco ($P < 0,05$) em

relação à ocorrência de resíduos de produtos de uso veterinário no leite, foi calculado o *Odds ratio* (OR).

2.4.1 Simulação do risco de produção de leite com presença de resíduos de produtos de uso veterinário por modelo estocástico

O modelo de simulação estocástica combinou as variáveis apresentadas na Tabela 3.1 para apresentação de uma estimativa dos riscos de produção de leite com presença de resíduos de produtos de uso veterinário na região estudada por meio do uso do software @ Risk (2012) (Versão 5.7, Palisade Corporation Inc., Ithaca, New York, USA) com a amostragem por hipercubo latino e 100.000 iterações para cada análise. As distribuições do volume estimado de produção de leite com presença de resíduos de produtos de uso veterinário pelas propriedades e em toda região estudada em cada etapa do estudo e seus respectivos percentuais frente ao volume total foram determinadas, com intervalos de confiança de 95%.

Os dados de produção de leite na região estudada durante o período do estudo, assim como o número de animais em lactação ordenhados foram obtidos a partir dos dados de Pesquisa Pecuária realizados pelo IBGE (2011), para compor a base de dados utilizada na montagem do modelo de simulação estocástico determinístico (médias obtidas nos anos de 2010 e 2011). A região contemplada nesse estudo representa uma produção da ordem de 51.139.000 litros de leite ao ano, totalizando um rebanho de aproximadamente 24.829 vacas em lactação ordenhadas (IBGE, 2011).

Tabela 3.1 - Dados de entrada (*input*) e saída (*output*) utilizados para o modelo estocástico de simulação do risco de ocorrência de resíduos de produtos de uso veterinário no leite de propriedades leiteiras de Minas Gerais, Brasil

(continua)

Parâmetros	Notação	Etapas do estudo	Cálculo ou distribuição
Número de vacas em lactação no estudo	LAC	I, II e III	<i>Input</i> para RiskLogNormal (56;45)
Taxa de animais medicados	TAM1	I	<i>Input</i> para RiskLogNormal (0,05;0,062)
	TAM2	II	<i>Input</i> para RiskLogNormal (0,053;0,083)
	TAM3	III	<i>Input</i> para RiskLogNormal (0,045;0,082)
Vacas em lactação medicadas (exceto piretroides, em que foi considerado medicado 100% dos animais)	VALM1	I	<i>Input</i> para LAC x TAM1
	VALM2	II	<i>Input</i> para LAC x TAM2
	VALM3	III	<i>Input</i> para LAC x TAM3
Taxa de amostras positivas para resíduos de produtos de uso veterinário	RES1	I	<i>Input</i> para RiskNormal (0,511;0,076)
	RES2	II	<i>Input</i> para RiskNormal (0,233;0,064)
	RES3	III	<i>Input</i> para RiskNormal (0,163;0,057)
Taxa de amostras positivas para resíduos de antimicrobianos	ATM1	I	<i>Input</i> para RiskNormal (0,326;0,071)
	ATM2	II	<i>Input</i> para RiskNormal (0,046;0,032)
	ATM3	III	<i>Input</i> para RiskNormal (0,023;0,023)
Taxa de amostras positivas para resíduos de antiparasitários	ATP1	I	<i>Input</i> para RiskNormal (0,302;0,070)
	ATP2	II	<i>Input</i> para RiskNormal (0,209;0,062)
	ATP3	III	<i>Input</i> para RiskNormal (0,139;0,053)
Taxa de amostras positivas para resíduos de lactonas macrocíclicas	LAM1	I	<i>Input</i> para RiskNormal (0,256;0,066)
	LAM2	II	<i>Input</i> para RiskNormal (0,139;0,053)
	LAM3	III	<i>Input</i> para RiskNormal (0,093;0,044)
Taxa de amostras positivas para resíduos de piretroides	PIR1	I	<i>Input</i> para RiskNormal (0,116;0,049)
	PIR2	II	<i>Input</i> para RiskNormal (0,070;0,039)
	PIR3	III	<i>Input</i> para RiskNormal (0,116;0,049)

Tabela 3.1 - Dados de entrada (*input*) e saída (*output*) utilizados para o modelo estocástico de simulação do risco de ocorrência de resíduos de produtos de uso veterinário no leite de propriedades leiteiras de Minas Gerais, Brasil

(conclusão)

Parâmetros	Notação	Etapas do estudo	Cálculo ou distribuição
Vacas em lactação medicadas e positivas para resíduos de produtos de uso veterinário e/ou classe	VPOS1	I	<i>Input</i> para LAC x taxa de amostras positivas 1
	VPOS2	II	<i>Input</i> para LAC x taxa de amostras positivas 2
	VPOS3	III	<i>Input</i> para LAC x taxa de amostras positivas 3
Vacas em lactação ordenhadas	LAC _p	I, II E III	<i>Input</i> para média obtida a partir de banco de dados dos anos de 2010-2011 na região estudada (IBGE, 2011)
Volume de leite produzido na região amostrada	VOL	I, II E III	<i>Input</i> para média obtida a partir de banco de dados dos anos de 2010-2011 na região estudada (IBGE, 2011)
Média de leite produzido por vaca ao ano na região	LVA	I, II E III	<i>Input</i> para VOL / LAC _p
Quantidade de leite produzido pelas propriedades com resíduos de produtos de uso veterinário e/ou classe	LRES1	I	<i>Output</i> para VPOS1 x LVA
	LRES2	II	<i>Output</i> para VPOS2 x LVA
	LRES3	III	<i>Output</i> para VPOS3 x LVA
Quantidade de leite produzido na região estudada com resíduos de produto de uso veterinário e/ou classe	VRES1	I	<i>Output</i> para LCA _p / LAC x LRES1
	VRES2	II	<i>Output</i> para LCA _p / LAC x LRES2
	VRES3	III	<i>Output</i> para LCA _p / LAC x LRES3
Percentual de leite produzido na região estudada com resíduos de produto de uso veterinário e/ou classe	PRES1	I	<i>Output</i> para VRES1 / VOL
	PRES2	II	<i>Output</i> para VRES2 / VOL
	PRES3	III	<i>Output</i> para VRES3 / VOL

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Diferentes resíduos de produtos de uso veterinário foram detectados nas amostras de leite cru de propriedades leiteiras selecionadas no estado de Minas Gerais, Brasil, antes e após o treinamento para implementação das BPA. Os analitos estudados e a frequência da ocorrência dos resíduos presentes nas amostras analisadas nas diferentes etapas do estudo estão descritos na Tabela 3.2. Como não houve diferença estatisticamente significativa entre os dados obtidos nas etapas II e III, os mesmos foram compilados em uma única etapa (após o treinamento).

A presença de resíduos de produtos de uso veterinário foi observada em 38 amostras das 129 analisadas (29,5%), destas 22 (51,2%), 09 (20,9%) e 07 (16,3%) detectadas, respectivamente, nos tempos zero, 48 e 96 dias a partir da realização do treinamento, sendo que nenhuma das propriedades amostradas apresentaram reincidência. No total, 55 analitos foram detectados, sendo 18 antimicrobianos e 31 antiparasitários. Desses analitos, dez apresentaram valores superiores aos BLMR (BRASIL, 2011b), sendo um para antimicrobiano e o restante (nove) para antiparasitários. Em 16 amostras positivas (12,40%) observou-se presença de múltiplos analitos, com dois em cada amostra analisada, sendo 11 (68,75%), 01 (6,25%) e 04 (25,00%) nos tempos zero, 48 e 96 dias, respectivamente. Diferentes combinações de analitos presentes foram observadas nessas amostras, sendo CIPRO, ENRO, CFT, DORA, CYP, PNV, IVR, OXA, OTC, ABA e DEL os analitos envolvidos nas múltiplas detecções. Dessas amostras, três se apresentaram em não conformidade no tempo zero para um dos analitos presentes e uma amostra com 96 dias após treinamento.

A presença de resíduos de produtos de uso veterinário foi observada em todas as etapas, no entanto, com significativa diminuição de sua frequência após realização do treinamento para implementação das BPA. Para os resíduos de antimicrobianos pesquisados, 14 amostras positivas foram observadas antes do treinamento e duas após 48 e 96 dias, com uma amostra não conforme antes do treinamento e nenhuma após. Para resíduos de antiparasitários, 13 amostras foram positivas antes do treinamento e nove após. No entanto, a diminuição significativa de sua ocorrência aconteceu somente no grupo das lactonas macrocíclicas ($P < 0,05$), não sendo possível o mesmo resultado para piretróides, provavelmente, devido à grande infestação por carrapatos observada no período do estudo em toda região envolvida e a característica em comum de aplicação desses produtos em todo rebanho.

Tabela 3.2 - Resíduos de produtos de uso veterinário em amostras de leite cru refrigerado antes e após aplicação de treinamento teórico-prático *in loco* para implementação das Boas Práticas Agropecuárias (BPA) na atividade leiteira de 43 propriedades rurais do estado de Minas Gerais, Brasil

(continua)

Classes Analitos	Analitos detectados	ANTES DO TREINAMENTO – ETAPA I (n = 43)				APÓS TREINAMENTO – ETAPAS II e III (n = 86)				Valor de P para Treinamento
		Amostras Positivas (%)	Faixa de detecção ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Média \pm SE ^a ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Amostras não conformes (%)	Amostras Positivas (%)	Faixa de detecção ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Média \pm SE ^a ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Amostras não conformes (%)	
ANTIMICROBIANOS		14 (32,6)	ND^b-69,4	17,7 \pm 0,5	1 (2,3)	3 (3,5)	ND^b-39,4	20,1 \pm 0,3	0 (0,0)	< 0,0001
<i>β-lactâmicos</i>		11 (25,6)	ND^b-69,4	14,7 \pm 1,1	1 (2,3)	0 (0,0)	ND^b	ND^b	0 (0,0)	< 0,0001
PNG, PNV, CFT, CLX,	PNV	1 (2,3)	8,0-8,0	8,0 \pm 0,0	1 (2,3)	ND ^b	ND ^b	ND ^b	0 (0,0)	0,1557
OXA,	CFT	7 (16,3)	13,4-69,4	21,8 \pm 3,2	0 (0,0)	ND ^b	ND ^b	ND ^b	0 (0,0)	0,0001
DCX	OXA	2 (4,7)	4,2-4,4	4,3 \pm 0,0	0 (0,0)	ND ^b	ND ^b	ND ^b	0 (0,0)	0,0438
	DCX	2 (4,7)	3,8-3,9	3,8 \pm 0,0	0 (0,0)	ND ^b	ND ^b	ND ^b	0 (0,0)	0,0438
<i>Tetraciclinas</i>		1 (2,3)	ND^b-25,0	25,0 \pm 0,0	0 (0,0)	2 (2,3)	ND^b-18,6	17,5 \pm 0,1	0 (0,0)	1,0000
CTC, DOXI, TC, OTC	OTC	1 (2,3)	25,0-25,0	25,0 \pm 0,0	0 (0,0)	2 (2,3)	16,3-18,6	17,5 \pm 0,2	0 (0,0)	1,0000
<i>Quinolonas</i>		2 (4,7)	ND^b-38,7	27,7 \pm 0,8	0 (0,0)	1 (1,2)	ND^b-39,4	39,4 \pm 0,0	0 (0,0)	0,2153
OXO, NALIDIX, FLU,	CIPRO	2 (4,7)	16,6-38,7	27,7 \pm 2,4	0 (0,0)	1 (1,2)	39,4-39,4	39,4 \pm 0,0	0 (0,0)	0,2153
DIFLO, CIPRO, ENRO, NOR, SARA	ENRO	2 (4,7)	3,0-3,1	3,1 \pm 0,0	0 (0,0)	1 (1,2)	6,0-6,0	6,0 \pm 0,0	0 (0,0)	0,2153
<i>Sulfonamidas</i>		ND^b	ND^b	ND^b	0 (0,0)	ND^b	ND^b	ND^b	0 (0,0)	1,0000
SDMX, SQX, SDZ, STZ, SPY, SMA, SMZ, SCP, SFX, SDX, SMR	ND ^b	ND ^b	ND ^b	ND ^b	0 (0,0)	ND ^b	ND ^b	ND ^b	0 (0,0)	1,0000
<i>Sulfonamida sinérgica</i>	ND ^b	ND ^b	ND ^b	ND ^b	0 (0,0)	ND ^b	ND ^b	ND ^b	0 (0,0)	1,0000
TMP	ND ^b	ND ^b	ND ^b	ND ^b	0 (0,0)	ND ^b	ND ^b	ND ^b	0 (0,0)	1,0000

Tabela 3.2 - Resíduos de produtos de uso veterinário em amostras de leite cru refrigerado antes e após aplicação de treinamento teórico-prático *in loco* para implementação das Boas Práticas Agropecuárias (BPA) na atividade leiteira de 43 propriedades rurais do estado de Minas Gerais, Brasil

(conclusão)

Classes Analitos	Analitos detectados	ANTES DO TREINAMENTO – ETAPA I (n = 43)				APÓS TREINAMENTO – ETAPAS II E III (n = 86)				Valor de P para Treinamento
		Amostras Positivas (%)	Faixa de detecção ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Média \pm SE ^a ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Amostras não conformes (%)	Amostras Positivas (%)	Faixa de detecção ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Média \pm SE ^a ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Amostras não conformes (%)	
ANTIPARASITÁRIOS		13 (30,2)	ND^b-45,7	9,9 \pm 0,7	3 (7,0)	15 (17,4)	ND^b-251,0	48,7 \pm 2,7	6 (7,0)	0,1508
<i>Lactonas macrocíclicas</i>		11 (25,6)	ND^b-2,7	1,4 \pm 0,1	0 (0,0)	10 (11,6)	ND^b-18,3	4,3 \pm 0,2	1 (1,2)	0,0487
ABA, DOR,	ABA	1 (2,3)	2,7-2,7	2,7 \pm 0,0	0 (0,0)	6 (7,0)	2,2-18,3	5,6 \pm 0,7	1 (1,2)	0,2708
EPR, IVR,	DOR	3 (7,0)	0,9-2,5	1,7 \pm 0,1	0 (0,0)	ND ^b	ND ^b	ND ^b	ND ^b	0,0132
MOX	IVR	7 (16,3)	0,4-2,2	1,0 \pm 0,1	0 (0,0)	4 (4,7)	1,2-2,9	2,1 \pm 0,1	0 (0,0)	0,0258
<i>Piretróides</i>		5 (11,6)	ND^b-45,7	25,2 \pm 1,0	3 (7,0)	8 (9,3)	ND^b-251,0	104,3 \pm 4,3	5 (5,8)	0,6842
γ CYH, λ CYH, CYF, CYP,	CYP	5 (11,6)	1,6-45,7	25,2 \pm 2,7	3 (7,0)	6 (7,0)	7,7-251,0	138,6 \pm 10,8	5 (5,8)	0,3946
DEL, FEV, PER	DEL	ND ^b	ND ^b	ND ^b	ND ^b	2 (2,3)	1,0-1,9	1,5 \pm 0,1	0 (0,0)	0,3135
Resíduos em geral		22 (51,2)	ND^b-69,4	13,0 \pm 0,4	4 (9,3)	17 (19,8)	ND^b-251,0	43,5 \pm 1,3	6 (7,0)	0,0007

^aSE: erro padrão da média. ^bND: não detectável.

PNG: penicilina G; PNV: penicilina V; CFT: ceftiofur; CLX: cloxacilina; OXA: oxacilina; DCX: dicloxacilina; CTC: clortetraciclina; DOXI: doxiciclina; TC: tetraciclina; OTC: oxitetraciclina; OXO: ácido oxolínico; NALIDIX: ácido nalidíxico; FLU: flumequina; DIFLO: difloxacina; CIPRO: ciprofloxacina; ENRO: enrofloxacina; NOR: norfloxacina; SARA: sarafloxacina; SDMX: sulfadimetoxazol; SQX: sulfaquinoxalina; SDZ: sulfadiazina; STZ: sulfatiazol; SPY: sulfapiridina; SMA: sulfametoxazol; SMZ: sulfametazina; SCP: sulfacorpiridazina; SFX: sulfizoxazol; SDX: sulfadoxina; SMR: sulfamerazina; TMP: trimetropim; ABA: abamectina; DOR: doramectina; EPR: eprinomectina; IVR: ivermectina; MOX: moxidectina; γ CYH: γ -cialotrina; λ CYH: λ -cialotrina; CYF: ciflutrina; CYP: cipermetrina; DEL: deltametrina; FEV: fenvalerato; e, PER: permetrina.

De acordo com Hernandez et al. (2009), a falta de conhecimento dos produtores quanto aos riscos no manuseio de substâncias perigosas como os produtos de uso veterinário, especialmente os piretróides, pode prejudicar a segurança do leite produzido pela presença de seus resíduos no mesmo tornando-o impróprio ao consumo, assim como, à saúde dos trabalhadores e o meio ambiente, pois se tratam de produtos tóxicos, com efeito cumulativo e potencialmente contaminantes, com grande resistência no meio ambiente (SPINOSA; GÓRNIAC; BERNARDI, 2006). Adicionalmente, nota-se que os critérios para controle de infestações têm sido definidos exclusivamente e de forma geralmente subjetiva pelos próprios produtores. Em geral, informações sobre a epidemiologia regional do parasito são negligenciadas; acaricidas são escolhidos por critérios que não a eficácia, e a aplicação desses ocorre geralmente de forma inadequada, desafiando inclusive o sucesso do próprio tratamento. Além disso, efetua-se o controle da mosca-do-chifre (*Haematobia irritans*) com produtos de ação acaricida (piretróides e organofosforados), mas aplicados em doses insuficientes para garantir o controle do carrapato, contribuindo indiretamente para o aumento da resistência (MARTINS, 2004; BARROS; GOMES; KOLLER, 2007).

Em dezembro de 2011 entrou em vigor a Instrução Normativa n.48 (BRASIL, 2011c) proibindo para bovinos em fase de terminação, em todo o território nacional, o uso de produtos antiparasitários que contenham em sua formulação princípios ativos da classe das avermectinas, cujo período de carência ou de retirada descrito na rotulagem seja superior a 28 dias. Além disso, produtos de longo período de carência, geralmente, não são recomendados para uso em bovinos durante a lactação, especialmente aqueles destinados aos tratamentos de vacas secas ou mesmo bovinos de corte.

A frequência da presença de resíduos de produtos de uso veterinário no leite cru demonstrou diminuição significativa ($P = 0,0007$) de 51,2 para 18,6% de amostras positivas, antes e após o treinamento, respectivamente. A frequência de amostras positivas para antimicrobianos e antiparasitários antes do treinamento foi de 44,2 e 30,2%, respectivamente. Após o treinamento essas frequências diminuíram para 4,7% ($P < 0,0001$) e 20,9% ($P = 0,1508$), respectivamente para antimicrobianos e antiparasitários. Porém, dentre os resíduos de antiparasitários, apenas o grupo das lactonas macrocíclicas apresentou diminuição significativa após o treinamento ($P = 0,0487$) de 25,6 para 11,6% de amostras positivas. Tais resultados demonstram que as BPA apresentam-se eficazes como ferramenta útil no controle e prevenção de resíduos de produtos de uso veterinário no

leite. Antes do treinamento, quatro amostras (9,3%) apresentaram resíduos de antimicrobianos e de antiparasitários concomitantemente. Após o treinamento, esse resultado foi observado em uma amostra (1,2%), sem propriedades reincidentes.

Nota-se grande escassez de estudos na literatura científica que busquem avaliar a influência de diferentes práticas de manejo e/ou treinamento de mão-de-obra na ocorrência de resíduos de produtos de uso veterinário no leite cru. No presente estudo, observou-se que após o treinamento para implementação das BPA nas propriedades as amostras positivas para antimicrobianos e antiparasitários diminuíram em 89,4 e 30,8%, respectivamente. Esse resultado representou 83,7% das propriedades com produção de leite sem presença de resíduos no final do estudo de forma crescente e progressiva ao longo do tempo analisado, enquanto que no diagnóstico de situação realizado no tempo zero (I etapa) esse percentual era de 48,8%.

Das 43 propriedades estudadas em cada etapa, observaram-se 22 amostras positivas para resíduos de produtos de uso veterinário no leite antes do treinamento, diminuindo significativamente ($P < 0,05$) para nove e sete, após 48 e 96 dias após o treinamento, respectivamente. Dados que reforçam e confirmam a importância das BPA como ferramenta primordial para a diminuição do risco de resíduos de produtos de uso veterinário no leite. Além disso, não foi observada reincidência em nenhuma das propriedades estudadas após realização do treinamento.

A partir dos dados obtidos pela aplicação da lista de verificação nas propriedades leiteiras selecionadas, observou-se que cinco das seis categorias estudadas apresentaram diferença significativa ($P < 0,05$) antes e após o treinamento (Tabela 3.3), comprovando a importância do mesmo para a implementação das BPA, ferramenta necessária para adequação e padronização de critérios internacionalmente reconhecidos e recomendáveis. Além disso, segundo Ruegg (2003), a adoção e padronização de práticas de manejo mais adequadas, visando redução de riscos, nas propriedades leiteiras pode ajudar a acalmar alguns receios dos consumidores contribuindo para uma imagem mais positiva da indústria de laticínios de modo geral.

A frequência de amostras de leite cru em conformidade para pesquisa de resíduos de produtos de uso veterinário em leite apresentou correlação positiva de moderada a muito forte, de acordo com a classificação proposta por Finney (1980), para todas as categorias avaliadas (Tabela 3.4).

Tabela 3.3 - Índice de conformidade obtido para as principais categorias avaliadas antes e após o treinamento para implementação das Boas Práticas Agropecuárias (BPA) em 43 propriedades leiteiras de Minas Gerais, Brasil

Categorias	CAT* (n = 43)		CPT* (n = 86)	
	Média ± SE	Mínimo - máximo	Média ± SE	Mínimo - máximo
Sanidade animal	58,5 ^a ± 25,8	8,3 - 100,0	61,1 ^a ± 28,8	8,3 - 100,0
Prevenção e controle de resíduos	61,6 ^a ± 16,9	33,8 - 88,8	76,9 ^b ± 17,3	42,6 - 98,3
Gestão ambiental	50,0 ^a ± 21,0	9,5 - 62,9	62,9 ^b ± 22,5	14,3 - 97,6
Manejo de ordenha	68,9 ^a ± 31,2	5,6 - 100,0	78,2 ^b ± 27,2	8,3 - 100,0
Segurança do trabalho	39,2 ^a ± 22,1	5,3 - 95,2	55,5 ^b ± 21,4	9,5 - 95,2
Bem estar animal	60,3 ^a ± 23,3	14,3 - 93,8	66,2 ^b ± 23,8	14,3 - 93,8
TOTAL GERAL (MÉDIA)	56,7 ^a ± 8,8	5,3 - 100,0	66,0 ^b ± 7,9	8,3 - 100,0

CAT: índice de conformidade antes do treinamento; CPT: índice de conformidade após treinamento; SE: erro padrão da média

Letras iguais em mesma linha não diferem significativamente pelo Teste t de Student ($P > 0,05$).

*Índice de conformidade: calculado pela fórmula $[C / (C + NC) \times 100]$, sendo C as variáveis em conformidade com as recomendações e NC aquelas em não conformidade. Os dados após treinamento foram reunidos, por apresentarem resultados similares.

