

Pelotas, RS / Janeiro, 2024

Sistema de coleta e envio de amostras de leite in natura para determinação de resíduos de antimicrobianos



***Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Embrapa Clima Temperado
Ministério da Agricultura e Pecuária***

e-ISSN 1806-9193

Documentos 540

Janeiro, 2024

Sistema de coleta e envio de amostras de leite in natura para determinação de resíduos de antimicrobianos

*Rosângela Silveira Barbosa
Marcelo Bonnet Alvarenga
Bianca Pio Ávila
Giovana Paula Zandoná
Fernanda Moreira Oliveira
Rosane Lopes Crizel*

***Embrapa Clima Temperado
Pelotas, RS
2024***

Embrapa Clima Temperado
BR-392, km 78, Caixa Postal 403
CEP 96010-971, Pelotas, RS
Fone: (53) 3275-8100
www.embrapa.br/clima-temperado
www.embrapa.br/fale-conosco/sac

Comitê Local de Publicações

Presidente

Luis Antônio Suita de Castro

Secretária-executiva

Bárbara Chevallier Cosenza

Membros

Walkyria Bueno Scivittaro

Sônia Desimon

Marilaine Schaun Pelufê

Revisão de texto

Bárbara Chevallier Cosenza

Normalização bibliográfica

Marilaine Schaun Pelufê

Projeto gráfico

Leandro Sousa Fazio

Diagramação

Nathália Santos Fick

Foto da capa

Renata Dalbann

Publicação digital: PDF

Todos os direitos reservados

A reprodução não autorizada desta publicação, no todo ou em parte,
constitui violação dos direitos autorais (Lei nº 9.610).

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Embrapa Clima Temperado

S623 Sistema de coleta e envio de amostras de leite cru para
determinação de resíduos de antimicrobianos /
Rosângela Silveira Barbosa... [et al.]. – Pelotas:
Embrapa Clima Temperado, 2024.
14 p. (Documentos / Embrapa Clima Temperado, e-ISSN
1806-9193 ; 540).

1. Produção leiteira. 2. Qualidade. 3. Leite.
4. Laboratório. I. Barbosa, Rosângela Silveira. II. Série.

CDD 636.2

Autores

Rosângela Silveira Barbosa

Médica-veterinária, doutora em Zootecnia, pesquisadora da Embrapa Clima Temperado, Pelotas, RS

Marcelo Bonnet Alvarenga

Engenheiro de Alimentos, doutor em Ciências de Alimentos, analista da Embrapa Clima Temperado, Pelotas, RS

Bianca Pio Ávila

Engenheira-agrônoma, doutora em Ciência e Tecnologia de Alimentos, bolsista do Projeto Leite Seguro, Embrapa Clima Temperado, Pelotas, RS

Giovana Paula Zandoná

Tecnóloga em Alimentos, doutora em Ciência e Tecnologia de Alimentos, bolsista do Projeto Leite Seguro, Embrapa Clima Temperado, Pelotas, RS

Fernanda Moreira Oliveira

Engenheira de Alimentos, doutora em Ciência e Tecnologia de Alimentos, bolsista do Projeto Leite Seguro, Embrapa Clima Temperado, Pelotas, RS

Rosane Lopes Crizel

Química de Alimentos, doutora em Ciência e Tecnologia de Alimentos, bolsista do Projeto Leite Seguro, Embrapa Clima Temperado, Pelotas, RS

Apresentação

O Brasil é destaque por sua elevada competitividade e liderança na produção de leite e produtos derivados, destacando-se na adequação dos sistemas de controle de qualidade e segurança em todos os processos da cadeia produtiva.

O uso de antimicrobianos é uma preocupação na cadeia de produção de leite, uma vez que o tratamento inadequado de infecções pode levar à produção de leite com antimicrobianos em quantidades superiores aos limites máximos de resíduos (LMR) estabelecidos para proteção da saúde dos consumidores. A resistência aos antimicrobianos, frequentemente associada ao mau uso desses fármacos, é considerada pela Organização Mundial da Saúde (OMS) uma das maiores ameaças globais de saúde pública.

