

AVALIAÇÃO DA PRESENÇA DE RESÍDUOS DE ANTIMICROBIANOS EM LEITE E BEBIDA LÁCTEA UHT POR TESTE DE INIBIÇÃO MICROBIANA COMERCIAL

Evaluation of the presence of antimicrobials residues in Milky Drink and UHT Milk for Microbial Inhibition Commercial Test

Aline da Silva Costa¹
Verônica Lobato²

SUMÁRIO

A ocorrência de resíduos de antibióticos no leite tem sido objeto de preocupação constante por parte das autoridades sanitárias constituindo um sério problema na saúde pública, devido aos efeitos tóxicos destes compostos, alergias, e até mesmo alguns tipos de câncer, além da possibilidade de favorecer o desenvolvimento de microrganismos patogênicos e alterar a constituição da microflora do trato gastrointestinal. A presença de resíduos de antibióticos no leite representa o principal ponto crítico de controle de contaminação química do leite, devendo ser observada na recepção da matéria prima nas plataformas das indústrias de laticínios. Os objetivos deste trabalho foram: avaliar a incidência de resíduos de antimicrobianos leite UHT comercializado em Seropédica, Rio de Janeiro e avaliar o método de análise pelo kit comercial Delvotest®SP-NT de acordo com a sensibilidade. Para o teste de resíduo antimicrobiano foram obtidos amostras de leite esterilizado, todas pelo processo UHT, coletados em supermercados locais, entre Março de 2007 a Julho de 2008 sendo estes armazenados sob congelamento. As análises das 175 amostras foram realizadas com teste microbiológico comercial Delvotest®SP-NT com *Geobacillus. stearothermophilus* var. *calidolactis*, em meio semi-sólido com indicador. Do total de amostras analisadas, 2 (duas) foram positivas perfazendo um total de 1,1% de incidência em leite já processado e ofertado ao consumo. Os kits foram testados quanto a sua eficácia, confrontando doses de alguns fármacos que compõem o "pool" de sensibilidade do kit. Realizaram-se diluições dos seguintes antimicrobianos: Amoxicilina, Ampicilina, Gentamicina, Eritromicina, e Trimetoprima em doses diferentes à sensibilidade indicada pelo fabricante, uma inferior, uma intermediária e outra superior ao limite de detecção do método e todas foram confirmadas pelo kit testado. A presença de inibidores bacterianos encontrados nas amostras analisadas, contrariando a legislação em vigor, torna enfática a necessidade da atuação dos órgãos de Saúde Pública quer seja através da inspeção, quer seja através de amplos programas educativos junto à população envolvida na cadeia de produção.

Termos para indexação: Leite; Resíduos de antimicrobianos; Teste de Inibição Microbiana.

INTRODUÇÃO

O leite é um alimento único pelo seu valor nutritivo e pela sua composição, sendo, portanto, um constituinte essencial da dieta dos recém-nascidos para todas as espécies de mamíferos, em particular para a espécie humana, sendo também indicado em todas as idades. Por isso é extremamente importante apresentar-se com qualidade (FONSECA, 2000).

Entretanto, mesmo com os avanços tecnológicos ocorridos ao longo dos últimos anos, a qualidade

do leite produzido no Brasil ainda está muito além do tecnicamente recomendado, ficando comprometidas a inocuidade dos alimentos lácteos ofertados à população e também as possibilidades do país de se estabelecer como um forte competidor no mercado internacional. A baixa qualidade da matéria-prima aqui produzida limita a transformação industrial desse leite a produtos de baixo valor agregado e sem um padrão de mercado (DÜRR, 2005)

Assim como outros alimentos de origem animal, o leite, durante o seu processo de produção primária,

1 Mestranda em Ciência e Tecnologia de Alimentos - Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos – UFRuralRJ; email: linekac@yahoo.com.br
2 Professora Adjunta Departamento de Tecnologia de Alimentos – Instituto de Tecnologia - UFRuralRJ

processamento, transporte e comercialização, pode ser contaminado por microrganismos patogênicos, ou mesmo por outras substâncias tóxicas, que impliquem em riscos à saúde do consumidor (CERQUEIRA, 1995).

Se a mastite é um problema, o seu controle através do uso de antibióticos impõe outro desafio para a manutenção da qualidade do leite: o resíduo de antibióticos no produto. A contaminação do leite e, conseqüentemente, dos produtos lácteos por antimicrobianos, deve-se principalmente ao tratamento de vacas em lactação com problemas de mastite ou ao tratamento durante o período seco, para controlar a mastite (GIGANTE, 2004).

