

DETECÇÃO DE RESÍDUOS DE ANTIBIÓTICOS E DE SUBSTÂNCIAS ANTIMICROBIANAS EM LEITE PASTEURIZADO

Maryanne Henrique da Silva (1); João Paulo Gollner-Reis (2); Elsa Helena Walter de Santana (3)
Cíntia Hoch Batista de Souza (4); Karla T. M. Gollner-Reis (5)

(Instituto Federal de Alagoas – IFAL Campus Murici/AL - maryannehenriquesilva@outlook.com.br; Universidade Federal Fronteira Sul – UFFS Campus Realeza/PR – joao.reis@uffs.edu.br; Universidade Norte do Paraná – UNOPAR Campus Piza – elsa.santanta@unopar.br; Universidade Norte do Paraná – UNOPAR Campus Piza, cintia.souza@unopar.br; Instituto Federal de Alagoas – IFAL Campus Murici/AL - karlagollner@gmail.com)

RESUMO: A detecção de substâncias antimicrobianas (RSA) e de resíduos de antibióticos (RA) em leites tem sido uma preocupação constante do meio laticinista e da comunidade acadêmica. Este trabalho diagnosticou a incidência de RA e de RSA em 80 amostras de Leite Pasteurizado (LP) comercializado na cidade de Londrina – PR através do uso de duas metodologias. A detecção de RSA foi realizada através da metodologia de inibição bacteriana com cultura termofílica de iogurte e solução de púrpura de bromocresol Método do Iogurte Indicador – RSA_{II} e a detecção de RA através do emprego do kit comercial Charm MRL BL/TET Test - RA_{TB}. Os resultados de RSA_{II} indicaram a incidência de 13 amostras (16,25%) em desacordo com a legislação vigente. Todas as amostras de LP apresentaram resultado negativo para detecção em RA_{TB}. Desta forma, o diagnóstico obtido é indicativo da possível presença de outros tipos de substâncias inibidoras e/ou conservantes. E demonstram a necessidade de avaliação dos procedimentos de garantia da qualidade do LP, sugerindo que a detecção exclusiva de RA pode estar fornecendo uma falsa segurança da não existência de resíduos dessas substâncias. Parece ser emergencial a implantação de técnicas para a detecção de RSA na seleção da matéria prima.

Palavras-chave: Beta-lactâmicos, iogurte indicador, púrpura de bromocresol, tetraciclinas.

INTRODUÇÃO

A detecção de resíduos de antibióticos (RA) em leites tem sido uma preocupação constante no meio laticinista e na comunidade acadêmica, sendo a razão de estudos científicos que envolvem a detecção de RA, diagnósticos dos fatores inerentes a sua ocorrência em leites *in natura* e de consumo (ALVA, 2009; BANDO et al, 2009; BIACCHI et al, 2004; DIAZ et al, 2010; MACEDO et al, 2009; ROSA; QUEIROZ, 2007; TOLENTINO et al, 2009; VILLA, 2007) e a validação de metodologias de detecção (GUEDES et al, 2009; RUELLA et al, 2005; TENÓRIO, 2007).

Os resíduos de antibióticos são considerados contaminantes químicos, oriundos de tratamento de patologias do rebanho leiteiro sem o adequado controle do prazo de descarte previsto por cada medicamento (BRITO; LAGE, 2005; DIETRICH, 2008; HANJDENWURCEL, 1980).

Estes resíduos presentes no leite também podem ser provenientes de suplementos incorporados à alimentação (SANTOS;FONSECA, 2007).

O período de descarte do leite proveniente de animais em antibioticoterapia pode ser dependente de fatores como: dose ministrada; esquema do tratamento; via de administração; metabolismo; produção animal; terapia de secagem e antecipação da parição (SANTOS; FONSECA, 2007; OLIVEIRA;CARNEIRO, 2000; RAIÁ JUNIOR, 2001; FAGUNDES, 2003).