Visando o atendimento das normas nacionais, Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes (PNCRC/Animal), PNCRC, exigências do mercado e principais órgãos mundiais de sistemas de controle e segurança alimentar, o Laboratório de Qualidade do Leite da Embrapa Clima Temperado (Lableite), integrante da Rede Brasileira de Qualidade do Leite, oferece análises qualitativas e quantitativas, por meio de testes comerciais e equipamentos cromatográficos, e dispõe de equipe qualificada para pesquisar os resíduos de antimicrobianos em leite e derivados. O objetivo desta publicação é orientar os produtores e técnicos do setor leiteiro sobre a rotina de coleta e encaminhamento de amostras de leite, do estabelecimento rural até o Lableite, para a determinação de resíduos antimicrobianos segundo padrões técnicos de excelência técnica.

Waldyr Stumpf Junior

Chefe-Geral Interino da Embrapa Clima Temperado

Sumário

Introdução	9
Tipos de análises para pesquisa de antimicrobianos	9
Análises qualitativas	9
Análises quantitativas	10
Coleta de amostras	10
Coleta de amostra individual	10
Coleta de amostra do tanque de resfriamento	11
Volume de leite coletado	11
Fechamento do frasco	11
Identificação, armazenamento e envio de amostras	11
Cuidados gerais	12
Critérios necessários para o recebimento de amostras em leite in natura	12
Endereço para envio das amostras	13
Referências	13

Introdução

A cadeia produtiva do leite no Brasil cresceu substancialmente nas últimas décadas, a ponto de o País se tornar o terceiro maior produtor mundial de leite (FAO, 2022). Em vista dessa relevante participação no setor, fez-se necessária a criação do Programa Nacional de Qualidade do Leite (PNQL), com o intuito de promover a melhoria da qualidade do leite brasileiro, garantir a segurança alimentar da população, agregar valor aos produtos lácteos, evitar perdas e, consequentemente, aumentar a competitividade do leite e seus derivados (MAPA, 2021).

Para atingir os objetivos do PNQL e possibilitar o monitoramento sistemático da qualidade do leite, existe a Rede Brasileira de Laboratórios de Controle da Qualidade do Leite (RBQL), composta por nove laboratórios credenciados pelo Ministério da Agricultura e Pecuária (Mapa). O Laboratório de Qualidade do Leite da Embrapa Clima Temperado (Lableite), localizado na Embrapa Clima Temperado (Estação Terras Baixas) é um dos integrantes da RBQL (MAPA, 2023).

No Lableite são recebidas amostras de leite cru refrigerado dos produtores da região sul do Rio Grande do Sul, para realização de análises de qualidade, sob Sistema de Inspeção Federal (SIF), seguindo as Instruções Normativas nº 76 e 77, de 26 de novembro de 2018 (BRASIL, 2018a; BRASIL, 2018b). Além dessas instruções normativas, existe o Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes (PNCRC/Animal), uma ferramenta de gerenciamento de riscos adotada pelo Mapa, que tem o objetivo de promover a segurança química dos alimentos de origem animal processados em estabelecimentos sob Serviço de Inspeção Federal (SIF), por meio da Instrução Normativa (IN) nº 42/1999 (BRASIL, 1999; BRASIL, 2019). No PNCRC/Animal, os testes realizados verificam o respeito aos limites máximos de resíduos químicos em produtos animais aplicáveis no Brasil, os quais são estabelecidos pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa), abrangendo ampla gama de fármacos veterinários autorizados e proibidos, agrotóxicos, contaminantes inorgânicos, micotoxinas e dioxinas.

Tanto a IN nº 77 quanto o PNCRC abordam os antimicrobianos no leite, que são fármacos veterinários comumente utilizados no tratamento de sinais clínicos e doenças em animais produtores de leite (Jank; Louíse, 2017). Entretanto, o uso indiscriminado de antimicrobianos ocasiona a detecção de resíduos do medicamento no leite cru (Zahreddine et al., 2021). Se essas substâncias estiverem presentes no leite cru em níveis que excedem os limites máximos de resíduos (LMR), podem causar alergia, toxicidade e resistência a antimicrobianos no consumidor. A resistência aos antimicrobianos é considerada pela Organização Mundial da Saúde (OMS) uma das maiores ameaças globais de saúde pública (WHO, 2017).

