

# PREVALÊNCIA DE ANTIBIÓTICOS NO LEITE PASTEURIZADO TIPO B E ESPECIAL 3,2% DE GORDURA CONSUMIDOS EM BELO HORIZONTE, 1982-83 \*

*Prevalence of Antibiotic Residues in Pasteurized Milk, type B and 3,2% Fat Special, Marketed in Belo Horizonte, Brazil, 1982-83*

PROCI-1984.00014

SIL

1984

SP-1984.00014

Teófilo José Pimentel da Silva\*\*  
Márcia Cristina de Sena\*\*\*

**RESUMO** — *A prevalência de resíduos antibióticos nos leites pasteurizados, distribuídos em Belo Horizonte, de abril/82 a março/83, foi de 4,16% no leite pasteurizado tipo B enquanto no leite tipo Especial 3,2% de gordura foi de 0% na marca n.º 1, de 1,04% na marca n.º 2 e de 2,08% na marca n.º 3. Essas prevalências mostraram que houve alguma melhoria na qualidade do leite pasteurizado consumido em Belo Horizonte, comparadas com as prevalências de 1978. Um método teste para detectar resíduos de antibióticos usando esporos de *Bacillus stearothermophilus* var. *calidolactis* foi estudado e comparado com três outros métodos. De 384 pacotes comerciais de leite pasteurizado analisados para a presença de penicilina, o método clássico com disco (*Bacillus subtilis*) detectou penicilina em apenas 71,40% das amostras de leite nas quais foi detectada penicilina pelo método Delvotest-P. O método do T. T. C. (*Streptococcus thermophilus*) detectou penicilina somente em 57,14% dessas amostras. Por outro lado, o método teste detectou penicilina em 85,71% das amostras de leite nas quais foi detectada penicilina pelo método Delvotest-P. O método teste é indicado para detectar penicilina em leite pasteurizado com baixas concentrações a partir de 0,008 U.I./ml.*

## INTRODUÇÃO

A terapia antibiótica tem sido amplamente empregada pelos produtores e veterinários no tratamento de doenças infecciosas de vacas leiteiras, principalmente nas mamites. Estas drogas também têm sido incorporadas na alimentação animal como suplemento de dietas. Estes usos, às vezes indiscriminados, estão conduzindo à presença de resíduos antibióticos no leite e conseqüentemente constituindo problemas de saúde pública e de tecnologia, além de levar a perdas econômicas. Logo, há uma preocupação por parte dos órgãos de inspeção de alimentos no controle deste problema.

WELSH *et alii* (1955) encontraram uma prevalência de 11,6% de resíduos de penicilina no leite pasteurizado nos Estados Unidos, Canadá e Reino Unido. KOSIKOWSKI (1960) verificou uma prevalência de 0,54% de resíduos de antibióticos no leite de dezessete estados dos Estados Unidos. MELLO FILHO (1969) detectou resíduos de penicilina em torno de 1,9% em mil amostras de leite tipo C, no Estado de São Paulo. FARRELY (1970) detectou a presença de penicilina em índices de 5,8% das amostras de leite pasteurizado analisadas na cidade de Dublin (Irlanda). COOK *et alii* (1976) encontraram uma prevalência de 3,2% de penicilina no leite pasteurizado, comercializado na cidade de

\* Trabalho realizado com auxílio do CPq — EV/UFGM e apresentado à 29.ª Semana do Laticinista — Julho/1983.  
\*\* Professor do Departamento de Tecnologia e Inspeção de Produtos de Origem Animal da Escola de Veterinária da UFGM.

\*\*\* Pesquisadora bolsista do CNPq.

Johannesburg (África do Sul). FAGUNDES (1980) estudou a prevalência de antibióticos no leite tipo B e tipo C consumidos em Belo Horizonte tendo encontrado prevalências de 5,49% e 1,25% respectivamente. BARROS & PERCHES (1981) encontraram uma prevalência de antibióticos no leite tipo B em São Paulo de 15,04% nas análises do leite dos produtores, de 21,25% no leite resfriado (carro-tanque) e de 21,87% no leite pasteurizado.

