



**Fundação Educacional do Município de Assis
Instituto Municipal de Ensino Superior de Assis
Campus "José Santilli Sobrinho"**

CLÓVIS ASSIS DA ROCHA HENRIQUES

**DETERMINAÇÃO DE ANTIBIÓTICOS NO LEITE CRU E
PASTEURIZADO COMERCIALIZADO NA REGIÃO DE ASSIS - SP**

Assis

2012

CLÓVIS ASSIS DA ROCHA HENRIQUES

DETERMINAÇÃO DE ANTIBIÓTICOS NO LEITE CRU E
PASTEURIZADO COMERCIALIZADO NA REGIÃO DE ASSIS - SP

Trabalho de conclusão de curso de Curso apresentado ao Instituto Municipal de Ensino Superior de Assis, como requisito do Curso de Graduação.

Orientando (a): Clóvis Assis da Rocha Henriques

Orientador (a): Ms. Gilcelene Bruzon

Área de Concentração: Ciências Exatas e da Terra

Assis

2012

FICHA CATALOGRÁFICA

HENRIQUES, Clóvis Assis da Rocha

Determinação de antibióticos no leite cru e pasteurizado comercializado na região de Assis-SP / Clóvis Assis da Rocha Henriques. Fundação Educacional do Município de Assis - FEMA -- Assis, 2012.

72p.

Orientador: Gilcelene Bruzon.

Trabalho de Conclusão de Curso – Instituto Municipal de Ensino Superior de Assis – IMESA.

1. Determinação de antibióticos. 2. Leite cru e pasteurizado. 3. Comercializado na região de Assis.

CDD: 660
Biblioteca da FEMA

DETERMINAÇÃO DE ANTIBIÓTICOS NO LEITE CRU E PASTEURIZADO COMERCIALIZADO NA REGIÃO DE ASSIS - SP

CLÓVIS ASSIS DA ROCHA HENRIQUES

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao Instituto Municipal
de Ensino Superior de Assis, como
requisito do Curso de Graduação,
analisado pela seguinte comissão
examinadora:

Orientador: Ms. Gilcelene Bruzon

Analisador: Patrícia Cavani Martins de Mello

Assis
2012

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais, Firmino e Conceição, que me deram a educação básica na minha vida.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por ter me dado força e capacidade para concluir este trabalho.

Aos meus familiares, meus pais, Firmino e Conceição, que poderão ter o orgulho de seu filho.

Aos meus amigos, Marcelo, Rafael, João, Lucas, Fernanda, Grazielle, que estiveram presentes nesses quatro anos de faculdade e que agora poderão se distanciar, deixando muita saudade.

A Maria Eduarda pela compreensão pelas dificuldades ocorridas neste período.

A professora, Gilcelene Bruzon, pela orientação e constante estímulo transmitido durante o trabalho e também pelo conhecimento extra que passou através deste. Assim como os outros professores que passaram conhecimento necessário durante o curso e também o mais importante, conhecimento para a vida!

A imaginação é mais importante que a ciência, porque a ciência é limitada, ao passo que a imaginação abrange o mundo inteiro.

Albert Einstein

(1879-1955)