Por serem resistentes aos processamentos térmicos de beneficiamento do leite (MACEDO;FREITAS, 2009; NERO et al, 2010; SANTOS et al, 2005) a prevalência de resíduos de antibióticos no leite oferece riscos à saúde pública como desequilíbrio flora intestinal, hipersensibilidade por pessoas alérgicas, efeitos toxicológicos e resistência microbiana e/ou seleção de bactérias resistentes a antibióticos (MACEDO;FREITAS, 2009; NERO et al, 2010; SANTOS et al, 2005; BOSQUROLLI, 2004; DENOBILE;NASCIMENTO, 2004; MORAIS et al, 2010), bem como, perdas econômicas para cadeia produtiva do leite (MACEDO;FREITAS, 2009; DIETRICH, 2008; RAIÁ JUNIOR, 2001; SANTOS et al, 2005). O leite também pode apresentar resíduos de outras substâncias oriundas de produtos e/ou insumos da agropecuária e resíduos ambientais, como: antiparasitários, promotores de crescimento, produtos de higienização de ordenha, metais pesados e micotoxinas (SANTOS et al, 2005).

No mercado nacional, existem vários testes comerciais importados (Kit) para triagem de resíduos de antibióticos usados pelos laticínios. Os kits enzimáticos são baseados na reação específica para cada grupo de substâncias ou para detecção de simultâneas de mais de um grupo e em geral e são empregados para a triagem de RA em leite cru (MACEDO;FREITAS, 2009; DIETRICH, 2008).

Os kits com princípio da inibição bacteriana, baseiam-se no crescimento do micro-organismo teste na amostra e modificação da coloração, pela presença de um indicador de pH (DIETRICH, 2009; SANTOS;FONSECA, 2007).

Estudos realizados com diferentes tipos de kits comerciais para resíduos de substâncias antimicrobianas (RSA), com a detecção fundamentada na inibição microbiana, revelam resultados positivos em leite cru e em diferentes tipos de leite de consumo (DIAZ et al, 2010; VILLA, 2007; NERO et al, 2010; COSTA;LOBATO,2009; FOLLY;MACHADO, 2001; MATTAR et al, 2009; SOUZA et al, 2010).

Na década de 80 e meados da década de 90, o teste de antibiótico da “Cultura do Iogurte” ou método rápido do Iogurte-Indicador, foi muito difundido e empregado pelos laticínios,

como uma forma eficiente e com baixo custo. Seu emprego era voltado para detecção de diferentes resíduos em leite, por possuir características de elevada sensibilidade à presença de resíduos de antibióticos e/ou de substâncias antimicrobianas, como detergentes, sanitizantes, inibidores e conservantes (HAJDENWUERCEL, 1980; MAGALHAES et al,1995; TRONCO, 2008).

Sua metodologia é fundamentada no princípio da inibição microbiana, onde na ausência dessas substâncias, a cultura termofílica encontra condições ideais de multiplicação, acidificando o meio pela produção de ácido láctico, gerando a coagulação do leite e a mudança de coloração de violeta para amarelo pela presença do indicador púrpura de bromocresol (HAJDENWUERCEL, 1980; COSTA;LOBATO, 2009; TRONCO, 2008).

Em contra partida, na possível presença de resíduos de substâncias antimicrobianas, ocorre à inibição da multiplicação do micro-organismo indicador, e conseqüente não acidificação do leite. Desta forma, o meio permanece líquido com coloração violeta, sendo o resultado reportado como positivo. Caso ocorra à formação de um coágulo semi líquido e com coloração intermediária (verde amarelada), o resultado é reportado como suspeito para RSA (HAJDENWUERCEL, 1980; TRONCO, 2008).