No Lableite são realizados testes qualitativos (kits comerciais) e quantitativos (cromatografia), para avaliação de resíduos de antimicrobianos em leite cru. Assim, este Documento foi elaborado com o objetivo de orientar a realização da coleta e encaminhamento correto de amostras de leite cru para a determinação de resíduos de antimicrobianos no Lableite.

Tipos de análises para pesquisa de antimicrobianos

De acordo com a IN nº 76 (BRASIL, 2018), faz-se necessária a realização de pesquisa de resíduos de produtos de uso veterinário em leite cru. Os ensaios podem ser divididos em análises qualitativas e quantitativas.

Análises qualitativas

A análise qualitativa de resíduos de antimicrobianos consiste em testes lentos e rápidos. No Lableite são utilizados dois testes lentos, o Delvotest® T e o Charm® Blue Yellow II. Esses testes são baseados na inibição de crescimento microbiano, com duração em torno de 3h15 e seus resultados

são apresentados como: positivo ou negativo. Os testes lentos são realizados conforme a norma ISO 18330:2003 | IDF 188:2003.

O teste rápido utilizado no Lableite é o Charm® ED, um ensaio imunoenzimático, com tecnologia de fluxo lateral ROSA®. Dependendo da família de antimicrobiano, tem-se um tipo de fita de teste: QUAD 1 – betalactâmicos, quinolonas, sulfonamidas e tetraciclina-livres; QUAD 2 – macrolídeos e gentamicina; QUAD 3 – aminoglicosídeos; ANFENICOL – anfenicol. Os testes podem ter duração de 5 minutos (QUADs) a 8 minutos (ANFENICOL) e seus resultados são expressos como positivo ou negativo, além de informar a família do antimicrobiano presente. O teste rápido é realizado conforme a norma ISO/TS 26844:2006 | IDF/RM 215:2006.

Análises quantitativas

Os ensaios de análise quantitativa de resíduos antimicrobianos no leite no Lableite são realizados em dois conjuntos de equipamentos. O primeiro conjunto consiste num cromatógrafo líquido acoplado a um espectrômetro de massas híbrido quadrupolo e tempo de voo (LC-QTOF), e o outro, num cromatógrafo líquido acoplado a um espectrômetro de massas do tipo triplo quadrupolo (LC-QqQ). A validação dos métodos para determinação da concentração de resíduo de antimicrobianos é realizada de acordo com o Regulamento de Execução UE 2021/808 e os resultados são expressos em ppb ou µg/L. Para atendimento ao PNCRC com relação aos limites máximos de resíduos (LMR), o cliente do laboratório, solicitante da análise, deve consultar a IN n° 162, de 1° de julho de 2022.

Coleta de amostras

Para que o Laboratório de Qualidade do Leite (Lableite) receba amostra de leite para análise, o cliente deverá enviar um e-mail manifestando o interesse na realização de tal análise, para o endereço cpact.lab.leite@embrapa.br, a fim de receber as devidas orientações. A coleta de amostra de leite cru bovino é de responsabilidade do cliente e deverá estar de acordo com os procedimentos de Instruções e Solicitação de Ensaio e Coleta de Amostras (LQL.PO.001).

O procedimento de coleta deve partir dos sistemas de ordenha manual, ordenha mecânica em balde ao pé, ordenha mecânica com medidores de leite ou tanque de resfriamento.

Coleta de amostra individual

Ordenha manual e ordenha mecânica em balde ao pé

Após o término da ordenha completa da vaca individual, deverá ser realizada a homogeneização do leite utilizando homogeneizador manual, fazendo-se 10 movimentos suaves de cima para baixo, com uso de agitador apropriado, conforme Figura 1. Em seguida, com auxílio de uma concha, a amostra deverá ser transferida para frasco de coleta, de primeiro uso, sem conservante, tampa natural e não estéril, fornecido pelo laboratório que será responsável pela análise, conforme Figura 2.