Tabela 3.4 - Correlação (Teste de Pearson) entre as diferentes categorias avaliadas por meio da lista de verificação das Boas Práticas Agropecuárias (BPA) aplicada em 43 propriedades leiteiras de Minas Gerais, Brasil, e sua associação com amostras em conformidade para resíduos de antimicrobianos e antiparasitários nas amostras de leite cru analisadas ($P < 0,05$)

Categorias	CRPUV	GA	MO	ST	BEA	RATM	RATP
SA	0,6489	0,4955	0,7274	0,6104	0,7202	0,6801	0,5690
CRPUV	---	0,7390	0,8200	0,8193	0,7680	0,9812	0,9700
GA		---	0,7378	0,7816	0,6363	0,7577	0,6981
MO			---	0,7523	0,7412	0,8479	0,7711
ST				---	0,6835	0,8026	0,8221
BEA					---	0,7895	0,6926
RATM						---	0,9224

SA: sanidade animal; CRPUV: controle de resíduos de produtos de uso veterinário; GA: gestão ambiental; MO: manejo de ordenha; ST: segurança do trabalho; BEA: bem estar animal; RATM: resíduos de antimicrobianos (abaixo do limite máximo de resíduo permitido); RATP: resíduos de antiparasitários (abaixo do limite máximo de resíduo permitido).

Assim, o conjunto das BPA, nas diferentes categorias, influenciou significativamente e de forma cumulativa e complementar os resultados, demonstrando que as variáveis são interdependentes para

a garantia de produção de leite livre de resíduos de produtos de uso veterinário de acordo com os resultados obtidos na análise de correlação. No entanto, cabe destacar as mais altas correlações positivas e classificadas como muito fortes observadas entre as variáveis da categoria de controle de resíduos de produtos de uso veterinário e a obtenção de leite dentro dos padrões para resíduos de antimicrobianos ($r = 0,9812$) e antiparasitários ($r = 0,9700$). Além disso, foi observada correlação positiva muito forte para a produção de leite dentro do padrão para resíduos de antimicrobianos e antiparasitários concomitantemente, sendo o controle e prevenção de uma classe auxilia diretamente na outra ($r = 0,9224$), contribuindo para produção de leite livre de resíduo de produto de uso veterinário como um todo.

Portanto, o conjunto das práticas de manejo adotadas e adequadamente executadas aumenta a probabilidade de produção de leite dentro dos padrões de segurança para resíduos de produtos de uso veterinário, principalmente. No entanto, algumas variáveis de cada categoria estudada, apresentaram significância em relação ao treinamento ($P < 0,05$) quando avaliadas individualmente. Do total de 192 variáveis analisadas nesse estudo por meio da aplicação da lista de verificação, 41 (21,4%) apresentaram-se significativas ($P < 0,05$) em relação ao treinamento para implementação das BPA (antes e depois).

Na categoria de gestão ambiental, cinco variáveis apresentaram significância de forma individual em relação ao treinamento ($P < 0,05$), dentre elas: número e localização adequada de lixeiras; destino apropriado para material pérfuro-cortante; descarte de produtos evitando contaminação ambiental; embalagens e outros materiais armazenados em local seguro até seu descarte final e; ausência de excesso de poeira e sujeira no ambiente de produção. Tais fatores podem estar relacionados ao grande interesse observado nas propriedades em relação à segurança dos trabalhadores, bem estar dos animais e proteção ambiental, com grande receptividade e busca de melhorias em relação a esse assunto.

Na categoria manejo de ordenha, apenas a variável “registros e manutenção periódica de equipamentos de ordenha e de armazenamento e resfriamento do leite” apresentou diferença significativa ($P < 0,05$) após o treinamento, elevando de 81,4 para 93,0% o seu índice de conformidade. Esse resultado, pode ser devido ao fato da maior parte das propriedades já adotarem algumas das recomendações necessitando apenas de pequenos ajustes em algumas delas.

Na categoria de segurança do trabalho, sete variáveis se apresentaram-se significativas em relação ao treinamento: funcionário toma banho e/ou se higieniza logo após aplicação de produtos químicos;

quando produtos entram em contato com a pele, é realizada lavagem imediata; em caso de acidentes, é procurado médico portando a embalagem do produto envolvido; armazenamento dos produtos químicos é realizado em local fresco, seco, escuro e longe de crianças e animais; não é permitida reutilização de embalagens de produtos químicos; logo após aplicação de produtos antiparasitários os funcionários removem suas luvas, lavam as mãos de imediato e/ou tomam banho completo e; funcionários responsáveis pela manipulação de produtos químicos são devidamente capacitados para o uso de equipamentos de proteção individual (EPI). Tal resultado se deve, provavelmente, ao desconhecimento do assunto observado na maior parte das propriedades. No entanto, grande interesse foi demonstrado em resolver e melhorar a segurança dos trabalhadores, buscando adequação às recomendações apresentadas.

A variável da categoria “bem estar animal” que se apresentou significativa estatisticamente ($P < 0,05$) demonstra relação direta com a categoria de “controle de resíduos de produtos de uso veterinário”: animais descartes quando medicados, identificados como “impróprios ao consumo humano”. Além disso, dentre as 94 variáveis avaliadas individualmente na categoria de “controle de resíduos de produtos de uso veterinário em leite”, 27 (28,7%) foram significativas em relação ao treinamento ($P < 0,05$) e obtiveram seus respectivos valores de *Odds ratio* (OR) calculados em relação à ocorrência de resíduos de produtos de uso veterinário no leite conforme os resultados obtidos nas análises laboratoriais realizadas (Tabela 3.5).

Observa-se a partir dos dados da Tabela 3.5, maiores chances de diminuição da ocorrência de resíduos para antimicrobianos em comparação aos antiparasitários de forma geral, sendo que para ambas houve um destaque para o fator de risco “respeito ao período de carência de antiparasitários conforme descrito na bula”, que quando não realizado aumenta o risco de ocorrência de antimicrobianos e de antiparasitários, em média, em 15 e três vezes, respectivamente. No entanto, quando considerados todos os resíduos pesquisados, esse fator de risco quando não respeitado pode aumentar em aproximadamente 60 vezes a ocorrência de resíduos de produtos de uso veterinário no leite. Mesmo que o período de carência se refira aos produtos antiparasitários, a sua influência sobre os antimicrobianos é realmente percebida na prática e também por sua forte associação (Tabela 3.4). Quando os trabalhadores se preocupam com o período de carência dos produtos antiparasitários, isso tende a indicar que em relação aos antimicrobianos tais controles já estejam mais avançados. Percebe-se, em geral, uma

tendência em não respeitar o período de carência de produtos aplicados em rebanho por desconhecimento, indicado pelo baixo percentual de conformidade desse fator de risco antes do treinamento (7,0% em média), aumentado para 61,6% após o treinamento. Porém, não alcançando a média de 72,1% de conformidade observada para os antimicrobianos (Tabela 3.5). Dentre outros fatores de risco, observou-se a importância do fator “cruzamento do período de carência de produtos utilizados em vacas secas com as datas dos partos”, que quando não realizado adequadamente e monitorado pode aumentar em até 14 vezes a chance de ocorrência de resíduos de antimicrobianos no leite, especialmente quando os animais adiantam o parto sem controles mais eficazes dos longos períodos de carência dos medicamentos aplicados em vacas secas.

Durante o treinamento foi realizada orientação para utilização de produtos antiparasitários sem carência para tratamentos realizados nas vacas durante a lactação. No entanto, alguns produtores apresentaram resistência em utilizá-los por duas alegações principais: maior custo desses produtos e ineficácia contra os carrapatos. Em algumas propriedades foram experimentados produtos sem carência. Porém, os resultados observados não foram satisfatórios, sendo relatados: diminuição dos intervalos entre as aplicações, aumento do custo de produção e, conseqüentemente, da probabilidade de maior resistência dos carrapatos aos produtos. Segundo Rocha et al. (2012), a maior parte dos produtores rurais não tem o conhecimento básico sobre a biologia e o controle de carrapatos, aplicando os produtos carrapaticidas por meio de bomba costal e sem critérios técnicos definidos.

A detecção precoce da resistência é essencial para evitar a seleção de carrapatos resistentes em situações de uso contínuo do mesmo princípio ativo, bem como, para atrasar a propagação da resistência (ANDREOTTI, 2010). No presente estudo, observou-se que muitos produtores utilizavam como base decisória para a aquisição de produtos antiparasitários o “biocarrapatograma” para monitoramento da resistência dos carrapatos na propriedade para diversos princípios ativos. Relatou-se a recomendação, na maior parte das análises realizadas na região, pelo uso da CYP como produto de maior sensibilidade, inclusive com protocolo de aplicação nos animais a cada 21 dias para controle da infestação, ou até mesmo, em intervalos menores (15 dias) foram observados durante análise dos registros presentes nas unidades produtoras. Tal dado se confirma pela maior frequência observada na detecção de CYP dentre os antiparasitários pesquisados no leite durante o estudo.

A ferramenta de avaliação de *Odds ratio* das variáveis avaliadas nesse estudo gerou uma lista dos principais fatores de risco que poderiam ser utilizados por laticínios e sua equipe de extensionistas até mesmo para rever e selecionar produtores candidatos a fornecedores para suas plantas de processamento. A adoção dessa ferramenta de monitoramento pode vir a proporcionar controle de qualidade com segurança atualmente inexistente no país. Tal ferramenta, inclusive, permite a soma das chances em um escore global, segundo Shitandi e Kihumbu (2004), o que proporciona uma avaliação preliminar para uma investigação mais detalhada se necessário.

Os fatores de risco mais associados à presença de resíduos de antimicrobianos em leite são o uso de medicamentos sem prescrição do médico veterinário e ausência de registro dos tratamentos realizados. Tais informações corroboram com aquelas observadas no presente estudo, as quais se agravam pela inobservância do período de carência dos produtos associada ao seu uso intensivo contribuindo para o aumento da frequência de presença de resíduos de produtos de uso veterinário no leite, tornando-o impróprio ao consumo humano e potencial contaminante ambiental. O desrespeito ao período de carência pode ser devido ao desconhecimento ou mesmo omissão intencional dos mesmos (VÁSQUEZ; OLIVERA, 2012).

Os principais fatores de risco que podem contribuir para a contaminação do leite por resíduos de produtos de uso veterinário corroboram com aqueles reportados em outros estudos, tais como: ausência ou erro nos registros de tratamentos, inobservância do período de carência, falta de assistência veterinária, período de secagem das vacas curtos ou interrompidos durante o tratamento com antimicrobianos, acidentes ou não descarte devido do leite de animais tratados, descarte de apenas um dos quartos de animais em tratamento, falhas de comunicações entre os trabalhadores, alta rotatividade de funcionários na propriedade, animais recém adquiridos e sem registros e falta de identificação dos animais em tratamento (McEWEN et al., 1991; SAWANT; SORDILLO; JAYARAO, 2005; BLOWEY; EDMONSON, 2010; VÁSQUEZ; OLIVERA, 2012).

A ferramenta de avaliação dos principais fatores de risco apresenta uma lista de variáveis que podem ser utilizadas por laticínios e sua equipe de extensionistas para rever e selecionar fornecedores. Tal ferramenta permite a soma do risco em um escore de risco global, segundo Shitandi e Kihumbu (2004), o que proporciona uma avaliação preliminar para uma investigação mais detalhada se necessário.

Tabela 3.5 - Principais variáveis avaliadas que foram influenciadas pelo treinamento ($P < 0,05$) para implementação das Boas Práticas Agropecuárias (BPA) em propriedades leiteiras, com seus respectivos valores de *Odds ratio* (OR) em relação à ocorrência de resíduos de produtos de uso veterinário nas amostras de leite cru analisadas, caso a variável se apresente “não conforme” (NC)

(continua)

Variáveis significativas em relação ao treinamento para BPA	Conformidade (%) para $P < 0,05$		OR para resíduos de produtos de uso veterinário		
	Antes do treinamento ($n = 43$)	Após treinamento ($n = 86$)	ATM	ATP	PUV
Identificação dos animais em tratamento	27,9	59,3	3,6	1,4	1,6
Tratamento anotado e/ou registrado	30,2	67,4	7,2	0,9	1,4
Arquivamento de históricos e registros de tratamentos	30,2	58,1	3,6	0,8	1,0
O leite das vacas em tratamento com antimicrobianos é separado e descartado	90,7	100,0	---	---	3,7
Os funcionários conhecem o significado do “período de carência” dos produtos	62,8	100,0	5,6	1,2	2,7
Conhecimento do período de carência de cada medicamento utilizado	30,2	68,6	5,0	1,1	1,8
Data de parto e período de carência dos tratamentos de vaca seca são cruzados	11,6	57,0	14,4	1,0	1,7
Animais enfermos são isolados, identificados e ordenhados separadamente	32,6	61,6	1,6	1,3	1,2
Procedimento adequado e padronizado para uso de agulhas	14,0	31,4	2,9	1,3	1,5
Listagem dos medicamentos utilizados e autorizados para bovinos de leite	39,5	66,3	1,6	1,8	1,9
Respeito ao período de carência de antimicrobianos conforme bula	48,8	72,1	11,7	1,0	2,2
Medicamentos vencidos segregados e identificados para descarte adequado	39,5	74,4	3,7	0,9	1,5
Observadas e respeitadas as “restrições de uso” dos produtos utilizados	37,2	69,8	8,7	1,6	2,9
Funcionários com consciência da responsabilidade legal com os animais	16,3	97,7	5,8	1,8	3,6

Tabela 3.5 - Principais variáveis avaliadas que foram influenciadas pelo treinamento ($P < 0,05$) para implementação das Boas Práticas Agropecuárias (BPA) em propriedades leiteiras, com seus respectivos valores de *Odds ratio* (OR) em relação à ocorrência de resíduos de produtos de uso veterinário nas amostras de leite cru analisadas, caso a variável se apresente “não conforme” (NC)

Variáveis significativas em relação ao treinamento para BPA	(conclusão)				
	Conformidade (%) para $P < 0,05$		OR para resíduos de produtos de uso veterinário		
	Antes do treinamento (n = 43)	Após treinamento (n = 86)	ATM	ATP	PUV
Produtos estocados em local específico e conforme recomendação do fornecedor	44,2	62,8	2,7	0,8	1,2
Acesso aos produtos restrito às pessoas responsáveis	37,2	61,6	2,4	1,2	1,5
Farmácia mantida trancada	9,3	47,7	10,4	1,5	2,2
Na farmácia, os produtos estão organizados e separados conforme o uso	4,7	69,8	8,7	1,6	2,4
Os produtos são armazenados em suas embalagens originais e com rótulos íntegros	51,2	79,1	2,3	1,1	1,2
Os responsáveis estão cientes dos riscos na manipulação dos produtos	65,1	94,2	2,7	1,7	1,7
Funcionários cientes dos riscos relacionados à reutilização de embalagens	69,8	94,2	3,2	2,0	2,1
Utilizadas agulhas e seringas limpas e/ou estéreis	43,6	62,8	1,0	2,6	1,9
O período de carência de antiparasitários é respeitado conforme bula	7,0	61,6	15,4	3,4	59,7
Produtos “pour on” não são aplicados por outras vias (injetável e/ou oral) nos animais	94,1	100,0	6,1	3,0	1,9
Evita-se o uso de produtos tópicos em animais molhados e/ou sujos	61,8	83,8	3,6	1,7	2,4
Espera do mínimo de 2 horas para liberar os animais, na chuva, após uso de produto tópico	58,8	89,7	4,6	1,2	2,6
Animal descarte medicado devidamente identificado como “impróprio ao consumo”	34,9	66,3	3,6	1,4	2,0
TOTAL GERAL (MÉDIA)	40,5	72,5	5,5	1,5	4,1

ATM: antimicrobianos; ATP: antiparasitários; PUV: produtos de uso veterinário

A importância de orientar os pecuaristas quanto ao uso correto de produtos de uso veterinário e manutenção de registros de tratamento corrobora com experiências de outras regiões do mundo (CULLOR, 1992; SHITANDI; KIHUMBU, 2004; YOUNG et al., 2010b; VÁSQUEZ; OLIVERA, 2012). Os produtores de leite têm a responsabilidade para a venda de leite livre de resíduos. Assim, é importante que compreendam os principais fatores de risco que levam à presença de resíduos no leite, bem como suas consequências. Para tanto, precisam ser fornecidas informações e treinamentos aos fazendeiros e seus funcionários sobre práticas de gestão que garantam o uso correto e seguro de medicamentos em animais como parte de um programa de prevenção e controle de resíduos (VÁSQUEZ; OLIVERA, 2012). Além disso, educação continuada direcionada aos produtores de leite deve ser realizada procurando abordar as principais lacunas observadas em relação à segurança alimentar identificadas por meio de estudos científicos e os médicos veterinários devem ser incluídos como multiplicadores-chave da transferência dos conhecimentos aos trabalhadores no campo (YOUNG et al., 2010b).

3.1 SIMULAÇÃO DO RISCO DE PRODUÇÃO DE LEITE COM PRESENÇA DE RESÍDUOS DE PRODUTOS DE USO VETERINÁRIO POR MODELO ESTOCÁSTICO

Na Tabela 3.6 estão representados os resultados obtidos a partir dos modelos de simulação estocásticos para produção de leite na região estudada com presença de resíduos de produtos de uso veterinário. Para cada valor de saída (*output*) obtido a partir do modelo, os valores de média, mínimo e máximo, com intervalo de confiança de 95%, foram apresentados para os diferentes grupos de resíduos pesquisados nesse trabalho, assim como, para o total de resíduos de produtos de uso veterinário (42 analitos).

Devido ao elevado desvio padrão das variáveis utilizadas no modelo estocástico, algumas das iterações apresentaram diferença de risco negativo, o que sugere que a produção de leite com resíduos de produtos de uso veterinário apresentou menor risco de ocorrência após o treinamento para implementação das BPA. Mas como resultados negativos não são prováveis, a distribuição não foi fixada em zero, com essa possibilidade não descartada. Esta diferença de risco negativo foi a principal razão pela qual algumas das iterações produziu estimativas negativas de perdas totais anuais (Tabela 3.6).

Tabela 3.6 - Estimativa dos parâmetros utilizados no modelo de simulação das perdas em volume e percentual de leite produzido com presença de resíduos de produtos de uso veterinário na região estudada no estado de Minas Gerais, Brasil

Variável/ Etapa	Média de produção (Litros de leite/ano)	Intervalo de confiança (95%) – Litros de leite/ano	
		Mínimo	Máximo
Leite com resíduos de produtos de uso veterinário			
Etapa I	1.307.055 (2,56%)	10.240 (0,02%)	53.421.646 (104,46%)
Etapa II	630.078 (1,23%)	170.381 (-0,33%)	48.796.929 (95,42%)
Etapa III	374.988 (0,73%)	654.477 (-1,28%)	49.740.842 (97,27%)
Leite com resíduos de antimicrobianos			
Etapa I	833.356 (1,63%)	30.662 (-0,06%)	46.476.555 (90,88%)
Etapa II	125.555 (0,25%)	2.459.267 (-4,81%)	11.169.500 (21,84%)
Etapa III	53.455 (0,10%)	1.627.398 (-3,18%)	5.600.966 (10,95%)
Leite com resíduos de antiparasitários (lactonas macrocíclicas + piretróides)			
Etapa I	771.984 (1,51%)	40.904 (-0,08%)	32.684.134 (63,91%)
Etapa II	567.246 (1,11%)	180.134 (-0,35%)	44.601.877 (87,22%)
Etapa III	320.707 (0,63%)	856.544 (-1,67%)	35.032.279 (68,50%)
Leite com resíduos de lactonas macrocíclicas			
Etapa I	653.938 (1,28%)	90.177 (-0,18%)	39.267.169 (76,79%)
Etapa II	377.252 (0,74%)	1.823.813 (-3,57%)	44.692.279 (87,39%)
Etapa III	213.534 (0,42%)	1.166.506 (-2,28%)	20.382.021 (39,86%)
Leite com resíduos de piretróides			
Etapa I	5.946.413 (11,63%)	4.981.710 (-9,74%)	18.546.612 (36,27%)
Etapa II	3.567.450 (6,98%)	5.969.203 (-11,67%)	12.288.200 (24,03%)
Etapa III	5.946.394 (11,63%)	4.757.322 (-9,30%)	16.736.860 (32,73%)

Etapa I: antes do treinamento para implementação das Boas Práticas Agropecuárias (BPA).

Etapa II: 48 dias após o treinamento para implementação das BPA.

Etapa III: 96 dias após o treinamento para implementação das BPA.

Para a indústria laticinista da região produtora como um todo, a perda média de leite seria em torno de 1.307.055 L por ano, correspondendo a 2,56% do volume de produção com presença de resíduos de produtos de uso veterinário (Tabela 3.6). Considerando-se o valor médio bruto do litro do leite pago ao produtor (US \$ 0,42/litro), na região estudada e no mesmo período segundos dados obtidos de CEPEA-ESALQ/USP (2011), tal prejuízo representaria aproximadamente R\$ 1.045.280 ou US \$ 548.772 de prejuízo ao ano. No entanto, quando se compara com os resultados obtidos após o treinamento para implementação das BPA, observa-se uma redução média na produção de leite com resíduos de produtos de uso veterinário de 51,8%, representando 630.078 L de leite contaminado com resíduos ao ano (1,23% do volume total de produção anual), o que corresponderia a aproximadamente US \$ 264.733, menos da metade do prejuízo anterior ao treinamento. Quando se avalia a continuação do trabalho de monitoramento e implementação das BPA (III etapa), os resultados referentes a produção de leite com presença de resíduos de produtos de

uso veterinário é de 374.988 L de leite contaminado ao ano, cerca de 0,73% do volume de produção anual. Isto representa um prejuízo em torno de US \$ 157.341 e uma diminuição de produção de leite com resíduos de produtos de uso veterinário na ordem de 71,5% ao final do estudo realizado, com estimativas de perdas significativamente menores a cada etapa.

Considerando que o treinamento foi significativo para diminuição de resíduos de produtos de uso veterinário em geral, assim como, para os grupos de antimicrobianos e lactonas macrocíclicas, quando analisados separadamente, nota-se a partir dos resultados apresentados na Tabela 3.6, que para presença de resíduos de antimicrobianos os impactos positivos do treinamento para implementação das BPA foram ainda maiores do que para resíduos em geral, representando uma diminuição do risco de produção de leite com resíduos de antimicrobianos de 84,9% (II etapa) e 93,9% (III etapa) em relação à I etapa (tempo zero – diagnóstico de situação, antes do treinamento). Para lactonas macrocíclicas a diminuição do risco de produção de leite com esses resíduos diminuiu em 42,2% (II etapa) e 67,2% (III etapa) em relação ao período anterior ao treinamento (I etapa).

4 CONCLUSÕES

A aplicação das BPA e sua constante monitorização em propriedades leiteiras contribui significativamente para a redução do risco de produção de leite com presença de resíduos de produtos de uso veterinário, especialmente nas classes de produtos aplicados individualmente nos animais, como os antimicrobianos e lactonas macrocíclicas.

Algumas práticas isoladas foram significativas em relação ao treinamento e demonstraram aumentar as chances de ocorrência de resíduos quando não conformes. No entanto, o conjunto (categorias) apresentou maior significância e correlação positiva forte para produção de leite livre de resíduos de produtos de uso veterinário de forma geral, tornando as práticas de manejo interdependentes. Assim, as BPA constituem uma ferramenta eficaz para produção de leite seguro e útil para a prevenção de possíveis prejuízos, descartes, danos à saúde do consumidor e/ou dos animais, assim como, possíveis contaminações ambientais.