Os antimicrobianos mais comumente utilizados em animais de produção podem ser divididos em cinco classes incluindo os β -lactâmicos (penicilinas e cefalosporinas), as tetraciclina (oxitetraciclina, tetraciclina e clortetraciclina), os aminoglicosídeos (estreptomicina, neomicina e gentamicina), os macrolídeos (eritromicina) e as sulfonamidas (sulfametazina) (MITCHELL et al., 1998).

É de fundamental importância prevenir a presença de resíduos de antimicrobianos no leite para reduzir problemas técnicos no processamento de produtos lácteos e a possibilidade da transmissão desses resíduos ao consumidor, o que pode acarretar problemas de saúde pública.

Os resíduos de antimicrobianos no leite podem apresentar sérias conseqüências toxicológicas e técnicas. A presença destes no leite retarda ou mesmo impede os processos microbiológicos utilizados na manufatura de determinados produtos lácteos (PORTUGAL, 2003).

Através do consumo de leite fluido, o resíduo de antibiótico chega à mesa do consumidor e constitui um problema de saúde pública, cujos aspectos toxicológicos, microbiológicos e de desenvolvimento de reações de hipersensibilidade são de grande importância (GIGANTE, 2004).

O Programa Nacional de Controle de Qualidade do Leite (PNQL), implantado em 2005 recomenda maior rigor na avaliação da presença de resíduos de antimicrobianos no leite. Para tanto, são necessários estudos sobre o assunto para fornecer subsídios aos produtores, médicos veterinários e técnicos, no sentido de melhor orientar o uso destes e prevenir resíduos.

Um dos requerimentos atuais da sociedade é a disponibilidade de alimentos seguros, saudáveis e nutritivos de todos os segmentos das redes de empresas, dos estabelecimentos produtores, das organizações, dos aparelhos reguladores do Estado e instituições que constituem a cadeia produtiva do leite. O direcionamento da pesquisa e da transferência de tecnologias para que tais demandas sejam atendidas é compromisso institucional e social inquestionável (BRESSAN & MARTINS, 2004).

A ocorrência de resíduos de antimicrobianos no leite tem sido objeto de preocupação constante por parte das autoridades sanitárias constituindo um sério problema na saúde pública, devido aos efeitos tóxicos destes compostos, alergias, e até mesmo alguns tipos de câncer, além da possibilidade de favorecer o desenvolvimento de microrganismos patogênicos e alterar a constituição da microflora do trato gastrointestinal.

Kits de detecção de resíduos de antimicrobianos podem ser usados para testar amostras de leite de vacas individualmente ou a granel, havendo uma variedade de produtos disponíveis, empregando uma variedade de metodologias e espectros de sensibilidades a antibiótico (SENYK et al., 1990).

Os objetivos deste trabalho foram: avaliar a incidência de resíduos de antimicrobianos leite UHT comercializado em Seropédica, Rio de Janeiro e avaliar o método de análise pelo kit comercial Delvotest®SP-NT de acordo com a sensibilidade.

MATERIAL E MÉTODOS

Para o teste de resíduos de antimicrobianos foram obtidas amostras de leite esterilizado, todas as embalagens continham selo de inspeção sanitária e armazenadas sob congelamento, em recipientes plásticos (garrafinhas) de 300 mL.

Foram analisadas 175 amostras de leite e bebida láctea UHT, as 16 marcas investigadas foram codificadas como mostra a tabela 1, com predominância das marcas D, K e N. A tabela também apresenta o tipo de leite conforme a padronização do teor de gordura sendo: I (integral), D (desnatado), SD (semi desnatado) e BL (bebida láctea).

As análises foram realizadas com teste microbiológico comercial Delvotest SP-NT (Cap-Lab Indústria e Comércio Ltda), com *Geobacillus stearothermophilus var. calidolactis*, em meio semi-sólido com indicador, juntamente com todos os nutrientes necessários para o crescimento bacteriano.

Os testes obedeceram a seguinte seqüência: 1- abertura das ampolas (Delvotest®SP-NT) com retirada da tampa de alumínio, 2- foram adicionados volumes de 0,1 mL das amostras de leite a serem analisadas nas ampolas (Delvotest®SP-NT) 3- estas ampolas permaneceram incubadas em banho-maria a $64^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ por 3 (três) horas, segundo a recomendação técnica, sempre acompanhadas de controle negativo. Após este período foram realizadas as leituras e consideram-se positivos os testes que apresentaram cor púrpura e negativo aqueles que apresentaram uma mudança da cor púrpura para amarela, conforme ocorre no controle negativo.