Foto: Juliana Volz

Figura 1. Procedimento para homogeneização do leite em balde.



Foto: Juliana Volz

Figura 2. Coleta das amostras de leite em frascos de coleta, de primeiro uso, sem conservante, tampa natural e não estéril, fornecido pelo laboratório que será responsável pela análise.

Ordenha mecânica com medidores de leite

O leite deve ser coletado logo após o término da ordenha, diretamente do medidor para o frasco de coleta (de primeiro uso, sem conservante, tampa natural e não estéril).

Coleta de amostra do tanque de resfriamento

Ligar o agitador do tanque por, no mínimo, 5 minutos (para tanques com capacidade inferior a 3.000 L) ou 10 minutos (para tanques com capacidade superior a 3.000 L) para que ocorra a homogeneização do leite. Após, com uma concha coletar a amostra, transferindo-a para um frasco de primeiro uso, sem conservante, tampa natural e não estéril.

Volume de leite coletado

O volume de amostra coletado deve ser de aproximadamente 40 mL (Figura 3) obedecendo o limite da terceira marcação no frasco (Figura 4).



Foto: Renata Dalbarn

Figura 3. Acondicionamento da amostra de leite em frascos com volume máximo de 40 mL.



Foto: Bianca Ávila

Figura 4. Marcações do frasco para coleta de leite.

Fechamento do frasco

O frasco de polipropileno deverá estar devidamente fechado, sem lacre, sem fita adesiva ao redor da tampa.

Identificação, armazenamento e envio de amostras

- 1) A amostra deverá ser acondicionada em frasco de primeiro uso, sem conservante, tampa natural e não estéril, identificada com etiqueta contendo um código unívoco fornecido pelo Lableite. Além disso, deverá ser preenchida e entregue, juntamente com o lote de amostra(s), a Planilha de Coleta de Campo (LQL.FO.012) com informações do cliente e da(s) amostra(s) de leite coletada(s).
- 2) Após a coleta, a(s) amostra(s) deve(m) ser armazenada(s) em resfriador até seu transporte ao Lableite. As amostras destinadas exclusivamente para análise de cromatografia deverão ser congeladas em freezer (-20 °C) logo após a coleta, e tão logo encaminhadas ao Lableite, seguindo os prazos estabelecidos para análise.
- 3) Para o transporte, as amostras devem manter a temperatura entre 0 e 10 °C ou, no caso de congeladas, manter a condição de temperatura de congelamento até a chegada ao Lableite. Para tanto, devem ser acondicionadas em caixas de isopor/isotérmicas contendo gelo reutilizável (gelox). No caso das amostras refrigeradas, deve-se

realizar isolamento com papelão ou papel (por exemplo: jornal) para evitar o contato direto da amostra com o gelox. Além disso, o espaço entre o gelox e a tampa da caixa deverá ser preenchido com papelão ou papel (figura 5), a fim de evitar o congelamento das amostras pelo contato com o gelox.

- 4) O transporte deverá ser realizado o mais breve possível, para que a amostra coletada chegue ao laboratório em condições adequadas para realização das análises.