O uso de uma estratégia de prevenção baseada no risco buscando minimizar ou eliminar a presença de resíduos de produtos de

uso veterinário no leite na unidade produtiva é possível e viável no Brasil a partir da adoção das BPA na atividade. Desta forma, essa ferramenta torna-se essencial para redução da ocorrência de resíduos de produtos de uso veterinário no leite na produção primária e para garantir sua segurança até o consumidor final. Apresenta ainda, grande impacto financeiro, pois a região estudada possui grande representatividade no volume de leite produzido.

AGRADECIMENTOS

O presente estudo contou com auxílio financeiro do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA).

Agradecimentos especiais a Gabriel Rübensam, Doriane Sacheto, Louise Jank e Magda Targa Martin pela valiosa assistência nas análises químicas.

Alexandre Cota Lara e equipe por todo auxílio logístico no trabalho junto aos produtores.

CAPÍTULO 4

QUALIDADE DO LEITE: INFLUÊNCIA DAS CONDIÇÕES CLIMÁTICAS E PRÁTICAS NO MANEJO DE ORDENHA

L. C. A. Picinin^{1*}, M. M. O. P. Cerqueira², I. M. Toaldo¹, F. N. Souza²,
M. O. Leite², L. M. Fonseca², A. M. Q. Lana² e M. T. Bordignon-Luiz¹

¹ Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC). Rod. Admar Gonzaga, 1346, Bairro Itacorubi, Florianópolis, SC, Brasil, CEP: 88.034-001.

² Escola de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG). Belo Horizonte, MG, Brasil.

RESUMO

O presente estudo objetivou avaliar a influência das condições climáticas, do treinamento e da implementação das boas práticas no manejo de ordenha sobre a qualidade e quantidade de leite produzido em diferentes períodos climáticos em propriedades leiteiras de Minas Gerais, Brasil. Para verificar a influência das condições climáticas sobre a qualidade do leite cru, foram analisadas 3.096 amostras de leite durante um período de três anos e correlacionadas com os principais fatores climáticos no mesmo período (temperatura diária do ar mínima, média e máxima, precipitação pluviométrica e umidade relativa do ar). Foram avaliados os resultados obtidos nas análises de amostras de leite cru coletadas no ano anterior (2009/2010) e também no posterior (2011/2012) aquele em que foi realizado o treinamento para implementação das boas práticas no manejo de ordenha (2010/2011), compreendendo três etapas, antes do treinamento (período seco – tempo zero – I etapa), 48 dias após o treinamento (período de transição – II etapa) e 96 dias após o treinamento (período chuvoso – III etapa). Na I etapa, foi realizado um diagnóstico de situação com coleta de amostras para análises laboratoriais, aplicação da lista de verificação padronizada e treinamento para implementação das boas práticas de manejo de ordenha; na II etapa foi realizada nova coleta de amostras para análises e reaplicação da lista de verificação para avaliar a eficiência do treinamento; e, na III etapa foi realizada uma repetição da II etapa. Em cada etapa foram realizadas análises físico-químicas; contagem de células somáticas (CCS) e contagem bacteriana total (CBT). Os dados climáticos (precipitação pluviométrica, umidade relativa do ar, temperatura diária do ar mínima, média e máxima) foram coletados. A partir do histórico dos três anos observou-se correlação positiva entre CBT e CCS e os principais fatores climáticos, assim como, correlação negativa com os principais constituintes do leite e o volume de leite produzido diariamente, demonstrando que nos períodos mais quentes e chuvosos, o leite tende a apresentar menor qualidade e volume produzido. A implementação das boas práticas no manejo de ordenha mostrou que é possível em curto e médio prazos, manter a qualidade do leite produzido quanto a CBT, CCS, gordura e volume de leite produzido diariamente, mesmo em estações com maior precipitação pluviométrica e temperatura diária do ar. Observou-se correlação positiva com o volume de leite produzido diariamente e correlação negativa para CBT, sendo que CBT apresentou correlação positiva com CCS, principais parâmetros higiênico-sanitários do leite. Nas estações

quentes e chuvosas são encontrados os maiores desafios higiênico-sanitários para a produção de leite na região estudada, podendo estes serem controlados ou minimizados com a aplicação das boas práticas no manejo de ordenha, especialmente no que se refere à CBT. Conclui-se que as boas práticas de ordenha são ferramentas úteis, eficazes, práticas, rápidas e essenciais para produção de leite com qualidade e em maior quantidade, desde que constantemente monitorada.

Palavras-chave: qualidade do leite cru, boas práticas na ordenha, condições climáticas

1 INTRODUÇÃO

O Brasil apresenta o segundo maior rebanho leiteiro do mundo e é o quarto maior produtor mundial de leite, sendo a maior produção concentrada na região Sudeste do país, onde o estado de Minas Gerais lidera o *ranking* nacional (EMBRAPA, 2013) com crescente representatividade na exportação de lácteos.

A legislação vigente no Brasil estabelece alguns parâmetros de qualidade para leite cru refrigerado, dentre os quais, o mínimo de 3,0% de gordura, 8,4% extrato seco desengordurado (ESD) e 2,9% de proteína (BRASIL, 2011a). O limite máximo vigente para CCS é de 600.000 células/mL e para CBT de 600.000 UFC/mL (BRASIL, 2011a). Os parâmetros de CCS e CBT, na região Sul, Sudeste e Centro-Oeste, serão modificados a partir de julho de 2014 para 500.000 células/mL e 300.000 UFC/mL, respectivamente (BRASIL, 2011a), aproximando-se aos padrões de países e mercados mais exigentes.

Os parâmetros que definem a qualidade do leite variam de acordo com os países, regiões, rebanhos, além dos aspectos sanitários e condições higiênicas para obtenção e preservação da matéria-prima. Alguns parâmetros são indicadores internacionais da qualidade do leite, tais como, baixa contagem bacteriana total (CBT), elevados teores de gordura e proteína, baixa contagem de células somáticas (CCS), ausência de resíduos de produtos de uso veterinário e/ou contaminantes e rebanhos produtores livres de tuberculose e brucelose. Variações nos parâmetros de qualidade do leite afetam consideravelmente o processo de produção de derivados, a segurança e a qualidade do produto final (HARDING, 1995; GONZÁLEZ et al., 2011).

De acordo com Dufour et al. (2011), CCS e CBT são internacionalmente utilizadas como parâmetros de avaliação higiênico-sanitária do leite. Para os produtores de leite em todo o mundo, a CCS

não é apenas uma medida de saúde do úbere e desempenho do rebanho, mas também, fator determinante de mercado. Vários fatores fisiológicos e ambientais podem influenciar a CCS do leite, tais como estágio de lactação, idade da vaca, número de lactações, estação do ano, práticas de manejo, qualidade e eficiência da ordenha e intervalos entre ordenhas. No entanto, está bem esclarecido cientificamente que a infecção da glândula mamária é o principal fator que afeta a CCS (HARDING, 1995; OLDE-RIEKERINK et al., 2007; DUFOUR et al., 2011). A CBT pode ser considerada como indicador das condições higiênicas de produção de leite, que, no entanto, sofre grande variação sazonal, observando-se melhor qualidade de leite durante os períodos secos (ELMOSLEMANY et al., 2010).

O efeito de condições climáticas mais quentes e úmidas representa custos elevados para os produtores de leite. Segundo Armstrong (1994), os principais fatores ambientais que produzem estresse por calor em vacas de leite são temperatura e umidade. Não apenas pela redução no volume de produção (WEST, 2003; VALTORTA; GALLARDO, 2004), como também, menor teor de sólidos, o que reduz a rentabilidade. Além disso, nestes períodos, as vacas têm desempenho reprodutivo prejudicado, maior susceptibilidade a problemas sanitários no rebanho e, conseqüentemente, podem produzir leite de baixa qualidade higiênico-sanitária (MORSE et al., 1988; WEST, 2003; GONZÁLEZ et al., 2011; NÓBREGA; LANGONI, 2011). Porém, poucos são os estudos realizados para avaliar a influência de diferentes condições climáticas sobre a qualidade e volume de leite produzido no Brasil, assim como, o efeito das boas práticas de manejo de ordenha nos mesmos em diferentes tempos.

O presente estudo objetivou avaliar a influência de diferentes condições climáticas e também do treinamento e implementação das boas práticas no manejo de ordenha sobre a qualidade e quantidade de leite produzido em diferentes períodos climáticos em propriedades leiteiras de Minas Gerais, maior estado produtor de leite no Brasil.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 AMOSTRAGEM E ANÁLISES

Foram selecionadas aleatoriamente 43 propriedades leiteiras do estado de Minas Gerais, Brasil, sendo 26 propriedades (60%) com produção diária de até 500 L de leite, 04 (10%) com produção de 501 a 1.000 L de leite/dia e (13) 30% acima de 1.001 L diários de leite.

Em cada propriedade selecionada foram coletadas e analisadas duas amostras mensais de leite nos anos de 2009 a 2011, totalizando 3.096 amostras analisadas.

As coletas das amostras de leite cru para análises laboratoriais, foram realizadas de acordo com a Norma FIL 50C:1995 (IDF, 1995). As amostras foram coletadas assepticamente em tanques de expansão refrigeradores das propriedades leiteiras selecionadas. A qualidade do leite foi avaliada para composição físico-química (teores de gordura, proteína, extrato seco total e extrato seco desengordurado), CCS e CBT.

As amostras de leite para análise de CCS e análises de composição físico-química foram coletadas em frascos de 40 mL contendo bronopol (2-bromo-2-nitropane-1,3-diol) e analisado em equipamento automatizado (CombSystem 2300[®], Bentley Instruments, Chaska, USA) de acordo com IDF (2000). A composição físico-química foi determinada pelo método de absorção do comprimento de onda na região do infra-vermelho e a CCS pelo método de citometria de fluxo. Para determinação da CBT, pelo princípio de citometria de fluxo, foi utilizado o equipamento Bactocount 150[®] (Bentley Instruments, Chaska, USA), sendo as amostras coletadas em frascos de 40 mL contendo azidiol (3 $\mu\text{L}/\text{mL}$). Todas as amostras foram mantidas a 4 °C até a realização das análises laboratoriais. Todas as análises foram realizadas em duplicata.

2.2 INFLUÊNCIA DAS CONDIÇÕES CLIMÁTICAS NA QUALIDADE DO LEITE CRU

Para avaliar a influência das diferentes condições climáticas na qualidade do leite cru produzido nas propriedades selecionadas, foram avaliados os resultados das análises realizadas no período de 2009 a 2011 (três anos). Os dados foram compilados e correlacionados com os dados climáticos (precipitação pluviométrica, umidade relativa do ar, temperatura diária do ar média, mínima e máxima) obtidos no mesmo período na região estudada a partir dos registros oficiais do Centro de Meteorologia do Estado de Minas Gerais (SIMGE, 2012).

Para fins desse estudo, foram estabelecidos três períodos climáticos (seco – mês de setembro, transição – mês de novembro e chuvoso – mês de janeiro) conforme os dados obtidos dos meses mais representativos para a caracterização da precipitação pluviométrica, temperatura diária do ar (média, mínima e máxima) e umidade relativa do ar (URA) em cada mês na região estudada durante todo o período de 2009 a 2011 (Tabela 4.1).

Tabela 4.1 - Condições climáticas na região central de Minas Gerais e suas respectivas médias, no período de três anos consecutivos (2009 a 2011), para classificação das diferentes etapas estabelecidas para fins desse estudo

Meses de referência (2009 a 2011)	Período climático estabelecido	Precipitação pluviométrica (mm de chuva)	Temperatura diária do ar (°C)			URA* (%)
			Mínima	Máxima	Média	
Setembro	Período seco	14,49 ^a	16,16 ^a	26,56 ^a	20,61 ^a	57,98 ^a
Novembro	Período de transição	88,46 ^b	17,10 ^b	25,83 ^b	21,70 ^b	72,30 ^b
Janeiro	Período chuvoso	160,27 ^c	18,43 ^c	27,10 ^c	22,62 ^c	76,37 ^c

Dados obtidos a partir de banco de dados do SIMGE (2012).

a, b, c Médias com letras diferentes em mesma coluna são estatisticamente diferentes ($P < 0,05$) pelo test t de Student.

*URA: umidade relativa do ar.

2.3 INFLUÊNCIA DO TREINAMENTO E DAS BOAS PRÁTICAS DE MANEJO DE ORDENHA NA QUALIDADE DO LEITE CRU

A implementação das boas práticas de manejo de ordenha foi realizada nas mesmas propriedades descritas no item 2.1. Esta foi realizada em três etapas, classificadas para fins desse estudo, como: antes do treinamento (período seco – tempo zero – setembro de 2010), 48 dias após o treinamento (período de transição – novembro de 2010) e 96 dias após o treinamento (período chuvoso – janeiro de 2011).

Em cada uma das etapas foram coletadas e analisadas amostras de leite cru e verificadas as principais práticas de manejo de ordenha adotadas em cada propriedade e realização de treinamento teórico-prático individualizado *in loco* almejando a adoção, correção e/ou adequação dos principais fatores de risco identificados em não conformidade em relação às recomendações contidas na lista de verificação aplicada.

Para monitoramento dos principais fatores de risco relacionados às práticas de manejo de ordenha, foi utilizada lista de verificação adaptada de práticas para manejo de ordenha (categoria “manejo de ordenha” do Anexo I), recomendadas por FAO/IDF (2004) e consagradas internacionalmente. Cada item foi pontuado como: conforme (C), não conforme (NC) e não se aplica (NSA). A frequência de conformidade para manejo de ordenha foi calculada pela fórmula: $[C / (C+NC) \times 100]$ (ANDRADE; OGLIARI, 2007).

2.4 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

As análises paramétricas foram realizadas por ANOVA com delineamento em blocos ao acaso e comparação de médias pelo teste *t* para amostras dependentes (Teste *t* de Student). A correlação entre as variáveis quantitativas foi realizada pelo método de Pearson ($P < 0,05$). Para variáveis não-paramétricas foi realizado teste de Qui-quadrado e contraste entre médias pelo teste de Wilcoxon. A correlação entre as variáveis qualitativas com as demais foi realizada pelo método Spearman ($P < 0,05$). A classificação do grau de correlação utilizada foi realizada de acordo com o proposto por Finney (1980).

Todas as análises estatísticas foram realizadas no software SAS/STAT® (Versão 8, SAS® Institute Inc., Cary, NC, USA).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 INFLUÊNCIA DAS CONDIÇÕES CLIMÁTICAS NA QUALIDADE DO LEITE CRU

O Brasil é um país de clima predominantemente tropical e apresenta grandes variações climáticas conforme a região, pois é um país de grande extensão territorial. No estado de Minas Gerais, região de estudo nesse trabalho, durante o período de 2009 a 2011, foi observada grande variabilidade climática com precipitação pluviométrica média de 77,55 mm de chuva ao ano variando desde zero até 240,08 mm de chuva, temperatura diária do ar média de 20,43 °C, com valor mínimo de 6,50 °C a máximo de 43,00 °C e URA média de 66,62%, variando de 50,73 a 81,21% (SIMGE, 2012).

Os resultados dos parâmetros de qualidade do leite podem ser influenciados por diferentes condições de produção de leite no Brasil, assim como, o manejo do rebanho, uma vez que durante períodos mais chuvosos e quentes os animais tendem a ser mantidos em pastagens, em contraste com os períodos mais secos e frescos em que os animais são mantidos confinados. Estudos de comparação mostram diferenças em relação aos sistemas de pastagens e ao confinamento quanto ao desempenho reprodutivo, mastite, CCS, saúde do casco e geral da vaca (BENDIXEN et al., 1986; PHILIPS, 1990; GOLDBERG et al., 1992; WHITE et al., 2002).

A correlação entre as diferentes condições climáticas e as análises físico-químicas, CCS e CBT do leite produzido no período de 2009 a 2011 nas 43 propriedades leiteiras de Minas Gerais, Brasil está descrita

na Tabela 4.2. O grau de correlação variou de fraco a muito forte conforme a relação entre cada variável, permitindo inferir que a quantidade e a qualidade do leite produzido está sob interferência de múltiplos fatores.

Os teores percentuais dos principais constituintes do leite apresentaram correlação positiva entre si (proteína, gordura, EST e ESD) e correlação negativa com CCS (exceto EST). O volume diário de produção de leite apresentou relação positiva com percentuais de EST e ESD e correlação negativa com CCS. Segundo Auldish, Walsh e Thompson (1998), isto pode ser explicado pelo dano físico das células epiteliais secretoras e por alterações na permeabilidade vascular do alvéolo secretor devido ao aumento da mastite subclínica e, conseqüentemente, diminuição da produção de leite. A CCS também apresentou correlação negativa com teores percentuais de gordura, proteína e ESD. Segundo González et al. (2011), a diminuição do teor percentual de proteína, especialmente caseína, ocorre devido a ação de proteases bacterianas e diminuição na capacidade de síntese devido ao dano do epitélio secretor, assim como, a diminuição do teor percentual de gordura que pode ser devido à ação de lipases de origem leucocitária.

A partir dos dados apresentados na Tabela 4.2, pode-se observar que as condições climáticas influenciaram ($P < 0,05$) a maior parte dos parâmetros de qualidade do leite cru refrigerado, assim como, o volume de produção diário de leite em propriedades leiteiras do estado de Minas Gerais, Brasil. Em geral, com o aumento da precipitação pluviométrica, da temperatura diária do ar e da URA, observou-se correlação negativa com os principais constituintes do leite (teores percentuais de gordura, proteína, EST e ESD). Os principais parâmetros higiênico-sanitários do leite (CCS e CBT) apresentaram correlação positiva moderada entre si ($r = 0,5509$) e em relação às diferentes condições climáticas avaliadas. Entre os fatores climáticos, a temperatura diária mínima do ar apresentou maior associação positiva com a CCS do leite ($r = 0,6421$). Tal fato pode ser desencadeado, provavelmente, por deficiência imunológica dos animais devido ao estresse térmico, aumentando a predisposição às doenças, dentre elas a mastite subclínica, representada pelo aumento de CCS no leite.

Diminuição da qualidade do leite e do volume de produção, assim como aumento na incidência de doenças e desordens em vacas produtoras de leite, como por exemplo mastite, apresentam padrão sazonal, o que pode ser justificado pela dificuldade em manter as condições higiênicas adequadas nos períodos mais quentes e chuvosos (MORSE et al., 1988; SMITH; HOGAN, 1998; SCHREINER; RUEGG,

2003; FERREIRA et al., 2006; OLDE-RIEKERINK; BARKEMA; STRYHN, 2007; ZAFALON et al., 2008; ADEDIRAN et al., 2010).

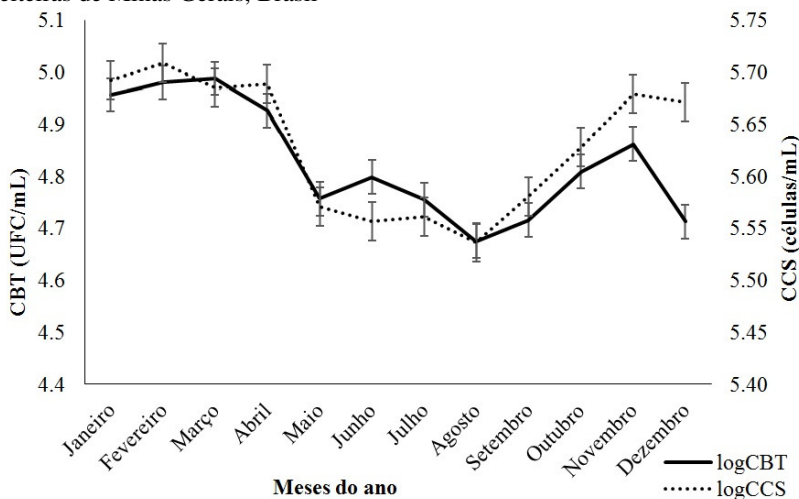
Na Figura 4.1, observa-se que períodos mais quentes e chuvosos (outubro a janeiro) podem ser considerados como aqueles que oferecem maiores desafios higiênico-sanitários para a qualidade do leite produzido, constatado pela maior tendência de valores mais elevados para CCS e CBT no leite cru produzido na região de Minas Gerais, Brasil. Segundo Bueno et al. (2008) isso pode ser devido ao aumento da contaminação ambiental, acúmulo de lama nas instalações e maior ocorrência de tetos sujos no momento da ordenha. Tais fatores, associados às falhas na rotina de ordenha, podem ser responsáveis por elevada contaminação inicial e aumento da prevalência de mastite no rebanho.

Tabela 4.2 - Correlação de Pearson entre variáveis ($P < 0,05$) referentes aos dados analíticos de qualidade de leite de 3.096 amostras de leite cru refrigerado coletadas durante o período de 2009 a 2011 em 43 propriedades leiteiras de Minas Gerais, Brasil

Variáveis	Proteína	EST	ESD	CCS	CBT	Precipitação pluviométrica	Temperatura diária do ar			URA
							Mínima	Máxima	Média	
Volume leite/dia		0,7639	0,6655	-0,3557			-0,3285			-0,4473
Gordura	0,7611	0,3774	0,5093	-0,5010		-0,3472	-0,6138	-0,6312	-0,6383	
Proteína		0,5685	0,6878	-0,3658		-0,3171	-0,4268	-0,4065	-0,4393	
EST			0,7498							-0,4161
ESD				-0,6047	-		-0,5332	-0,4474	-0,5101	-0,3422
CCS					0,3175					
CBT					0,5509	0,4299	0,6421	0,4938	0,5767	0,4355
Precip. pluviométrica							0,3950	0,2902	0,3452	
Temp. diária do ar mín.							0,4717		0,3369	0,7167
Temp. diária do ar máx.								0,8884	0,9615	0,4314
									0,9731	

EST: extrato seco total; ESD: extrato seco desengordurado; CCS: contagem de células somáticas; CBT: contagem bacteriana total; URA: umidade relativa do ar.

Figura 4.1 - Médias mensais da contagem de células somáticas (CCS) e contagem bacteriana total (CBT) avaliadas em três anos (2009 a 2011) em amostras de leite cru refrigerado coletadas mensalmente em 43 propriedades leiteiras de Minas Gerais, Brasil



3.2 INFLUÊNCIA DO TREINAMENTO E DAS BOAS PRÁTICAS DE MANEJO DE ORDENHA NA QUALIDADE DO LEITE CRU

A partir da constatação da influência de diferentes condições climáticas sobre a qualidade e volume do leite produzido na região estudada, realizou-se treinamento teórico-prático para implementação das boas práticas de manejo de ordenha nas propriedades leiteiras selecionadas durante diferentes estações climáticas. Tal procedimento visava minimizar ou eliminar os principais fatores de risco responsáveis pela diminuição da qualidade e/ou volume do leite produzido em condições climáticas desfavoráveis, como as estações mais chuvosas e quentes (outubro a janeiro), como observado pela maior tendência de aumento nos valores de CCS e CBT (Figura 4.1).

Observa-se que no ano anterior ao treinamento para implementação das boas práticas no manejo de ordenha (Tabela 4.3), com o aumento da precipitação pluviométrica, temperatura diária do ar e URA houve diminuição do volume de leite produzido diariamente e aumento significativo do teor de proteína do leite e CBT. Os demais parâmetros analisados no leite cru não diferiram. Segundo Schreiner e

Ruegg (2003), condições ambientais mais quentes e chuvosas podem levar a maiores dificuldades de higiene do local e dos úberes dos animais produtores de leite e afetar os valores de CCS e CBT, que consequentemente, afetam os demais parâmetros de qualidade e volume de produção.