Considerando o acima exposto, este trabalho teve como objetivo, diagnosticar a incidência de resíduos de antibióticos e de substâncias antimicrobianas em Leite Pasteurizado da cidade de Londrina – PR, empregando as metodologias da cultura termofílica de iogurte e púrpura de bromocresol - Método do Iogurte-Indicador (HAJDENWUERCEL, 1980) e o método do kit comercial imunoreceptor Charm MRL BL/TET Test - Charm Sciences Inc – Massachusetts, EUA (CHARM,2010).

METODOLOGIA

Oitenta amostras de leite pasteurizado foram coletadas, no período de outubro a novembro de 2010, sendo 29 amostras de Leite Pasteurizado Tipo A (LPA), 3 amostras de Leite Pasteurizado Tipo B (LPB), 19 amostras de Leite Pasteurizado Integral (LPI), 27 amostras de Leite Pasteurizado Padronizado (LPP) e 2 amostras de Leite Pasteurizado Desnatado (LPD).

Do total de amostras analisadas 48(60%) foram coletadas ao término do processamento no interior da câmara fria de armazenagem de dois laticínios da região de Londrina – PR e 32 amostras (40%) foram adquiridas no comércio da cidade de Londrina – PR, após 24h do processamento. Imediatamente após a coleta, as amostras foram codificadas, conservadas em caixa térmica (com gelo reciclável) a temperatura média de 7°C e transportadas para o laboratório da

garantia e controle de qualidade da Granja Leiteira da Fazenda Experimental da Universidade Norte do Paraná - UNOPAR, localizada em Tamarana – PR.

No momento da análise, cada amostra foi homogeneizada por agitação e foram retirados 100 mL de amostra, em condições assépticas, para realização das análises físico-químicas (em duplicata) de Acidez Dornic (°D) e Alizarol 75 °GL – método IN 68/2006 (BRASIL,2006).

Ambas as análises, foram empregadas como forma de pré-seleção das amostras aptas, para realização da pesquisa de detecção de resíduos de antibióticos e de resíduos de substâncias antimicrobianas.

Após as análises físico químicas todas as amostras foram testadas para presença de resíduos de substâncias antimicrobianas através do Método Iogurte – Indicador (HAJDENWUERCEL, 1980; NERO et al, 2010) e Detecção de Resíduos de Antibióticos através do kit comercial Charm MRL BL/TET Test (CHARM, 2010).

O princípio do método Iogurte – Indicador baseia-se na inibição bacteriana, onde na ausência RSA (resíduos de antibióticos e/ou conservantes e/ou inibidores) ocorre à multiplicação da cultura de iogurte (*Lactobacillus bulgaricus* e *Streptococcus thermophilus*) via fermentação da lactose com produção de ácido láctico, acarretando a redução do pH e conseqüente coagulação do leite (ponto isoelétrico da caseína).

O processo é realizado na presença da solução indicadora de púrpura de bromocresol - 0,35%, permitindo a visualização do resultado através da mudança de coloração da amostra.

A detecção de resíduos de antibiótico (RA) através do emprego do kit comercial imunoreceptor Charm MRL BL/TET Test (Figura 1) para detecção de resíduos de antibióticos do grupo tetraciclinas e beta-lactâmicos, foi realizado segundo as orientações do fabricante (CHARM, 2010), onde o dispositivo conjunto é previamente inserido na chapa incubadora (chapa aquecedora HEXIS – Hexis Científica S/A – Campinas, SP) para pré-aquecimento a 55 °C ($\pm 1^\circ\text{C}$).

Após homogeneização da amostra, uma alíquota de 300 μL foi dispensada lentamente no dispositivo conjunto, com auxílio de micropipeta, a chapa aquecedora foi tampada e a incubação realizada a 55 °C ($\pm 1^\circ\text{C}$) por 8 min.. Em paralelo, foram realizadas provas controles positivas e negativos.

A interpretação dos resultados foi realizada de acordo com as orientações do fabricante, através de leitura visual da formação de coloração nas linhas/faixas do dispositivo: linha C (controle); linha BL (beta-lactâmicos) e linha TE (tetracíclicas).