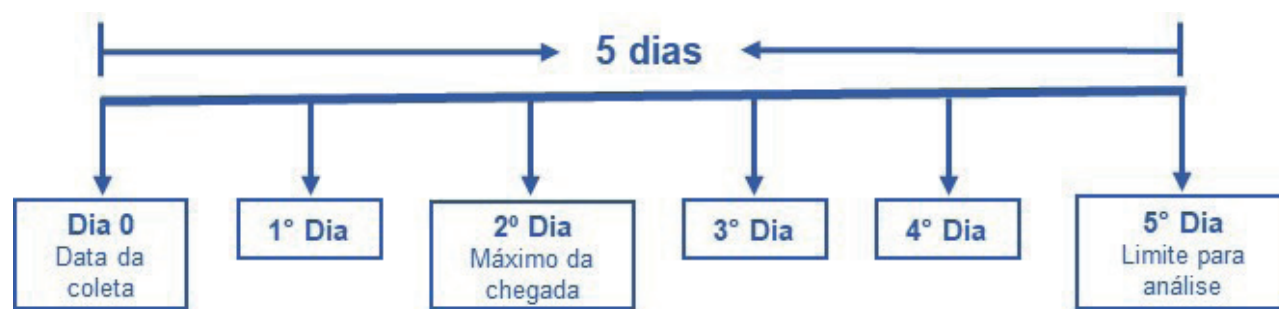


Fotos: Renata Dalbann

Figura 5. Acondicionamento de amostra de leite para análises. Amostras em caixa isopor contendo gelo reutilizável e disposição do papel jornal, para evitar o contato direto da amostra com o gelox, no caso de amostras não congeladas (A); disposição dos gelos reutilizáveis sobre as amostras para auxiliar na manutenção da temperatura até o envio ao laboratório (B); preenchimento da caixa até a tampa, com jornal ou outro tipo de papel (C).

- 5) A Planilha de Coleta de Campo (LQL.FO.012) deve ser anexada na parte interna da tampa da caixa de isopor/isotérmica, envolta em plástico colado com fita adesiva, ou ainda, enviada pelo e-mail cpact.leb.leite@embrapa.br ao laboratório.

- 6) As amostras podem ser enviadas por transportadoras, correio ou entregues diretamente no Lableite. As amostras refrigeradas que serão analisadas por meio de kits comerciais devem ser enviadas ao laboratório antes do prazo máximo de 2 dias.



Elaboração: Rosângela Barbosa

Figura 6. Cronograma dos prazos de chegada e análise após a data da coleta.

Cuidados gerais

- 1) Na coleta de amostra individual, NUNCA coletar o leite diretamente do animal.
- 2) Na coleta de amostra do tanque NUNCA coletar o leite pelo registro do tanque.
- 3) TODAS as informações referentes à coleta deverão ser registradas na Planilha de Coleta de Campo (LQL.FO.012).
- 4) NUNCA vedar as tampas dos frascos de coleta de amostras com fita adesiva.

- 5) NUNCA recongelar as amostras destinadas à cromatografia.

Crítérios necessários para o recebimento de amostras em leite in natura

- 1) A caixa isotérmica ou isopor deverá estar devidamente embalada e vedada, não apresentando qualquer dano que comprometa a conservação, integridade e identidade da amostra.

- 2) O formulário com informações do cliente e da(s) amostra(s) de leite coletada(s) deve acompanhar o lote de amostras, devidamente preenchido. O formulário LQL.FO.012 deve ser acondicionado em saco plástico vedado e fixado na parte interna da tampa da caixa isotérmica ou isopor e/ou enviado para o e-mail cpact.lab.leite@embrapa.br.
- 3) O responsável pela entrega da amostra deverá assinar um registro de entrega da amostra.
- 4) A triagem das amostras será realizada por um profissional do Lableite devidamente capacitado para realizar a atividade.
- 5) A temperatura da amostra deve estar entre 0 e 10 °C, para solicitações de análises em testes comerciais qualitativos (lento e rápido); caso esteja fora dessa variação, a amostra será descartada. Para cromatografia, as amostras devem estar congeladas.
- 6) O prazo máximo de análise para testes qualitativos é de até 5 dias, e quantitativos (amostras estarão congeladas após a coleta), de até 3 meses, a contar do prazo de coleta das amostras de leite.
- 7) Após a abertura do registro de entrega das amostras, essas são submetidas a uma triagem, de acordo com os critérios de recebimento de amostras estipulado pelo Manual de Procedimentos para Laboratórios, disponível na página eletrônica do Mapa.
- 8) As amostras que apresentarem regularidade na triagem são encaminhadas para análise.
- 9) As amostras que forem consideradas não conformes, em desacordo com as determinações do Mapa, serão descartadas, gerando-se os registros pertinentes, arquivando-se a via no Laboratório.
- 10) Os motivos para a não realização da análise de uma amostra pelo laboratório são evidenciados por uma triagem.
- 11) Os documentos para suporte na coleta de amostras de leite devem ser acessados pelo link: <https://drive.google.com/drive/u/0/folders/1nkZRFJIHjbnuvV59LFf-kAia3e-seAP5>.

