

COMUNICAÇÃO CIENTÍFICA

PESQUISA DE RESÍDUOS DE BETA-LACTÂMICOS NO LEITE CRU
COMERCIALIZADO CLANDESTINAMENTE NO MUNICÍPIO
DE MOSSORÓ, RN, UTILIZANDO O DELVOTEST SP

C.G. Mendes, S.M. Sakamoto, J.B.A. Silva, A.Í. Leite

Universidade Federal Rural do Semi-Árido, Departamento de Ciências Animais, Rod. BR 110, km 47, CEP 59625-900, Mossoró, RN, Brasil. E-mail: carolmendesvet@hotmail.com

RESUMO

O trabalho foi realizado com o objetivo de analisar leite cru comercializado clandestinamente no Município de Mossoró, RN, quanto à presença de resíduo de beta-lactâmicos. Foi utilizado o teste de triagem Delvotest SP. Durante dois meses, foram coletadas amostras de leite cru comercializado em diferentes pontos de Mossoró; as coletas foram semanais, levando a um total de 32 amostras analisadas. Antes de aplicar o teste, as amostras foram preparadas para inativar possíveis inibidores inespecíficos (lisoenzima, lactoferrina etc), em seguida os testes foram realizados de acordo com as recomendações do fabricante. Todas as amostras analisadas foram negativas. Portanto, as amostras estavam livres de antibióticos ou não continham quantidade maior que o limite máximo resíduo (LMR) permitido no leite. A ausência de amostras positivas do leite cru analisado não permite afirmarmos que a população está livre do problema, pois sabe-se que este alimento não passa por fiscalização e, dessa forma, pode ser responsável por expor ao risco a saúde das pessoas que o consomem.

PALAVRAS-CHAVE: Resíduo de antibióticos, segurança alimentar, saúde pública.

ABSTRACT

RESEARCH OF RESIDUES OF BETA-LACTAMS IN THE RAW MILK MARKETED SECRETLY IN THE COUNTY OF MOSSORÓ, STATE OF RIOGRANDE DO NORTE, BRAZIL, USING DELVOTEST SP. The research was carried out with the objective of analyzing raw milk marketed secretly in the Municipal district of Mossoró, State of Rio Grande do Norte, Brazil, in regard to the presence of beta-lactam residues. Delvotest SP was used as the selection test. For two months, samples of raw marketed milk were collected in different points of Mossoró, the collections were weekly, resulting in a total of 32 analyzed samples. Before applying the test, the samples were prepared to inactivate possible unspecific inhibitions (lisoenzyme, lactoferrina, etc.), and soon afterwards the tests were conducted according to the manufacturer's recommendations. All of the analyzed samples were negative. Therefore the samples were free from antibiotics or they contained amounts less than the maximum residue limit (LMR) allowed in the milk. The absence of positive samples among the raw milk analyzed does not prove that the population is free of the problem, because it is known that this food is not subjected to any control and therefore poses a health risk to those who consume it.

KEY WORDS: Antibiotic residue, food safety, public health.

O leite é um dos alimentos de maior importância para a sociedade humana, sendo sua qualidade higiênica influenciada principalmente pelo estado sanitário do rebanho, manejo dos animais e dos equipamentos durante a ordenha, e a presença de microrganismos, resíduos de drogas e odores estranhos (DÜRR, 2004; BRITO; BRITO, 1997).

A presença de resíduos de antibióticos no leite resulta da aplicação de diferentes substâncias no efetivo leiteiro, para a prevenção ou tratamento de doenças, com destaque para infecções da glândula

mamária e as doenças do trato reprodutivo. A presença desses resíduos é um fator de desclassificação, uma vez que torna a matéria-prima inadequada para o uso na indústria e para o consumo humano, já que não há tratamento tecnológico que consiga inativar tais substâncias (SANTOS, 2003). Quantidade de antibiótico acima do limite máximo de tolerância aprovado pela legislação para leite cru, torna-o impróprio para o consumo (BRANDÃO, 2000). Os riscos à saúde do consumidor são representados por reações alérgicas, frequentemente associadas aos antibióticos beta-

lactâmicos (penicilina), que podem desencadear choque anafilático em indivíduos sensíveis (COSTA, 2002).

