

Ocorrência de cloranfenicol em leite pasteurizado comercializado no Estado do Paraná, Brasil

Renata Cabrera de Oliveira^{1*}, Érika Bando² e Miguel Machinski Junior³

¹Curso de Graduação em Farmácia, Universidade Estadual de Maringá, Av. Colombo, 5790, 87020-900, Maringá, Paraná, Brasil. ²Programa de Pós-graduação em Análises Clínicas, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, Paraná, Brasil.

³Departamento de Análises Clínicas, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, Paraná, Brasil. *Autor para correspondência. E-mail: renata29269@hotmail.com

RESUMO. A presença de resíduos de cloranfenicol no leite pode causar efeitos tóxicos na população exposta. O objetivo deste trabalho foi investigar a ocorrência de cloranfenicol em amostras de leite comercializadas no Estado do Paraná, Brasil. Foram analisadas 151 amostras de leite pasteurizado B e C de 61 marcas diferentes, comercializadas em 35 municípios. Os resíduos de cloranfenicol foram analisados por ensaio imunoenzimático (ELISA). Foram detectados resíduos de cloranfenicol em quatro (2,6%) das amostras analisadas, sendo duas amostras de leite tipo B e duas do tipo C. Esses dados demonstram que esse antimicrobiano continua sendo utilizado em animais destinados ao consumo humano ou há presença de contaminantes ambientais. Portanto, há necessidade de programas de monitoramento de resíduos de medicamentos veterinários em alimentos para garantir sua qualidade e, conseqüentemente, proteção à saúde humana.

Palavras-chave: cloranfenicol, leite, ELISA.

ABSTRACT. Occurrence of chloramphenicol in pasteurized milk commercialized in the state of Paraná. The presence of chloramphenicol residues in milk can cause toxic effects on the exposed population. The aim of this work was to investigate the occurrence of chloramphenicol in milk samples commercialized in the state of Paraná, Brazil. 151 pasteurized milk samples, type B and C of 61 different marks, commercialized in 35 cities were analyzed. Chloramphenicol residues were examined by enzyme immunoassay (ELISA). Chloramphenicol residues were detected in four (2.6%) out of the milk samples analyzed, being two samples of type B and two of type C. These data show that either this antibiotic is still being used in animals destined to human consumption or there is environmental contamination. Thus, monitoring programs are needed to verify veterinary drug residues in food to certify its quality and, consequently, protection of human health.

Key words: chloramphenicol, milk, ELISA.

Introdução

O cloranfenicol é um antimicrobiano de amplo espectro, com excelentes propriedades antibacteriana e farmacocinética (Ferguson *et al.*, 2005), produzido por *Streptomyces venezuelae* ou por síntese química (Botsoglou e Fletouris, 2001). O uso clínico em humanos desse antibiótico é limitado ao tratamento de doenças como febre tifóide, meningite bacteriana e conjuntivite, pois está freqüentemente associado ao aparecimento de sérios efeitos colaterais como anemia aplástica, uma rara e séria desordem sangüínea (Franklin e Snow, 1989; IARC, 1990; FAO/WHO, 1994; Roybal, 1998).

Na União Européia, Estados Unidos, Canadá, e em muitos outros países (Ferguson *et al.*, 2005), inclusive o Brasil, o uso de cloranfenicol é proibido em animais utilizados para consumo humano,

devido a sua toxicidade.

A maioria dos países estabelece, em suas legislações sanitárias, regulamentação para o uso de antimicrobianos na pecuária, definindo os limites máximos de resíduos (LMR) nos alimentos de origem animal (Ruela *et al.*, 2005). Para o cloranfenicol, o LMR não foi estabelecido, porque seus efeitos tóxicos não são dose-dependente (Guy *et al.*, 2004).

Como o uso do cloranfenicol é proibido, os métodos de análise devem apresentar um baixo limite de detecção (Ferguson *et al.*, 2005). Métodos de triagem como o de inibição bacteriana e testes imunológicos são utilizados para monitorização de resíduos de antimicrobianos no leite, além de técnicas analíticas mais sensíveis e específicas para identificação e quantificação dos resíduos de antimicrobianos presentes no leite, como a cromatografia líquida e

gasosa (Schenck e Callerry, 1998).

O ensaio imunoenzimático (ELISA) é um método bastante utilizado para detecção de compostos químicos em alimentos, pois possui alta sensibilidade e simplicidade de execução (Jin *et al.*, 2006) e permite que muitas amostras sejam realizadas em um curto período de tempo (Haasnoot *et al.*, 1999), porém resultados positivos obtidos por essa metodologia devem ser confirmados por técnicas com maior especificidade (Petz, 1996).

