

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

**Pesquisa para a detecção de resíduos
inibidores em leite cru produzido
na região de Uberlândia(MG).**

Mirian Francisca Martins Queiroz

Monografia apresentada à coordenação do
Curso de Ciências Biológicas da
Universidade Federal de Uberlândia para
Obtenção de grau de Bacharel
em Ciências Biológicas.

UBERLÂNDIA
1997

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

**Pesquisa para a detecção de resíduos
inibidores em leite cru produzido
na região de Uberlândia-MG.**

Mirian Francisca Martins Queiroz

Prof^a Maria Aparecida Martins R. Junqueira
Orientadora

Monografia apresentada à coordenação do
Curso de Ciências Biológicas da Universidade
Federal de Uberlândia para obtenção
do grau de Bacharel em Ciências Biológicas.

UBERLÂNDIA
1997

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

**Pesquisa Para detecção de Resíduos
Inibidores em Leite Cru produzido
na Região de Uberlândia-MG.**

Mirian Francisca Martins Queiroz

Aprovada pela comissão examinadora ____/____/____. Média ____

Prof.^a Maria Aparecida M. R. Junqueira
Orientadora

Prof.^a Fernanda Paula Collares
Conselheira

Prof.^o José Luiz G. A. Oliveira
Conselheiro

Uberlândia, 26 de junho 1997

DEDICAÇÃO

A DEUS

“Que Deus maravilhoso nós temos! Como são grandiosos sua sabedoria, seus conhecimento e suas riquezas! Como é possível a nós compreendermos suas decisões e seus métodos! Quem é, dentro nós, que pode conhecer a sua mente? Quem é sábio o suficiente para ser seu conselheiro e guia? Alguém jamais pode oferecer-lhe o bastante para persuadi-lo a agir? Todas as coisas vêm única e exclusivamente de Deus. Tudo vive por seu poder, e tudo é para sua glória.”

Romanos.11-33:36

Ao meu marido, Claycson, por sua compreensão, estímulo e apoio imprescindível.

Aos meus pais e demais familiares, pelo carinho e paciência durante toda a minha carreira científica.

AGRADECIMENTOS

À prof^a Maria Aparecida Martins Rodrigues Junqueira, minha sincera gratidão, pela orientação deste trabalho e principalmente pelos ensinamentos.

À prof^a Fernanda Paula Collares, por despertar meu interesse pela área.

À Técnica de Laboratório Liana Moreira Vidigal, pelo auxílio laboratorial durante a realização deste trabalho e principalmente pela amizade e paciência.

Aos funcionários do Laboratório de Tecnologia e Inspeção de Leite e Derivados.

Aos funcionários da Cooperativa CALU, pela ajuda na obtenção das amostras coletadas.

Aos colegas, e a todas as pessoas envolvidas, que direta ou indiretamente colaboraram para a realização deste trabalho.

“O ensino está diretamente ligado à pesquisa; é sem dúvida um pré-requisito para uma pesquisa consciente dos problemas que a sociedade coloca a si mesma . Isto não significa dizer que a pesquisa deve ser desenvolvida em uma etapa posterior; ela é concomitante ao ensino. A pesquisa torna o ensino uma atividade lúcida, porque ensino sem pesquisa é mera repetição de fatos e teorias, que quase sempre estão ligados ao passado.”

Humberto Guido

RESUMO

Com o objetivo de verificar a ocorrência de resíduos inibidores, 400 amostras de leite “cru” de fornecedores da Cooperativa CALU, foram analisadas no período de março a abril de 1997 no Laboratório de Tecnologia e Inspeção de Leite e Derivados da Universidade Federal de Uberlândia. Para detecção de antibióticos, foram utilizados o método do “TTC” com os microrganismos *Streptococcus thermophilus* e *Lactobacillus bulgaricus*, e o método de “Disco e placa” em associação com o micorganismo *Bacillus subtilis*.

Os resultados obtidos permitiram verificar que a inibição total nas amostras analisadas apresentou valores baixos, mas que inibições parciais ocorreram em percentagens consideráveis, indicando a presença de resíduos inibidores inespecíficos no leite produzido na região.

Palavras chaves: antibióticos/ inibidores/ leite/ resíduos

ÍNDICE

I.INTRODUÇÃO.....	01
II.OBJETIVO.....	09
III.MATERIAL E MÉTODOS.....	10
3.1.Método do “TTC”	10
3.1.1.Procedimento.....	11
3.2.Método de “Disco e Placa”	12
3.2.1.Procedimento.....	13
IV.RESULTADO E DISCUSSÃO.....	14
4.1.Método do “TTC”	14
4.2.Método do “Disco e Placa”	16
V.CONCLUSÃO.....	19
VI.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	21
VII.ANEXOS.....	24

INTRODUÇÃO

O leite é considerado um alimento quase completo e faz parte do consumo diário, principalmente de jovens, crianças e idosos. Desta maneira , ele deve apresentar condições sanitárias adequadas, estando isento de qualquer substância estranha.(COVA,1984).