Para garantir amostras livres de resíduos de drogas, muitos métodos têm sido usados: como o método de inibição microbiológica, métodos imunológicos, métodos enzimáticos, cromatografia gasosa, cromatografia em camada delgada e cromatografia líquida de alta pressão (KANG; KONDO, 2001).

Existem vários kits comerciais para detecção de resíduos de antibióticos disponíveis no mercado, entre eles o Delvotest SP que utiliza o método de inibição microbiana para detecção de antibióticos, detectando 16 tipos de antibióticos, entre eles: penicilina G, ampicilina, amoxicilina, cloxacilina, cefoperazone, cefalonium, ceftiofur, cefuroxime, eritromicina, tilosina, dihidrostreptomina, neomicina, gentamicina, oxitetraciclina, sulfadiazina e trimetoprim (BRITO, 1997; BRITO, 2000; NEAVES, 1999).

Foi criado pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) juntamente com vários atores do governo e da sociedade civil, em 2002, o Programa de Análise de Resíduos de Medicamentos Veterinários em Alimentos de Origem Animal (PAMVet), no qual critérios foram estabelecidos e o leite bovino foi selecionado como a primeira matriz de análise para a pesquisa de resíduos de medicamentos veterinários (BRASIL, 2005).

No relatório do PAMVet referente aos anos 2002/2003 foi utilizado como teste de triagem o Delvotest SP para detecção de beta-lactâmicos, tais como: benzilpenicilina/benzilpenicilina procaína, ampicilina, amoxicilina, ceftiofur, que têm como limite máximo de resíduo (LMR) permitido no leite, respectivamente, 4 µg/kg, 4 µg/kg, 4 µg/kg e 100 µg/kg (BRASIL, 2005). De acordo com HONKANEN-BUZALSKI; REYBROECK (1997), o limite de sensibilidade de detecção do Delvotest SP para os antibióticos citados anteriormente são: benzilpenicilina procaína 3 µg/kg, ampicilina 6 µg/kg, amoxicilina 6 µg/kg, ceftiofur 50 µg/kg.

O trabalho foi realizado com o objetivo de analisar o leite cru comercializado clandestinamente no Município de Mossoró, RN, quanto à presença de resíduo de beta-lactâmicos.

Durante dois meses, foram coletadas 32 amostras de leite cru comercializado em diferentes pontos do Município de Mossoró, RN. As coletas foram realizadas semanalmente. Cada amostra apresentava 500 mL de leite. Estas foram transportadas em bolsa térmica com gelo até o laboratório da Universidade Federal Rural do Semi-Árido onde foi realizada a análise de resíduo de antibiótico.

As amostras passaram por tratamento prévio para inativar possíveis inibidores inespecíficos (lisoenzima, lactoferrina etc) do leite, para evitar resultados falso-positivos. Para isso, uma alíquota de

um mL de cada amostra foi incubada em banho-maria a 80° C por 10 minutos, estando acomodadas em microtubos (tipo Eppendorf).

Em seguida, os testes foram realizados de acordo com as recomendações do fabricante do Delvotest SP, e as amostras foram mantidas em banho-maria à temperatura de 64 ± 5° C por 3 horas. Para a interpretação, observou-se a cor da parte inferior correspondente a 2/3 do ágar sólido nas ampolas depois de decorrido o tempo de incubação requerido. Na presença de antimicrobianos, o microrganismo é inibido e não há alteração do pH, o meio permanece azul, obtendo-se, assim, um resultado positivo; na ausência de antimicrobianos detectáveis pelo teste, o microrganismo multiplica-se, acidificando o meio e alterando sua coloração que passa do azul para o amarelo, gerando um resultado negativo.