Diversos métodos para detectar resíduos de antibióticos no leite foram desenvolvidos nos últimos anos: FOSTER & WOODRUFF (1943), SILVERMAN & KOSIKOWSKI (1952), NEAL & CALBERT (1955), ARRET & KIKSHBAUM (1959), KOSIKOWSKI & LEDFORD (1960), IGARASHI et alii (1961), MART et alii (1963), I.D.F. (1970), VAN OS et alii (1975), HUHTANEN et alii (1977), KAUFMAN (1977), VILELA & SANTOS (1982), MESSER et alii (1982) e outros modificados. Todavia, não foi conseguido ainda um método completamente aceitável que possa ser facilmente utilizado nas condições de indústria no Brasil.

O presente trabalho objetivou estudar a prevalência de resíduos antibióticos no leite pasteurizado tipo B e Especial 3,2% de Gordura consumidos em Belo Horizonte e avaliar comparativamente a sensibilidade relativa de quatro métodos para detecção de antibióticos no leite.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Amostras de leite

Foram colhidos pacotes de 1.000 ml de leite pasteurizado tipo B e Especial 3,2% de Gordura de três marcas comerciais, nos supermercados de Belo Horizonte, num total de 96 e 288, respectivamente. A colheita se realizou durante 12 meses (abril/82 a março/83), sendo duas vezes por semana. Os pacotes foram acondicionados em caixas isotérmicas e conduzidos para o laboratório do Departamento de Tecnologia e Inspeção de Produtos de Origem Animal da Escola de Veterinária da UFMG.

### Métodos

A presença ou não de resíduos antibióticos no leite foi detectada através de três métodos referendados mundialmente e um teste em pesquisa.

**Método clássico com disco de papel de filtro.** O procedimento foi aplicado conforme o STANDARD METHODS FOR THE EXAMINATION OF DAIRY PRODUCTS (1978).

Suspensões de esporos de *Bacillus subtilis* (ATCC 6633) foram obtidas dos laboratórios Difco. As placas foram incubadas a 32°C por 12h. Zonas de inibição maiores do que 13 mm foram consideradas como teste positivo. Fez-se o controle positivo (0,05 U.I./ml) e o controle negativo.

**Método do T.T.C. ou cloreto de 2, 3, 5 - trifenil tetrazolium.** O procedimento adotado foi segundo o H.M.S.O. (1968). Cultura liofilizada de *Streptococcus thermophilus* foi obtida do Chr. Hansen's Laboratorium. Fez-se o controle positivo (0,04 U.I./ml) e o controle negativo.

**Método do DELVOTEST-P da Gist-Broca-des nv.** Os materiais para o teste Delvotest-P foram obtidos da Bioquímica do Brasil S/A (BIOBRÁS). O procedimento foi segundo VAN OS et alii (1975) e as instruções técnicas recomendadas pelo fabricante. Tabletes nutrientes contendo o bromocresol púrpura como indicador são adicionados em ampolas contendo meio agar sólido semeado com esporos de *Bacillus stearothermophilus* var. *calidolactis*. Após a adição de 0,1 ml de uma amostra de leite, a ampola é incubada em banho-maria 63-65°C por 2h30'. Na ausência de substâncias antimicrobianas todo o meio sólido se torna amarelo (resultado negativo), enquanto a permanência do púrpura de todo meio indica positividade do teste. Como controle foi utilizada uma ampola contendo leite livre de antibióticos. Neste método o microrganismo tem crescimento inibido a uma concentração 0,005 U.I./ml.

**Método teste em pesquisa.** O procedimento foi baseado na técnica de VILELA & SANTOS (1981) com algumas modificações. A cultura do *Bacillus stearothermophilus* var. *calidolactis* foi obtida de uma ampola do DELVOTEST-P. O conteúdo da ampola foi transferido para um tubo com 10 ml de caldo triptona (pH + 8,0) e incubado a 55°C por 18h. Em seguida, foram efetuadas 3 repicagens, na proporção de 1%, em caldo triptona (pH + 8,0) para se obter um número de esporos viáveis na ordem de 10 UFC/ml, sendo que na última fez-se simultaneamente uma repicagem em agar triptona inclinado (pH + 8,0). O meio antibiótico foi preparado colocando-se 10 ml do caldo triptona com esporos viáveis e 1 porção de uma alça de platina com os esporos viáveis desenvolvidos no agar inclinado, em 100 ml de agar triptona pH + 8,0 (+ 55°C). Em seguida adicionou-se o indicador bromocresol púrpura na concentração final de 0,05% e