RESUMO

O leite é amplamente consumido pela população na forma natural, de iogurte, queijo, leite em pó, leite condensado, manteiga e sobremesas. É composto por uma mistura complexa de lipídeos, proteínas, carboidratos, vitaminas e minerais, além de componentes secundários que derivam do mecanismo de síntese celular. A presença de antibióticos no leite ocorre devido às inflamações como mastite, altamente associadas às condições sanitárias na ordenha, saúde dos animais, ao manejo e à alimentação dos animais, e representam perdas significativas de produtividade. A presença de antibióticos no leite e seus derivados pode prejudicar a saúde humana, os sinais observados na maioria dos casos são de vômitos, náuseas, contrações abdominais, diarreia, sudorese e cefaleia. O objetivo é determinar a presença de antibióticos no leite cru, pasteurizado e UHT comercializado na região de Assis- SP, utilizando o método de redutase e o método do halo. O método de redutase, utilizando-se azul de metileno como indicador, pode ser utilizado para detectar, presuntivamente, resíduos de antibióticos no leite, outro método recomendado é o antibiograma (teste de sensibilidade) pela técnica de difusão de discos, tendo como princípio de ação uma substancial fonte de proteínas e carboidratos que proporcionam o desenvolvimento e crescimento de cepas bacterianas de interesse clínico. Foram coletado um leite cru, pasteurizado e UHT na cidade de Maracá e um leite cru, pasteurizado e UHT na cidade de Cruzália. As cepas utilizadas foram a *Staphylococcus aureus* em meio ABP e *Escherichia coli* em meio EMB, ambas as cepas foram também cultivadas em meio Agar Mueller Hinton. Para validação do método foram utilizados os antibióticos Gentamicina, Penicilina e Oxitetraciclina. De acordo com as análises de redutase verificou-se que apenas uma amostra de leite cru pode ser considerada qualidade satisfatória as demais amostras foram consideradas leites de boa qualidade. Os resultados positivos para os antibióticos mostraram a sensibilidade do método para a detecção de antibióticos em leite. De acordo com as análises do método do halo verificou-se que as amostras de leite cru e pasteurizado não continham antibióticos, apenas uma das amostra de leite UHT obteve resultado positivo, indicando que nesse leite provavelmente há presença de antibióticos.

Palavra chave: Antibióticos, Leite, Redutase, Halo.

ABSTRACT

Milk is widely consumed by the population in natural way, yogurt, cheese, powdered milk, condensed milk, butter and desserts. It consists of a complex mixture of lipids, proteins, carbohydrates, vitamins and minerals, plus minor components that are derived from cellular synthesis engine. The presence of antibiotics in milk is due to inflammation such as mastitis, highly associated health conditions for milking, animal health, the handling and feeding of animals, and represent a significant loss of productivity. The presence of antibiotics in milk and dairy products can impair human health, the signs observed in most cases are vomiting, nausea, abdominal cramps, diarrhea, headache and sweating. The goal is to determine the presence of antibiotics in raw milk, pasteurized and UHT milk marketed in the region of Assis-SP using the method and the method reductase halo. The method reductase, using methylene blue as indicator can be used to detect presumptive antibiotic residues in milk, another method is recommended antibiogram (test sensitivity) by disc diffusion technique, with the principle share a substantial source of protein and carbohydrates that provide the development and growth of bacteria of clinical interest. We collected a raw, pasteurized and UHT milk in the city of Maracaí and a raw, pasteurized and UHT milk in the city of Cruzália. The strains used were *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* using BPA in EMB medium, both strains were also cultivate in Mueller Hinton Agar. To validate the method we used the antibiotic Gentamicin, Penicillin and Oxytetracycline. According to the analyzes of reductase was found that only one raw milk sample can be considered satisfactory quality all other samples were considered good quality milk. The results showed positive for antibiotics sensitivity of the method to detect antibiotics in milk. According to the analysis method of the halo was found that the samples of raw and pasteurized milk containing no antibiotics, only one of UHT milk sample obtained positive result indicating that there is probably milk presence of antibiotics.