Na análise para detecção de resíduo de beta-lactâmicos realizada no Município de Mossoró todas as amostras foram negativas. De acordo com os resultados observados no relatório do PAMVet referente aos anos de 2002 e 2003, onde foi utilizado o Delvotest SP para analisar 326 amostras de leite, sendo 44 de leite em pó e 282 de leite UHT, obteve 100% das amostras negativas para beta-lactâmicos (BRASIL, 2005).

Em estudo realizado por TETZNER; BENEDETTI (2005), com o uso do Delvotest, em amostras de leite cru da região do Triângulo Mineiro, observaram resultados diferentes, 33,3% das amostras positivas para beta-lactâmicos. NUNES; D'ANGELINO (2007), trabalhando com ocorrência de resíduos de antibióticos no leite com o Delvotest SP, em fazendas produtoras e no leite pronto para consumo, também observaram resultados positivos para amostras analisadas. Das 50 amostras analisadas, cinco foram positivas, representando 10%, sendo quatro de fazendas produtoras e uma de leite pronto para consumo.

De acordo com FAGUNDES (2003), trabalhando com ocorrência de resíduos de antimicrobianos utilizados no tratamento de interrupção de lactação, no início da lactação subsequente em animais com período seco recomendado, o Delvotest SP foi satisfatório. A ocorrência de resultados positivos neste teste pode servir como alerta aos produtores de que animais submetidos à terapia de secagem podem estar eliminando resíduo no leite além do período de carência e, o mais grave, este leite estar sendo incorporado ao tanque de pequena mistura junto ao de animais isentos de resíduos.

Outros trabalhos foram feitos utilizando o princípio da inibição microbiana, porém não na forma de kits comerciais como o trabalho de BORGES *et al.* (2000), que analisaram a ocorrência de resíduos de antibióticos 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 *Bacillus stearothermophilus* como microrganismos-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 *Bacillus stearothermophilus*, e observaram 50,0% das amostras positivas.

No estudo de NUNES *et al.* (2004), para detecção de resíduo de antibiótico no leite "in natura" na Cidade de Teresina, PI, utilizando outro tipo de teste microbiano - Copan (CH ATK) Teste Único P&S, observaram que das 53 amostras analisadas, 98,1% encontravam-se de acordo com a legislação vigente no Brasil.

No trabalho de CARLOS *et al.* (2004), avaliando o leite tipo "C" do Município de Campos dos Goytacazes, RJ, utilizando cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), em apenas sete (32,56%) das 43 amostras de leite não foram detectadas a presença de resíduo de penicilina.

FOLLY; MACHADO (2001), buscando determinar resíduos de antibióticos utilizando métodos de inibição microbiana, enzimático e imuno-ensaios no leite pasteurizado comercializado na região norte do Estado do Rio de Janeiro, analisaram 300 amostras de leite, 13 foram positivas, revelando uma frequência de contaminação de 4,33%. A pasteurização tem pouco ou nenhum efeito no conteúdo de antimicrobianos do leite (BRITO, 2000).

No Brasil existe, desde 2002, a instrução normativa nº 51 que trata dos regulamentos técnicos de produção, identidade e qualidade do leite. Aprova adoção de métodos analíticos de resíduos de antibióticos no leite, porém estes devem apresentar sensibilidade para os LMR. Nesta instrução é criado o regulamento do leite cru e refrigerado que deve atender a uma série de exigências para ser comercializado como requisitos microbiológicos, físicos, químicos, de contagem de células somáticas e de resíduos químicos a serem avaliados pela rede Brasileira de laboratórios de controle da qualidade do leite, mostrando também as metas a serem cumpridas até o ano de 2011 nas regiões Sul, Sudeste e Centro-Oeste, e 2012 no Norte e Nordeste (BRASIL, 2002).

A sensibilidade do Delvotest SP aumenta a probabilidade de resultados falso-positivos (ANDREW *et al.*, 1997) devido a fatores como alta contagem de células somáticas (HALBERT *et al.*, 1996), e a presença de inibidores inespecíficos do leite (HILLERTON *et al.*, 1999; CARLSSON *et al.*, 1989). Assim, em uma situação de baixa prevalência de amostras positivas, aumenta o

valor preditivo negativo do teste (SISCHO, 1996), o que reforça os resultados encontrados no período estudado.