O incremento da produção de leite provocou a utilização desordenada de insumos, dentre eles os antibióticos. Tais medicamentos são usados para tratamento de mamites em gado leiteiro e são autorizados por lei, mas há limites a serem obedecidos. (Tabela 1) . “Porém, muitos trabalhos realizados no Brasil têm mostrado a falta de controle quanto à presença de substâncias estranhas, tais como antibióticos, detergentes e sanitizantes.”(REIS et al.,1963 e MELO et al.,1995 citado por MAGALHÃES).

Tabela 1-Limite Máximo Aceitável de Resíduos de Alguns Antimicrobianos no Leite

ANTIBIÓTICOS	LIMITE MÁXIMO DE RESÍDUOS NO LEITE (mg/l)
Ampicilina	0,01
Bacitracina	1,2
Cefalosporina	0,01
Cloranfenicol	0 ^{**}
Clortetraciclina	0,02
Cloxacilina	0,02
Diidroestreptomicina	0,2
Eritromicina	0,04
Estreptomicina	0,2
Nafcilina	0,02
Neomicina	0,15
Novobiocina	0,15
Nistatina	1,1
Oleandomicina	0,15
Oxitetraciclina	0,1
Penicilina	0,004
Polimixina B	5
Sulfadimidina	0,025
Tetraciclina	0,1

****A OMS não estabelece limite aceitável de resíduos para o consumo humano de cloranfenicol porque não é possível garantir que os resíduos sejam seguros para pessoas sensíveis que poderiam desenvolver anemia aplástica.**

Os inibidores exógenos do leite podem chegar a este por introdução involuntária ou fraudulenta pelo produtor, para melhorar aparentemente a qualidade bacteriológica do leite cru; pelo desrespeito ao período de carência do leite quando são utilizados os antibióticos para tratamento, principalmente de mamites (AURVALLE,1981) (FAGUNDES & MOLIN,1988), e pelos resíduos remanescentes da higienização dos diversos equipamentos e utensílios que entram em contato direto com o produto e nas suas diversas fases de produção e beneficiamento através do uso de

produtos como o cloro e o formaldeído.(BARROS & PERCHES,1981 e MARTINS,1985 citado por MAGALHÃES,1995).

JACQUET(1964) citado por DEMETER(1971), calcula que a proporção de antibióticos encontrada no leite oscila entre 30 a 80 % da quantidade de produto aplicado no úbere infectado. A persistência do antibiótico no leite está em função da dose administrada e da forma do excipiente, sendo que as formas aquosas são eliminadas em 48 horas, enquanto as oleosas levam de 4 a 5 dias após a aplicação. Especificamente o antibiótico penicilina está presente no leite por 24 horas até ser eliminado.

Os resíduos de antibióticos põem em risco a saúde humana, pois quando ingeridos podem levar a reações alérgicas em pessoas sensíveis. Resíduos de cloranfenicol podem induzir à anemia aplástica em pessoas suscetíveis, enquanto os de penicilina podem causar fenômenos de hipersensibilidade imediata ou tardia em pessoas alérgicas e previamente sensibilizadas por este antibiótico. Além dos possíveis efeitos tóxicos diretos dos resíduos de antibióticos e seus metabólitos sobre estruturas ou funções biológicas(células ou ação de enzimas), das manifestações alérgicas e indução de outros quadros patológicos , há o risco de indução à multiresistência bacteriana e sua posterior transferência entre microrganismos, especialmente Gram negativos, através de plasmídeos.(DIÁRIO OFICIAL,1993). AGUAYO et al.(1992), relataram a ocorrência de bactérias patogênicas resistentes aos antibióticos nos suplementos alimentares.

A quantidade de 0,003 unidades de penicilina/ml de leite podem causar respostas alérgicas depois da ingestão incluindo erupções na pele, asma, choque anafilático, ou até a morte. Outros resíduos de antibióticos em quantidades mínimas podem ser carcinogênicos, teratogênicos, mutagênicos, causar indução ou inibição enzimática (SEYMOUR et al., 1988).

Outro fato importante é que ocorre também um alto índice de resistência bacteriana ao antibiótico pelas bactérias intestinais levando à diarreia e dificuldade de tratamento de novos processos infecciosos. Além destes problemas, existem outros como toxicidade nos sistemas, neurológico, renal, hepático, fotossensibilização, eritroblastopenia, distúrbios ósseos e dentários, discrasias sangüíneas, nevrite ótica. (MILHARD & PEARSON,1981 e FAGUNDES & MOLIN,1988 citado por MAGALHÃES,1995).

Além dos problemas ligados à saúde, os resíduos inibidores alteram as propriedades organolépticas do leite e derivados, e prejudicam a industrialização de produtos fermentados (MARTINS & MARTINS,1985 citado por MAGALHÃES,1995). Nas indústrias, os antibióticos podem causar parcial ou total falha na fermentação. Isso porque os fermentos lácticos são inibidos por esses resíduos. No caso de propagação de cultura de espécies múltiplas contendo em média baixas concentrações de antibióticos, resultou em alterações no equilíbrio da espécie e finalmente falha no iniciador (coalho). Os resíduos antibióticos em leite têm sido identificados recentemente como principal causador, secundado apenas por bacteriófagos, de lenta produção de ácido durante a produção de queijo. (HAVERBECK et al.,1983).