distribuiu-se em 10 placas de Pet de 110mm dd., para se obter uma camada de 0,8 — 1,0 mm de espessura. As placas, depois de solidificadas, foram empacotadas em sacos plásticos e mantidas na geladeira (+ 5°C) até o uso. No momento da prática, foram feitas depressões circulares de 5 mm de diâmetro com um cortador, no agar da placa, e com uma seringa esterilizada foi transferido 0,1 ml da amostra de leite a ser analisada, em duplicata. Simultaneamente fez-se o controle positivo (0,008 U.I./ml) e o controle negativo. As placas foram incubadas a 62 + 1°C e após 2 horas procedeu-se a leitura. A ausência de resíduos inibidores permitirá o crescimento do microrganismo teste, que é indicado pelo abaixamento do pH e do potencial de óxido-redução, modificando a cor violeta do meio para amarela. Por outro lado, permanecendo um halo violeta ao redor da depressão, indicará a presença de concentrações suficientemente altas de antibiótico, capaz de inibir o crescimento do microrganismo teste. O diâmetro do halo será proporcional à concentração de antibiótico no leite. Foi considerado positivo um halo violeta  $\geq 13 + 1$  mm (0,008 U.I./ml).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os dados da TAB. I mostram que houve uma diminuição na prevalência de antibióticos no leite tipo B e tipo Especial 3,2% de Gordura, comparado com os resultados obtidos por FAGUNDES (1980) que encontrou uma prevalência de 5,49% e 1,25% respectivamente.

O leite pasteurizado tipo B apresentou uma prevalência de 4,16%, um pouco maior do que o tipo Especial 3,2% de Gordura. Acredita-se que essa maior incidência seja, provavelmente, devida ao tratamento de vacas com mamite durante o período de lactação sem o cuidado de ordenhá-las separadamente, durante e pelo menos 72 horas após o tratamento, conforme recomenda a legislação do MA-SIPA (1977), e além do mais se deve ao fato da quantidade desse tipo de leite ser mínima ou seja  $\pm 1\%$  ( $\pm 5.000$  l/dia) em relação ao leite tipo Especial 3,2% de Gordura. Logo, a mistura do leite de um produtor com resíduos de antibióticos irá alterar o volume total da produção do dia. Essa prevalência de 4,16% foi um pouco menor do que a detectada por FAGUNDES (1980) de 5,49%, entretanto, é muito menor quando detectaram uma prevalência de 21,87% no leite pasteurizado tipo B comercializado na cidade de São Paulo.

Os leites pasteurizados tipo Especial 3,2% de Gordura, apresentaram prevalência de antibióticos menor do que os achados por FAGUNDES (1980) que encontrou 1,25% e menor ainda do que os resultados de MELLO FILHO (1969) que detectou uma prevalência de resíduos de penicilina de 1,9% no leite pasteurizado tipo C no Estado de São Paulo. A marca n.º 3 apresentou uma prevalência um pouco maior, entretanto, essa indústria comercializa apenas cerca de  $\pm 2\%$  desse tipo de leite em Belo Horizonte.

TABELA I  
Resultados das análises para detecção de resíduos inibidores em 384 pacotes de leite pasteurizado tipo B e tipo Especial 3,2% de gordura, comercializados em Belo Horizonte, no período de 12 meses.

MARCA N.º	TIPO	MÉTODOS						PREVALÊNCIA (%)			
		Clássico c/disco		T.T.C.		DELVOTEST-P			Teste em Pesquisa	Total pacotes	
		(+)	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)		
1	B	3	93	2	94	4	92	4	92	96	4,16
1	Esp. 3,2% G	0	96	0	96	0	96	0	96	96	0,00
2	Esp. 3,2% G	0	96	0	96	1	95	0	96	96	1,04
3	Esp. 3,2% C	2	94	2	94	2	94	2	94	96	2,08

(+) positivo

(-) negativo

As prevalências encontradas não diferem muito dos trabalhos realizados por MEARA (1959), KOSIKOWSKI (1960), FARRELY (1970) e COOK *et alii* (1976).