Após o período de incubação, ácido suficiente é produzido pelo crescimento e multiplicação das bactérias que utilizam a glicose. A alteração da cor do indicador de pH (púrpura de

Tabela 1 – Quantidade e marcas das amostras analisadas.

Marca	I	D	SD	BL	Número Amostras Testadas	%
A	5	5	0	0	10	5,7
B	0	0	0	4	4	2,3
C	1	0	0	0	1	0,6
D	27	12	4	0	43	24,6
E	1	0	0	0	1	0,6
F	1	1	0	0	2	1,1
G	10	5	0	0	15	8,6
H	10	5	0	0	15	8,6
I	6	3	0	0	9	5,1
J	4	1	0	0	5	2,9
K	13	7	7	0	27	15,4
L	4	0	0	0	4	2,3
M	3	4	0	0	7	4,0
N	13	4	3	0	20	11,4
O	5	1	0	0	6	3,4
P	0	6	0	0	6	3,4
Total	103	54	14	4	175	100

bromocresol), indica uma amostra livre de antimicrobianos. Se, no entanto, o crescimento e multiplicação da bactéria forem retardados ou inibidos, não ocorre a acidificação do meio e este permanece púrpura. A coloração intermediária entre amarelo e púrpura também é considerada positiva para resíduo de antimicrobiano.

As ampolas do teste forma mantidas sob refrigeração à temperatura de aproximadamente 4°C, conforme recomendação do fabricante, e no momento da utilização, permaneceram à temperatura ambiente, apenas as ampolas que foram utilizadas.

Para descartar a presença do inibidor formol nas amostras de leite UHT, foi realizado o teste do formaldeído conforme a Instrução Normativa nº68 (BRASIL,2006) objetivando evidenciar a presença de resíduos de antimicrobianos nas amostras positivas com a finalidade de verificar se a inibição do crescimento do *Geobacillus stearothermophilus* var. *calidolactis* possa ter sido determinado por este conservador.

Os kits foram testados quanto a sua eficácia, confrontando doses de alguns dos fármacos que compõem o "pool" de sensibilidade do kit. Realizaram-se diluições dos seguintes antimicrobianos: Amoxicilina, Ampicilina, Gentamicina, Eritromicina, e Trimetoprima em doses diferentes à sensibilidade indicada pelo fabricante, uma inferior, uma intermediária e outra superior ao limite de detecção do método.

Para Eritromicina, o limite de inferior de detecção do kit (LI) é 40ng/mL e o limite superior de detecção (LS) de 200ng/mL, sendo também testado um valor de 20 ng/mL (abaixo do LI). Para Amoxicilina, o LI é 2ng/mL e o LS de 5ng/mL, sendo também testado um valor de 1ng/mL (abaixo do LI). Para Gentamicina, o LI é 50ng/

mL e o LS de 200ng/mL, sendo também testado um valor de 25 ng/mL (abaixo do LI). Para Ampicilina, o LI é 7ng/mL e o LS de 200ng/mL, sendo também testado um valor de 25 ng/mL (abaixo do LI). Para Trimetoprima, o LI é 50ng/mL e o LS de 300ng/mL, sendo também testado um valor de 25 ng/mL (abaixo do LI).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Entre as 175 amostras de leite UHT investigadas, 02 (duas) amostras apresentaram-se positivas no teste de detecção de resíduos de antimicrobianos, revelando uma frequência de contaminação de 1,1%. As duas amostras positivas eram Integrais, indicando uma tendência de veiculação pelo conteúdo lipídico. Estes resultados são similares ao apresentado por Souza et al. (2008) que também encontraram 1% das amostras de UHT positivas pelo mesmo método.

No relatório PAMVet referente aos anos 2004/2005 das 312 amostras em que foram procedidas análises de triagem para tetraciclina, 21 amostras (7%) apresentaram resultado não conforme, sendo seis (2%) em leite UHT. De 306 amostras avaliadas na triagem para cloranfenicol, 22 (7%) foram insatisfatórias, 13 (5%) de leite UHT e nove (28%) de leite em pó. resultado este que deixa dúvidas se está havendo ou não, a utilização indevida deste antimicrobiano que é proibido no Brasil para uso em animais produtores de alimentos;

Conforme os resultados encontrados neste trabalho, 2 (duas) amostras positivas correspondem a centenas de produtos do mesmo lote comercializados que poderiam também estar com níveis acima do LMR permitido pela legislação, podendo assim ser consumido justificando a

necessidades deste tipo de controle fiscal com regularidade uma vez que o leite é consumido principalmente por crianças. Deve-se atentar para o fato de que estas amostras serem do tipo UHT, possivelmente a leite cru de origem teria níveis maiores que os detectados.