Com a finalidade de elaborar produtos adequados e evitar perdas devido à presença de antibióticos em leite, várias fábricas de derivados de leite realizam testes de detecção de resíduos antes de iniciar a fabricação de seu produtos. Essa identificação de antibióticos no leite pode ser feita através de métodos diretos e indiretos.

Alguns países europeus usam de antibióticos administrados diretamente no úbere das vacas adicionados de corantes que apresentem coloração específica. Incorpora-se às doses de antibióticos um corante resistente, sem efeitos colaterais e que persiste no leite o mesmo tempo que o antibiótico, sendo esse um método indireto (DEMETER,1971).

Já os métodos diretos, podem ser químicos, microbiológicos ou combinados. Os métodos químicos compreendem as técnicas de colorimetria, de espectrofotometria e de cromatografia. Os métodos biológicos, tem suas técnicas fundadas nos efeitos bactericidas, inibitórios ou morfológicos dos antibióticos sobre o microorganismo. Vários são esses métodos, tais como: "Disc assay", "T.T.C.", "Intertest", "Oxoid", "Devoltest", etc. (TROLLDENIER,1981).

Os métodos químicos utilizados na pesquisa de inibidores bacterianos no leite são mais complexos e geralmente menos sensíveis que os métodos microbiológicos, além de não se adaptarem facilmente ao grande volume de análises (AURVALLE,1981). As pesquisas microbiológicas, por outro lado, possuem um pré-requisito no controle de inibidores em geral e não somente de uma substância específica. Os microrganismos mais utilizados nos testes são os seguintes: *Bacillus stearothermophilus*, *Bacillus subtilis*, *Streptococcus thermophilus*, *Bacillus cereus*, *Sarcina lutea* e o *Bacillus megaterium*.

United Kingdom Milk Marketing Boards tem se esforçado para diminuir a frequência de resíduos, testando regularmente o leite e impondo multas aos produtores dos quais o leite contenha maior nível de inibidores que o permitido. Na Escócia, o Milk Marketing Boards pune a presença de agentes inibidores adicionados em uma concentração igual ou maior que 0,02 U.I./ml de penicilina. E essas leis têm tido algum sucesso na redução do volume de leite contaminado por antibióticos, segundo CRAWFORD(1964) citado por HAVERBECK(1983).

A preocupação quanto a presença de antibióticos tem levado a elaboração de pesquisas, cujos resultados apresentam altos índices de inibidores, como descreveremos a seguir. A ocorrência de resíduos de inibidores bacterianos em 120 amostras de leite pasteurizado e comercializado na região de Belo Horizonte, apresentou os seguintes resultados positivos: 6,67% para leite tipo "A", 36,67% para o leite tipo "B", 0,00% para leite tipo "C" e 20% para leite "Integral-

Fazenda”, totalizando um percentual de 15,83% de amostras positivas. (BOECHAT et al.,1994 citado por MAGALHÃES,1995), representada na Tabela 2.

Tabela 2-Ocorrência de Inibidores Bacterianos em Amostras de Leite Pasteurizado Tipos “A”,”B”,”C” e Integral/Fazenda Comercializados em Belo Horizonte.

Tipo de Leite	n**	Amostras positivas	%	Intervalo de Confiança
A	30	02,00	06,67	0 a 15,60
B	30	11,00	36,67	19,43 a 53,91
C	30	0,00	0,00	00,00
IF *	30	06,00	20,00	5,69 a 34,31
Total	120	19,00	15,83	9,3 a 22,36

***Integral/Fazenda**

****n (Número de amostras)**

BARROS & PERCHES(1981) citado por MAGALHÃES(1995), observaram em 33 amostras de leite tipo “B” em São Paulo uma percentagem de 21,87% de inibidores no leite pasteurizado distribuído ao consumidor. Em Belo Horizonte, FAGUNDES(1988), pesquisou inibidores em 183 amostras de leite e SILVA & SENA(1984) citado por MAGALHÃES(1995) pesquisando 96 amostras de leite encontraram uma percentagem de 5,49% e 4,16%, respectivamente.

REIS et al.(1963) citado por MAGALHÃES(1995), analisaram leite cru de Belo Horizonte e encontraram 1,44% das amostras positivas para penicilina e 0,58% das amostras positivas para substâncias inibidoras indeterminadas. Em São Paulo, MELLO

FILHO et al.(1965/1967) citado por MAGALHÃES(1995), concluíram que em 1.000 amostras de leite pasteurizado tipo “C”, 9,0% tinham inibidores, dentre os quais 1,9% eram de penicilina. Em Belo Horizonte, FAGUNDES(1980) citado por MAGALHÃES et al. (1995) revelou a prevalência de 1,25% de inibidores em 80 amostras de leite pasteurizado tipo “C” e SILVA & SENA(1984) citado por MAGALHÃES(1995), na mesma cidade, pesquisaram 288 amostras de leite e encontraram uma percentagem de 1,04%.