O objetivo deste trabalho foi investigar a ocorrência de contaminação por cloranfenicol em amostras de leite pasteurizado comercializadas no Estado do Paraná, Brasil.

Material e métodos

Amostras

Foram coletadas 151 amostras de leite pasteurizado B e C de 61 diferentes marcas comercializadas em 35 municípios do Estado do Paraná, Brasil, no período de março de 2005 a abril de 2006. As amostras foram armazenadas sob congelamento (-18°C) e testadas imediatamente após o descongelamento.

Reagentes

A determinação de cloranfenicol em leite foi realizada utilizando o kit de ELISA da marca Ridascreen Chloramphenicol produzido pela empresa R-Biopharm®. O kit foi mantido, conforme instruções do fabricante, sob temperatura de 2-8°C, protegido da luz e devidamente embalado até o momento de uso.

O padrão de cloranfenicol utilizado foi da marca Bio Chimico (teor de pureza 100,44%), mantido sob temperatura ambiente, protegido da luz até o momento do preparo das soluções.

Os demais reagentes utilizados foram da marca Synth e grau analítico.

Para o preparo da solução tampão fosfato (PBS) pH 7,8, misturou-se 8,5 mL da solução A com 91,5 mL da solução B. Solução A: 8,64 g de fosfato de potássio monobásico (KH₂PO₄.H₂O) em 1000 mL de água destilada. Solução B: 9,48 g de fosfato de sódio dibásico anidro (Na₂HPO₄) em 1000 mL de água destilada (Scortichini *et al.*, 2005).

O Reagente de Carrez I foi preparado dissolvendo-se 15,2 g de ferrocianeto de potássio trihidratado (K₄Fe(CN)₆.3H₂O) em 100 mL de água destilada. Para o preparo do Reagente de Carrez II, dissolveram-se 29,9 g de sulfato de zinco hepta-hidratado (ZnSO₄.7H₂O) em 100 mL de água destilada.

A solução estoque de cloranfenicol (2.10⁸ ppt) foi preparada em tampão PBS, armazenado em frasco

âmbar e mantido sob temperatura de 2-8°C, até o momento da utilização.

A solução intermediária de cloranfenicol (1.10⁴ ppt) foi obtida a partir da solução estoque e armazenada como descrito acima. Essa solução foi diluída em tampão PBS, imediatamente antes das análises, para o preparo das curvas de calibração.

As soluções padrão de trabalho (50; 150; 450; 1350 e 4050 ng L⁻¹), utilizadas nas curvas de calibração, foram preparadas imediatamente antes das análises por diluição da solução intermediária em tampão PBS e 50 µL foram utilizados para o teste. Para a concentração 0 ng L⁻¹ foi utilizada uma alíquota de 50 µL do tampão PBS.

Equipamentos

Os equipamentos utilizados foram espectrofotômetro para placas de ELISA Stat Fax 303 Intertek®, centrífuga Fanem®, agitador vortex Phoenix®, micropipetas de volume variável Gilson® e micropipeta multicanal de volume variável High Tech Lab®.

Preparo das amostras

Das 151 amostras, 69 foram preparadas utilizando o Reagente de Carrez e extração com acetato de etila. Cada amostra (5 mL) foi desproteïnizada com 250 µL do Reagente de Carrez I e II, agitada em vortex, refrigerada a 8°C e centrifugada (10 minutos a 3000 g). O sobrenadante (2,2 mL) foi extraído com acetato de etila por agitação durante 10 minutos e centrifugação (10 minutos a 3000 g). Uma alíquota de 2 mL do sobrenadante foi transferida para um frasco e evaporada a 60°C. O resíduo seco foi ressuscitado em 250 µL do tampão 1 de diluição do kit e 50 µL foram usados para o teste. As demais amostras foram resfriadas a 8°C e desengorduradas por centrifugação (15 minutos a 3000 g) e 50 µL do leite desnatado foram usados para o teste.

Procedimento analítico

As amostras de leite foram analisadas em duplicata utilizando o kit Ridascreen® Chloramphenicol. Para a realização dos testes, foram adicionados, em cada microcavidade, soluções padrão de trabalho ou amostras, a enzima peroxidase conjugada com cloranfenicol e anticorpo anticloranfenicol. Após incubação durante duas horas à temperatura ambiente e a etapa de lavagem, foram adicionados o substrato da enzima (peróxido de uréia) e o cromógeno (tetrametilbenzidina). As placas foram reincubadas durante 30 minutos à temperatura ambiente em local protegido da luz.