No período estudado, o leite cru comercializado clandestinamente em diferentes pontos do Município de Mossoró apresentou todas as amostras negativas para a ocorrência de resíduo de beta-lactâmicos.

REFERÊNCIAS

- ANDREW, S.M.; FROBISH, R.A.; PAAPE, M.J.; MATURIN, L.J. Evaluation of selected antibiotic residue screening tests for milk from individual cows and examination of factors that affect the probability of false-positive outcomes. *Journal of Dairy Science*, v.80, p.3050-3057, 1997.
- BORGES, G.T.; SANTANA, A.P.; MESQUITA, A.J. de; MESQUITA, S.Q.P.; SILVA, L.A.F. da; NUNES, V. de Q. Ocorrência de resíduos de antibióticos em leite pasteurizado integral e padronizado produzido e comercializado no Estado de Goiás. *Ciência Animal Brasileira*, Goiás, v.1, n.1, p.59-63, 2000. Disponível em: <<http://www.revistas.ufg.br/index.php/vet/article/viewFile/236/200>>. Acesso em: 22 mar. 2006.
- BRANDÃO, S.C.C. O futuro da qualidade do leite brasileiro. *Industria de Laticínios*, n.25, p.68-70, 2000.
- BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. *Programa de Análise de Resíduos de Medicamentos Veterinários em Alimentos de Origem Animal - PAMVet - Relatório 2002/2003 - Monitoramento de Resíduos em Leite Exposto ao Consumo (1º e 2º anos de atividades)*. Brasília: ANVISA, 2005. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/ALIMENTOS/pamvet/relatorio_02_03.pdf>. Acesso em: 13 mar. 2008.
- BRASIL. Ministério da Agricultura. Instrução Normativa nº. 51, de 18/09/2002. *Regulamentos Técnicos de Produção, Identidade e Qualidade do Leite tipo A, do Leite tipo B, do Leite tipo C, do Leite Pasteurizado e do Leite Cru Refrigerado e o Regulamento Técnico da Coleta de Leite Cru Refrigerado e seu Transporte a Granel*. Disponível em: <<http://pucrs.campus2.br/~thompson/InstrucaoNormativa51.pdf>>. Acesso em: 13 mar. 2008.
- BRITO, J.R.F.; BRITO, M.A.V.P. Conceitos básicos da qualidade do leite. *Leite Brasil*, n.1, set. 1997. Disponível em: <<http://www.leitebrasil.org.br>>. Acesso em: 20 mar. 2006.
- BRITO, M.A.V.P. Perigos dos resíduos antimicrobianos. *Leite Brasil*, n.2, out. 1997. Disponível em: <<http://www.leitebrasil.org.br>>. Acesso em: 20 mar. 2006.
- BRITO, M.A.V.P. *Resíduos de antimicrobianos no leite*. Juiz de Fora: Embrapa Gado de Leite, 2000. 28p. (Embrapa Gado de Leite. Circular Técnica, 60).