Em outros estados, sem especificação do leite, MELLER et al.(1874) citado por MAGALHÃES et al.(1995), encontraram em Santa Maria(Rio Grande do Sul), a presença de apenas 1,0 % de penicilina nas 100 amostras de leite pesquisadas e ausência de tetraciclina. Em Salvador(BA), foram detectadas em 160 amostras de leite, 1,87% de amostras positivas para inibidores bacterianos, sendo 80 amostras de leite pasteurizado e 80 de leite esterilizado, os quais 1,25% foi de penicilina e 0,625% de outros inibidores. (COVA,1984).

Segundo MARTINS & MARTINS(1985) citado por MAGALHÃES et al.(1995), os animais produtores de leite tipos “A” e “B” por serem criados de maneira intensiva, confinados e sujeitos a estresse pela alta produção, são mais suscetíveis a doenças, como pneumonias, doenças do casco, do aparelho reprodutor e principalmente mamites pela intensa utilização da ordenha mecânica. Agrupando esses fatores e somando-os à preocupação do produtor quanto aos investimentos com melhoramentos zootécnico, têm-se como resultado a aplicação sistemática e indiscriminada de antibióticos no tratamento preventivo e nos suplementos alimentares.

Para a produção dos leites tipo “A” e “B” existe ainda preocupação constante com a limpeza e sanitização dos utensílios e equipamentos de ordenha com substâncias sanitizantes, que podem deixar resíduos e assim contaminarem o leite. (MERIN & ROSENTHAL,1985 citado por MAGALHÃES et al.,1995). Dessa forma, justificam-se as prováveis causas de percentagens elevadas de

inibidores nos leites tipos “A” e “B” mencionados nas pesquisas consultadas. Já o leite “C” apresentou baixa ocorrência de inibidores segundo as literaturas, devido a sua produção ocorrer de maneira extensiva, predominando a ordenha manual. Sendo assim, os problemas decorrentes da ordenha mecânica inexistem. Portanto, este leite apresenta quase sempre baixas concentrações de inibidores ou até mesmo ausência.

O presente trabalho foi realizado com dois métodos de detecção de resíduos inibidores, o “TTC” (2,3,5-tripheniltetrazolium) utilizando os microrganismos *Streptococcus thermophilus* e *Lactobacillus bulgaricus*. “Sendo este um teste de triagem de inibidores” (NEAL & CALBERT, 1955 citado por MAGALHÃES, 1995), “o método apresenta maior sensibilidade à penicilina, eritromicina, clortetraciclina e cloranfenicol, mas é insensível a neomicina” (HAVERBECK et al., 1983). Já o segundo método utilizado foi “Disc assay” (“Disco e placa”) associado ao microorganismo *Bacillus subtilis*, “este é um método geralmente utilizado para detectar resíduos de estreptomicina e penicilina” (BRADY & KATZ, 1989 citado por MAGALHÃES, 1995).

Tendo em vista os altos índices de resíduos inibidores inespecíficos e antibióticos, já mencionados neste trabalho, a pesquisa dos mesmos em leite de consumo torna-se cada vez mais importante por razões como perdas industriais e saúde pública.

II-OBJETIVO

O presente trabalho teve como objetivo estudar a ocorrência dos resíduos inibidores bacterianos no leite “cru” fornecidos à Cooperativa CALU, comercializado na região de Uberlândia (MG).

III-MATERIAL E MÉTODOS

No período compreendido entre março a abril de 1997, foram coletadas 400 amostras de leite cru das plataformas de recepção da Cooperativa CALU de Uberlândia. As amostras foram analisadas no Laboratório de Tecnologia e Inspeção de Leite e Derivados da Universidade Federal de Uberlândia.

Todo material utilizado para coleta foi previamente esterilizado, sendo as amostras coletadas no período matutino e posteriormente transportadas para o laboratório em caixa isotérmica. As análises foram realizadas num prazo máximo de 01 hora após a coleta, buscando assim reduzir riscos de interferências externas que pudessem alterar os resultados das análises. Para realizar as análises, dois métodos foram utilizados, os quais serão descritos a seguir.

3.1-Método do “TTC”

Em tubos de ensaio esterelizados, as amostras foram distribuídas sempre em duplicata.

Foi necessária a preparação de amostras com um leite padrão (prova em branco) , ausente de resíduos antibióticos , elaboradas a partir de leite em pó desnatado “Molico” reconstituído a 10 % para comparação com o leite pesquisado ao final de cada análise.

Também foi utilizada cultura liofilizada de *Lactobacillus bulgaricus* e *Streptococcus thermophilus*, de marca Rich (CHR HANSEN) preparada a partir da repicagem do fermento láctico liofilizado em um litro de leite em pó desnatado a 45 °C na concentração de 10 %, segundo recomendação do fabricante. A cultura foi homogeneizada e incubada em banho-maria a 45 °C por 6 horas e repicada duas vezes por semana, utilizando sempre cultura recém preparada.