Após esse período, adicionou-se ácido sulfúrico 1N para interromper a reação. A leitura foi realizada em 450 nm. Os valores de absorvância obtidos para os padrões foram multiplicados por 100 e divididos pela média dos valores determinados para o padrão 0,0 ng L⁻¹, calculando-se as porcentagens de absorção. A curva de calibração foi determinada por análise de regressão relacionando-se o logaritmo natural da concentração (eixo das abcissas) com a porcentagem da absorção (eixo das ordenadas). A concentração de cloranfenicol em ng L⁻¹ correspondente à absorvância de cada amostra foi lida a partir da curva de calibração. Para obter a concentração de cloranfenicol contida na amostra, a concentração lida na curva de calibração foi multiplicada pelo fator de diluição 0,25, correspondente ao preparo da amostra com o reagente de Carrez. O programa RIDA[®] SOFT Win foi utilizado para os cálculos das curvas de calibração e concentração das amostras. O limite de detecção do teste é de 150 ng L⁻¹.

Resultados

Das 151 amostras analisadas, quatro apresentaram resultados positivos, correspondendo a 2,6% do total de amostras analisadas. Destas, duas eram do tipo B e duas do tipo C. Foram considerados positivos somente os resultados superiores ao limite de quantificação do método, 150 ng L⁻¹. As amostras positivas apresentaram níveis de cloranfenicol entre 156,6 e 402,4 ng L⁻¹ (Tabela 1).

Tabela 1. Níveis de contaminação por cloranfenicol em amostras de leite pasteurizado comercializado no Estado do Paraná, período março/2005 a abril/2006.

Número de registro	Concentração de cloranfenicol (ng L ⁻¹)
384	156,6
527	186,7
586	164,3
587	402,4

Discussão

O PAMVet, Programa de Análise de Resíduos de Medicamentos Veterinários em Alimentos de Origem Animal, analisou 306 amostras de leite UHT e leite em pó coletadas em diversos estados do Brasil entre agosto e dezembro de 2004. Destas, 22 (5%) estavam contaminadas por cloranfenicol. Entre as 306 amostras analisadas, 40 eram do Estado do Paraná e nenhuma delas apresentou contaminação por cloranfenicol (Anvisa, 2006). Os resultados encontrados nesta investigação demonstram um aumento na contaminação por cloranfenicol em leite comercializado no Estado do Paraná entre os anos de

2004 e 2006.

Um estudo realizado entre os anos de 2002 e 2003 na Alemanha, em que mais de 17500 amostras de carne de gado, suínos e aves foram analisadas, indicou que menos de 0,2% das amostras coletadas em fazendas e matadouros desse país continham resíduos de cloranfenicol (FAO/WHO, 2004).

De acordo com os dados da Comissão Européia (2004), amostras de leite em pó e produtos de leite analisados apresentaram níveis de 21 a 1230 ng L⁻¹ e 300 a 1270 ng L⁻¹, respectivamente (FAO/WHO, 2004).

Cerkvenik (2002) analisou amostras de alimentos de origem animal, incluindo carne, leite e ovos. As amostras foram coletadas na Eslovênia no período de 1991 a 2000. Das 1308 amostras de carne, leite e ovos analisadas, a única positiva foi uma amostra de leite coletada em 1997. Esses resultados são devidos principalmente à estrita proibição do uso desse medicamento em animais destinados ao consumo humano e ao controle sanitário de resíduos de antimicrobianos em alimentos nesse país.

Ramirez *et al.* (2001) analisaram amostras de leite pasteurizado coletadas na Cidade do México, México, e obtiveram resultados semelhantes aos obtidos no presente trabalho. Das 102 amostras analisadas, 5 (4%) estavam contaminadas com cloranfenicol.

Esses dados indicam que embora o uso do cloranfenicol em animais destinados ao consumo humano seja proibido em muitos países, esse antimicrobiano pode estar sendo utilizado, mesmo que em pequena escala. Embora a presença de resíduos de cloranfenicol em alimentos pode não ser necessariamente resultado de utilização intencional, estudos indicam que a presença de baixos níveis desses resíduos nos alimentos pode ocorrer devido à contaminação ambiental existente por esse antibiótico, que pode ser produzido naturalmente por bactérias (*Streptomyces venezuelae*) presentes no solo (FAO/WHO, 2004).