A TABELA II mostra o segundo objetivo do trabalho que foi avaliar comparativamente a sensibilidade de três métodos referendados mundialmente e um método teste em pesquisa. A sensibilidade será expressa como sensibilidade relativa em função dos raros resultados de positividade detectados no grande volume de amostras analisadas.

do que o *Bacillus subtilis* em 5.200 amostras de leite cru comercial analisadas.

O método do T.T.C. detectou resíduos de penicilina em 57,14% das amostras de leite nas quais foram detectadas penicilina pelo método Delvotest-P. VAN OS *et alii* (1975) concluíram que o *B. stearothermophilus* var. *calidolactis* é inibido em concentrações de penicilina 0,005 U.I./ml. Por outro lado, NEAL & CALBERT (1955) observaram que o *Streptococcus thermophilus* só é inibido em concentrações de penicilina  $\geq$  0,04 U.I./ml.

TABELA II

Incidência de resíduos de penicilina em 384 pacotes de leites pasteurizados comercializados em Belo Horizonte, detectados pelo *B. subtilis*, *S. thermophilus* e *B. stearothermophilus* var. *calidolactis*.

MÉTODO	Número de pacotes detectados positivos	% de pacotes confirmados positivos	Sensibilidade com % do DELVOTEST-P
Clássico com disco ( <i>B. subtilis</i> )	05	1,30	71,42
T.T.C. ( <i>S. thermophilus</i> )	04	1,04	57,14
DELVOTEST-P ( <i>B. stearothermophilus</i> )	07	1,82	100
Teste em pesquisa ( <i>B. stearothermophilus</i> )	06	1,56	85,71

O método Delvotest-P apresentou uma sensibilidade de 100% de probabilidade estatística nos 384 pacotes de leite analisados, o que não difere dos achados de JOHNSON *et alii* (1977) que comparando três métodos de detecção de antibióticos (disco clássico, cilindro em placa e Delvotest-P) concluíram que o Delvotest-P alcançou 95% de segurança no diagnóstico para penicilina. Por outro lado, coincidiu com os resultados de FAGUNDES (1980) que encontrou sensibilidade e especificidade de 100% de probabilidade estatística nas diluições de 0,01, 0,001, 0,002 e 0,005 U.I./ml para penicilinas.

O método clássico com disco detectou resíduos de penicilina em 71,42% das amostras de leite nas quais foram detectadas penicilina pelo método Delvotest-P. Esses resultados são próximos aos obtidos por JOHNSON *et alii* (1977) quando detectaram penicilina em 75% de um total de 588 amostras confirmadas positivas para o Delvotest-P. GINN *et alii* (1978) concluíram que o *Bacillus stearothermophilus* foi quatro vezes mais sensível à penicilina

O método teste em pesquisa detectou resíduos de penicilina em 85,71% das amostras de leite nas quais foram detectadas penicilina pelo método Delvotest-P. A menor concentração de penicilina detectada por este teste estatisticamente significativo ( $P < 0,05$ ) foi 0,008 U.I./ml. Portanto, o *B. stearothermophilus* foi bem mais sensível do que o *B. subtilis*, que foi muito mais sensível do que o *S. thermophilus*.

### CONCLUSÕES

De acordo com as prevalências de antibióticos encontradas neste estudo, podemos concluir que está havendo uma preocupação maior por parte dos produtores, do Serviço de Inspeção Federal/MA e das indústrias de laticínios na Região de Belo Horizonte. Acreditamos que dessa forma a melhoria da qualidade sanitária do leite será progressiva e culminará num maior consumo e rendimento deste indispensável alimento.

Os resultados comparativos da sensibilidade dos quatro testes utilizados nesta pesquisa, mostram que um número maior de identificações positivas de resíduos de penicilina no leite adulterado, poderiam ser antecipadas se o método Delvotest-P fosse utilizado ao contrário dos outros. Entretanto, a utilização do Delvotest-P a nível de plataforma de indústria é inviável em face do seu elevado custo, por se tratar de produto importado. Logo, o método teste em pesquisa parece ser uma forma alternativa satisfatória, uma vez que o seu procedimento é simples de ser conduzido, essencialmente tão rápido ou mais do que o Delvotest-P e mais sensível do que os métodos frequentemente utilizados para detecção de antibióticos no leite (clássico com disco e T.T.C.). Parece ser também uma boa prática, para uso de rotina nas análises de laboratório, para um grande número de amostras.