Para esse método se fez ainda necessária a preparação da Solução 2,3,5 Trifenil Cloreto Tetrazólio(“TTC”) à 4 % em água destilada e esterilizada.(Anexo -1)

3.1.1-Procedimento

Foram colocados 10 ml de leite cru em tubo de ensaio com tampa e pasteurizado à 82° C por 5 minutos. Para controle, utilizou-se 10 ml de leite em pó reconstituído a 10% e livre de inibidores, pasteurizado juntamente com as demais amostras analisadas. A seguir os tubos foram resfriados em banho de gelo até chegarem à 42° C , inoculados com 1,0 ml de iogurte diluído 1:1 em leite em pó reconstituído livre de inibidores e, após homogeinização foram

levados para incubação por 2 horas em banho-maria a 42^o C. Após esse período foi adicionado 0,3 ml de solução de “TTC” em cada tubo; após homogeneização os tubos permaneceram em banho-maria por mais 30 minutos.

A coloração das amostras foram comparadas ao tubo controle, de cor rosa escuro. Quando a cor do leite analisado se apresentava mais clara que o tubo controle, considerava-se que o leite continha resíduo inibidor em graduação compatível com a cor, cuja intensidade variava de acordo com a atividade microbiana presente no leite. Para amostras positivas, ou seja, apresentando resíduos de inibidores, a cor do leite conserva-se branca.

3.2-Método de “Disco e Placa”

Foi utilizado o meio de cultura “Antibiotic Médium n^o 1” de marca MERCK. Para o preparo do meio de cultura foram utilizados 1000 ml (1 L) de água para 31,0 gramas do meio, segundo recomendações do fabricante, e em seguida a mistura foi dissolvida e esterelizada em autoclave. O meio de cultura foi resfriado à 50^oC-55^oC em estufa e inoculado com 1 ml de suspensão do *Bacillus subtilis* para 100ml de cultura. Após incubação por 6 horas a 35^oC deve ocorrer o desenvolvimento de um halo de aproximadamente 5 mm em torno de um disco de papel de filtro embebido em solução de antibiótico.(Anexo-2). Aliquotas de 6 ml do meio foram distribuídas em placas de Petri (100x20 mm) já previamente esterilizadas. As placas com meio solidificado (ágar-germe) ficavam acondicionadas no refrigerador por no máximo 5 dias para sua utilização, sendo sempre retiradas 15 minutos antes das análises.

3.2.1-Procedimento

As amostras foram distribuídas em tubos de ensaio esterelizados, sempre em duplicata e aquecidas à 80°C - 82°C por 5 minutos em banho-maria e em seguida resfriadas em banho de gelo à temperatura ambiente. Com pinça de ponta fina flambada, pega-se um disco de papel de filtro (1,25mm de diâmetro) e tocando a superfície da amostra do leite a ser analisado devidamente homogeneizado, de modo a evitar a formação de conglomerados de substâncias gordurosas. O disco era então levemente agitado para eliminar o excesso do leite (Obs.: A absorção é da ordem de 0,1 ml), depositando-o suavemente na superfície do ágar, com no máximo 8 discos por placa. As placas assim preparadas foram levadas à estufa à 35°C e colocadas para incubação durante 5-7 horas. Ao fim deste período, a positividade (presença de inibidores), foi detectado pela formação de um halo de inibição impedindo o crescimento do bacilo na zona próxima ao disco de papel, sendo necessário examinar cuidadosamente a superfície do meio de cultura, colocando a placa contra um foco de luz distante, sob diversos ângulos. Na ausência de inibidores nenhum halo se formava, crescendo os bacilos em volta de todo o disco.

IV- RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1-Método do “TTC”

É um método biológico que se baseia na inibição de bactérias inoculadas em leite por agentes inibidores e não é específico para antibióticos. A concentração do inibidor no leite é inversamente proporcional a intensidade de cor rosa produzida durante o período de incubação. O leite que não contém inibidores, após incubação apresenta coloração rosa intenso; a tonalidade rosa claro indica inibição parcial das bactérias; e a permanência da cor branca no leite determina a presença de resíduos inibidores, tornando a prova positiva.

Das análises realizadas no Laboratório de Tecnologia e Inspeção de Leite e Derivados (400 amostras de leite cru coletadas na CALU), os resultados mostraram que 47 amostras (11,75%) apresentaram coloração rosa claro ou inibição parcial do inóculo; 2 amostras (0,5%) apresentaram coloração branca ou inibição total. As demais amostras tiveram reação negativa ou rosa intenso, podendo ser consideradas isentas de resíduos inibidores.(Figura 1).