Endereço para envio das amostras

As amostras devem ser enviadas aos cuidados do laboratório para o seguinte endereço:
Laboratório de Qualidade do Leite – Lableite
Embrapa Clima Temperado
Estação Experimental Terras Baixas – ETB Campus
Universitário, s/n°, Capão do Leão, RS

É importante destacar o horário de recebimento de amostras no Lableite Embrapa Clima Temperado: de segunda-feira a sexta-feira, das 8h30 às 11h30 e das 13h às 16h30.

Referências

BRASIL. Ministério da Agricultura e Pecuária. **Programa Nacional de Qualidade do Leite** - PNQL. Disponível em: <https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/inspecao/produtos-animal/qualidade-do-leite-pnql>. Acesso em: 26. jul. 2023.

BRASIL. Ministério da Agricultura e Pecuária. **Rede Brasileira de Qualidade do Leite** - RBQL. Disponível em: <https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/lfdalaboratorios-credenciados/laboratorios-credenciados/produtos-de-origem-animal/rede-brasileira-de-qualidade-do-leite-rbql>. Acesso em: 26. jul. 2023.

BRASIL. Ministério da Agricultura e Pecuária. Secretaria de Defesa Agropecuária. **Manual de coleta de amostras de produtos de origem animal**. Versão 06. Brasília, DF: MAPA, 2021.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Instrução Normativa n. 42**, de 20 de dezembro de 1999. Altera o Plano Nacional do Controle de Resíduos em Produtos de Origem Animal – PNCRC e os Programas de Controle de Resíduos em Carne – PCRC, Mel – PCRM, Leite – PCRL e Pescado - PCRP. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 1999.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Instrução Normativa n. 76**, de 26 de novembro de 2018. Aprovam os Regulamentos Técnicos que fixam a identidade e as características de qualidade que devem apresentar o leite cru refrigerado, o leite pasteurizado e o leite pasteurizado tipo A. Diário Oficial da União, Brasília, DF, n. 230, 2018a.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Instrução Normativa n. 77**, de 26 de novembro de 2018. Estabelece os critérios e procedimentos para a produção, acondicionamento, conservação, transporte, seleção e recepção do leite cru em estabelecimentos registrados no serviço de inspeção oficial. Diário Oficial da União, Brasília, DF, n. 230, 2018b.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Instrução Normativa n. 162**, de 1º de julho de 2022. Estabelece a ingestão diária aceitável (IDA), a dose de referência aguda (DRfA) e os limites máximos de resíduos (LMR) para insumos farmacêuticos ativos (IFA) de medicamentos veterinários em alimentos de origem animal. Diário Oficial da União, Brasília, DF, n. 126, 2022.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal. Coordenação Geral de Programas Especiais. Coordenação de Caracterização de Risco. **Anuário dos Programas de Controle de Alimentos de Origem Animal do DIPOA**. Brasília, DF: MAPA, 2019. v. 5.

FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations). FAO STAT - Livestock Primary. Roma, 2019. Disponível em: <https://www.fao.org/faostat/en/>. Acesso em: 28 mar. 2022.

JANK, L. **Avaliação da Incidência de Antimicrobianos em Produtos de Origem Animal**. 2017. 138 f. Tese (Doutora em Química) - Instituto de Química, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

WHO (World Health Organization). **Stop using antibiotics in healthy animals to prevent the spread of antibiotic resistance**. Geneva, 2017. Disponível em: <https://www.who.int/news/item/07-11-2017-stop-using-antibiotics-in-healthy-animals-to-prevent-the-spread-of-antibiotic-resistance>. Acesso em: 25 jul. 2023.

ZAHREDDINE, Z.; JABER, A.; HALDAR, S.A.; HOSRI, C.; IBRAHIM, G., and CHEBL, E. HPLC-DAD multi-residue method for determination of florfenicol, penicillin and tetracycline residues in raw cow milk. **Journal of Clinical and Laboratory Research**, v. 2, n. 3, 2021. DOI: 10.31579/jclr.2021/017.