No período de realização das avaliações das práticas de manejo de ordenha (I etapa) e treinamento para implementação e/ou adequação das boas práticas (etapas II e III), os resultados de CBT não diferiram, ao contrário do que ocorreu no período anterior ao treinamento (2009/2010). Observou-se, portanto, que com a implementação das boas práticas no manejo de ordenha, os resultados de qualidade do leite foram mantidos. A produção de leite, CCS e o teor percentual de gordura não foram alterados nos diferentes períodos climáticos analisados, mas houve diminuição nos teores de proteína, EST e ESD (Tabela 4.3).

A partir dos dados de correlação apresentados na Tabela 4.4, observou-se que as práticas de manejo de ordenha apresentaram correlação positiva com o volume de leite produzido diariamente ($r = 0,4158$) e negativa com CBT ($r = -0,4628$). Correlação positiva e moderada ($r = 0,6097$) foi observada entre CBT e CCS. De fato, a associação entre CCS e CBT tem sido descrita (PANTOJA; REINEMANN; RUEGG, 2009). No entanto, o período do estudo pode ser considerado curto para alterar de forma significativa os resultados das análises de leite quanto a CCS, observando-se que em curto e médio prazos, os resultados da adoção e/ou adequação das boas práticas de manejo de ordenha demonstrou maior significância para a melhoria da qualidade microbiológica do leite e aumento da produtividade diária (Tabelas 4.3 e 4.4).

Treinamento e adoção e/ou adequação das boas práticas de manejo de ordenha foram realizados durante o período seco (etapa I), também mais favorável para produção de leite de melhor qualidade, isto é, com maiores teores percentuais de proteína, gordura, EST e ESD, e com maior tendência de menores CBT e CCS (Tabela 4.2). No entanto, a partir dos dados gerados antes e após o treinamento para implementação das boas práticas de manejo de ordenha, no presente estudo, observou-se que os valores de CBT e CCS não apresentaram diferença antes e após o treinamento ($P > 0,05$). A partir do treinamento para adoção e/ou adequação das boas práticas no manejo de ordenha pode-se minimizar a provável e negativa interferência das condições climáticas mais desfavoráveis (período mais quentes e chuvosos, etapas II e III), possibilitando a obtenção de leite em quantidade e com qualidade mesmo em períodos chuvosos (Tabela 4.3).

O treinamento e implementação das boas práticas de manejo de ordenha permitiu o aumento significativo ($P < 0,05$) do percentual de conformidade para os fatores de risco avaliados, de 68,86 para 78,19%, antes e após o treinamento, respectivamente, sem alteração do volume de leite produzido diariamente. Além disso, foi possível manter a qualidade frente aos parâmetros higiênico sanitários do leite, isto é, CBT e CCS, mesmo nas estações mais quentes e chuvosas (após o treinamento) conforme observado nas Tabela 4.3. De fato, segundo Ruegg (2003), a adoção e padronização das práticas recomendáveis para o manejo de ordenha, reduzem a contaminação microbiana do leite. No entanto, alguns fatores que sofrem maiores interferências nutricionais, climáticas e ambientais, como os constituintes do leite, apresentaram tendência de diminuição de seus valores, especialmente os teores percentuais de proteína e, conseqüentemente, EST e ESD. Tais constituintes do leite apresentaram diferenças advindas principalmente dos fatores nutricionais nas diferentes estações climáticas do que das práticas de manejo de ordenha, as quais não apresentaram correlação significativa (Tabela 4.4). Noro et al. (2006) encontraram a mesma variação na concentração de proteína do leite ao longo do ano, verificando maiores teores nas estações de outono/inverno, isto é, nas estações mais secas.

A dieta fornecida ao animal nas diferentes estações, estado de saúde do animal e diversos fatores genéticos podem interferir na composição físico-química do leite (LE ROUX; LAURENT; MOUSSAOUI, 2003; OGOLA; SHITANDI; NANUA, 2007). Maior incidência de mastite está frequentemente associada com alta precipitação pluviométrica (SCHREINER; RUEGG, 2002), confirmada por dados da Tabela 4.2 do presente estudo e minimizada também pela adoção e/ou adequação das boas práticas no manejo de ordenha, conforme demonstrado na Tabela 4.3. No entanto, tanto no período anterior ao estudo (2009/2010), como no período do treinamento (2010/2011) não foi observada diferença na CCS entre os diferentes períodos climáticos. No período de transição e chuvoso consecutivo (2011/2012 – sem treinamento), houve aumento ($P < 0,05$) para CCS, assim como, para CBT, demonstrando que a constância do monitoramento interfere na qualidade do leite, juntamente com a sazonalidade (Tabela 4.3).

Tabela 4.3 - Comparação entre médias dos teores percentuais de composição de leite, volume de produção, contagem de células somáticas (CCS), contagem bacteriana total (CBT) de leite cru refrigerado coletado no mesmo período do ano anterior ao estudo realizado (2009/2010), o período de diagnóstico e treinamento para implementação das boas práticas no manejo de ordenha (2010/2011) e após aproximadamente um ano do treinamento realizado (2011/2012)

Treinamento (tempo)	Mês/ano (período)	Médias dos parâmetros físico-químicos do leite cru analisado (erro padrão da média)						
		Volume leite (L/dia)	Gordura (%)	Proteína (%)	EST (%)	ESD (%)	LOG CCS (CÉLS/ML)	LOG CBT (UFC/ML)
Período anterior ao treinamento para implementação das boas práticas no manejo de ordenha EJO DE								
ST	Set/2009	780,97 ^a	3,70 ^a	3,16 ^a	12,32 ^a	8,62 ^a	5,67 ^a	4,78 ^a
12 meses	SECO	(83,27)	(0,06)	(0,01)	(0,07)	(0,01)	(0,03)	(0,08)
ST	Nov/2009	771,97 ^a	3,61 ^a	3,16 ^a	12,22 ^a	8,62 ^a	5,71 ^a	5,07 ^b
10 meses	TRANSIÇÃO	(76,92)	(0,03)	(0,02)	(0,04)	(0,02)	(0,03)	(0,08)
ST	Jan/2010	551,46 ^b	3,63 ^a	3,22 ^b	12,20 ^a	8,57 ^a	5,71 ^a	5,04 ^b
8 meses	CHUVOSO	(59,60)	(0,03)	(0,01)	(0,04)	(0,02)	(0,03)	(0,08)
Período do treinamento para implementação das boas práticas no manejo de ordenha (etapas I, II e III)								
ST	Set/2010	725,07 ^a	3,63 ^a	3,23 ^a	12,53 ^a	8,90 ^a	5,62 ^a	4,76 ^a
	SECO	(79,70)	(0,04)	(0,01)	(0,05)	(0,02)	(0,04)	(0,09)
CT	Nov/2010	736,22 ^a	3,62 ^a	3,27 ^b	12,37 ^b	8,76 ^b	5,66 ^a	4,98 ^a
48 dias	TRANSIÇÃO	(77,98)	(0,04)	(0,01)	(0,04)	(0,02)	(0,03)	(0,09)
CT	Jan/2011	769,47 ^a	3,68 ^a	3,21 ^{ab}	12,39 ^b	8,71 ^b	5,66 ^a	4,85 ^a
96 dias	CHUVOSO	(70,71)	(0,04)	(0,01)	(0,05)	(0,02)	(0,03)	(0,08)
Período posterior ao treinamento para implementação das boas práticas no manejo de ordenha								
CT	Set/2011	748,56 ^a	3,72 ^a	3,29 ^a	12,51 ^a	8,78 ^a	5,48 ^a	4,59 ^a
12 meses	SECO	(83,31)	(0,04)	(0,02)	(0,05)	(0,02)	(0,03)	(0,06)
CT	Nov/2011	664,37 ^a	3,80 ^a	3,27 ^a	12,46 ^a	8,65 ^b	5,65 ^b	4,75 ^{ab}
14 meses	TRANSIÇÃO	(78,88)	(0,04)	(0,02)	(0,06)	(0,03)	(0,03)	(0,07)
CT	Jan/2012	681,01 ^a	3,74 ^a	3,22 ^a	12,42 ^a	8,69 ^b	5,69 ^b	4,82 ^b
16 meses	CHUVOSO	(70,72)	(0,04)	(0,01)	(0,04)	(0,02)	(0,04)	(0,07)

ST: sem treinamento; CT: com treinamento

a, b, c Letras minúsculas diferentes em mesmo período diferem estatisticamente ($P < 0,05$), pelo test t de Student

A adequada orientação técnica e implementação das boas práticas de manejo de ordenha apresentam-se como importantes e eficazes ferramentas para a melhoria da qualidade e quantidade do leite produzido, com impacto positivo em curto e médio prazos, principalmente nos valores de CBT, mesmo em períodos de maiores desafios higiênico-sanitários, como aqueles mais chuvosos e quentes. Apesar de as boas práticas no manejo de ordenha serem primordiais, é também importante o monitoramento contínuo das práticas realizadas, assim como, a crescente necessidade de se investir em melhor ambiência para garantia do bem estar e sanidade animal.

Tabela 4.4 - Correlação de Pearson ou Spearman ($P < 0,05$) para análises de qualidade do leite e índice de conformidade das boas práticas para manejo de ordenha em propriedades leiteiras de Minas Gerais, Brasil

Variáveis	Gordura	Proteína	EST	ESD	Log CBT*	CMO*
Volume leite /dia	0,2824		0,2860			0,4158
Gordura		0,3042	0,9121	0,1835		
Proteína			0,5787	0,7781		
EST				0,5704		
Log CCS*					0,6097	
Log CBT*						-0,4628

**Teste de Spearman*

EST: extrato seco total; ESD: extrato seco desengordurado; CCS: contagem de células somáticas; CBT: contagem bacteriana total; CMO: índice de conformidade para práticas adotadas no manejo de ordenha.

4 CONCLUSÕES

As condições climáticas interferiram na qualidade e volume de leite produzido em propriedades leiteiras de Minas Gerais, Brasil. O aumento da precipitação pluviométrica, da temperatura diária do ar (média, mínima e máxima) e da URA correlacionam-se negativamente com o volume de leite produzido e seus constituintes e positivamente com CBT e CCS, demonstrando que nos períodos mais quentes e chuvosos o leite tende a apresentar menor qualidade e volume produzido.

O treinamento e adoção e/ou adequação das boas práticas no manejo de ordenha influenciaram positivamente na qualidade e volume do leite produzido, evidenciado principalmente pela manutenção dos valores de CBT, assim como o volume diário de leite produzido e a CCS, em períodos identificados como de maiores desafios higiênico-sanitários, como as estações mais quentes e chuvosas.

A atividade leiteira deve ser continuamente monitorada para que o padrão de qualidade do leite produzido seja constante, com garantia da

sanidade animal, produtividade, rentabilidade e, conseqüentemente, segurança alimentar.

AGRADECIMENTOS

O presente estudo contou com auxílio financeiro do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA).

Agradecimentos especiais ao Alexandre Cota Lara e sua equipe, assim como, aos profissionais do Laboratório de Qualidade do Leite da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG).

CAPÍTULO 5

INFLUÊNCIA DAS CONDIÇÕES CLIMÁTICAS SOBRE A CONTAMINAÇÃO POR AFLATOXINA M₁ NO LEITE CRU PRODUZIDO EM MINAS GERAIS, BRASIL

L. C. A. Picinin^{1*}, M. M. O. P. Cerqueira², E. A. Vargas³, A. M. Q. Lana² I. M. Toaldo¹ e M. T. Bordignon-Luiz¹

¹ Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC). Rod. Admar Gonzaga, 1346, Bairro Itacorubi, Florianópolis, SC, Brasil, CEP: 88.034-001.

² Escola de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG). Belo Horizonte, MG, Brasil.

³ Laboratório de Controle, Qualidade e Segurança Alimentar (LAQSA), Laboratório Nacional Agropecuário (LANAGRO), Ministério de Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). Belo Horizonte, MG, Brasil.



Influence of climate conditions on aflatoxin M1 contamination in raw milk from Minas Gerais State, Brazil

Lídia Cristina Almeida Picinin^a, Mônica Maria Oliveira Pinho Cerqueira^b, Eugênia Azevedo Vargas^c,
Ângela Maria Quintão Lana^d, Isabela Maia Toaldo^a, Marilde T. Bordignon-Luiz^{a,*}

^a Programa de Pós-graduação em Ciência dos Alimentos, Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), Rod. Admar Gonzaga, 1346, Bairro Itacorubi, Florianópolis, CEP: 88.034-001, SC, Brazil

^b Departamento de Inspeção e Tecnologia de Produtos de Origem Animal (DITPOA), Escola de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Belo Horizonte, CEP: 30.123-970, MG, Brazil

^c Laboratório de Controle, Qualidade e Segurança Alimentar (LACQSA), Laboratório Nacional Agropecuário (LANAGRO), Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), Belo Horizonte, CEP: 30.380-090, MG, Brazil

^d Departamento de Zootecnia (Estatística), Escola de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Belo Horizonte, CEP: 30.123-970, MG, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 27 August 2012

Received in revised form

8 October 2012

Accepted 16 October 2012

Keywords:

Aflatoxin M1

Climate periods

Brazilian milk

ELISA

HPLC-FD

ABSTRACT

Aflatoxin M1 (AFM1) contamination in milk is a potential risk for animal and human health. The occurrence of AFM1 in raw milk from Minas Gerais State, Brazil, in different climate conditions was evaluated. A total of 129 milk samples were collected from dairy farms in three distinct periods (dry period, transition period and rainy period), and analyzed by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) as screening test. Samples with AFM1 at concentrations above 0.05 µg/L were analyzed by liquid chromatography with fluorescence detection (HPLC-FD) as confirmatory method. All the analyzed samples showed contamination with AFM1. In the three periods, AFM1 was detected at concentrations below the permitted limit of 0.50 µg/L in milk, according to the Brazilian legislation, and 18 samples (13.95%) showed contamination with AFM1 above the permitted limit of 0.05 µg/L established by Codex Alimentarius and European Commission. Milk contamination with AFM1 was significantly affected by climatic conditions, and the highest values were verified in dry period. The AFM1 contamination was lower than the acceptable daily intake (ADI) estimated for Latin America, indicating that milk from this region is safe for human consumption. Control measures to monitor AFM1 in milk are mandatory in tropical climate countries especially in dry periods.

© 2012 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Mycotoxins represent a major problem for food industries affecting productivity, welfare and health, and are also a permanent risk concerning food safety for humans and animals (Brayden, 2012; Driehuis, Spanjer, Schoten, & Giffel, 2008; Fallah, 2010). Aflatoxins are toxins produced by many strains of *Aspergillus flavus*, *Aspergillus parasiticus* and *Aspergillus nomius* that grow in vegetal products, and can be present in milk and its derivatives due to animals feeding on contaminated plants. The contamination with aflatoxins in dairy products is a serious health hazard for consumers (Ruangwiset & Ruangwiset, 2010). Aflatoxin B1 (AFB1) is a carcinogenic and mutagenic difuranocoumarin derivative, considered the most potent

natural toxin. In this group, aflatoxin M1 (AFM1), a metabolite of AFB1, is important due to its hydroxylation, and may be present in the milk of mammals that eat food contaminated by AFB1. The AFM1 toxin is classified on Group 1 of risk (carcinogenic for humans) by International Agency for Research on Cancer (Bakirci, 2001; IARC, 2002; Lopez, Ramos, Ramadan, Bulacio, & Perez, 2001; Prandini et al., 2009).

Aflatoxins are thermo stable and are not destroyed by thermal treatment, and can be detected in dairy products submitted to pasteurization, sterilization process and also in fermented products. Babies and children are the groups associated with the highest exposure and risk due to their high consumption of milk and dairy products. Also, the AFM1 toxin is excreted in the milk of contaminated lactants (Pietri, Bertuzzi, Bertuzzi, & Piva, 1997; Prandini et al., 2009; Sibanda, Saeger, & Peteghem, 1999; Turconi et al., 2004). The contamination of milk and dairy products with aflatoxins and the concentration of these toxins in milk products may vary according to geographic location, development level of the country and climatic

* Corresponding author. Tel.: +55 48 3721 5376; fax: +55 48 3721 9943.

E-mail address: marilde.bordignon@ufsc.br (M.T. Bordignon-Luiz).

conditions. High temperatures and extreme weather events such as droughts and floods may influence milk production and its quality as a result of changes in the availability and quality of food and water provided to animals (Bakirci, 2001; Nemati, Mehran, Hamed, & Masoud, 2010; Tajkarimi et al., 2008; Van der Spiegel, Van der Fels-Klerx, & Marvin, 2012).

Several countries have established regulatory limits for AFM1 in milk and derivative products, with values varying according to national legislation. According to the Food and Agriculture Organization, sixty countries have established regulatory limits for AFM1. The requirements include permitted limits ranging from minimum detectable levels to 15 µg/L for the AFM1 concentration in milk (FAO, 2004). The European Community has set the maximum permitted level for AFM1 in milk at 0.05 µg/L, whereas Brazil and United States (US) has established the regulatory limit at 0.50 µg/L (Brasil, 2011; CAC, 2001; EG, 2006a; FAO, 2004; Iha, Barbosa, Okada, & Trucksess, 2011).

Brazil currently has the second largest dairy herd in the world, producing annually more than 29 billion liters of milk, with a growing global representation in dairy exports. The state of Minas Gerais, located in the Southeast Region, has the largest area dedicated to dairy farming in Brazil, leading the national production (IBGE, 2011). Due to its tropical climate, Brazil has a great variability of seasonal climatic conditions, with considerable temperature variations and rainfall periods that influence animal practices and foodstuff production and quality (SIMGE, 2011). In Brazil most of the milk production is destined for national consumption and the quality monitoring of this essential and nutritious food it is of considerable relevance.

The aim of this work was to investigate the occurrence of AFM1 in Brazilian raw milk from dairy farms in Minas Gerais State at different climate periods. Considering that Minas Gerais State has different microclimates that can influence milk contamination with AFM1, in this study we present an analysis of raw milk regarding the toxicological risk for consumers originated from the initial vehicle in dairy production chain. Raw milk samples were analyzed by enzyme-linked immunoabsorbent assay (ELISA) as screening test and high performance liquid chromatography with fluorescence detection (HPLC-FD) for confirmatory purposes. Additionally, the estimated daily intake for adults of the AFM1 toxin was assessed for the different climate periods.

2. Material and methods

2.1. Sampling

Sampling procedure was carried out from August 2009 to February 2010, at forty-three randomly selected dairy farms in Minas Gerais State, Brazil. During this period, climate reports were assessed through official registers of Meteorology Center of Minas Gerais State (SIMGE, 2011) in order to map seasonal periods. Data on temperature, relative humidity and rainfall were evaluated and three distinct climate conditions were identified: dry period, transition period and rainy period, as summarized in Table 1.

Table 1
Climate conditions of the studied periods. Samples were collected from August 2009 to February 2010 at dairy farms in Minas Gerais State, Brazil.

Climate condition	Rainfall ^a (mm)	Temperature ^a (°C)			Relative humidity ^a (%)
		Minimum	Maximum	Mean	
Dry period	7.88	14.51	25.34	19.31	54.39
Transition period	100.27	16.60	25.81	20.26	74.49
Rainy period	187.55	18.63	27.13	22.29	70.70

^a Data provided by SIMGE (2011) database.

A total of 129 raw milk samples were collected aseptically from bulk tanks at dairy farms. For each farm, samples were collected in three stages within an interval of 48 days, in order to obtain raw milk samples produced at different climate conditions. Milk samples were conditioned in glass bottles and kept frozen at -18 °C until analysis.

2.2. Chemicals and instrumentation

AFM1 standard was purchased from Sigma–Aldrich Chemical Co. (St. Louis, MO, USA). Standard solutions of AFM1 were prepared and standardized by spectrophotometer in accordance with AOAC (2005, chap. 49). Calibration curve was prepared by dilution of working standard solutions in water:acetonitrile:methanol (65:25:10, v/v/v) covering the range of 0.004–2.5 µg/L. Acetonitrile and methanol were HPLC grade and all other chemicals were analytical grade. Ultrapure water was generated by a Milli-Q Millipore system (Massachusetts, USA).

The quantitative screening of AFM1 was performed by Enzyme Linked Immunoabsorbent Assay (ELISA) using the Aflatoxin M1 Plate Kit Cat#20-0201 (Beacon Analytical Systems, USA) following the manufacturer instructions. The ELISA kit was constituted by a microplate with 96 vacuum-packed wells covered with aluminum, 2 mL sample vials, standard solutions of AFM1 (0.0015; 0.0030; 0.0100; 0.0300; 0.1000 mg/L) and negative control (0.0 µg/L), flasks containing 12 mL of enzyme conjugate AFM1 HRP, flasks containing 14 mL of substrate, flasks containing 14 mL of stop solution (1 N HCl), and a vial containing 50 mL of concentrated wash solution. Absorbance measurements were taken on a Tecan Sunrise automatic microplate reader with 450 nm filter and a controller software package (Tecan Instruments, Austria). Centrifuge Joao BR41 and Joao CR 312 (Joao, France), Biotek PLA 35 automated plate washer (Bio-tek Instruments, Austria), and Afla M1 – HPLC immunoaffinity column (Vicom, USA) were employed.

The HPLC system consisted of a Shimadzu LC chromatograph series (Kyoto, Japan) equipped with a quaternary pump, on-line degasser, column heater, and fluorescence detector (FD). Analytical separation was performed on a Shim-pack CLC-ODS end-capped RP-column (250 × 4.6 mm, 5 µm), fitted with a G-ODS end-capped guard column (10 × 4 mm) of the same packing material, both manufacture by Shimadzu (Kyoto, Japan). The mobile phase consisted of a water: acetonitrile: methanol mixture (65:25:10, v/v/v) on isocratic mode, with the flow rate set at 1.0 mL/min. The injection volume was 50 µL. Fluorescence detection was performed at maximum excitation/emission wavelength for AFM1 (365/435 nm). All data were processed using Shimadzu LC solutions software version 1.21 (Kyoto, Japan).

2.3. Sample preparation procedure

2.3.1. ELISA screening analysis

Aliquots of 1.3 g of raw milk were weighted into glass tubes and centrifuged at 1700 × g for 5 min. Aliquots of 100 µL of the supernatant were placed into individual wells of the microplate kit for the immunoassay test. After a wash step, samples were stirred for 30 s and incubated in the dark at room temperature (25 °C) for 30 min. No washing step was performed prior to the addition of the enzyme conjugate. After incubation, 100 µL of the enzyme conjugate were added to each well and gently shaken for 30 s. Samples were incubated again for 15 min under the same conditions. Subsequently, four washing steps were carried out on an automated plate washer, followed by the addition of 100 µL of substrate to each well and another incubation as previously described. Finally, 100 µL of the stop solution were added to each well and absorbance readings were performed.

2.3.2. HPLC-FD confirmatory analysis

The HPLC confirmatory analysis was performed for all positive samples for AFM1 at concentrations above 0.05 µg/L in the ELISA screening test.