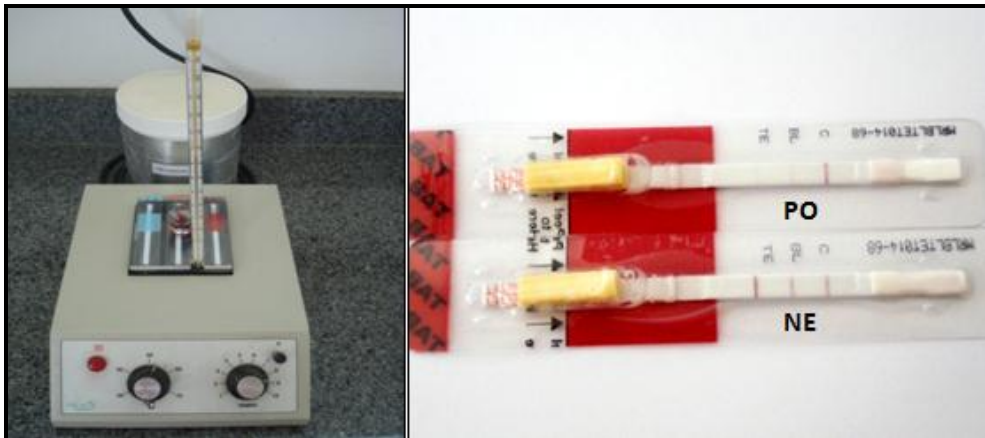


Figura 1 – kit comercial imunoreceptor Charm MRL BL/TET Test com a chapa aquecedora empregado para análise de 80 amostras de leite pasteurizado e interpretação dos resultados: PO = Positivo e NE = Negativo.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A partir dos dados obtidos na análise de acidez Dornic foi calculada a média dos resultados e desvio padrão, para cada tipo de Leite Pasteurizado. A média de acidez encontrada por tipo de leite variou entre 13°D a 18° D, estando desta forma todas as amostras aptas para realização da detecção de RA_{TB} e RSA_{II}.

Tabela 1: Resultados de resíduos de antibióticos (RA_{TB}) e resíduos de substâncias antimicrobianas (RSA_{II}) em 80 amostras de Leite Pasteurizados, comercializadas no período de outubro a novembro de 2010, Londrina – PR

Tipo	Resíduos de Antibióticos - RA _{TB}		Resíduos de Substâncias Antimicrobianas - RSA _{II}		
	Negativo	Positivo	Negativo	Suspeito	Positivo
LPA	29	0	28	1	0
LPB	03	0	1	1	1
LPI	19	0	15	4	0
LPP	27	0	21	4	2
LPD	02	0	2	0	0
Total	80	0	67	10	03

RA_{TB}: Resíduos antibióticos tetraciclínas e beta-lactâmicos – Charm MRL BL/TET Test. / RSA_{II}: Resíduos de substâncias antimicrobianas - método iogurte indicador/ LPA: Leite pasteurizado tipo A/ LPB: Leite pasteurizado tipo B/ LPI: Leite pasteurizado integral/ LPP: Leite pasteurizado padronizado/ LPD: Leite pasteurizado desnatado.

Todas as 80 amostras (100%) de leite pasteurizado apresentaram resultados negativos (Tabela 1) para detecção de resíduos de antibióticos – RA_{TB}, estando dessa forma de acordo com a

legislação vigente (BRASIL, 2002; 1999) e frente à sensibilidade de detecção do kit Charm MRL BL/TET Test (CHARM, 2010).

O percentual encontrado é diferente daqueles descritos para beta-lactâmicos, por Alva (2009) em leite esterilizado (66,60%) do Callao no Peru, e por Folly; Machado (2001) em leite pasteurizado (1,66%) do Rio de Janeiro - BR, utilizando kits comerciais de testes enzimáticos.