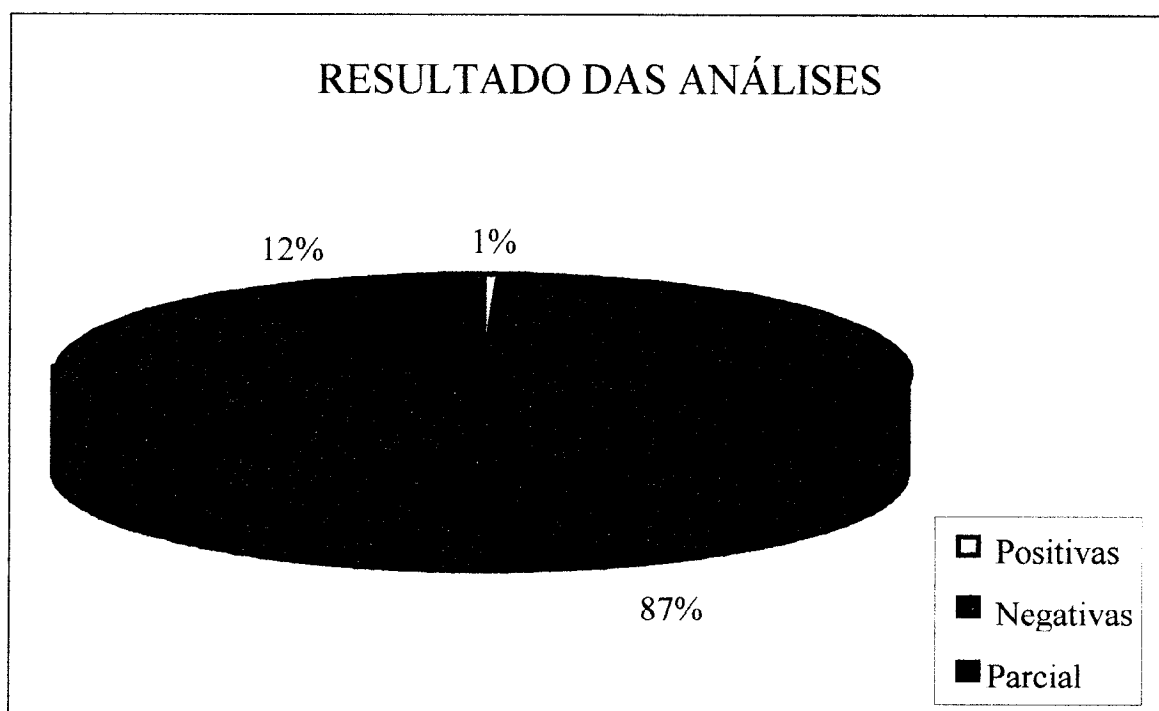


Figura 1: Ocorrência de resíduos inibidores em 400 amostras de leite cru analisadas no Laboratório de Tecnologia e Inspeção de Leite e Derivados no período de março a abril de 1997.

De acordo com os dados, na maior parte das amostras (87%) não houve reação positiva para resíduos antibióticos e outros inibidores, quando analisados pelo método do "TTC". Isso significa que há ausência de resíduos inibidores no leite cru, independente da sua natureza. Já os resultados de inibição parcial das amostras (12%) determinou a presença de agentes inibidores não específicos e em apenas (0,5%) amostras houve reação positiva para resíduos inibidores também não específicos.

O leite ao sair do úbere já contém resíduos inibidores com ação bacteriostática, as lacteninas, e suas quantidades variam de animal para animal apresentando maior concentração no colostro e no leite mamítico. (MELLO FILHO et al., 1965/1967 citado por MAGALHÃES, 1995). Sendo assim, mesmo com o aquecimento das amostras à 82⁰C por 5 minutos visando destruir estas substâncias inibidoras naturais, não foi possível afirmar que tanto os resultados

positivos, quanto os parciais presentes no leite eram resíduos de antibióticos pois segundo a Apostila de Análises Microbiológicas da Cooperativa Central de Laticínios de São Paulo, esse método pode detectar além de antibiótico, agente sanitizante ou alta contagem de leucócitos.

4.2- Método do “Disco”

Este é também um método biológico, cujo princípio utilizado leva em consideração que se substâncias inibidoras estiverem presentes nas amostras de leite analisadas, após incubação serão detectadas a partir do disco embebido em leite. No meio de cultura “Antibiotic Medium nº 1” em placa de Petri, forma-se um halo em volta do disco de papel, impedindo o crescimento do microrganismo *Bacillus subtilis* inoculado. O resultado positivo caracteriza-se por uma zona clara de inibição. O diâmetro desta zona clara está relacionado com a concentração da substância inibidora que se encontra na amostra. Se ao final do período de incubação a amostra não apresentar halo em volta do disco a mesma será considerada negativa, estando portanto livre de substâncias inibidoras.

As 400 amostras de leite cru preparadas e testadas pelo método do “TTC” foram avaliadas também pelo método do “Disco e Placa”. Desse total de amostras trabalhadas nenhuma apresentou resultado positivo ou seja, formação de um halo incolor em volta dos discos de papel embebidos em leite.

A diferença de resultados quando comparados os dois métodos, pode estar associada a sensibilidade dos diferentes microrganismos empregados em cada um dos métodos, pois segundo literatura consultada, a positividade pode depender do microrganismo utilizado. Veja demonstração desta sensibilidade segundo MAGALHÃES(1995) na Tabela 3.

Tabela 3- Comparação da Sensibilidades de Microrganismo - Teste na Detecção dos Resíduos Inibidores, em Amostras de Leite Comercializados em Belo Horizonte.

Microrganismo-teste	n**	Amostras Positivas	%
<i>Bacillus. Subtilis</i>	120	0,6	5,00
<i>B. stearothermophilus</i>	120	19	15,83
<i>Bacillus cereus</i>	120	0,2	1,67
<i>S. thermophilus</i>	120	15	12,50

****n (Número de amostras)**

Pode-se verificar através desta comparação de sensibilidade que o microrganismo *Bacillus subtilis*, que é utilizado no método de “Disco e Placa” apresenta baixa sensibilidade a resíduos inibidores(5,0%), sendo portanto necessário quantidades maiores de resíduos antibióticos (pois é específico para antibióticos) para que seja detectado por este método. Já o *Streptococcus thermophilus* que é um dos microorganismos usados no método do “TTC” apresenta uma maior sensibilidade(12,50%), o que permite detectar resíduos inibidores presentes em menores quantidades e ainda é sensível a presença de substâncias detergentes e sanitizantes no leite.(NEAL& CALBERT,1955 e MERIN&ROSENTHAL,1985 citado por MAGALHÃES,1995).