Prior to the chromatographic analysis, samples were submitted to an immunoaffinity column clean-up. Aliquots of 110 mL of milk were centrifuged at 10 °C for 10 min, at 1780 × g. The upper fat layer was discarded and the extracts were filtered through qualitative filter paper (Whatman no. 4), following the clean-up on the immunoaffinity column at a flow rate of 2–3 mL/min. The column was washed twice with 20 mL of water to remove matrix interferences. The AFM1 bound to the antibody was released by elution with 2.5 mL of acetonitrile: methanol (3:2, v/v) followed by 2.5 mL of methanol at a flow rate of 2–3 mL/min. The eluate was evaporated at 40 °C under nitrogen atmosphere, and reconstituted with water: acetonitrile: methanol (65:25:10, v/v/v). A volume of 50 µL was injected into the chromatograph.

2.4. Quality assurance

All the analytical results were corrected by recovery using quality control samples in accordance with validation data and the EC (2006b). Recovery assays were conducted by spiking uncontaminated samples with AFM1 standard solution at the concentration levels of the calibration curve. The fortified samples were extracted and analyzed using the described procedure. Method precision was assessed through the analysis of fortified samples, and evaluating the coefficient of variance (CV). The limit of detection for the ELISA screening test was assessed following the manufacturer's instructions. For the HPLC confirmatory method, the limit of detection (LOD) and the limit of quantification (LOQ) were determined using a signal-to-noise ratio of 3:1 and 10:1, respectively.

2.5. Estimate of daily intake (EDI) of aflatoxin M1

The estimated daily intake for adults of AFM1 was calculated for the different climate periods and assuming a body weight of 60 kg. For each climate period, the estimated daily intake was calculated as the product of the mean concentration of AFM1 in the analyzed samples by ELISA and HPLC methods and the average consumption of milk per adult of 0.148 L/person/day in Brazil (IBGE, 2009). Results were expressed as µg of AFM1 per person per day.

2.6. Statistical analysis

Statistical analysis was performed using SAS/STAT® software version 8.0 (Institute Inc., USA). Results were expressed as mean with standard error and as minimum and maximum concentration of AFM1. Differences in AFM1 concentrations detected in the different climate periods were examined using analysis of variance. The significance of the results was assessed through the Wilcoxon test, by comparison of the means of independent groups, at a significance level of 0.05 ($p > 0.05$).

3. Results

3.1. Method performance

For the ELISA screening test, the detection limit for the AFM1 toxin in raw milk samples was determined at 0.0003 µg/L and the analyte recovery was 97.1%. The linearity of the calibration curve was verified within the interval of 0.0003–1.0 µg/L. These results are consistent with those declared by the manufacturer for the determination of AFM1. The HPLC-FD confirmatory analysis showed a recovery rate up to 90% for AFM1, in accordance with Brazilian Legislation requirements for contaminants at lower concentrations (<1 µg/L). The linearity range of the calibration curve was verified within the interval of 0.0002–2.5 µg/L and was proven to be adequate for AFM1 quantification in raw milk samples. The precision (repeatability) and intermediary precision (intra-laboratory reproducibility) for the AFM1 in milk samples were 16% and 21%, respectively. The limit of detection (LOD) was determined at 0.0001 µg/L and the limit of quantification (LOQ) was determined at 0.0002 µg/L. The performance of the method exhibited good accuracy (z -score ≤ 2) and reproducibility for milk, with an uncertainty of IQ = 0.0002 ± 0.0006 µg/L. These results meet Brazilian Legislation criteria (Brasil, 2011).

3.2. AFM1 contamination in raw milk

For the three climate periods, the ELISA screening analysis of 129 samples of raw milk showed the presence of AFM1 in all samples analyzed, regardless of the climate conditions. The occurrence of AFM1 in raw milk in the distinct climate periods is presented in Table 2. The contamination levels of the AFM1 toxin in milk samples ranged from 0.0002 to 0.1057 µg/L, with higher levels detected in samples of the dry period. The statistical analysis of the data showed a significant difference ($p > 0.0001$) between the mean concentrations of AFM1 in raw milk samples taken from the different periods. As shown in Table 2, most of the contaminated samples with AFM1 levels of 0.05–0.50 µg/L ($n = 13$), were collected in the dry period and represent the highest levels detected, whereas for contamination levels below 0.05 µg/L, a greater number of samples were collected in the rainy period in comparison with the dry and transition periods.

Regarding the permitted limits for AFM1 in milk, all samples showed concentrations of the toxin below 0.50 µg/L, meeting Brazilian criteria (Brasil, 2011). In the other hand, when Codex Alimentarius and European standards are assumed (CAC, 2001; EC, 2006a), 18 samples (13.95%) were detected with AFM1 concentrations above 0.05 µg/L (Table 2), accounting for non-compliant samples. The overall concentrations of AFM1 in the 18 samples analyzed in the ELISA screening test and the HPLC method are presented in Table 3. For these samples, comprising 13 (10.08%) from the dry period and 5 (3.88%) from the transition period, the HPLC quantification showed higher concentrations of AFM1 in milk, with concentrations of the toxin ranging from 0.0660 to

Table 2
ELISA screening analysis of AFM1 in raw milk samples from Minas Gerais, Brazil collected during different climatic periods and the estimated daily intake.

Climate conditions	Minimum (µg/L)	Maximum (µg/L)	Mean ± SE (µg/L)	Contaminated samples and concentration levels of AFM1		
				<0.05 µg/L	0.05–0.50 ^a µg/L	>0.50 ^b µg/L
Dry period ($n = 43$)	0.0031	0.1057	0.0359 ^a ± 0.0044	30	13	00
Transition period ($n = 43$)	0.0017	0.0709	0.0171 ^b ± 0.0030	38	05	00
Rainy period ($n = 43$)	0.0002	0.0249	0.0055 ^c ± 0.0004	43	00	00
Mean ($n = 129$)	0.0002	0.1057	0.0195 ± 0.0021	111	18	00

^{a, b, c} Means in the same column with different capital letters are significantly different ($p < 0.05$).

^a Exceeding Codex Alimentarius (Codex Alimentarius, 2001) and Europe Community (European Commission, 2006a) regulations.

^b Exceeding Brazilian (Brazil, 2011) and United States (FAO, 2004) regulations.

Table 3

Aflatoxin M1 (AFM1) in 18 samples of raw milk at concentrations above 0.05 µg/L obtained in the screening test (ELISA) and confirmed by HPLC analysis.

Samples	Concentration of AFM1 (µg/L)	
	Screening analysis (ELISA)	Confirmatory analysis (HPLC)
1	0.0595	0.0900
2	0.1057	0.3000
3	0.0573	0.1400
4	0.0705	0.1000
5	0.0912	0.2800
6	0.0561	0.0800
7	0.0843	0.1400
8	0.0718	0.1900
9	0.0647	0.1300
10	0.0931	0.2700
11	0.0647	0.1400
12	0.0675	0.0600
13	0.0536	0.1000
14	0.0625	0.1400
15	0.0709	0.1700
16	0.0632	0.2100
17	0.0576	0.0900
18	0.0709	0.5000

0.5000 µg/L, as summarized in Table 4. It is relevant to note that for the rainy period none of the samples showed upper limits for the AFM1 contamination considering the European and Codex standards (>0.05 µg/kg). In comparison with the ELISA screening test, the chromatographic analysis with the fluorescence detection allowed a higher sensibility for determination of AFM1 in milk, and was proven adequate as confirmatory method. The chromatograms for the HPLC confirmatory analysis of AFM1 in milk are shown in Fig. 1.

3.3. Estimate daily intake of aflatoxin M1

According to the Joint FAO/WHO Expert Committee the average dietary intake of AFM1 is estimated at 0.0035 µg/person/day in Latin American (JECFA, 2001). As the average consumption of milk is estimated as 54 L/person/year in Brazil, corresponding to 148 mL/person/day (IBGE, 2009), the estimated daily intake could be calculated using the mean concentration detected in the ELISA and HPLC-FD analysis of raw milk samples, considering a body weight of 60 kg, as summarized in Table 5.

In the ELISA screening, the highest levels of AFM1 were detected in the dry period, with an estimated intake of 0.0052 µg/person/day, exceeding the dietary intake for the Latin American diet reported by JECFA (2001). In the other hand, for the three climate periods, the overall mean concentration of the AFM1 toxin gives an estimated daily intake of 0.0028 µg/person. This value is lower than the dietary intake reported for the Latin American diet, however, it corresponds to 28 times the dietary intake estimated for the African diet by JECFA. For the HPLC analysis, higher values for the dietary intake could be estimated, due to the lower limit of detection of the technique. In contrast to the ELISA screening results, the confirmatory analysis indicated that the greatest degree of contamination

with AFM1 and thus the highest values for the estimated daily intake were associated with the transition period, despite the lower number of samples ($n = 5$) in comparison with the dry period ($n = 13$). The daily intake was estimated to be 0.0230 µg/person/day for the dry period, whereas for the transition period, the estimated daily intake was determined as 0.0329 µg/person/day. Thus, the overall mean dietary intake of AFM1 for the three periods was estimated at 0.0186 µg/person/day, as shown in Table 5.

4. Discussion

Regarding the seasonal variability, our study indicates that the mean concentration of AFM1 in raw milk from Minas Gerais in rainy season was significantly ($p < 0.05$) lower than the values for the transition or dry periods, verifying that the different microclimates in Minas Gerais State influence the milk contamination with the AFM1 toxin. Mean concentrations of AFM1 in milk from Europe, Latin America, Far East, Middle East and Africa have been reported by JECFA (2001) as 0.0230, 0.0220, 0.3600, 0.0050 and 0.0018 µg/L, respectively. In the analysis of milk samples, the average concentration verified for the AFM1 toxin ranged from 0.0195 µg/L in the ELISA screening to 0.1258 µg/L in the HPLC confirmatory analysis, exceeding the reported contamination for Latin America (JECFA, 2001). Our findings are consistent with some previous studies that reported a high concentration of AFM1 in dry seasons in comparison with the rainy conditions (Fallah, Rahnama, Jafari, & Saei-Dehkordi, 2011; Hussain & Anwar, 2008; Kamkar, 2005; Nematy et al., 2010; Prandini et al., 2009; Ruangwises & Ruangwises, 2009, 2010), since in dry periods, lactating cows are fed with greater amounts of mixed feed that may be contaminated with higher levels of AFB1, the metabolite precursor of the AFM1 toxin.

In this study, the concentrations of AFM1 detected in raw milk samples may indicate that food provided to cows in dairy farms in Minas Gerais was probably contaminated with the toxin, especially during the dry period, when rainfall did not exceeded 8.0 mm and temperatures were moderate (Table 1), and supplementary feedstuff was provided to feedlot cattle. Also, higher levels of contamination were detected in the transition period, when the rainfall rates increased at moderate temperatures, representing a climate period in which the cattle are usually kept in confinement and on pasture land. However, in the rainy period, when the animals are usually free to roam on pasture land, the risk of contamination decreased, with lower concentrations of AFM1 detected.

Based on the analysis of milk samples from Minas Gerais State, the leading producer in the dairy chain in Brazil, the occurrence of AFM1 does not appear to be a serious public health hazard, according to Brazilian legislation. However, aflatoxins are recurrent and their presence in foods and feeds may be particularly difficult to prevent or suppress. By comparing our findings with the Codex Alimentarius and European standards, some samples of raw milk showed exceeding values for the AFM1 toxin, which represents a public health concern, according international criteria. For this reason, data on climate influences in mycotoxin contamination in milk and feedstuff provided to cattle are of great relevance, particularly in tropical climate countries as Brazil, where different conditions of rainfall, relative humidity and temperature are perceived on unequable basis.

Regarding the toxicological impact of the AFM1 contamination, the reported occurrence of this toxin in raw milk from Minas Gerais and the estimated daily intake for adults were superior in the drier periods (dry and transition periods). Also, the results of the confirmatory analysis by HPLC showed a higher exposure to AFM1. Nevertheless, considering that raw milk has an essential role in dairy chain, the mycotoxin contamination can be passed forward through milk derivatives production. It is relevant to note that in

Table 4

HPLC confirmatory analysis of 18 samples with AFM1 concentration above 0.05 µg/L in the ELISA screening test.

Climate conditions	Minimum (µg/L)	Maximum (µg/L)	Mean ± SE (µg/L)
Dry period ($n = 13$)	0.0600	0.3000	0.1554 ^a ± 0.060
Transition period ($n = 5$)	0.0900	0.5000	0.2220 ^b ± 0.090
Rainy period ($n = 0$)	–	–	–
Mean ($n = 18$)	0.0016	0.0589	0.1258 ± 0.1139

^{a, b} Means with significant difference at $p < 0.05$.

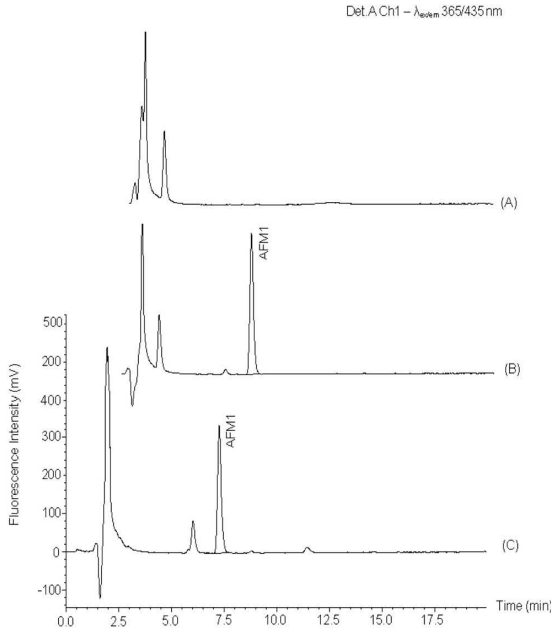


Fig. 1. HPLC-FD confirmatory analysis of AFM1 in milk. Chromatograms: (A) blank milk sample; (B) fortified milk sample (AFM1 at 0.20 $\mu\text{g/L}$); (C) contaminated milk sample with AFM1 concentration at 0.14 $\mu\text{g/L}$.

Table 5, the daily intake of AFM1 is expressed in $\mu\text{g/person/day}$, considering a body weight of 60 kg. However, as essential and nutritious food, milk is consumed mainly by infants and in some cases by elderly people. Thus, the reported values could be underestimated, also due to the fact that the estimated values for milk consumption do not include other dairy foods such as cheese, yogurt and sweets.

When the AFM1 levels obtained in the ELISA screening are considered, the estimated daily intake in the dry period was found to be 1.48 times higher than the expected value of the dietary intake in Latin America according to JECFA (2001), comprising the period of greatest risk. However, with the onset of rains (transition period) and rainy season (rainy period) the observed average is lower than the value recommended for Latin America by JECFA (2001) by factors of 1.40 and 4.38 times, respectively. In the other

hand, for the HPLC confirmatory analysis, both of the analyzed periods (dry and transition) demonstrated higher values for the estimated daily intake in comparison with dietary intake estimated by JECFA (2001).

As well reported, greater attention should be given to the milk production during drier seasons, as the risk of AFM1 contamination is increased, as the total amount of toxin can be found above the permitted limits (Bilandzic, Varenina, & Solomun, 2010; Kamkar, 2005; Prandini et al., 2009; Tajkari et al., 2007). Notwithstanding, the dietary intake can significantly increase, exceeding recommended standards, and therefore compromising food safety. Control measures can be implemented in the initial food chain, monitoring the quality of vegetal dietary products and feed provided to animals. Also, knowledge of the critic climate conditions that may influence milk contamination with the AFM1 toxin is

Table 5
Estimated daily intake of AFM1 from Brazilian raw milk produced during different climate periods analyzed by ELISA screening and HPLC-FD confirmatory method.

Climate condition	ELISA (n = 129)		HPLC-FD (n = 18)	
	Range ($\mu\text{g/person/day}$)	Mean \pm SE	Range ($\mu\text{g/person/day}$)	Mean \pm SE
Dry period	0.0005–0.0156	0.0052 \pm 0.0006	0.0089–0.0444	0.0230 \pm 0.0033
Transition period	0.0003–0.0105	0.0025 \pm 0.0004	0.0133–0.0740	0.0329 \pm 0.0107
Rainy period	0.0000–0.0037	0.0008 \pm 0.0001	–	–
Overall mean	0.0003–0.0099	0.0028 \pm 0.0022	0.0074–0.0395	0.0186 \pm 0.0169

important as a predictable and effective manner to reduce the AFM1 contamination, through adequate storage of feed, animal treatment, and food safety management through milk production.

5. Conclusion

The occurrence of AFM1 was detected at different levels in 129 samples of raw milk from Minas Gerais State, Brazil, collected in three distinct climate periods. The different climate conditions demonstrated to have influence on milk contamination with the AFM1 toxin, whereas a higher contamination was verified in raw milk samples from the dry period. The contamination levels were proven to be below the permitted limits established by Brazilian Legislation. Notwithstanding, 18 samples (13.95%) showed upper limits levels of the AFM1 toxin and could be considered inappropriate for human consumption, according to the Codex Alimentarius and European standards.

In this work, the average concentration of AFM1 in Brazilian raw milk and the estimated daily intake varied significantly for the different climate periods, verifying that climate conditions represent a risk factor for the occurrence of AFM1 in milk. Hence, effective surveillance measures should be implemented through the good agricultural practices, especially in the dry season seeking to prevent and minimize contamination by AFM1 in feedstuff provided to animals, therefore decreasing concentrations of this toxin in Brazilian milk in order assure milk quality and food safety.

Conflict of interest

The authors declare that there are no conflicts of interest.

Acknowledgments

The authors are grateful to Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) for the financial support. Adriana de Souza Lima, Nilton Giovanni de Almeida, Tatiana Vieira Alves, Eliene Alves dos Santos, Kátia Letícia de Carvalho and Marcelo Fernandes Camargos are acknowledged for their assistance with the chemical analysis.

Alexandre Cota Lara and his team for support in collecting and performing this work. Andre Luis de Simone and team of Trialogix Veterinary Diagnostic Ltda. for financing ELISA kits for screening analysis.

References

- AOAC. (2005). *Official methods of analysis* – Review (18th ed.). Gaithersburg: AOAC International.
- Bakirci, I. (2001). A study on the occurrence of aflatoxin M₁ in milk and milk products produced in Van province of Turkey. *Food Control*, 12, 47–51.
- Bilandzic, N., Varenina, I., & Solomun, B. (2010). Aflatoxin M₁ in raw milk in Croatia. *Food Control*, 31, 1279–1281.
- Brasil. (2011). Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Secretaria de Defesa Agropecuária, Instrução Normativa No. 24/2011. *Diário Oficial da União*, 15(41) de agosto de 2011, 8.
- Brayden, W. L. (2012). Mycotoxin contamination of the feed supply chain: implications for animal productivity and feed security. *Animal Feed Science and Technology*, 173, 134–158.
- CAC. (2001). *Commission submitted on the draft maximum level for aflatoxin M1 in milk*. Codex Committee on Food Additives and Contamination 33rd Session, Hague, The Netherlands.
- Driehuis, F., Spanjer, M. C., Scholten, J. M., & Giffel, M. C. (2008). Occurrence of mycotoxins in feedstuffs of dairy cows and estimation of total dietary intakes. *Journal of Dairy Science*, 91, 4261–4271.
- EC. (2006a). Commission Regulation (EC) n.1881/2006 of 19 December 2006 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs. *Official Journal of the European Union*, L 264, 5–24.
- EC. (2006b). Commission Regulation (EC) n.401/2006 of 23 February 2006 laying down the methods of sampling and analysis for the official control of the levels of mycotoxins in foodstuffs. *Official Journal of the European Union*, L 70, 12–34.
- Fallah, A. A. (2010). Aflatoxin M₁ contamination in dairy products marketed in Iran during winter and summer. *Food Control*, 31, 1478–1481.
- Fallah, A. A., Rahnama, M., Jafari, T., & Saei-Dehkordi, S. S. (2011). Seasonal variation of aflatoxin M₁ contamination in industrial and traditional Iranian dairy products. *Food Control*, 22, 1653–1656.
- FAO, Food and Agriculture Organization of the United Nations. (2004). *Worldwide regulations for mycotoxins in food and feed in 2003*. Food Nutrition, 81, FAO.
- Hussain, I., & Anwar, J. (2008). A study on contamination of aflatoxin M₁ in raw milk in the Punjab province of Pakistan. *Food Control*, 19, 393–395.
- IARC, International Agency for Research on Cancer. (2002). Some traditional herbal medicines, some mycotoxins, naphthalene and styrene: Evaluation of carcinogenic risk to humans. *IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans*, 82, 171–175.
- IBGE, Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. (2009). *Vigilância Sanitária. Agudição de alimentos por renda per capita*. Available at <http://www.ibge.gov.br/estadosat/temas.php?sigla=mg&tema=pofoajiscacoalimentar>. Retrieved in 22.07.11.
- IBGE. (2011). *Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Estatísticas do leite, Vigilância Municipal Agropecuária*. Available at <http://www.milkepoint.com.br/mercado/estatisticas/estatisticas-lactes-71231n.aspx>. Retrieved in 15.06.11.
- Iha, M. H., Barbosa, C. B., Okada, I. A., & Truckess, M. W. (2011). Occurrence of aflatoxin M₁ in dairy products in Brazil. *Food Control*, 22, 1971–1974.
- JECFA. (2001). *Safety evaluation of certain mycotoxins in food. Prepared by the 56th meeting of the food additives series No. 47*. Available at www.inchem.org/documents/jecfa/jecmono/v47je02.htm. Retrieved in 04.05.11.
- Kamkar, A. (2005). A study on the occurrence of aflatoxin M₁ in raw milk produced in Sarab city of Iran. *Food Control*, 16, 593–599.
- Lopez, C., Ramos, I., Ramadan, S., Bulacio, L., & Perez, L. (2001). Distribution of aflatoxin M₁ in cheese obtained from milk artificially contaminated. *International Journal of Food Microbiology*, 64, 211–215.
- Nemati, M., Mehran, M. A., Hamed, P. K., & Masoud, A. (2010). A survey on the occurrence of aflatoxin M₁ in milk samples in Ardebil, Iran. *Food Control*, 21, 1022–1024.
- Pietri, A., Bertuzzi, T., Bertuzzi, P., & Piva, G. (1997). Aflatoxin M₁ Occurrence in samples of Grana Padano. *Food Additives & Contaminants*, 14, 341–344.
- Prandini, A., Tansini, G., Sigolo, S., Filippi, L., Laporta, M., & Piva, G. (2009). On the occurrence of aflatoxin M₁ in milk and dairy products. *Food and Chemical Toxicology*, 47, 984–991.
- Ruangwiset, N., & Ruangwiset, S. (2009). Occurrence of aflatoxin M₁ in pasteurized milk of the school milk project in Thailand. *Journal of Food Protection*, 72, 1761–1763.
- Ruangwiset, N., & Ruangwiset, S. (2010). Aflatoxin M₁ contamination in raw milk within the central region of Thailand. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 85, 195–198.
- Sibanda, L., Saeger, S. D., & Petegheem, C. V. (1999). Development of a portable field immunoassay for the detection of aflatoxin M₁ in milk. *International Journal of Food Microbiology*, 48, 203–209.
- SIMGE, Sistema de Meteorologia e Recursos Hídricos de Minas Gerais. (2011). *Base de Dados Meteorológicos e Hidrológicos*. Available at <http://www.simge.mg.gov.br/base_dados/index.html>. Retrieved in 18.07.11.
- Tajkarimi, M., Alibadi Shojae, F., Salah Nejad, M., Poursootani, H., Motalebi, A. A., & Mahdavi, H. (2007). Seasonal study of aflatoxin M₁ contamination in milk in five regions in Iran. *International Journal of Food Microbiology*, 116, 346–349.
- Tajkarimi, M., Alibadi-sh, F., Salah Nejad, A., Poursootani, H., Motalebi, A. A., & Mahdavi, H. (2008). Aflatoxin M₁ contamination in winter and summer milk in 14 states in Iran. *Food Control*, 19, 1033–1036.
- Turconi, G., Giaccollo, M., Livieri, C., Cronizzoli, S., Maccarini, L., Castellazzi, A. M., et al. (2004). Evaluation of xenobiotics in human milk and ingestion by the newborn – epidemiological survey in Lombardy (Northern Italy). *European Journal of Nutrition*, 43, 191–197.
- Van der Spiegel, M., Van der Fels-Klerx, H. J., & Marvin, H. J. P. (2012). Effects of climate change on food safety hazards in the dairy production chain. *Food Research International*, 46, 201–208.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A presença de resíduos de produtos de uso veterinário foi observada em 40 das 132 amostras de leite cru coletadas em propriedades leiteiras de Minas Gerais, Brasil. Do total, 11 amostras apresentaram concentração de resíduos acima dos respectivos limites máximos permitidos pela legislação brasileira para os analitos PNV (01), ABA (01) e CYP (09), observados nas classes de antimicrobianos, lactonas macrocíclicas e piretróides, respectivamente.