Morais et al. (2010) em um estudo sobre a presença de RA em LP de 3 Estados brasileiros (ES; MG; e RJ) apontaram o índice de 64,90% de amostras positivas, para diferentes tipos de resíduos de drogas veterinárias, também empregando kits comerciais enzimáticos.

Zanella et al.(2010) e Bando et al. (2009) reportaram resultados positivos para diferentes tipos de RA em LP comercializados no Estado do Paraná, acusando a incidência desses em 30,8% e 41,3% das amostras analisadas, respectivamente, com kits comerciais imunológicos.

Na literatura é possível verificar a informação do maior emprego do kit comercial para detecção de beta-lactâmicos, por parte dos laticínios brasileiros, em função de ser a linha de antibióticos mais utilizados no território nacional para o tratamento de mastites do rebanho leiteiro (DIETRICH, 2008; SANTOS;FONSECA, 2007; NERO et al., 2010).

Porém, em estudos realizados com amostras de leite pasteurizado comercializado no Paraná os resultados obtidos, demonstram um maior índice de detecção para tetraciclina frente à realidade até então preconizada para beta-lactâmicos (ALVA, 2009; BOSQUIROLI, 2004; MORAIS et al, 2010; ZANELLA et al, 2010).

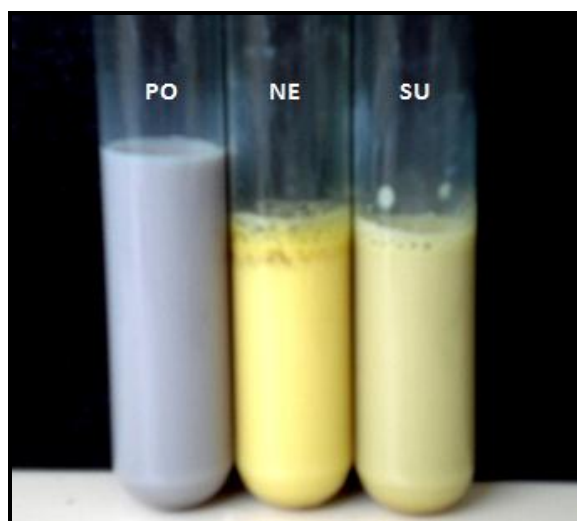


Figura 2 – Interpretação dos resultados da análise de resíduos de substâncias antimicrobianas RSA_{II} em amostras de leite pasteurizado, como: PO = Positivo; SU = Suspeito e NE = Negativo.

Nas 80 amostras de LP de Londrina – PR, analisadas pelo teste de detecção de resíduos de substâncias antimicrobianas - RSA_{II} (Figura 2) os resultados indicaram a incidência de 13 amostras (16,25%) em desacordo com a legislação vigente (Tabela 1). Deste total, 3 amostras (3,75%) apresentaram resultado positivo e 10 amostras (12,5%) como suspeitas. Apenas para LPD não foi detectada a presença de RSA.

Estudo realizado por Fonseca et al. (2009) empregando o método RSA_{II}, em 100 amostras de leites UHT (10 marcas) de 5 Estados brasileiros (GO; MG; RJ; PR e SP) descrevem ter encontrado resultado positivo em 4% das amostras mineiras e resultado negativo para 100% das amostras dos demais Estados.

Considerando-se que todas as amostras apresentaram resultados negativos de beta-lactâmicos e tetracíclicas pelo método RA_{TB}, neste estudo, os resultados de RSA_{II} são indicativos da possível presença de resíduos de outros tipos/linhas de antibióticos (não detectados pelo Kit específico), de antiparasitários ou de substâncias inibidoras e/ou conservantes.

Estes resíduos podem ser oriundos de resíduos acidentais de sanitizantes ou de detergentes do processo de higienização dos equipamentos e/ou da adição intencional de outras substâncias conservadoras/ inibidoras no leite.