Porém apesar destas diferenças significativas de sensibilidade encontradas, os microorganismos *B. stearothermophilus* e *S. thermophilus* apesar de apresentarem maiores percentagens de detecção não podem ser considerados os melhores microrganismos para triagem, pois segundo a literatura existe variação de sensibilidade a tipos diferentes de antibióticos. O *Bacillus*

stearothermophilus é bastante sensível à penicilina; *Bacillus cereus* à presença de tetraciclina; *Bacillus subtilis* é mais sensível à estreptomicina, podendo também apresentar boa sensibilidade à penicilina e o *Streptococcus thermophilus* é mais sensível a penicilina, apresentando boa sensibilidade à clortetraciclina, eritromicina, cloranfenicol (HAVERBECK et al., 1983) e detecta também agentes sanitizantes.

Desta forma, não se pode dizer que um determinado microrganismo detecta melhor a presença de inibidores com relação a outro, pelo fato de que os microrganismos não são sensíveis a todos os antibióticos ao mesmo tempo. Assim, para a detecção de inibidores no leite deve-se empregar o *Bacillus subtilis*, o *Bacillus stearothermophilus* e o *Streptococcus thermophilus* ao mesmo tempo, pois desta forma a maioria dos antibióticos e das substâncias detergentes e sanitizantes presentes no leite poderão ser detectadas, já que a sensibilidade a estas drogas são variáveis. (MAGALHÃES, 1995).

Nas indústrias brasileiras, ou mesmo na própria fazenda com o intuito de detectar resíduos antes de liberá-lo para a industrialização o ideal seria utilizar o Método do "TTC", o qual utiliza o *Streptococcus thermophilus* e o *Lactobacillus bulgaricus*. Este método é simples, barato, rápido (~ 3 horas) e possui boa sensibilidade a vários antibióticos, e ainda pode detectar substâncias sanitizantes e desinfetantes que também não devem estar presentes no leite.

V-CONCLUSÃO

O resultado obtido através do método “TTC” demonstrou que em 400 amostras, 2 amostras(~1%) apresentaram inibição total e 47 amostras(12%) com inibição parcial, demonstrando que resíduos inibidores estavam presentes mesmo em leite do tipo “C”, produzido de forma mais extensiva com predomínio de ordenha manual, inexistindo os problemas decorrentes da ordenha mecânica, o que deveria ter reduzido a presença de resíduos inibidores. Estes resultados indicam a necessidade do controle e acompanhamento da produção de leite tanto pelas indústrias quanto pelos órgãos de inspeção.

Já o método de “Disco e Placa” das 400 amostras todas apresentaram resultado negativo. Mas foi possível concluir que mesmo sendo este um método específico para antibióticos, ele não deve ser empregado isoladamente, pois apresenta uma baixa sensibilidade(5%) quando comparado a outros métodos. Nesse caso pode determinar valores negativos em leite que contenha resíduos de antibióticos em quantidades inferiores à sensibilidade do mesmo.

Tendo em vista que nenhum desses métodos é suficientemente sensível para todos antibióticos, o ideal é a combinação de métodos

de detecção para afirmar com certeza que o leite está completamente livre de resíduos inibidores e portanto apresenta resultado negativo.

A utilização do método “TTC” é aconselhável tanto nas indústrias brasileiras, quanto nas próprias fazendas para detecção de inibidores no leite antes de liberá-lo para a sua industrialização. É um método simples, barato, rápido e possui uma boa sensibilidade a vários antibióticos podendo ainda detectar substâncias sanitizantes e desinfetantes.

Os produtores de leite e os técnicos responsáveis pela produção leiteira devem ser alertados quanto ao uso de antibióticos, aos perigos à saúde pública e aos prejuízos industriais acarretados pelo uso indiscriminado destas drogas.

Torna-se imprescindível a realização de mais pesquisas quanto a presença de resíduos de inibidores nos tipos de leite produzidos em nossa região e no Brasil, especificamente os já tratados termicamente e prontos para o consumo. A partir daí, pode-se ter melhor controle da legislação responsável, fiscalizando e impedindo que produtos lácteos contendo resíduos inibidores sejam consumidos pela população.

IV-REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGUAYO, M.E.D., DUARTE, A.AB.L., Incidence of multiple antibiotic resistente organisms isolated from retail milk products in Helmosillo, **Journal of Food Protection**, México, v. 55, n. 5, p. 370 - 373,1982.

ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS, Cooperativa Central de Laticínios do Estado de São Paulo. **Apostila**, Módulo I, Departamento de Produção/Desenvolvimento da Qualidade, p.15 - 17,1994.