O treinamento para implementação das BPA influenciou na diminuição da frequência de ocorrência de resíduos de produtos de uso veterinário no leite, sendo ainda mais efetivo para o grupo de medicamentos aplicados individualmente nos animais, como os antimicrobianos e lactonas macrocíclicas.

O treinamento influenciou algumas práticas de manejo analisadas individualmente, no entanto, o conjunto das práticas (categorias) apresentou maior significância e correlação positiva forte para produção de leite livre de resíduos de produtos de uso veterinário, sendo uma ferramenta eficaz e importante para produção de leite seguro para o consumo e primordial para prevenção de possíveis danos à saúde do consumidor e bem estar dos animais, descartes, prejuízos e/ou contaminações ambientais.

O uso racional, responsável e consciente de produtos de uso veterinário associado às BPA e sua constante monitorização em propriedades leiteiras reduziu o risco da ocorrência de resíduos de produtos de uso veterinário no leite produzido.

Considerando os resultados obtidos, pode-se sugerir que a estratégia de prevenção baseada no risco para fins de reduzir a ocorrência de resíduos de produtos de uso veterinário no leite ao nível da produção primária é possível no Brasil e pode resultar em impacto financeiro representativo e produtivo na cadeia láctea.

A implementação das boas práticas no manejo de ordenha pode controlar ou minimizar os possíveis impactos negativos advindos de estações climáticas mais desfavoráveis como as estações mais quentes e chuvosas, especialmente no que se refere ao volume de leite produzido e sua qualidade microbiológica.

A concentração de aflatoxina M₁ no leite cru analisado e sua ingestão diária estimada por adultos variou em diferentes períodos climáticos. Assim, torna-se importante a adoção das boas práticas agrícolas, especialmente nas estações mais secas, buscando prevenir

e/ou minimizar a contaminação do leite por aflatoxina, assegurando sua qualidade e, conseqüentemente, a saúde do consumidor.

Assim, a atividade leiteira deve ser continuamente monitorada para que seu padrão de qualidade seja atendido em todas as etapas de produção, buscando adoção e monitoramento permanente das boas práticas na produção de leite reconhecidas internacionalmente, com garantia da sanidade e bem estar animal, produtividade, rentabilidade e, conseqüentemente, segurança alimentar e ambiental.

REFERÊNCIAS

- ADEDIRAN, S. A.; NISH, P.; DONAGHY, D. J.; RATKOWSKY, D. A.; MALAU-ADULI, A. E. O. Genetic and environmental factors influencing milk, protein and fat yields of pasture-based dairy cows in Tasmania. *Animal Production Science*, v.50, n.4, p.265-275, 2010.
- AHMAD, R.; SALEM, N. M.; ESTAITIEH, H. Occurrence of organochlorine pesticide residues in eggs, chicken and meat in Jordan. *Chemosphere*, v.78, p.667-671, 2010.
- ANDERSON, K. L.; MOATS, W. A.; RUSHING, J. E. Detection of milk antibiotic residues by use of screening tests and liquid chromatography after intramammary administration of amoxicillin or penicillin G in cows with clinical mastitis. *American Journal Veterinary Research*, v.59, n.9, p.1096-1100, 1998.
- ANDRADE, D. F.; OGLIARI, P. J. *Estatística para as ciências agrárias e biológicas: com noções de experimentação*. Florianópolis: Ed. da UFSC, 2007. 432p.
- ANDRADE, E. L. *Introdução à pesquisa operacional: métodos e modelos para análise de decisão*. 2. ed. Rio de Janeiro: LTC, 2000.
- ANDREOTTI, R. *Situação atual da resistência do carrapato-do-boi Rhipicephalus (Boophilus) microplus aos acaricidas no Brasil*. Campo Grande, MS: Embrapa Gado de Corte, 2010. 36p.
- ARAÚJO, J. M. A. *Química de alimentos: teoria e prática*. 4. ed. Viçosa, MG: Ed. da UFV, 2008. 596p.
- ARCURI, E. F.; BRITO, M. A. V. P.; PINTO, S. M. Qualidade microbiológica do leite refrigerado nas fazendas. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v.58, n.3, p.440-446, 2006.
- ARMSTRONG, D. V. Heat stress interaction with shade and cooling. *Journal of Dairy Science*, v.77, p.2044-2050, 1994.
- AULDIST, M. J.; WALSH, B. J.; THOMPSON, N. A. Seasonal and lactational influences on bovine milk composition in New Zealand. *Journal of Dairy Research*, v.65, p.401-411, 1998.

AUSTRALIAN GOVERNMENT. Australian pesticides and veterinary medicine authority. Disponível em:
<http://www.apvma.gov.au/residues/docs/mrl_table1_october2011.pdf>. Acesso em: 11 dez. 2011.

BAKIRCI, I. A study on the occurrence of aflatoxin M₁ in Milk and Milk products produced in Van province of Turkey. *Food Control*, v.12, p.47-51, 2001.

BARKEMA, H. W.; VAN DER PLOEG, J. D.; SCHUKKEN, Y. H.; LAM, T. J.; BENEDICTUS, G.; BRAND, A. Management style and it's association with bulk milk somatic cell count and incidence rate of clinical mastitis. *Journal of Dairy Science*, v.82, n.6, p.1655-1663, 1999.

BARROS, A. T. M.; GOMES, A.; KOLLER, W. W. Insecticide susceptibility of horn flies, *Haematobia irritans* (Diptera: Muscidae), in the State of Mato Grosso do Sul, Brazil. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, v.16, n.3, p.145-151, 2007.

BAVA, L.; ZUCALI, M.; SANDRUCCI, A.; BRASCA, M.; VANONI, L.; ZANINI, L; TAMBURINI, A. Effect of cleaning procedure and hygienic condition of milking equipment on bacterial count of bulk tank milk. *Journal of Dairy Research*, v.78, p.211-219, 2011.

BENDIXEN, P. H.; VILSON, B.; EKESBO, I.; ÅSTRAND, D. B. Disease frequencies of tied zero-grazing cows and of dairy cows on pasture during summer and tied during winter. *Preventive Veterinary Medicine*, v.4, p.291-306, 1986.

BEZERRA, J. R. M. V. *Tecnologia da fabricação de derivados do leite*. Guarapuava, PR: Ed. Unicentro, 2008. 56p.

BILANDŽIĆ, N.; KOLANOVIĆ, B. S.; VARENINA, I.; SCORTICHINI, G.; ANNUNZIATA, L.; BRSTILO, M.; RUDAN, N. Veterinary drug residues determination in raw milk in Croatia. *Food Control*, v.22, p.1941-1948, 2011.

BILANDZIC, N.; VARENINA, I.; SOLOMUN, B. Aflatoxin M₁ in raw Milk in Croatia. *Food Control*, v.21, n.9, p.1279-1281, 2010.

BITTENCOURT, M. S.; MARTINS, M. T.; ALBUQUERQUE, F. G. S.; BARRETO, F.; HOFF, R. High-throughput multiclass screening method for antibacterial residue analysis in meat using liquid chromatography-tandem mass spectrometry: a novel minimum sample preparation procedure. *Food Additives and Contaminants A*, v.19, p.1-9, 2011.

BLOSSER, T. H. Economic losses from and the national research program on mastitis in the Unites States. *Journal of Dairy Science*, v.62, n.1, p.119-124, 1979.

BLOWEY, R.; EDMONSON, P. *Mastitis control in dairy herds*. 2. ed. Londres: CAB International, 2010. 239p.

BOOTH, J. M.; HARDING, F. Testing for antibiotic residues in milk. *The Veterinary Record*, v.119, p.565-569, 1986.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa n.42, de 20 de dezembro de 1999. Altera o Plano Nacional de Controle de Resíduos em produtos de origem animal – PNCR e os Programas de Controle de Resíduos em Carne - PCRC, Mel - PCRM, Leite - PCRL e Pescado - PCRP. *Diário Oficial da União*, Brasília: 22 dez. 1999.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa N°62 de 21 de dezembro de 2011. Regulamento Técnico de Produção, Identidade e Qualidade do Leite Tipo A, do Leite Tipo B, do Leite Tipo C, do Leite Pasteurizado e do Leite Cru Refrigerado e o Regulamento Técnico da Coleta de Leite Cru Refrigerado e seu Transporte a Granel. *Diário Oficial da União*, Brasília, 30 dez. 2011a. Seção 1.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa N°48 de 28 de dezembro de 2011. Proíbe em todo o território nacional o uso em bovinos de corte produtos antiparasitários que contenham em sua formulação princípios ativos da classe das avermectinas. *Diário Oficial da União*, Brasília, 29 dez. 2011c. Seção 1.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. *Produtos Veterinários: orientações para o uso responsável*. Brasília: MAPA/SDA, 2008. 24p.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. *Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal* – RIISPOA. 1952. 154p.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução Nº7 de 18 de fevereiro de 2011. Dispõe sobre limites máximos tolerados (LMT) para micotoxinas em alimentos. *Diário Oficial da União*, Brasília, n.37, p.72, 22 fev. 2011b. Seção 1.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Diretoria Colegiada. Resolução RDC Nº53 de 02 de outubro de 2012. Dispõe sobre o Regulamento técnico MERCOSUL. *Diário Oficial da União*, Brasília, n.47, 03 out. 2012. Seção 1.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução RDC n.253, de 16 de setembro de 2003. Programa de Análise de Resíduos de Medicamentos Veterinários em Alimentos de Origem Animal - PAMVet. *Diário Oficial da União*, Brasília: 16 set. 2003.

BRITO, J. R. F.; PORTUGAL, J. A. B. *Diagnóstico da qualidade do leite, impacto para a indústria e a questão dos resíduos de antibióticos*. Juiz de Fora: Embrapa Gado de Leite, EPAMIG. 2003. 168p.

BRITO, M. A. V. P. *Resíduos de antimicrobianos no leite*. Juiz de Fora: Embrapa Gado de Leite, 2000. 28p.

BUENO, V. F. F.; MESQUITA, A. J.; OLIVEIRA, A. N.; NICOLAU, E. S.; NEVES, R. B. S. Total bacterial count: relationship to milk composition and period of the year in Goiás State, Brazil. *Revista Brasileira de Ciência Veterinária*, v.15, n.1, p.40-44, 2008.

BURGUESS, M. K.; HEGGUM, C.; WALKER, S.; SCHOTHORST, M. Recommendations for the hygienic manufacture of milk and milk based products. *Bulletin of the International Dairy Federation*, n.292, p.32, 1994.

CASIDA, J. E.; DURKIN, K. A. Neuroactive insecticides: targets, selectivity, resistance, and secondary effects. *Annual Review Entomology*, v.58, p.99-117, 2013.

CEPEA-ESALQ/USP. Centro de Estudos Avançados em Economia Aplicada – ESALQ/USP. *Leite: preços ao produtor*. Ano 2010-2011. Disponível em: <http://cepea.esalq.usp.br/leite/?page=155>, Acesso em 20 de dezembro de 2012.

CERQUEIRA, M. M. O. P.; SENA, M. J.; SOUZA, M. R.; LEITE, M. O.; PENNA, C. F. A. M. Avaliação da qualidade do leite estocado em tanque de imersão e expansão por 48 horas. *Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes*, v.54, n.304, p.251-254, 1999b.

CERQUEIRA, M. M. O. P.; SOUZA, M. R.; SENA, M. J.; LEITE, M. O.; PENNA, C. F. A. M. Fatores determinantes na qualidade do leite: estudo de uma indústria de laticínios. *Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes*, v.54, n.304, p.241-245, 1999a.

CHAMBERS, J. V. The microbiology of raw milk. In: ROBINSON, R.K. (Ed.). *Dairy Microbiology Handbook*. New York: Wiley-Interscience, 2002. p.39-90.

CHASSAGNE, M.; BARNOUIN, J.; LE GUENIC, M. Expert assessment study of milking and hygiene practices characterizing very low somatic cell score herds in France. *Journal of Dairy Science*, v.88, p.1090-1916, 2005.

CHINA, 2002. Regulation No. 235. *Establishment of maximum residue levels of veterinary medical products in foodstuffs of animal origin*, The Ministry of Agriculture, PR. Disponível em: <<http://www.fas.usda.gov/gainfiles/200809/146295851.pdf>>. Acesso em: 10 dez. 2011.

CODEX ALIMENTARIUS COMMISSION. *Maximum residue limits for veterinary drugs in food*. CAC/MRL, 02-2009. 36p.

CODEX ALIMENTARIUS, 2004. *Code of Hygienic Practice for Milk and Milk Products*. CAC/RCP, 57-2004. 49p.

COMMISSION REGULATION. Pharmacologically active substances and their classification regarding maximum residue limits in foodstuffs of animal origin. *Official Journal of the European Union*, Commission Regulation, n.37, 2010.

- COVELLO, V. T.; MUMPOWER, J. Risk analysis and risk management: an historical perspective. *Risk Analysis*, v.5, p.103-120, 1985.
- CREPPY, E. E. Update of survey, regulation and toxic effects of mycotoxins in Europe. *Toxicology Letters*, v.127, p.19-28, 2002.
- CULLOR, J. S. Milk antibiotic residue tests and veterinary practice. *Compendium on Continuing Education for the Practicing Veterinarian*, v.17, n.6, p.863-871, 1995.
- CULLOR, J. S. Tests for identifying antibiotic residues in milk: how well do they work? *Veterinary Medicine*, v.87, p.1235-1241, 1992.
- CUTTING, J. H.; KIESSLING, W. M.; BOND, F. L. Agarose gel electrophoretic detection of beta-lactam antibiotic residues in milk. *Journal of Association Official Analytical Chemists*, v.78, n.3, p.663-667, 1995.
- DUFOUR, S.; FRÉCHETTE, A.; BARKEMA, H. W.; MUSSELL, A.; SCHOLL, D. T. Invited review: effect of udder health management practices on herd somatic cell count. *Journal of Dairy Science*, v.94, n.2, p.563-579, 2011.
- DÜRR, J. W. Controle de qualidade e aumento da competitividade da indústria láctea. In: MARTINS, C. E. *Tendências e avanços do agronegócio do leite nas Américas: mais leite = mais saúde*. Juiz de Fora: Embrapa Gado de Leite, 2006. cap.7, p.81-96.
- ELMOSLEMANY, A. M.; KEEFE, G. P.; DOHOO, I. R.; WICHTEL, J. J.; STRYHN, H.; DINGWELL, R. T. The association between bulk tank milk analysis for raw milk quality and on-farm management practices. *Preventive Veterinary Medicine*, v.95, p.32-40, 2010.
- EMBRAPA. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – EMBRAPA Gado de Leite. *Panorama do leite*, ano 6, n.75, 2013. 12p.
- EMEA. *Antibiotic resistance in the European Union associated with therapeutic use of veterinary medicines* – report and qualitative risk assessment by the Committee for Veterinary Medicinal Products. The European Agency for the Evaluation of Medicinal Products, United

Kingdom, 1999. Disponível em: <<http://www.eudra.org/emea.html>>. Acesso em: 05 fev. 2011.

EUROPEAN COMMISSION. Commission Regulation (EU) No 37/2010 of 22 December 2009 on pharmacologically active substances and their classification regarding maximum residue limits in foodstuffs of animal origin. *Official Journal of the European Communities* L15. 2010.

FAGUNDES, C. M. *Inibidores e controle de qualidade do leite*. Pelotas: Ed. da UFPEL, 1997. 128p.

FAO. Food and Agriculture Organization of the United Nations. International Programme on Chemical Safety (IPCS). *Environmental Health Criteria, 240. Principles and Methods for the Risk Assessment of Chemicals in Food*. FAO/WHO, 2009.

FAO/IDF. Food and Agriculture Organization of the United Nations. International Dairy Federation. *Guide to good dairy farming practice*. Animal Production and Health Guidelines, Rome, Italy, 2004. 34p.

FAO/IDF. Food and Agriculture Organization of the United Nations. International Dairy Federation. *Guide to good dairy farming practice*. Animal Production and Health Guidelines, Rome, Italy, n. 8, 2011. 50p.

FAO/WHO. *Compendium of methods of analysis is identified as suitable to support codex MRLs*. 2011. Disponível em: <http://www.codexalimentarius.net/vetdrugs/data/MAS-RVDF_2006_e.pdf>. Acesso em: 24 dez. 2011.

FARRELL, H. M.; JIMENEZ-FLORES, R.; BLECK, G. T.; BROWN, E. M.; BUTLER, J. E.; CREAMER, L. K.; HICKS, C. L.; HOLLAR, C. M.; NG-KWAI-HANG, K. F.; SWAISGOOD, H. E. Nomenclature of the proteins of cow's milk – sixth revision. *Journal of Dairy Science*, v.87, p.1641-1674, 2004.

FDA MRL DATABASE, 2011. *International Maximum Residue Level Database*. Disponível em: <<http://www.mrldatabase.com/>>. Acesso em: 26 out. 2011.

FERREIRA, L. M.; NADER FILHO, A.; OLIVEIRA, E.; ZAFALON, L.F.; SOUZA, V. Variabilidade fenotípica e genotípica de estirpes de *Staphylococcus aureus* isoladas em casos de mastite subclínica bovina. *Ciência Rural*, v.36, p.1228-1234, 2006.

FINNEY, D. J. *Statistics for biologists*. London; New York: Chapman & Hall, 1980. 168p.

FOLLY, M. M.; UÉBE, P. M.; TEIXEIRA, G. N.; LESSA, S. S.; CARLOS, L. A.; MARTINS, M. L. L. Determinação de resíduos do antibiótico cloxacilina em leite de vacas com elevada contagem de células somáticas. *Jornal Brasileiro de Ciência Animal*, v.1, n.1, p.13-24, 2008.

FONSECA, L. F. L.; SANTOS, M.V. *Qualidade do Leite e controle da mastite*. São Paulo: Lemos, 2000. 175p.

FREITAS, C. M. *Riscos e processos decisórios: implicações para a vigilância sanitária*. In: Seminário Temático da ANVISA: as várias faces do conceito de risco em vigilância sanitária, 2009. Brasília: DF. Disponível em: <http://anvisa.gov.br/institucional/snvs/coprh/seminario/Riscos_processos.pdf>. Acesso em: 16 abr. 2011.

GLOBALGAP. *Control points and compliance criteria integrated farm assurance: dairy with traceable changes*. v. 3-4, abr. 2010. Disponível em: <http://www1.globalgap.org/cms/upload/The_Standard/IFA/Version_4_2011/English/CPCC/101007_GG_IFA_CPCC_AF_ENG_Interim_Final_V4.pdf>. Acesso em: 08 jan. 2011.

GLOBALGAP. *Integrated farm assurance – all farm base – livestock base – ruminant base – dairy: control points and compliance criteria*. English version 4.0, edition 4.0-1_feb 2012. Disponível em: <http://www.globalgap.org/uk_en/for-producers/livestock/DY/>. Acesso em: 22 abr. 2013.

GOLDBERG, J. J.; WILDMAN, E. E.; PANKEY, J. W.; KUNKEL, J. R.; HOWARD, D. B.; MURPHY, B. M. The influence of intensively managed rotational grazing, traditional continuous grazing, and

confinement housing on bulk milk tank quality and udder health. *Journal of Dairy Science*, v.75, p.96-104, 1992.

GOMES, D. M. *Resíduos de antibióticos promotores de crescimento em produtos de origem animal*. 2004. 78f. Monografia (Especialização) – Universidade de Brasília, Brasília, 2004.

GONZÁLEZ, F. D.; PINTO, A. T.; ZANELA, M. B.; FISCHER, V.; BONDAN, C. *Qualidade do leite bovino: variações no trópico e no subtropico*. Passo Fundo: Ed. da UPF, 2011. 190p.

GORNI, R.; CABRINI, S. *Dificuldades e demandas da indústria sobre testes para detecção de resíduos de antibióticos em leite*. In: BRITO, J. R. F. (Ed.). *Diagnóstico da qualidade do leite, impacto para a indústria e a questão dos resíduos de antibióticos*. Juiz de Fora: Embrapa Gado de Leite, 2003. cap.9, p.97-102.

HAAS, C. N.; ROSE, J. B.; GERBA, C. P. *Quantitative microbial risk assessment*. New York: John Wiley & Sons, 1999.

HARDING, F. *Milk quality*. London: Blackie Academic & Professional, 1995. 166p.

HEALTH CANADA. *Administrative Maximum Residue Limits (AMRLS) and Maximum Residue Limits (MRLS) set by Canada*. 2011. Disponível em: <http://www.hc-sc.gc.ca/dhp-mps/vet/mrl-lmr/mrl-lmr_versus_new-nouveau-eng.php>. Acesso em: 11 dez. 2011.

HERNANDES, T.; GOULART, M. A.; DORES, E. F. G. C.; PRADO, M.; MALM, O. Manejo sanitário do rebanho leiteiro e resíduos de inseticidas Piretróides em leite de vaca produzido no município de Chapada dos Guimarães, Brasil. *Acta Scientiae Veterinariae*, v.37, n.2, p.171-176, 2009.

HESHMATI, A.; MILANI, J. M. Contamination of UHT milk by aflatoxin M₁ in Iran. *Food Control*, v.21, p.19-22, 2010.

HOE, F. G. H.; RUEGG, P. L. Opinions and practices of Wisconsin producers about biosecurity and animal well-being. *Journal of Dairy Science*, v.89, p.2297-2308, 2006.

HOFF, R. B.; BARRETO, F.; KIST, T. B. L. Use of capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence detection to screen and liquid chromatography–tandem mass spectrometry to confirm sulfonamide residues: Validation according to European Union 2002/657/EC. *Journal of Chromatography A*, v.1216, p.8254–8261, 2009.

HONG, C. C.; KONDA, F. Simultaneous determination and identification of penicillin residues by high-performance liquid chromatographics analysis. *Journal of Food Protection*, v.60, n.8, p.1006-1009, 1997.

HUSSAIN, I.; ANWAR, J. A study on contamination of aflatoxin M₁ in raw milk in the Punjab province of Pakistan. *Food Control*, v.19, p.393-395, 2008.