A presença de RSA em leites pasteurizados de consumo, além dos possíveis riscos a saúde humana (MACEDO;FREITAS, 2009; SANTOS;FONSECA, 2007; ZANELLA et al,2010; BECKER et al, 2010) como desequilíbrio da microbiota intestinal, hipersensibilidade por indivíduos alérgicos e resistência bacteriana a antibióticos, pode possuir o intuito de promover uma ação antimicrobiana (bactericida ou bacteriostática) para intervir na deterioração e de inferir uma melhor qualidade microbiológica ao produto acabado (BORSAT-MOYSES et al, 2009).

CONCLUSÕES

A incidência da detecção de resíduos de substâncias antimicrobianas pelo método Iogurte – Indicador (RSA) de 16,5% nas amostras de leite pasteurizado analisadas e a ausência de amostras positivas para resíduos de antibióticos através do Charm MRL BL/TET Test (RA) sugerem a necessidade de uma nova avaliação dos procedimentos de garantia da qualidade da matéria prima e do processamento industrial.

O emprego de kits comercial de resíduos de antibióticos para detecção exclusiva de único grupo de antibiótico e a não realização de pesquisa de outros resíduos de substâncias

antimicrobianas pode estar fornecendo uma falsa segurança quanto à ausência de resíduos dessas substâncias no leite pasteurizado.

REFERÊNCIAS

- ALVA, D. M. G.. Detección de resíduos de antibióticos β – lactámicos y tetraciclina em leite comercializada em el mercado del Callao. **Ciênc. Tecnol.** V.12, n.1, p.25-30, 2009.
- BANDO, E., OLIVEIRA R.C., FERREIRA G.M., MACHINSKI, M. J., Occurrence of antimicrobial residues in pasteurized milk commercialized in the state of Paraná, Brazil. **J Food Protection.** v72, n.4, p. 911-914, 2009.
- BECKER, T. A., NEGRELO, I. F., RACOLTE, F., DRUNLKER, D. A.. Avaliação da qualidade sanitária de leite integral informal, pasteurizado, UHT e em pó comercializados na cidade de Medianeira e Serranópolis do Iguçu – Paraná. **Semina Ciênc. Agrár.**, v.31,n.3, p.707-716, 2010.
- BIACCHI, N. C., JORGE, A. O. C., UENO, M.. Detecção de resíduos antibióticos em leite bovino na região do vale do Paraíba. **Rev. Biociênc.**, v.10, n.1-2, p.47-49, 2004.
- BOSQUIROLI, S. L. Determinação de resíduos de antibióticos em Leite. LACE/PR2004. Disponível em: <<http://www.leite.pr.gov/arquivos/file/2se/lacen.pdf>>. Acesso: abr., 2015.
- BRITO, M. A. V. P., LANGE, C.C.. **Resíduos de antibióticos no leite. Comunicado Técnico 44.** Juiz de Fora: Embrapa Gado de Leite; 2005. 4p.
- COSTA, A. S., LOBATO, V.. Avaliação da presença de resíduos de antimicrobianos em leite e bebida láctea UHT por teste de inibição microbiana comercial. **Rev. ILCT** .v. 64, n.367/368, p.72-76, 2009.
- BORSAT-MOYSES, J., CARVALHO, I. F., HOFFMANN, F. L.. Avaliação físico-química do leite pasteurizado do tipo C produzido e comercializado na região de Tangará da Serra – MT, Brasil – estudo de caso. **Rev. ILCT** . v.64, n.366, p.22-27, 2009.
- BRASIL.. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Instrução Normativa SDA n. 68, de 13 de dezembro de 2006.** Métodos analíticos oficiais físico-químicos, para controle de leite e produtos lácteos. Brasília: MAPA/ SDA, 2006. 98p.
- _____. **Instrução Normativa n. 51, de 18 de setembro de 2002.** Regulamentos técnico de produção, identidade e Qualidade dos leites cru resfriados tipo A, do tipo B e do tipo C, do leite pasteurizado, do leite refrigerado e o regulamento técnico da coleta de leite cru refrigerado e seu transporte a granel. Brasília: MAPA; 2002. 8p.
- _____. **Instrução Normativa n. 42, de 20 de dezembro de 1999.** Alterar 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. Brasília: MAPA, 1999.4p.
- CHARM. **Charm ROSA® Test – MRL Beta-lactam/tetracyclin.** Lawrence: Charm Sciences; 2010. 4p.
- DIAZ, L. M. C, CIPRIANO, M. S., CRUZ, B. L., SEGURA, I. G., RUIZ, P. E. H., COERTEZ, I. P.. Os resíduos de antibióticos em leite cru comercializado na região de Tierra Caliente de Guerrero, no México. **Rev. Vet.** 2010. Disponível em: <<http://www.veterinaria.org/redvet/n020210/021009.pdf>>. Acesso: abril, 2010.