AURVALLE,A.E. Presença de Antibióticos no Leite. **A Hora da Veterinária**, v.1, n.3, p.20-27,1981.

DIÁRIO OFICIAL, Ministério da Agricultura, do Abastecimento e da Reforma Agrária. Portaria n. 101 de 11 de agosto de 1993: **Brasil**. Brasília: n. 156, sec. 1, p. 11.955 e 11.956, 17 de agosto de 1993.

BRITO, J. R. F.& DIAS, J. C.. Sanidade do Gado Leiteiro. Coronel Pacheco, **EMBRAPA-CNPGL/TORTUGA**, p. 78,1995.

COVA, W.G. Prática Sensitiva de Detecção de Penicilina no leite, **Higiene Alimentar**, v.3, p. 207-208, 1984.

CULLOR, J.S. Testing the Intended to Detect Antibiotic Residues in Milk. **Food Animal Practice**, v. 57, n. 3, p. 462-472, May 1992.

CULLOR, J.S.. Antibiotic Residue Assay: Can they be used to test milk from individual cows ? **Food Animal Prattice**, v.87, n° 5, p. 477-494, Maio, 1994.

DEMETER, K. J.& ELBERTZHAGEN, H.. **Lacto-Bacteriologia**. Zaragoza(Espanha), Editorial ACRIBIA, p. 150,1971.

EENENNAAM, A.L., CULLOR, J.S., PERANI, L., GARDNER, I.A., et al. Evoluotion of Milk with Naturally Occuring Clinical Mastites. **Journal of Dairy science**, v. 76, n. 10, p.3041-3053, Oct. 1993.

FAGUNDES, C.M., MOLIN, L. Interferência dos resíduos de antibióticos no controle de qualidade do leite e derivados. **Informe Agropecuário**, v. 13, n. 155, p. 24-30, 1988.

HAVERBECK, J., MULLAN, W.M.A., WALKER, A.L. Sensitivity of Intertest, Oxoid test, Devoltest Pand Disc Assay to Antibiotics. **Journal of the Society of Dairy Technoogy**, v. 36, n. 2, p.36-40, 1983.

MAGALHÃES, A. M.; SILVA, T. J. P.S.; RODRIGUES R.; ABREU, V. L. V.; BOECHAT, M. F. B. Detecção de Resíduos de Inibidores Bacterianos em Leite Pasteurizado Tipos “A”, “B”, “C” e “Integral Fazenda” Comercializado na Grande Belo Horizonte. **Anais do XIII Congresso Nacional de Laticínios**. Julho de 1995. Juiz de Fora - MG.

MAGARINOS, H. H., Manual Prático, **Análises Microbiológicas de Leche y Productos Lacteos**. Centro Tecnológico de La Leche, Universidade Austral de Chile, VALDIVIA, p.132 - 152, 1978.

OLIVEIRA, A.J., CARUSO, B.G.J., CARVALHO, M.C. Análises qualitativas e quantitativas para o controle de qualidade de leite cru. **Boletim Técnico**, n. 8, p. 19 e 20, 1995.

SEYMOUR, G.M., JONES, G.M. , GILLIARD, Mc L.M. Comparisons of on Farm. **Journal of Dairy Science**, v. 71, n. 2, p. 539-544, Feb. 1988.

TROLLENIER, H. Antibióticos em Medicina Veterinária. Zaragoza (Espanha). **Editorial Acríbia**, p. 275, 1981.

Preparo da Solução “TTC” a 4%:

- 200 ml de água destilada esterilizada;
- 8 gramas do “TTC”
- Frasco âmbar;
- Bastão estéril para homogeneização.

Devendo ser preparada próximo à chama, e guardada em geladeira.

Preparo da Cultura Láctica e Prova em Branco:

- Leite em pó desnatado reconstituído a 11%;
- 450 ml de água destilada;
- 50 gramas de leite em pó desnatado;

Dissolver à temperatura aproximadamente de 45 graus.

Distribuir o leite nos tubos de ensaio:

- 20 ml (para cultura);
- 10 ml (para prova em branco).

Esterilizar à 120 graus por 15 minutos.

Guardar em geladeira.

Semeadura da Cultura de *Lactobacillus bulgaricus* e *Streptococcus thermophilus*:

- 1 a 3 % de inóculo em cada tubo de leite reconstituído estéril;
- Homogeneizar;
- Incubar à 42 graus por aproximadamente 4 à 6 horas;
- Colher a acidez: variação de 75 à 80 graus Dornic;
- Repetir a semeadura dia sim dia não e guardar em geladeira.

Procedimento par Padronizar o Inoculo da Suspensão de Esporos:

- Prepara-se 100 ml de meio de cultura "Antibiotic Médium n 1", na proporção 1L - 31,0 gramas e esteriliza;
- Resfria-se o meio de cultura à 50- 55 C em estufa;
- Inocula-se no meio de cultura 1 ml da suspensão de *Bacillus subtilis*, quantidade padronizada o suficiente para que após incubação por 6 horas à 35 C, com um disco embebido em solução de antibiótico penicilina G sódica ou potassa com concentração de 0,05 U.I. por ml, apresentou um halo ao redor do disco, com 5 mm à partir da periferia do disco.