IARC. International Agency for Research for Cancer. *Some traditional herbal medicines, some mycotoxins, naphthalene and styrene: evaluation of carcinogenic risk to humans*. Lyon, v.82, 2002.

IBARRA, I. S.; RODRIGUEZ, J. A.; MIRANDA, J. M.; VEGA, M.; BARRADO, E. Magnetic solid phase extraction based on phenyl silica adsorbent for the determination of tetracyclines in milk samples by capillary electrophoresis. *Journal of Cromatography A*, v.1218, p.2196-2202, 2011.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Estatísticas Lácteas. *Pesquisa Pecuária Municipal / IBGE*. 2011. Disponível em: <<http://www.milkpoint.com.br/mercado/estatisticas/estatisticas-lacteas-71231n.aspx>>. Acesso em: 01 maio 2011.

IDF. International Dairy Federation. Current situation and compilation of commercially available screening methods for the detection of inhibitors/antibiotic residues in milk. *Bulletin of the International Dairy Federation*. Bruxelas, Bélgica, n.442, 2010. 164p.

IDF. International Dairy Federation. *Guide to prudent use of antimicrobial agents in dairy production*. Bruxelas, Bélgica, 2013. 56p.

IDF. International Dairy Federation. *Milk: enumeration of somatic cell*. Bruchelas, Bélgica: IDF/FIL, 1995. 8p. (IDF Standard, 148A).

IDF. International Dairy Federation. Whole milk - Determination of milkfat, protein & lactose content - *Guide for the operation of mid-infra-red instruments*. Bruxelas, Bélgica, 2000. 12p. (IDF Standard, 141C).

JANK, L.; HOFF, R. B.; TAROUCO, P. C.; BARRETO, F.; PIZZOLATO, T. M. β -lactam antibacterials residues analysis in bovine milk by LC-ESI-MS/MS: a simple and fast liquid-liquid extraction method. *Food Additives and Contaminants A*, v.12, p.1-11, 2011.

JAPAN FOOD CHEMICAL RESEARCH FOUNDATION, 2011. *Table of MRLs in Foods*. Disponível em: <http://m5.ws001.squarestart.ne.jp/foundation/fooddtl.php?f_inq=17600>. Acesso em: 26 out. 2011.

JAY, J. M. *Modern Food Microbiology*. 4. ed. Nova Iorque: Chapman & Hall, 1992.

JAYARAO, B. M.; PILLAI, S. R.; SAWANT, A. A.; WOLFGANG, D. R.; HEGDE, N. V. Guidelines for monitoring bulk tank milk somatic cell and bacterial counts. *Journal of Dairy Science*, v.87, p.3561-3573, 2004.

JOHNSON, M. E.; MARTIN, J. H., BAKER, R. J., PARSONS, J. G. A comparison of several assay procedures to detect penicillin residues in milk. *Journal Food Protection*, v.40, n.11, p.785-788, 1977.

KAMKAR, A. A study on the occurrence of aflatoxin M₁ in raw milk produced in Sarab city of Iran. *Food Control*, v.16, p.593-599, 2005.

KANG'ETHE, E. K.; ABOGE, G. O.; ARIMI, S. M.; KANJA, L. W.; OMORE, A. O.; MCDERMOTT, J. J. Investigation of the risk of consuming marketed milk with antimicrobial residues in Kenya. *Food Control*, v.16, n.4, p.349-355, 2005.

KITCHEN, B. J. Reviews of the progress of dairy science: milk compositional changes and related diagnostic tests. *Journal of Dairy Research*, v.48, n.1, p.167-188, 1981.

LAZARINI, C. A.; FLORIO, J. C.; LEMONICA, I. P.; BERNARDI, M. M. Effects of prenatal exposure to deltamethrin on forced swimming

behavior, motor activity, and striatal dopamine levels in male and female rats. *Neurotoxicol Teratology*, v.23, n.6, p.665-73, 2001.

LE ROUX, Y.; LAURENT, F.; MOUSSAOUI, F. Polymorphonuclear proteolytic activity and milk composition change. *Veterinary Research*, v.34, p.629-645, 2003.

LEAL, A. T.; FREITAS, D. R. J.; VAZ Jr., I. S. Perspectivas para o controle do carrapato bovino. *Acta Scientiae Veterinariae*, v.31, n.1, p.1-11, 2003.

LINS, E. S.; CONCEIÇÃO E. S.; MAURICIO, A. Q. Evolution of a residue laboratory network and the management tools for monitoring its performance. *Food Additives and Contaminants A*, v.29, n.4, p.490-496, 2012.

LOPEZ, C.; RAMOS, L.; RAMADÁN, S.; BULACIO, L.; PEREZ, J. Distribution of aflatoxin M₁ in cheese obtained from milk artificially contaminated. *International Journal of Food Microbiology*, v.64, p.211-215, 2001.

MARTÍNEZ-MARTÍNEZ, L.; CALVO, J. Desarrollo de las resistencias a los antibióticos: causas, consecuencias y su importancia para la salud pública. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, v.28, n.4, p.4-9, 2010.

MARTINS JÚNIOR, H. A.; BUSTILLOS, O. Y.; PIRES, M. A. F. Determinação de resíduos de cloranfenicol em amostras de leite e mel industrializados utilizando a técnica de espectrometria de massas em “tandem” (CLAE-EM/EM). *Quimica Nova*, v.29, n.03, p.586-592, 2006.

MARTINS, J. R. Manejo da resistência aos carrapaticidas. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, v.13, supl. 1, 2004.

McCLUSKEY, J. J.; WINFREE, J. A. Pre-empting public regulation with private food quality Standards. *European Review of Agricultural Economics*, v.36, n.4, p.525-539, 2009.

McEWEN, S. A.; BLACK, W. D.; MEEK, A. H. Antibiotic residue prevention methods, farm management, and occurrence of antibiotic residues in milk. *Journal of Dairy Science*. v.74, p.2128-2137, 1991.

MEEK, M. E. B.; BOOBIS, A. R.; CROFTON, K. M.; HEINEMEYER, G.; RAAIJ, M. V.; VICKERS, C. Risk assessment of combined exposure to multiple chemicals: a WHO/IPCS framework. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, v.60, n.2, p.S1-S14, 2011.

MENDES, M. C.; LIMA, C. K. P.; PRADO, A. P. Determinação da frequência de realização de bioensaios para o monitoramento da resistência do carrapato *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae). *Arquivos do Instituto Biológico*, v.74, n.2, p.87-93, 2007.

MENÉNDEZ-GONZÁLEZ, S.; HARTNACK, S.; BERGER, T.; DOHERR, M.; BREIDENBACH, E. A qualitative risk assessment approach for Swiss dairy products: opportunities and limitations. *Zoonoses and Public Health*, v.58, n.3, p. 209-219, 2011.

MEPHAN, T. B. The development of ideas on the role of glucose in regulating milk secretion. *Australian Journal of Agricultural Research*, v.44, n.3, p.509-522, 1993.

MITCHELL, J. M.; GRIFFITHS, M. W.; MCEWEN, S. A.; MCNAB, W. B.; YEE, A. J. Antimicrobial drug residues in milk and meat: causes, concerns, prevalence, regulations, tests and test performance. *Journal of Food Protection*, v.61, n.6, p.742-756, 1998.

MORSE, D.; DELORENZO, M. A.; WILCOX, C. J.; COLLIER, R. J.; NATZKE, R. P.; BRAY, D. R. Climatic effects on occurrence of clinical mastitis. *Journal of Dairy Science*, v.71, p.848-853, 1988.

NAGATA, T.; OKA, H. Detection of residual chloramphenicol, florfenicol and thiamphenicol in yellowtail fish muscles by capillary gas chromatography mass spectrometry. *Journal Agricultural Food Chemistry*, v.44, n.5, p.1280-1284, 1996.

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.

NEBOT, C.; IGLESIAS, A.; REGAL, P.; MIRANDA, J.; CEPEDA, A.; FENTE, C. Development of a multi-class method for the identification and quantification of residues of antibacterials, coccidiostats and

corticosteroids in milk by liquid chromatography tandem mass spectrometry. *International Dairy Journal*, v.22, p.78-85, 2012.

NEMATI, M.; MEHRAN, M. A.; HAMED, P. K.; MASOUD, A. A survey on the occurrence of aflatoxin M₁ in milk samples in Ardabil, Iran. *Food Control*, v.21, p.1022-1024, 2010.

NERO, L. A.; MATTOS, M. R.; BELOTI, V.; BARROS, M. A. F.; PINTO, J. P. A. N.; ANDRADE, N. J.; SILVA, W. P.; FRANCO, B. D. G. M. Leite cru de quatro regiões leiteiras brasileiras: perspectivas de atendimento dos requisitos microbiológicos estabelecidos pela Instrução Normativa 51. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v.25, n.1, p.191-195, 2005.

NERO, L. A.; MATTOS, M. R.; BELOTI, V.; BARROS, M. A. F.; NETTO, D. P.; PINTO, J. P. A. N.; ANDRADE, N. J.; SILVA, W. P.; FRANCO, B. D. G. M. Hazards in non-pasteurized milk on retail sale in Brazil: prevalence of *Salmonella* spp, *Listeria monocytogenes* and chemical residues. *Brazilian Journal of Microbiology*, v.35, p.211-215, 2004.

NERO, L. A.; VIÇOSA, G. N.; PEREIRA, F. E. V. Qualidade microbiológica do leite determinada por características de produção. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v.29, n.2, p.386-390, 2009.

NOAL, R. M. C. *Ações de melhoria contínua para incrementar a qualidade e produtividade na cadeia do leite*. 2006. 199f. Dissertação (Mestrado)- Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2006.

NÓBREGA, D. B.; LANGONI, H. Breed and season influence on milk quality parameters and in mastitis occurrence. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v.31, n.12, p.1045-1052, 2011.

NORO, G.; GONZÁLEZ, F. H. D.; CAMPOS, R.; DÜRR, J. W. Fatores ambientais que afetam a produção e a composição do leite em rebanhos assistidos por cooperativas no Rio Grande do Sul. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v.35, p.1129-1135, 2006.

O'BRIEN, M. *Making Better Environmental Decisions: an alternative to risk assessment*. Massachusetts: MIT Press, 2000.

OGOLA, H.; SHITANDI, A.; NANUA, J. Effect of mastitis on raw milk compositional quality. *Journal of Veterinary Science*, v.8, p.237-242, 2007.

O'KEEFFE, M.; KENNEDY, O. Residues – A Food Safety Problem? *Journal of Food Safety*, v.18, n.4, p.297-319, 2007.

OLDE-RIEKERINK, R. G. M.; BARKEMA, H. W.; STRYHN, H. The effect of season on somatic cell count and the influence of clinical mastitis. *Journal of Dairy Science*, v.90, n.4, p.1704-1715, 2007.

OLDE-RIEKERINK, R. G.; BARKEMA, H. W.; VEENSTRA, W.; BERG, F. E.; STRYHN, H.; ZADOKS, R. N. Somatic cell count during and between milkings. *Journal of Dairy Science*, v.90, p.3733-3741, 2007.

OLIVEIRA, C. J.; LOPES-JÚNIOR, W. D.; QUEIROGA, R. C.; GIVISIEZ, P. E.; AZEVEDO, P. S.; PEREIRA, W. E.; GEBREYES, W. A. Risk factors associated with selected indicators of milk quality in semiarid northeastern Brazil. *Journal of Dairy Science*, v.94, p.3166-3175, 2011.

ÖNAL, A. Overview on liquid chromatographic analysis of tetracycline residues in food matrices. *Food Chemistry*, v.127, n.1, p.197-203, 2011.

OPAS. Organização Pan-Americana da Saúde. *Perspectiva sobre a análise de risco na segurança dos alimentos: curso de sensibilização*. Rio de Janeiro: ANVISA. 2008. 155p.

PAIGE, J. C.; TOLLEFSON, L.; MILLER, M. A. Health implications of residues of veterinary drugs and chemicals in animal tissues. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, v.15, p.31-43, 1999.

PANTOJA, J. C. F.; REINEMANN, D. J.; RUEGG, P. L. Associations among milk quality indicators in raw milk bulk tank. *Journal of Dairy Science*, v.92, p.4978-4987, 2009.

PERES, G. T.; AIROLDI, F. P. S.; REYES, F. P. R. Medicamentos veterinários e a apicultura: aspectos comerciais, regulatórios e de saúde

do consumidor. *Revista Brasileira de Toxicologia*, v.20, n.1/2, p.13-19, 2007.

PÉREZ, J. J.; LEÓN, S. V.; GUTIÉRREZ, R.; LÓPEZ, Y.; FAURE, R.; ESCOBAR, A. Polychlorinated biphenyls (PCBs) residues in milk from an agroindustrial zone of Tuxpan, Veracruz, Mexico. *Chemosphere*, v.89, n.4, p.404-408, 2012.

PHILIPS, C. J. C. Adverse effects on reproductive performance and lameness of feeding grazing dairy cows partially on silage indoors. *Journal of Agricultural Science*, v.115, p.253-258, 1990.

PIETRI, A.; BERTUZZI, T.; BERTUZZI, P.; PIVA, G. Aflatoxin M₁ occurrence in samples of Grana Padano cheese. *Food additives and contaminants*, v.14, p.341-344, 1997.

POLITIS, I.; NG-KWAI-HANG, K. F. Effects of somatic cell count and milk composition on cheese composition and cheese making efficiency. *Journal of Dairy Science*, v.71, n.7, p.1711-1719, 1988.

PONTES-NETTO, D.; LOPES, M. O.; OLIVEIRA, M. C. S.; NUNES, M. P.; JUNIOR, M. M.; BOSQUIROLI, S. L.; BENATTO, A.; BENINI, A.; BOMBARDELLI, A. L. C.; FILHO, D. V.; MACHADO, E.; BELMONTE, I. L.; ALBERTON, M.; PEDROSO, P. P.; SCUCATO, E. S. Levantamento dos principais fármacos utilizados no rebanho leiteiro do Estado do Paraná. *Acta Scientiarum Sciences*, v. 27, n.1, p.145-151, 2005.

ROCA, M.; VILLEGAS, L.; KORTABITARTE, M. L.; ALTHAUS, R. L.; MOLINA, M. P. Effect of heat treatments on stability of β -lactams in milk. *Journal of Dairy Science*, v.94, n.3, p.1155-1164, 2011.

ROCHA, C. M.; BRUHN, F. R.; LEITE, R. C.; GUIMARÃES, A. M.; SAMPAIO, I. B.; OLIVEIRA, P. R. Principal component analysis on the perceptions of milk producers about *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* control in Minas Gerais. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, v.21, n.3, p.224-231, 2012.

RODRIGUES, A. C. O.; CARAVIELLO, D. Z.; RUEGG, P. L. Management of Wisconsin dairy herds enrolled in milk teams. *Journal of Dairy Science*, v.88, p.2660-2671, 2005.

RODRÍGUEZ, L. D.; ROMO, M. A.; CALONGE, M. C.; PEÑA, S. T. Uso prudente de antimicrobianos y propuestas de mejora em veterinaria. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, v.28, n.4, p.40-44, 2010.

RUANGWISES, N.; RUNGWISES, S. Aflatoxin M₁ Contamination in Raw Milk within the Central Region of Thailand. *Bulletin Environmental Contamination Toxicological*, v.85, p.195-198, 2010.

RÜBENSAM, G.; BARRETO, F.; HOFF, R. B.; KIST, T. L.; PIZZOLATO, T. M. A liquid-liquid extraction procedure followed by a low temperature purification step for the analysis of macrocyclic lactones in milk by liquid chromatography-tandem mass spectrometry and fluorescence detection. *Analytica Chimica Acta*, v.705, p.24-29, 2011.

RÜBENSAM, G.; BARRETO, F.; HOFF, R. B.; PIZZOLATO, T. M. Determination of avermectin and milbemycin residues in bovine muscle by liquid chromatography-tandem mass spectrometry and fluorescence detection using solvent extraction and low temperature cleanup. *Food Control*, v.29, p.55-60, 2013.

RUEGG, P. L. Practical food safety interventions for dairy production. *Journal of Dairy Science*, v.86, p.1-9, 2003.

RUEGG, P. L.; TABONE, T. J. The relationship between antibiotic residue violations and somatic cell count in Wisconsin dairy herds. *Journal of Dairy Science*, v.83, p.2805-2809, 2000.

SADIA, A.; JABBAR, M. A.; DENG, Y.; HUSSAIN, E. A.; RIFFAT, S.; NAVEED, S.; ARIF, M. A survey of aflatoxin M₁ in milk and sweets of Punjab, Pakistan. *Food Control*, v.26, p.235-240, 2012.

SANCO, EU Pesticides Database. 2008. Disponível em: <http://ec.europa.eu/sanco_pesticides/public/index.cfm?event=substance_selection>. Acesso em: 20 mar. 2011.

SANTOS, E. C.; RODRIGUES, R.; RUBINICH, J. *Causas de variação da produção e composição do leite*. Belo Horizonte: Escola de Veterinária da UFMG, 1989. 26p.

SANTOS, M. V.; FONSECA, L. F. L. *Estratégias para controle de mastite e melhoria da qualidade do leite*. Barueri: Manole, 2007. 314p.

SAWANT, A.; SORDILLO, L.; JAYARAO, B. A survey on antibiotic usage in dairy herds in Pennsylvania. *Journal of Dairy Science*, v.88, p.2991-2999. 2005.

SCHÄELLIBAUM, M. Efeitos de altas contagens de células somáticas sobre a produção e qualidade de queijos. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL SOBRE QUALIDADE DO LEITE, 2.; ENCONTRO ANUAL DO CONSELHO BRASILEIRO DE QUALIDADE DO LEITE, 1., 08-11 nov. 2000, Curitiba. *Anais...* Curitiba: Ed. da UFP, 2000a. p.21-26.

SCHÄELLIBAUM, M. Resíduos de antibióticos no leite. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL SOBRE QUALIDADE DO LEITE, 2.; ENCONTRO ANUAL DO CONSELHO BRASILEIRO DE QUALIDADE DO LEITE, 1., 08-11 nov. 2000, Curitiba. *Anais...* Curitiba: Ed. Da UFP, 2000b. p.89-94.

SCHREINER D. A.; RUEGG, P. L. Effects of tail docking on milk quality and cow cleanliness. *Journal of Dairy Science*, v.85, p.2503-2511, 2002.

SCHREINER D. A.; RUEGG, P. L. Relationship between udder and leg hygiene scores and subclinical mastitis. *Journal of Dairy Science*, v.86, p.3460-3465, 2003.

SHAIKH, B. Analytical methods for the determination of veterinary drug residues in food products of animal origin. *Journal of AOAC International*, v.94, n.2, p.359, 2011.

SHERIDAN, R.; POLICASTRO, B.; THOMAS, S.; RICE, D. Analysis and occurrence of the 14 sulfonamide antibacterials and chloranphenicol in honey by solid-phase extraction followed by LC/MS/MS analysis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.56, p.3509-3516, 2008.

SHITANDI, A.; KIHUMBU, G. Development and evaluation of a risk assessment tool for control of antimicrobial drug residues in milk. *Journal of Food Safety*, v.24, n.3, p.195-210, 2004.

SHRYOCK, T. R.; RICHWINE, A. The interface between veterinary and human antibiotic use. *Annals of the New York Academy of Sciences*, v.1213, p.92-105, 2010.

SHUSTER, D. E.; HARMON, R. J.; JACKSON, J. A.; HEMKEN, R. W. Suppression of milk production during endotoxin-induced mastitis. *Journal of Dairy Science*, v.74, n.11, p.3763-3774, 1991.

SIMGE, Sistema de Meteorologia e Recursos Hídricos de Minas Gerais. (2012). *Base de Dados Meteorológicos e Hidrológicos*. Disponível em: <http://www.simge.mg.gov.br/base_dados/index.html>. Acesso em: 18 jul. 2012.

SINDAN. Sindicato Nacional da Indústria de Produtos para a Saúde Animal., 2011. *Mercado veterinário no Brasil*. Disponível em: <<http://www.sindan.org.br/sd/sindan/index.html>>. Acesso em: 09 jul. 2012.

SMITH, L. K.; HOGAN, J. S. Milk quality – a worldwide perspective. In: NATIONAL MASTITIS COUNCIL ANNUAL MEETING, 37., St. Louis, MO, 1998. *Proceedings...* St. Louis, MO: National Mastitis Council (NMC), 1998. p.3-9.

SOUZA, S. V. C.; SILVA, G.; DINIZ, M. H. G. M.; SANTOS, E. V.; LIMA, J. A.; TEODORO, J. C. Determinação de resíduos de nitrofurazona, furazolidona e nicarbazina em tecidos de origem animal. *Revista Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v.21, n.1, p.34-38, 2001.

SOUZA, S. V. C.; VARGAS, E. A.; JUNQUEIRA, R. G. Eficiência de um kit de ELISA na detecção e quantificação de aflatoxina M₁ em leite e investigação da ocorrência no estado de Minas Gerais. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v.19, n.3, 1999.

SPINOSA, H. S.; GÓRNIAC, S. L.; BERNARDI, M. M. *Farmacologia aplicada à Medicina Veterinária*. 4Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006. 898p.

STANKER, L. H.; BUCKLEY, S.; MULDOON, M. A. Monoclonal antibody-based immunoassay for the detection of ceftiofur in milk. *Food Agricultural Immunology*, v.10, n.2, p.121-131, 1998.

STERNESJO, A.; MELLGREN, C.; BJORCK, L. Determination of sulfamethazine residues in milk by a surface-plasmon resonance-based biosensor assay. *Analytical Biochemistry*, v. 226, n.1, p.175-181, 1995.

STOLKER, A. A. M.; BRINKMAN, U. A. T. Analytical strategies for residue analysis of veterinary drugs and growth-promoting agents in food-producing animals – a review. *Journal of Chromatography A*, v.1076, p.15-53, 2005.

STUART, M.; LAPWORTH, D.; CRANE, E.; HART, A. Review of risk from potential emerging contaminants in UK groundwater. *Science of the Total Environment*, v.416, p.1-21, 2012.

TAJKARIMI, M.; ALIABADI-SH, F.; SALAH NEJAD, A.; POURSOLTANI, H.; MOTALLEBI, A. A.; MAHDAVI, H. Aflatoxin M₁ contamination in winter and summer milk in 14 states in Iran. *Food Control*, v.19, p.1033-1036, 2008.

TEUBER, M. Microbiological problems facing the dairy industry. *Bulletin of the International Dairy Federation*, v.276, p.6-9, 1992.

TOALDO, I. M.; GAMBA, G. Z.; PICININ, L. A.; RUBENSAM, G.; HOFF, R.; BORDIGNON-LUIZ, M. Multiclass analysis of antibacterial residues in milk using RP-liquid chromatography with photodiode array and fluorescence detection and tandem mass spectrometer confirmation. *Talanta*, v.99, p.616-624, 2012.

TORRE, A.; IGLESIAS, I.; CARBALLO, M.; RAMÍREZ, P.; MUÑOZ, M. J. An approach for mapping the vulnerability of European Union soils to antibiotic contamination. *Science of the Total Environment*, v.414, p.672-679, 2012.

TRONCO, V. M. *Manual para inspeção da qualidade do leite*. Santa Maria: Ed. da UFSM, 2008. 206p.