### Agradecimento

Ao Professor Edson Clemente dos Santos pela inestimável colaboração prestada na realização deste trabalho.

### SUMMARY

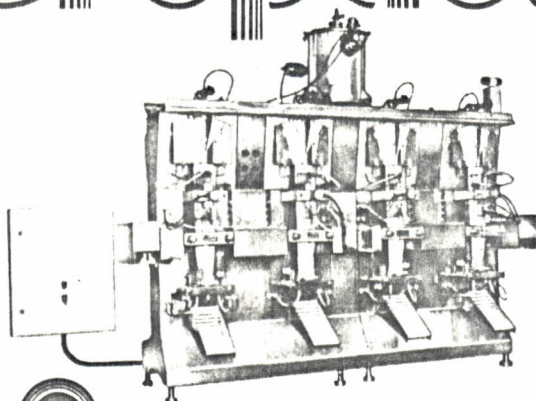
The prevalence of the antibiotic residues on the pasteurized milk distributed in Belo Horizonte, Brazil, from April 82 to March 83, was 4,16% for type B milk whereas type 3,2% Fat Special milk was 0% for brand 1, 1,04% for brand 2 and 2,08% for brand 3. These prevalences showed that improvements have occurred in milk quality of the pasteurized milk commercialized in Belo Horizonte, compared with the prevalences in 1978. A test method for detecting antibiotic residues using *Bacillus stearothermophilus* var. *calidolactis* was evaluated and compared with three other methods. Of 384 commercial packages of pasteurized milk analyzed for presence of penicillin, the *Bacillus subtilis* disc assay method detected penicillin in only 71,40% of the milk samples in which penicillin was detected by the Delvotest-P method. The *Streptococcus thermophilus* T.T.C. method detected penicillin in only 57,14% of these samples. On the other hand, the test method detected penicillin in 85,7% of the milk samples in which penicillin was detected by the Delvotest-P method. The test method was indicated for detecting penicillin in pasteurized milk in low concentrations since 0,008 U.I./ml.

### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION. *Standard methods for the examination of dairy products*. 14 ed. Am. Public Health Assoc., Washington, D.C., 1978. p.141-150.
- ARRET, B. & KIRSHBAUM, A. A rapid disc assay method for detecting penicillin in milk. *J. Milk Food Technol.*, Ames, 22: 329-331; 1959.
- BARROS, V.R.M. & PERCHES, E.M.C. Pesquisa de inibidores no leite tipo B. Distribuído ao consumo da grande São Paulo. *Rev. Inst. Lat. Cândido Tostes*, Juiz de Fora, 36 (216): 39-42, 1981.
- COOK, R.C.; KATZ, W.K.; MEARA, P.J. The incidence and sources of penicillin in milk supplied to the city of Johannesburg. *J. S. Afr. Vet. Assoc.*, Pretoria, 47 (3): 205-7, 1976.
- FAGUNDES, C.M. Persistência de antibióticos no leite bovino em condições experimentais e prevalência nos leites tipos B e C consumidos em Belo Horizonte, 1978. Belo Horizonte, Escola de Veterinária da UFMG, 1980. 48p. (Tese, Mestrado em Medicina Veterinária).
- FARRELY, B. T. A survey of the incidence of antibiotic contamination of milk in the Dublin liquid milk area. *Ir. Vet. J.*, Dublin, 26(3): 41-7, 1970.
- FOSTER, J.W. & WOODRUFF, H.B. Microbiological aspects of penicillin. — I. Methods of assay. *J. Bacteriol.* 46: 187, 1943.
- GINN, R.E.; TATINI, S.; PACKARD, V.S. Comparative evaluation of the Difco disc assay method for detecting penicillin in milk and milk products. *J. Food Prot.*, Ames, 41(5): 361-3, 1978.
- H.M.S.O. Ministry of Agriculture, Fisheries and Food, England. *Tech. Bull.*, London, n.º 17, 1968.
- HUHTANEN, C.N.; PHILLIPS, J.G.; BRAZIS, A.R.; BREDVOLD, E.; MARSHALL, R.T.; PEDERSON, D.E.; SING, E.L.; THOMPSON, D.I.; WALTZ, M.F.; WEHR, H.M.; BENGSCHE, H. Evaluation of a rapid test for antibiotic residue in milk using spores of *Bacillus stearothermophilus* var. *calidolactis*. *J. Food Prot.*, Ames, 40(4): 236-40, 1977.
- IGARASHI, R.T.; BAUGHAM, R.W.; NELSON, F.E.; HARTMAN, P.A. Rapid antibiotic assay methods using *Bacillus stearothermophilus*. *J. Milk Food Technol.*, Ames, 24: 143-46, 1961.
- INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION (IDF) *Detection of penicillin in milk by a disc assay technique*. Bruxelles. I.D.F., 1970. (Doc. 57).