- DENOBILO, M., NASCIMENTO, E. S.. Validação de método para determinação de resíduos dos antibióticos oxitetraciclina, tetraciclina, clortetraciclina e oxiciclina, em leite, por cromatografia líquida de alta eficiência. **Rev. Bras. Ciênc. Farm.**, v.40, n.2, p. 209-218, 2004.
- DIETRICH, J. M.. Controle de resíduos de antibióticos no leite. **Leite & Derivados**. v.106, n.10, p.156-162, 2008.
- FAGUNDES, H.. **Ocorrência de resíduos de antimicrobianos utilizados no tratamento de interrupção de lactação no início da lactação subsequente em animais com período seco recomendado**. 2003, 98p. Dissertação (mestrado Ciência Animal) Universidade de São Paulo – USP, São Paulo; 2003.
- FOLLY, M. M., MACHADO, S. C. A.. Determinação de resíduos de antibióticos, utilizando-se métodos de inibição microbiana, enzimáticos e imuno-ensaios no leite pasteurizado comercializado na região norte do Estado do Rio de Janeiro, Brasil. **Cienc Rural**. v.31,n.1, p.95-98, 2001.
- FONSECA, G. P., CRUZ, A. G., FARIAS, J. A. F., SILVA, R., MOURA, M. R. L., CARVALHO, L. M. J.. Antibiotic residues in Brazilian UHT milk: a screening study. **Cienc Tecnol Aliment.**, v.29,n.2, p.451-453, 2009.
- GUEDES, C.C., MATOS, C. M., MOUTINHO, C. G., SILVA, C. S.. Avaliação da utilização da espectrofotometria de UV/VIS na quantificação de antibióticos em extractos de leite de vaca. **Rev. Fac. Ciênc. Saúde**. n.6, p.232-234, 2009.
- HAJDENWURCEL, J. R.. **Manual de análises microbiológicas**. Juiz de Fora: ILCT/EPAMIG; 1980.36p.
- MACEDO, L. C. S., FREITAS, J. A.. Ocorrência de resíduos de antimicrobianos em leite. **Rev. Ciênc. Agrár.**, n.52, p.147-157, 2009.
- MAGALHÃES, N. A., SILVA, T. J. P., RODRIGUES, R., ABREU, V. L. V., BOECVHART, M. F., IBARRA, L. M.. Detecção de resíduos de inibidores bacterianos em leite pasteurizado tipos A, B, C e Integral/Fazenda comercializados na grande Belo Horizonte. Juiz de Fora, 1995. **Anais... do CONGRESSO NACIONAL DE LATICÍNIOS**, 8. Juiz de Fora: EPAMIG/ILCT, 1995. p.111-116.
- MATTAR, S., CALDERON, A., SOTELO, D., SIERRA, M., TORDECILLA, G.. Detección de antibióticos en leches: un problema de salud pública. **Salud Pública**. v.11, n.4, p.579-590, 2009.
- MORAIS, C. M. Q. J., DURAES, T. S., NÓBREGA, A. W., JACOB, S. C. Presença de resíduos de antibióticos em leite bovino pasteurizado. **Ciênc. Tecnol Aliment** 30, supl.1, p. 20-24, 2010.
- NERO, LA., MATTOS, M.R, BELOTI, V., BARROS, M. A. F., PINTO, J. P. A. N., FRANCO, B. D. G. M.. Resíduos de antibióticos em leite cru de quatro regiões leiteiras no Brasil. **Ciênc. Tecnol Aliment.**,v.27,n.2, p.391-393, 2010.
- OLIVEIRA, A. A., CARNEIRO, A. L.. HACCP aplicado à produção de leite. Juiz de fora, 17. In. **Anais... CONGRESSO NACIONAL DE LATICÍNIOS**, 2000. Juiz de Fora: EPAMIG/ILCT, 2000. p.139- 148.
- RAIA JUNIOR, R. B. **Influencia da mastite na ocorrência de resíduos de antimicrobianos no leite**. Dissertação, 2001. 98p. Dissertação (mestrado em Ciência Animal). Universidade de São Paulo –USP, São Paulo; 2001.
- ROSA, L. S., QUEIROZ, M. I. Avaliação da qualidade do leite cru e resfriado mediante a aplicação de princípios do APPCC. **Ciênc. Tecnol Aliment.**, v.27, n. 2, 422 – 430, 2007.
- RUELA, I. C. A., LIMA, J. A., SOUZA, S. V. C., JUNQUEIRA, R. G.. Otimização e validação de método para determinação de resíduos de oxitetraciclina, tetraciclina, clortetraciclina em leite por cromatografia líquida de alta eficiência. **Ciênc. Tecnol Aliment.**, v.25,n.1, p.139-146, 2005.
- SANTOS, M. V., FONSECA, L. F. L., **Estratégias para controle de mastite e melhoria da qualidade do leite**. São Paulo: Manole; 2007. 87p.