TURCONI, G.; GUARCELLO, M.; LIVIERI, C.; COMIZZOLI, S.; MACCARINI, L.; CASTELLAZZI, A. M.; PIETRI, A.; PIVA, G.; ROGGI, C. Evaluation of xenobiotics in human Milk and ingestion by the newborn-na epidemiological survey in Lombardy (Northern Italy). *The European Journal of Nutrition*, v.43, p.191-197, 2004.

VALEEVA, N. I.; MEUWISSEN, M. P. M.; BERGEVOET, R. H. M.; LANSINK, A. O.; HUIRNE, R. B. M. Improving Food Safety at the Dairy Farm Level: Farmers' and Experts' Perceptions. *Review of Agricultural Economics*, v.27, n.4, p.574-592, 2011.

VALTORTA, S. E.; GALLARDO, M. R. Evaporative cooling for Holstein dairy cows under grazing conditions. *International Journal of Biometeorological*, v.48, p.213-217, 2004.

VAN SCHAİK, G.; LOTEM, M.; SCHUKKEN, Y. H. Trends in somatic cells counts, bacterial counts, and antibiotic residue violations in New York State during 1999-2000. *Journal of Dairy Science*, v.85, n.4, p.782-789, 2002.

VÁSQUEZ, J. F.; OLIVERA, M. Residuos de β -lactámicos en leche cruda y factores asociados a su presentación. *Revista U.D.C.A. Actualidad & Divulgación científica*, v.15, n.1, p.157-165, 2012.

VELTHUIS, A. G. J. Process audits versus product quality monitoring of bulk milk. *Journal of dairy science*, v.94, n.1, p.235-249, 2011.

VOYSEY, P. A.; BROWN, M. Microbiological risk assessment: a new approach to food safety control. *International Journal of Food Microbiology*, v.58, n.3, p.173-179, 2000.

WEAVER, L. D. Antibiotic residues in milk and meat: perceptions and realities. *Veterinary Medicine*, v.87, n.12, p.1222-1228, 1992.

WEST, J. W. Effects of heat-stress on production in dairy cattle. *Journal of Dairy Science*, v.86, p.2131-2144, 2003.

WHITE, S. L.; BENSON, G. A.; WASHBURN, S. P.; GREEN-JUNIOR, J. T. Milk production and economic measures in confinement or pasture systems using seasonally calved Holstein and Jersey cows. *Journal of Dairy Science*, v.85, p.95-104, 2002.

WOLANSKY, M. J.; HARRILL, J. A. Neurobehavioral toxicology of pyrethroid insecticides in adult animals: a critical review. *Neurotoxicol Teratology*, v.2, p.55-78, 2008.

YOUNG, I.; HENDRICK, S.; PARKER, S.; RAJIĆ, A.; McCLURE, J. T.; SANCHEZ, J.; McEWEN, S. A. Knowledge and attitudes towards food safety among Canadian dairy producers. *Preventive Veterinary Medicine*, v.94, n.1-2, p.65-76, 2010b.

YOUNG, I.; RAJIC, A.; HENDRICK, S.; PARKER, S.; SANCHEZ, J.; McCLURE, J. T.; McEWEN, S. A. Attitudes towards the Canadian quality milk program and use of good production practices among Canadian dairy producers. *Preventive Veterinary Medicine*, v.94, p.43-53, 2010a.

ZACHOS, T.; POLITIS, I.; GOREWIT, R. C. Effects of mastitis on plasminogen activator activity of milk somatic cells. *Journal of Dairy Research*, v.59, n.4, p.461-467, 1992.

ZAFALON, L. F.; LANGONI, H.; BENVENUTTO, F.; CASTELANI, L.; BROCCOLO, C. R. Aspectos epidemiológicos da mastite bovina causada por *Staphylococcus aureus*. *Veterinária e Zootecnia*, v.15, n.1, p.56-65, 2008.

ANEXO A – LISTA DE VERIFICAÇÃO PADRÃO*

Identificação/código da propriedade:			Últimos resultados obtidos:			
Município/UF:			CCS	Horários ordenhas:		
Volume de leite diário:			CBT			
Dados de georreferenciamento:			G			
Número de animais em lactação/total:			P			
Atividade de sustento da família? () Sim () Não			EST	Genética rebanho:		
O proprietário trabalha na propriedade? () Sim () Não			ESD			
Data: ____/____/____ Horário: ____:____			Água		Resíduos	
Observações:						
CATEGORIAS	Cod.	Variáveis avaliadas	C	NC	NSA	Observações
SANIDADE ANIMAL	1	Fazenda/unidade possui registro legal				
	2	O gado que dá entrada na unidade passa por quarentena mínima de 90 dias				
	3	São obtidos e mantidos os registros sanitários dos animais adquiridos para controle de doenças				
	4	São criados, regularmente preenchidos e mantidos os registros de movimentação dos animais				
	5	Os procedimentos são rastreáveis				
	6	É realizada identificação dos animais com retroatividade desde nascimento (rastreabilidade)				
	7	Mínimo de 4 inspeções veterinárias são realizadas ao ano (com intervalo mínimo de 3 meses)				
	8	Programas sanitários (tratamento de cascos, prevenção de mastite, vacinação e programas de vermifugação etc)				
	9	Preenchidos e mantidos os registros de monitoramento de saúde do rebanho				

* Adaptada a partir de FAO/IDF (2004), GlobalIGAP (2010) e Brasil (2008)

CATEGORIAS	Cod.	Variáveis avaliadas	C	NC	NSA	Observações
	10	Unidade com programas de prevenção e controle de zoonoses ativos				
	11	Curral hospitalar: separa animais enfermos, bom acesso para tratamento, iluminação, paredes laváveis (> 2 metros)				
CONFORMIDADE SANITÁRIA (%)	n = 11	Fórmula: itens 1 a 11 -- % SANIDADE = [(C) / (C + NC) * 100]				
CONTROLE DE RESÍDUOS E CONTAMINANTES	12	Drogas aprovadas para uso em vacas em lactação				
	13	Identificação dos animais em tratamento				
	14	Tratamento anotado/registrado				
	15	Arquivamento de históricos e registros de tratamentos				
	16	Vacas em lactação tratadas são ordenhadas separadamente das não tratadas				
	17	O leite das vacas em tratamento é separado e descartado				
	18	É realizado tratamento de vaca seca				
	19	Há registro de tratamento individual de vacas secas				
	20	Os funcionários sabem o que é período de carência				
	21	Há conhecimento do período de carência de cada medicamento utilizado				
	22	Existe ficha de previsão para os partos				
	23	Data prevista de parto e tempo de carência dos tratamentos de vaca seca são cruzados e respeitados				
	24	As vacas secas em tratamento são identificadas				
	25	Todos os animais em tratamento possuem registros individuais				
	26	Existe controle individual para mastite				
	27	Só se utilizam produtos prescritos por médicos veterinários				
	28	Venda dos animais com rastreabilidade e informações dos tratamentos realizados (registros acompanham o animal)				
	29	Animais enfermos são isolados, identificados e ordenhados separadamente				
	30	Existe procedimento adequado e padronizado para uso de agulhas				

CATEGORIAS	Cod.	Variáveis avaliadas	C	NC	NSA	Observações
	31	Existe listagem dos medicamentos utilizados e todos são autorizados para bovinos de leite				
	32	Respeito de forma consciente o período de carência de cada antimicrobiano utilizado conforme descrito em sua bula				
	33	Todas as bulas e prescrições veterinárias se encontram disponíveis para consulta				
	34	Medicamentos vencidos são segregados e identificados para descarte adequado				
	35	Estão disponíveis para consulta todos os procedimentos para manejo dos animais enfermos				
	36	Para todos os produtos utilizados são observadas as "restrições de uso"				
	37	É feita notificação cada vez que se observa reação adversa no uso de determinado produto				
	38	Todo medicamento utilizado apresenta descrição do(s) seu(s) princípio(s) ativo(s)				
	39	Todos os produtos adquiridos possuem registro legal no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA)				
	40	Os protocolos de aplicação dos produtos são respeitados (dose, tempo, via de aplicação etc.)				
	41	Os produtos não são utilizados por vias de administração não recomendadas				
	42	Produtos de uso exclusivamente humano não são aplicados nos animais e vice-versa				
	43	Não são utilizadas fórmulas caseiras				
	44	Não se observa o uso de produtos proibidos e/ou não autorizados na unidade				
	45	Os funcionários possuem conhecimento (consciência) da responsabilidade com os animais (Decreto 5053/2004)				
	46	Já foram realizados antibiogramas (para escolha de princípios ativos mais adequados)				

CATEGORIAS	Cod.	Variáveis avaliadas	C	NC	NSA	Observações
	47	Funcionários não possuem autorização para se alimentarem durante aplicação de produtos e trato dos animais				
	48	Registros de aquisição de produtos são mantidos atualizados				
	49	Notas fiscais e/ou registros de produtos possuem: data da compra, validade, nome, quantidade, fornecedor, lote.				
	50	Os produtos são armazenados em local específico (farmácia) e conforme recomendação do fornecedor				
	51	O acesso aos produtos é limitado apenas às pessoas responsáveis e capacitadas para seu manuseio correto				
	52	Farmácia se localiza fisicamente separada da sala de leite				
	53	Farmácia mantida trancada				
	54	Na farmácia, os produtos se encontram organizados e separados conforme o uso (finalidade)				
	55	Produtos armazenados em suas embalagens originais e com rótulos íntegros				
	56	Os responsáveis estão cientes dos riscos na manipulação dos produtos				
	57	Procedimentos para uso dos produtos são padronizados e estão disponíveis para consulta sempre que necessário				
	58	Existem procedimentos escritos específicos para aplicação de medicamentos nos animais				
	59	Funcionários cientes dos riscos relacionados à reutilização de embalagens de produtos químicos				
	60	Alimentos para espécies diferentes são armazenados separadamente, sem risco de misturas				
	61	O armazenamento de alimentos fornecidos aos animais é feito de forma a evitar contaminações				
	62	Os alimentos úmidos e/ou deteriorados são descartados				
	63	Os fornecedores de ingredientes e/ou alimentos para os animais possuem programa de garantia de qualidade				

CATEGORIAS	Cod.	Variáveis avaliadas	C	NC	NSA	Observações
	64	Há registro de todos os ingredientes dos alimentos fornecidos aos animais para rastreabilidade				
	65	Todos os produtos veterinários utilizados possuem registro no MAPA				
	66	A rotulagem de todos os produtos se apresenta íntegra e legível				
	67	Todos os rótulos de produtos apresentam-se em língua portuguesa				
	68	Todos os produtos estão dentro do prazo de validade, que se apresenta visível e compreensível				
	69	Cada produto possui sua própria bula acessível e compreensível, em língua portuguesa				
	70	São utilizados somente produtos que contenham o dizer "USO VETERINÁRIO"				
CONFORMIDADE ANTIMICROBIANOS (%)	n = 59	Fórmula: itens 13 a 71 -- % ANTIMICROBIANOS = [(C) / (C + NC) * 100]				
<i>Antiparasitários - via oral</i>	71	É utilizada para aplicação de alguns produtos, pistola dosificadora, sempre mantida limpa e calibrada				
	72	A regulagem da pistola dosificadora, quando utilizada, é feita a cada 10 animais no mínimo				
	73	Animais pesados para aplicação da dosagem adequada, sendo permitido uso de fita				
	74	Animais separados em lotes conforme o peso				
	75	Quando sobra produto no frasco, são seguidas as recomendações contidas na bula				
	76	Aplicação nos animais em jejum				
	77	Conhecido e respeitado o período de carência dos antiparasitários orais				
<i>Antiparasitários - injetáveis</i>	78	São utilizadas agulhas e seringas limpas e estéreis				
	79	São utilizados calibres adequados das agulhas para aplicação nos animais				
	80	A via de aplicação certa é respeitada e utilizada para aplicação de produtos nos animais				
	81	A conservação dos produtos é realizada conforme recomendado em sua bula				

CATEGORIAS	Cod.	Variáveis avaliadas	C	NC	NSA	Observações
	82	É atendida a recomendação para agitar o frasco antes de usar, quando essa está presente no rótulo do produto				
	83	Animais pesados para aplicação da dosagem adequada, sendo permitido uso de fita				
	84	Há o devido cuidado para não injetar ar junto com o medicamento				
	85	Conhecido e respeitado o período de carência dos antiparasitários injetáveis				
<i>Antiparasitários - pulverização</i>	86	O volume recomendado para diluição é devidamente respeitado e seguido				
	87	Equipamentos de proteção individual (EPI) utilizados pelo aplicador, conforme recomendação do fabricante				
	88	Aplicação do produto feita a favor do vento e em direção contrária do pelo do animal				
	89	Pulverizadas todas as áreas dos animais com quantidade de calda suficiente				
	90	Pulverização nos animais nos horários mais frescos do dia				
	91	Busca-se não pulverizar animais doentes, cansados, sedentos ou debilitados				
	92	Embalagens vazias não são reutilizadas				
	93	Quando sobra produto no pulverizador após o término da aplicação, o mesmo é descartado				
<i>Produtos em spray</i>	94	Durante a aplicação, evita-se atingir olhos e boca dos animais				
	95	Antes da aplicação do produto em <i>spray</i> para tratamento de miases, as larvas são retiradas e a ferida limpa				
	96	O aplicador não fuma durante a aplicação				
	97	A respeitada a distância de aplicação do produto de aproximadamente 15 a 20 cm do ferimento				
<i>Antiparasitários - "pour on"</i>	98	Os produtos são comercializados com aplicador				
	99	Animais pesados para aplicação da dosagem adequada, sendo permitido uso de fita				

CATEGORIAS	Cod.	Variáveis avaliadas	C	NC	NSA	Observações
	100	Aplica-se o produto da cernelha até início da cauda				
	101	Produtos "pour on" jamais são aplicados via oral ou injetados nos animais				
	102	Evita-se o uso em animais molhados ou sujos				
	103	Um mínimo de 2 horas é aguardado antes de liberar os animais em caso de chuva				
	104	Respeito ao período de carência de cada antiparasitário utilizado conforme descrito em sua bula				
CONFORMIDADE ANTIPARASITÁRIOS (%)	n = 66	Fórmula: itens 12, 14, 15, 36-45, 47-59, 65-104 -- % ANTIPARASITÁRIOS = [(C) / (C + NC) * 100]				
CONFORMIDADE RESÍDUOS (%)	n = 93	Fórmula: itens 12 a 104 -- % RESÍDUOS = [(C) / (C + NC) * 100]				
GESTÃO AMBIENTAL	105	Na propriedade existe política de reciclagem de lixo				
	106	Unidade devidamente limpa e possui locais apropriados para descarte de lixo				
	107	Existe número adequado de lixeiras				
	108	Existe acordo com terceiros para coleta de lixo na propriedade				
	109	Existem locais apropriados e devidamente identificados para descarte de material perfuro-cortante				
	110	O descarte de lixo evita contaminação do meio ambiente				
	111	Se disponível, é utilizado um sistema oficial de coleta regular e descarte de lixo				
	112	Embalagens e outros materiais perigosos são armazenados adequadamente em local seguro até o descarte final				
	113	São respeitadas as leis e normas ambientais para o adequado descarte e/ou destruição de embalagens de produtos				
	114	É respeitado o uso dos produtos no pasto e cultivos conforme legislação e recomendações do fabricante				
	115	São utilizados somente produtos químicos autorizados				
	116	O armazenamento dos resíduos é feito sem afetar o meio ambiente				
	117	As fontes de água na propriedade são sustentáveis				

CATEGORIAS	Cod.	Variáveis avaliadas	C	NC	NSA	Observações
	118	Não se observa pragas ou animais domésticos soltos pela unidade				
	119	As instalações são de fácil higienização				
	120	Há iluminação suficiente em toda unidade				
	121	Ausência de excesso de poeira				
	122	Os pisos são adequados e bem drenados				
	123	Existem recomendações de medidas de segurança para o acesso de pessoas na unidade				
	124	Ausência de risco de acidentes por iluminação desprotegida				
	125	Ausência de entulho e/ou lixo na unidade				
CONFORMIDADE AMBIENTAL (%)	n = 21	Fórmula: itens 105 a 125 -- % AMBIENTAL = [(C) / (C + NC) * 100]				
MANEJO DE ORDENHA	126	Realiza teste individual para diagnóstico de mastite nos animais				
	127	Prepara os animais para ordenha higiênica				
	128	Identifica individualmente os animais que necessitam de manejo diferenciado				
	129	Ordenha as vacas com regularidade utilizando procedimentos padronizados de ordenha				
	130	Os animais sadios são ordenhados primeiro				
	131	Áreas de ordenha limpas e organizadas				
	132	As pessoas que trabalham na ordenha respeitam regras básicas de higiene				
	133	Área de armazenamento do leite, limpa e organizada				
	134	Acesso para coleta de leite pelo caminhão, livre de obstáculos				
	135	Equipamento de proporção adequada para armazenamento do leite conforme produção (tempo e temperatura)				
	136	Manutenção periódica dos equipamentos, com registros arquivados e organizados				
	137	Agendamento prévio de trocas de peças preventivas				
	138	Procedimentos operacionais padronizados para higienização de equipamentos de fácil acesso e respeitados				

CATEGORIAS	Cod.	Variáveis avaliadas	C	NC	NSA	Observações
	139	Instrução de uso dos produtos seguidas conforme recomendações do fornecedor e disponíveis para consulta				
	140	São utilizados agentes químicos e lubrificantes próprios, autorizados e recomendados para o uso devido				
	141	Produtos para higienização armazenados em local próprio, separados e conforme recomendação dos fabricantes				
	142	As instruções de uso e restrições estão disponíveis para consulta de forma clara, legível e em língua portuguesa				
	143	Registros arquivados de forma organizada e atualizados (mínimo 2 anos)				
CONFORMIDADE ORDENHA (%)	n = 18	Fórmula: itens 126 a 143 -- % ORDENHA = [(C) / (C + NC) * 100]				
SEGURANÇA DO TRABALHO	144	O aplicador toma banho ou higieniza bem as mãos após a aplicação de produtos químicos				
	145	Se produto entra em contato com pele, olhos e/ou mucosas do aplicador lava-se de imediato com água e sabão				
	146	Em caso de acidente, o aplicador consulta o médico portando a embalagem do produto				
	147	Os produtos químicos são armazenados em local fresco, ao abrigo de luz, trancados e longe de crianças e animais				
	148	Embalagens vazias não são reutilizadas em nenhuma situação				
	149	Após a aplicação de produtos antiparasitários o aplicador retira de imediato luvas e lava as mãos ou toma banho				
	150	Na unidade são realizados testes periódicos para pesquisa de resíduos nos produtos para controle e verificação				
	151	Existem informações suficientes e visíveis com orientações em casos de emergência				
	152	Os funcionários da unidade estão devidamente capacitados e orientados para o uso de EPI				
	153	É proibido fumar nas instalações da unidade				
	154	Há política e procedimentos por escrito de saúde, higiene e segurança				

CATEGORIAS	Cod.	Variáveis avaliadas	C	NC	NSA	Observações
	155	Existe mapa de avaliação de riscos				
	156	São realizados treinamentos periódicos dos funcionários				
	157	Existe na propriedade pelo menos uma pessoa com formação em primeiros socorros				
	158	Existem procedimentos padronizados em casos de emergência				
	159	Sinalética adequada de perigos potenciais				
	160	Na propriedade há disponível estojo de primeiros socorros bem equipado e mantido				
	161	Existe EPI suficiente e esta é guardada de forma adequada e em local próprio				
	162	Existem reuniões regulares com os funcionários da unidade e todas são devidamente registradas				
	163	Existe local próprio e específico para os funcionários se alimentarem e para higiene pessoal				
	164	Alojamento dos funcionários em bom estado				
CONFORMIDADE SEGURANÇA DO TRABALHO (%)	n = 21	Fórmula: itens 144 a 164 -- % TRABALHO = [(C) / (C + NC) * 100]				
BEM ESTAR ANIMAL	165	Água e alimento são fornecidos diariamente aos animais em quantidade suficiente				
	166	Ajustes periódicos na alimentação dos animais, ou sempre que necessário				
	167	Evita-se e previne-se o contato dos animais com plantas tóxicas				
	168	São realizados procedimentos adequados para comercialização de carneiros				
	169	São evitados maus tratos e/ou práticas impróprias para com os animais				
	170	São realizados treinamentos e capacitações dos funcionários para o correto uso de técnicas de manejo				
	171	A área da unidade tem tamanho suficiente para densidade animal alojada				
	172	Todo animal possui contato visual com os demais				
	173	O colostro é fornecido imediatamente aos recém nascidos				

CATEGORIAS	Cod.	Variáveis avaliadas	C	NC	NSA	Observações
	174	O leite é disponibilizado aos bezerros até se fornecer alimentação suficiente				
	175	Os bezerros são mantidos em grupos fixos				
	176	Os bezerros recebem dieta saudável, duas vezes ao dia				
	177	descorna realizada por meio de cauterização química, sem anestesia, durante as duas primeiras semanas de vida				
	178	Descorna com idade superior a 90 dias é efetuada cirurgicamente e exclusivamente por médico veterinário				
	179	Machos e fêmeas sexualmente maduros são mantidos em grupos separados para evitar prenhez				
	180	Onde a alimentação é restrita, assegura-se o fornecimento de ração suficiente				
	181	O plano nutricional se apresenta registrado, por escrito, e é revisado com intervalos máximos de 2 anos				
	182	Unidade com fábrica de ração: não permite produção de ração medicada para outras espécies em mesmo local				
	183	Todos os animais têm acesso a água limpa em quantidade suficiente				
	184	Unidade que possui fábrica de ração, possui aprovação e registro oficial pelo órgão responsável				
	185	Os rótulos das rações e suplementos fornecidos são mantidos para fins da rastreabilidade				
	186	As matérias primas são rastreáveis até o fornecedor				
	187	São tomados cuidados especiais em relação aos veículos de dupla função				
	188	Existe na unidade, local fechado e próprio para armazenamento de animal morto				
	189	As carcaças de animais mortos são mantidas for a da área de estábulos				
	190	Todo animal descartado medicado se apresenta identificado com: "IMPRÓPRIO PARA O CONSUMO"				
	191	A unidade possui embarcadouro e rampas adequados				
	192	Na unidade são proibidos ferrões e bastões elétricos				

CATEGORIAS	Cod.	Variáveis avaliadas	C	NC	NSA	Observações
CONFORMIDADE BEM ESTAR ANIMAL (%)	n = 28	Fórmula: itens 165 a 192 -- % BEM ESTAR ANIMAL = [(C) / (C + NC) * 100]				
TAREFAS PROJETO	194	A caixa fornecida para descarte de material perfuro-cortantes foi montada e se encontra em uso				
	195	O DVD de treinamento foi assistido na unidade				
	196	O Manual de Boas Práticas Veterinárias fornecido, foi lido e manuseado				
	197	Os relatórios de cada visita foram lidos e arquivados				
	198	Os sacos de lixos fornecidos para coleta seletiva e reciclagem estão em uso na unidade				
	199	Foi demonstrado interesse durante na realização do trabalho e execução das atividades do estudo				
	200	Na unidade existe bonificação por qualidade para os melhores resultados dos funcionários				
CONFORMIDADE TAREFAS PROJETO (%)	n = 07	Fórmula: itens 194 a 200 -- % TAREFAS = [(C) / (C + NC) * 100]				
CONFORMIDADE GERAL (%)	n = 192	Fórmula: itens 001 a 192 -- % GERAL = [(C) / (C + NC) * 100]				