- JOHNSON, M.E.; MARTIN, J.H.; BAKER, R.J.; PARSONS, J.G. A comparison of several assay procedures to detect penicillin residues in milk **J. Food Prot.**, Ames, 40(2): 785-9, 1977.
- KAUFMAN, O.W. A practical sensitive test to detect penicillin in milk. **J. Food Prot.**, Ames, 40:250-1, 1977.
- KOSIKOWSKI, F.V. The control of antibiotic in milk through a sound test program. **J. Milk Food Technol.**, Ames, 23:285-7, 1960.
- KOSIKOWSKI, F.V. & LEDFORD, R.A. A reverse-phase disc assay test for antibiotics in milk. **J. Amer. Vet. Med. Assoc.**, 136: 297, 1960.
- MARTH, E.H.; ALEXANDER, F.J.; HUS-SONG, R.V. Studies on disc assay methods for detection of antibiotics in milk. **J. Milk Food Technol.**, Ames, 25:150, 1963.
- MEARA, O.J. A survey of penicillin contamination of market milk supplies. **S. Afr. Med. J.**, 33: 821, 1959 apud ABDUSSALAM, M. et alii. **Higiene de la leche**. Genebra, OMS, 1959. p. 77.
- MELLO FILHO, A. Penicilina no leite de consumo da cidade de São Paulo e riscos de sensibilização. **Rev. Paul. Med.**, São Paulo, 25:21-34, 1969.
- MESSER, J.W.; LESLIE, J.E.; HOUGHTBY, G.A.; PEELER, J.T.; MARNETT, J.E. Bacillus stearothermophilus disc assay for detection of inhibitors in milk: collaborative study. **J. Assoc. Off. Anal. Chem.** 65(5): 1208-14, 1982.
- MINISTÉRIO DA AGRICULTURA. Secretaria de Inspeção do Produto Animal, Brasília, DF. **Normas para produção de leite tipo B**. 1977. 16p.
- NEAL, C.E. & GALBERT, H.E. The use of 2,3,5 - triphenyltetrazolium chloride as a test for antibiotic substances in milk. **J. Dairy Sci.**, Champaign, 38(6): 629-33, 1955.
- SILVERMAN, G.J. & KOSIKOWSKI, F.V. Systematic of inhibitory substances in milk. **J. Milk Food Technol.**, Ames, 15:120-4, 127, 1952.
- VAN OS, J.L.; LAMERIS, S.A.; DOODEWAARD, J.; OOSTENDORP, J.G. Diffusion test for the determination of antibiotic residues in milk. **Neth. Milk Dairy J.**, 29: 16-34, 1975.
- VILELA, S.C. & SANTOS, E.C. Identificação rápida de resíduos antibióticos no leite. **Arq. Esc. Vet. UFMG**, Belo Horizonte, 33(3): 569-74, 1981.
- WELSH, H.; JESTER, W.R.; BURTON, J.M. **Antibiot. chemother.**, Basel, 5: 571, 1955 apud ABDUSSALAM, M. et alii. **Higiene de la leche**. Genebra, OMS, 1966. p. 73.

# Prepac eco 2/4 9000 l/h



a arte de  
embalar  
líquidos  
alimentares  
automaticamente

**Prepac do Brasil**

máquinas automáticas de embalagem Ltda

av. octalles marcondes ferreira, 338 - jurubatuba - santo amaro - são paulo - telex (011) 32499 - foil br  
endereço telegráfico "plasticfoil" - cep 04696 - c. g. c. 62.846.928/0001-49 - inscr. estadual 108.355.801 - telefone pabx 248-2044