Outros trabalhos foram realizados utilizando o princípio da inibição microbiana, porém não na forma de kits comerciais. Borges et al. (2000), que analisaram a ocorrência de resíduos de antimicrobianos em leite, pasteurizado integral e padronizado produzido e comercializado no Estado de Goiás através do método de difusão de resíduos de antibióticos em ágar, tendo o *Bacillus subtilis* e o *Geobacillus stearothermophilus* como microorganismos-teste, observaram que das 533 amostras analisadas, 53 apresentaram resíduos de antimicrobianos, representando 9,95% das amostras analisadas.

Nascimento et al. (2001), em estudo sobre a ocorrência de resíduos de antibióticos no leite tipos A, B e C comercializado em Piracicaba, SP, utilizaram, também, o método de difusão de resíduos de antibiótico em ágar, porém empregaram somente a cultura teste de *Geobacillus stearothermophilus*, e observaram 50,0% das amostras positivas.

Dentre os resultados das diluições dos antimicrobianos testados: Amoxicilina, Ampicilina, Gentamicina, Eritromicina, e Trimetoprima em doses diferentes à sensibilidade indicada pelo fabricante, todas que estavam dentro da faixa sensível do método foram confirmadas pelo kit, de acordo com a tabela 2.

CONCLUSÃO

Diante dos resultados observados pode-se concluir que qualidade do leite apesar de estar normatizada, deve ser implementada de fato, tanto em atenção aos consumidores no mercado interno bem como no atendimento das exigências internacionais.

A presença de inibidores bacterianos encontrados nas amostras analisadas, contrariando a legislação em vigor, deixa claro que programas de monitoramento são necessários, desde que associado a estes, campanhas para educação dos produtores e funcionários envolvidos e, capacitação técnica, são primordiais para fomentar as boas práticas agropecuárias e obtenção de melhor qualidade no leite e seus derivados. Portanto, integração entre os produtores, indústria, centros de pesquisa e órgãos fiscalizadores é essencial.

Especificamente, para o leite, a realização de análises com kits de inibição microbiana, mostrou-se eficaz para a triagem de resíduos de antimicrobianos. Neste estudo, o kit comercial Delvotest®SP-NT, um dos mais utilizados para este fim, teve sua sensibilidade aos antimicrobianos testados, comprovada.

SUMMARY

The occurrence of antibiotic residues in milk has been the object of concern by the health authorities is a serious problem in public health due to toxic effects

Tabela 2 – Resultado das análises do teste de sensibilidade do Kit Delvotest®SP-NT

Atibiótico	Diluições analisadas (ng/mL)	Resultados positivos
eritromicina	200	200
	40	40
	20	-
	5	5
amoxicilina	2	2
	1	-
	50	50
gentamicina	25	-
	7	7
	4	4
ampicilina	2	-
	300	300
	50	50
trimetoprima	25	-

of these compounds, allergies and even some types of cancer, and the opportunity to promote the development of pathogenic microorganisms and to amend the constitution of the microflora of the gastrointestinal tract. The presence of antibiotic residues in milk is the most critical point of control of chemical contamination of milk, should be observed in receipt of raw material on the platforms of the dairy industry. The objectives of this study were: to evaluate the incidence of antibiotic residues in milk marketed Seropédica, Rio de Janeiro and evaluate the method of analysis by the commercial kit Delvotest® SP-NT according to sensitivity. To test for antimicrobial residues in milk samples were sterilized, UHT process at all collected in local supermarkets, from March 2007 to July 2008 which are stored under freezing. The analysis of 175 samples were taken with microbiological test commercial Delvotest® SP-NT with *Geobacillus stearothermophilus* var. *calidolactis*, in semi-solid with the indicator. Of the total samples analyzed, 2 (two) were positive for a total of 1.1% in incidence of milk already processed and offered for consumption. The kits were tested for their effectiveness, comparing doses of some drugs that make up the "pool" of sensitivity of the kit. There were dilutions of the following antibiotics: Amoxicilina, Ampicillin, Gentamicin, Erythromycin and Trimethoprim in different doses to the sensitivity shown by the manufacturer, one less, one intermediate and one above the detection limit of the method and all were confirmed by the test kit. The presence of bacterial inhibitors found in the samples, contrary to existing legislation, it emphatically the need for action of the organs of Public Health either through the inspection, either through extensive educational programs among the people involved in the production chain.