Conclusão

Há necessidade de programas de monitoramento de resíduos de medicamentos veterinários em alimentos para garantir sua qualidade e, conseqüentemente, segurança à saúde da população humana.

Agradecimentos

A Secretaria de Estado da Saúde do Paraná (SESA), Programa Estadual de Controle de Resíduos de Medicamentos Veterinários em Alimentos de Origem Animal (PAMvet-PR) e Laboratório Central do Estado do Paraná (Lacen-PR).

Referências

- ANVISA-Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Programa de Análise de Resíduos de Medicamentos Veterinários em Alimentos de Origem Animal - PAMVet - Relatório 2004/2005 - Monitoramento de Resíduos em Leite Exposto ao Consumo, 2006. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/alimentos/pamvet/relat%F3rio_leite_2004-05.pdf>. Acesso em: 24 nov. 2006.
- BOTSOUGLOU, N.A.; FLETOURIS, D.J. *Antibacterial drugs, drugs residues in foods pharmacology, food safety, and analysis*. New York: Marcel Dekker, 2001. p. 85-94.
- CERKVENIK, V. Analysis and monitoring of chloramphenicol residues in food of animal origin in Slovenia from 1991 to 2000. *Food Addit. Contam.*, London, v. 19, n. 4, p. 357-367, 2002.
- FAO/WHO. Evaluation of certain veterinary drug residues in food. Forty-second Meeting of the Joint FAO/WHO. Expert Committee on Food Additives, *Chloramphenicol Monograph*, FAO Food and Nutrition Paper 41/6. Rome, 1994.
- FAO/WHO. Toxicological Evaluation of certain veterinary drug residues in food. Sixty-second Meeting of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives, *Chloramphenicol Monograph*, FAO Food and Nutrition Paper 53. Rome, 2004.
- FERGUSON, J. et al. Detection of chloramphenicol and chloramphenicol glucuronide residues in poultry muscle, honey, prawn and milk using a surface plasmon resonance biosensor and Qflex® kit chloramphenicol. *Anal. Chim. Acta*, Amsterdam, v. 529, n. 1-2, p. 109-113, 2005.
- FRANKLIN, T.J.; SNOW, G.A. *Biochemistry of antimicrobial action*. 4. ed. New York: Chapman and Hall, 1989. p. 128.
- GUY, P.A. et al. Quantitative determination of chloramphenicol in milk powders by isotope dilution liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A*, Amsterdam, v. 1054, n. 1-2, p. 365-371, 2004.
- HAASNOOT, W. et al. Immunochemical detection of aminoglycosides in milk and kidney. *Analyst*, London, v. 124, n. 3, p. 301-305, 1999.
- IARC-International Agency for Research on Cancer. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. *Pharmaceutical Drugs*, Lyon, v. 50, p. 415, 1990.
- JIN, Y. et al. Development of ELISA and immunochromatographic assay for the detection of neomycin. *Clin. Chim. Acta*, Amsterdam, v. 364, n. 1-2, p. 260-266, 2006.
- PETZ, M. Residue analysis for antibiotics. *Meat Focus Int.*, Wallingford, v. 5, n. 10, p. 352-353, 1996.
- RAMIREZ, A. et al. Detection of antibiotics in commercialized milk in Mexico City. *Rev. Salud Animal*, Mexico, v. 23, n. 1, p. 37-41, 2001.
- ROYBAL, J.E. Chloramphenicol and Related Drugs. In: TURNIPSEED, S.B.; LONG A.R. (Ed.). *Analytical procedures for drug residues in food of animal origin*. West Sacramento: Science Technology System, 1998. p. 227.
- RUELA, I.C.A. et al. Otimização e validação de método para a determinação de resíduos de oxitetraciclina, tetraciclina e clortetraciclina em leite por cromatografia líquida de alta eficiência. *Cienc. Tecnol. Aliment.*, Campinas, v. 25, n. 1, p. 139-146, 2005.
- SCHENCK, F.J.; CALERRY, P.S. Chromatographic methods of analysis of antibiotics in milk. *J. Chromatogr. A*, Amsterdam, v. 812, p. 99-109, 1998.
- SCORTICHINI, G. et al. ELISA qualitative of chloramphenicol in muscle, eggs, honey and milk: method validation according to the Commission Decision 2002/657/EC criteria. *Anal. Chim. Acta*, Amsterdam, v. 535, n. 1-2, p. 43-48, 2005.

Received on February 16, 2007.

Accepted on April 16, 2007.