- CARLOS, L. DE A.; CORDEIRO, C.A.M.; FOLLY, M.M.; MARTINS, M.L.L. Avaliação físico-química, microbiológica e de resíduos de penicilina, em leite tipo "C" comercializado no município de Campos dos Goytacazes, RJ. *Higiene Alimentar*, v.18, n.123, p.57-60, 2004.
- CARLSSON, A.; BJÖRCK, L.; PERSSON, K. Lactoferrin and lysozyme in milk during acute mastitis and their inhibitory effect in Delvotest P. *Journal of Dairy Science*, v.72, n.12, p.3166-3175, 1989.
- COSTA, E.O. Uso de antimicrobianos na mastite. In: SPINOSA, H. DE S.; GÓRNIK, S.L.; BERNARDI, M.M. (Eds.). *Farmacologia aplicada à medicina veterinária*. 3.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002. Cap 42, p.443-455.
- DÜRR, J.W. Programa Nacional de Melhoria da Qualidade do Leite: uma oportunidade única. In: CARVALHO, M.P.; SANTOS, M.V. dos S. (Ed.). *O compromisso com a qualidade do leite no Brasil*. Passo Fundo: Ufpa, 2004. p.38-55.
- FAGUNDES, H. *Ocorrência de resíduos de antimicrobianos utilizados no tratamento de interrupção de lactação no início da lactação subsequente em animais com período seco recomendado*. 2003. 91f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2003. Disponível em <<http://www.teses.usp.br/>>. Acesso em: 13 mar. 2008.
- FOLLY, M.M.; MACHADO, S. da C.A. Determinação de resíduos de antibióticos, utilizando-se métodos de inibição microbiana, enzimático e imuno-ensaios no leite pasteurizado comercializado na região norte do estado do Rio de Janeiro, Brasil. *Ciência Rural*, v.31, n.1, 2001. Disponível em: <<http://www.scielo.br/>>. Acesso em: 18 mar. 2006
- HALBERT, L.W.; ERSKINE, R.J.; BARTLETT, P.C.; GILBERT, L.J. Incidence of false-positive results for assays used to detect antibiotics in milk. *Journal of Food Protection*, v.59, p.886-888, 1996.
- HILLERTON, J.E.; HALLEY, B.I.; NEAVES, P.; ROSE, M.D. Detection of antimicrobial substances in individual cow and quarter milk samples using Delvotest microbial inhibitor tests. *Journal of Dairy Science*, v.82, n.4, p.704-711, 1999.
- HONKANEN-BUZALSKI, T.; REYBROECK, W. Antimicrobials. In: BLUTHGEN, A.; TUINSTRAN, L.G.M. (Ed.). *Monograph on residues and contaminants in milk and milk products*. Brussels: International Dairy Federation, 1997. Cap. 4, p.26-34. (IDF - special issue 1997).
- KANG, J. H.; KONDO, F. Occurrence of false-positive results of inhibitor on milk samples using the Delvotest SP assay. *Journal of Food Protection*, v.64, n.8, p.1-5, 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. Disponível em: <<http://www.scielo.br/>>. Acesso em: 10 mar. 2006.
- NEAVES, P. Comparative sensitivities of Delvotest P, Delvotest SP and Delvotest MCS tests for the detection of antimicrobials in milk. The Food Microbiologists, 'Moleview', 28, Randalls Road, Leatherhead, Surrey, KT22 7TQ, UK. *British Mastitis Conference 1999*, p. 97. Axient/Institute for Animal Health/Milk Development Council/Novartis Animal Health.
- NUNES, E.M. de C.G.; PEREIRA, M.M.; MERATORI, M.C.S.; SILVA, T.C. da Detecção de resíduos de antibióticos no leite "in natura" coletado em um laticínio na cidade de Teresina - PI. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA, 31., 2004, São Luís, MA. *Resumos*. São Luís: 2004. 1-CD ROM.
- NUNES, M.T.; D'ANGELINO, J.L. Ocorrência de resíduos de antibióticos no leite, em fazendas produtoras e no leite pronto para consumo. *Higiene Alimentar*, v.21, n.149, 2007.
- SANTOS, M.V. Antibióticos: como não deixar resíduos no leite. *Balde Branco*, n.460, p.54-57, 2003.
- SISCHO, W.M. Symposium: dry residue avoidance: the issue of testing quality milk and tests for antibiotics residues. *Journal of Dairy Science*, v.79, p.1065-1073, 1996.
- TETZNER, T.A.D.; BENEDETTI, E. *Prevalência de resíduos de antibióticos em amostras de leite cru na região do Triângulo Mineiro*. 2005. Disponível em: <<http://www.girleiteiro.org.br/artigos.asp>>. Acesso em: 15 mar. 2006.

Recebido em 25/4/07

Aceito em 19/3/08