Index terms: Milk. Residues of antimicrobial drugs. Microbial Inhibition Test.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Relatório 2004/2005 - Monitoramento de Resíduos em Leite Exposto ao Consumo**. Brasília, 2006. Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/alimentos/pamvet/relat%F3rio_leite_2004-05.pdf. Acessado em 16 de março de 2009.
- BORGES, G.T.; SANTANA, A.P.; MESQUITA J.A.; MESQUITA S.Q.P.; SILVA, L.A.F.; NUNE,V.Q. Ocorrência de resíduos de antibióticos em leite pasteurizado integral e padronizado produzido e comercializado no estado de Goiás. **Ciência Animal Brasileira** n.1,v.1, p.59-63, 2000.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Departamento de Inspeção de Produtos de origem Animal. Métodos Analíticos Oficiais Físicos-Químicos para Controle de Leite e Produtos Lácteos. Instrução Normativa nº 68, de 12 de dezembro de 2006. Diário Oficial da União. Dez. 2006.
- Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br>. Acessado em: 22/09/2008.
- BRESAN, M; MARTINS, M.C. Segurança alimentar na cadeia produtiva do leite e alguns desafios. **Revista Política Agrícola**, ano XIII, n.3, 2004.
- CERQUEIRA, M. M. O. P.; LEITE, M. O. Doenças transmissíveis pelo leite e derivados. **Cad. Tec. Esc. Vet. UFMG** n.13, 1995.
- CULLOR, J. S.; VAN EENENNAAM, A.; GARDNER, L.; PERANI, J.;DELLINGER, W.L.; SMITH, T.; THOMPSON, M.A.; PAYNE, L.; JENSEN, L.; GUTERBOCK, W.M. Performance of various tests used to screen antibiotics residues in milk samples from individual animals. **J. Assoc. Off. Anal. Chem.**, v. 77, p. 862-870, 1994.
- DEWDNEY, J.M., MAES, L., RAYNAUD, J.P., BLANC, F., SCHEID, J.P., JACKSON, T., LENS, S., VERSCHUEREN, C. Risk assessment of antibiotic residues of beta-lactams and macrolides in food- products with regard to their immunoallergic potential. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v.29, n.7, p.477-483, 1991.
- DÜRR, J. W. **Como produzir leite de alta qualidade**. Brasília: SENAI, 2005.
- FONSECA, L.F.L.; SANTOS, M.V. **Qualidade do Leite e controle da mastite**, São Paulo: Lemos Editorial, 2000, 175p.
- GIGANTE, M. L. Importância da qualidade do leite no processamento de produtos lácteos. In: DÜRR, J. W.; CARVALHO, M. P. de; SANTOS, M. V. (Org.). **O compromisso com a qualidade do leite no Brasil**. 1. ed. Passo Fundo: UPF, 2004. p. 235 – 254.
- PORTUGAL, J. A. B. (coord.). O agronegócio do leite e os alimentos lácteos funcionais. Juiz de Fora: **EPAMIG – ILCT**, jul. 2001.
- MITCHELL, J.M., GRIFFITHS, M.W.; MCEWEN, S.A.; MCNAB, W.B.; YEE, A. Antimicrobial drug residues in milk and meat; causes, concerns, prevalence, regulations, tests, and test performance. **J. Food Prot.**, v. 61, n. 6, p. 742-745, 1998.
- MOURA, L.A., CARVALHO, P.B., PRERIRA, M.G., Qualidade de produtos alimentícios de origem animal. **Brasília Med**.v.38, n.1, p.13-19, 2001.
- NASCIMENTO, G.G.F. DO; MAESTRO, V.; CAMPOS, M.S.P. de Ocorrência de resíduos de antibióticos no leite comercializado em Piracicaba, SP. **Revista de Nutrição**, v.14, n.2, 2001.
- REYBROECK, W. Evaluation of screening test for the detection of antimicrobial residues in milk. In: SYMPOSIUM ON RESIDUES OF ANTIMICROBIAL DRUGS AND OTHER INHIBITORS IN MILK, Kiel, 1995. **Proceedings. International Dairy Federation**, 1995. p. 182-186.