- SANTOS, M. V., FONSECA, L. F. L., BRITO, M. A. V. P.. Resíduos e antibióticos: como evitar. **Balde Branco.**, n.489, p. 32-34, 2005.
- SOUZA, F. C., OLIVEIRA, E. N. A., SANTOS, D.C., SILVA, E. F. M.. Ocorrência de resíduos de antibióticos em leites pasteurizados comercializados no Estado do Ceará-Brasil. **Rev. Verde**, v.5,n.4, p.10-14, 2010.
- TENÓRIO, C. G. M. S. C.. **Avaliação da eficiência do teste Copan (Microplate e Single) na detecção de resíduos de antimicrobianos no leite.** 2007, 96p. Dissertação (mestrado em Ciência de Alimentos). Universidade Federal de Minas Gerais – UFMG, Belo Horizonte - MG, 2007.
- TOLENTINO, R.G., PEREZ, M.N., GONZALEZ, G.D., VEJA-LEON, S., LOPEZ, M.G., FLOREZ, G. P.. Determination of the presence of 10 antimicrobial residues in Mexican pasteurized milk. **Interiencia.** v.30, n.5, p.291-294, 2009.
- VILLA, F. B.. Qualidade físico-química, microbiológica e resíduos de antimicrobianos em leite In natura comercializado informalmente em Brotas, SP., 2007. 86p. Dissertação (Mestrado Ciência de alimentos) Universidade Estadual Paulista – USP – São Paulo-SP, 2007.
- TRONCO, V. M.. **Manual para inspeção da qualidade do leite.** Santa Maria:UFSM; 2008.87p.
- ZANELLA, G. N., BANDO, E., SIQUEIRA, V. L., MACHINSCKI JUNIOR, M.. Occurrence and antibiotic resistance of coliforms bacteria and antimicrobial residues in pasteurized cow's milk from Brazil. **Food Protect.**, v.79, n.9, p. 1684-1687, 2010.