Keyword: Antibiotics, Dairy, Reductase, Halo.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Leite inspecionado no Brasil, 2000/2011.....	20
Figura 2 – Sistema de suporte do úbere da vaca	21
Figura 3 – Alvéolos e Dutos formam o sistema secretor de leite	22
Figura 4 - Secreção do leite nas células secretórias	22
Figura 5 - Lactose é sintetizada no úbere a partir de glicose e galactose	23
Figura 6 - Estrutura Química da vitamina A	24
Figura 7 - Estrutura Química da vitamina C	25
Figura 8 - Estrutura Química da Tiamina	25
Figura 9 - Estrutura Química da Riboflavina	25
Figura 10 - Estrutura Química da vitamina B6	25
Figura 11 - Estrutura Química da Niacina	25
Figura 12 - Estrutura Química da vitamina B12	26
Figura 13 – Coleta das amostras	47
Figura 14 – Resultado do Método de Redutase	51
Figura 15 – Controle de papel	53
Figura 16 – Leite UHT tipo 1 e 2 sem antibióticos	53
Figura 17 – Leite UHT tipo 1A e 2A com Gentamicina	54
Figura 18 – Leite UHT tipo 1B e 2B com Oxitetraciclina	54
Figura 19 – Leite UHT tipo 1C e 2C com Penicilina	55
Figura 20 – Leite cru tipo 3 e 4 sem antibióticos	56
Figura 21 – Leite pasteurizado tipo 5 e 6 sem antibióticos	56
Figura 22 – Controle papel	57
Figura 23 – Leite UHT tipo 1 e 2 sem antibióticos	58

Figura 24 – Leite UHT tipo 1A e 2A com Gentamicina	58
Figura 25 – Leite UHT tipo 1B e 2B com Oxitetraciclina	59
Figura 26 – Leite UHT tipo 1C e 2C com Penicilina	59
Figura 27 – Leite cru tipo 3 e 4 sem antibióticos	60
Figura 28 - Leite pasteurizado 5 e 6 sem antibióticos	61
Figura 29 – Controle de papel	62
Figura 30 – Leite UHT tipo 1 e 2 sem antibióticos	62
Figura 31 – Leite UHT tipo 1A e 2A com Gentamicina	63
Figura 32 – Leite UHT tipo 1B e 2B com Oxitetraciclina	63
Figura 33 – Leite UHT tipo 1C e 2C com Penicilina	64
Figura 34 – Leite cru tipo 3 e 4 sem antibióticos	65
Figura 35 - Leite pasteurizado 5 e 6 sem antibióticos	65

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Leite inspecionado no Brasil, 2000/2011.....	19
Tabela 2 - Composição do leite de diferentes espécies (quantidade por 100g) ...	20
Tabela 3 - Classificação dos tipos de leite conforme a legislação brasileira	24
Tabela 4 – Resíduos de antibióticos pela Legislação Brasileira	38
Tabela 5 - Resultado do método de redutase	52
Tabela 6 - Meio EMB – Teste com leite UHT para validação do método	55
Tabela 7 - Meio EMB – Teste com leite cru e pasteurizado	57
Tabela 8 - Meio Agar Mueller Hilton – Teste com leite UHT para validação	60
Tabela 9 - Meio Agar Mueller Hilton – Teste com leite cru e pasteurizado	61
Tabela 10 - Meio ABP – Teste com leite UHT para validação do método	64
Tabela 11 - Meio ABP – Teste com leite cru e pasteurizado	66
Tabela 12 - Resultado dos meios Agar Mueller Hilton, ABP e EMB	66

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	17
2. LEITE	19
2.1 QUALIDADE DO LEITE	26
2.1.1 Padrões Físico Químicos.....	27
2.1.1.1 Sabor	27
2.1.1.2 Odor	28
2.1.1.3 Cor.....	28
2.1.1.4 Aspecto	28
2.1.1.5 Acidez	28
2.1.1.6 pH.....	29
2.1.1.7 Densidade	29
2.1.1.8 Viscosidade	29
2.1.1.9 Condutividade elétrica	29
2.1.2 Padrões Microbiológicos	30
2.2 CONTAMINAÇÃO DO LEITE	31
2.2.1 Contaminação por mastite, mamite	31
2.2.2 Contaminação por antibióticos	33
2.3 INSTRUÇÃO NORMATIVA Nº51/2002	35
3. ANTIBIÓTICOS	36
3.1 BENEFÍCIOS DOS ANTIBIÓTICOS	36
3.2 PROBLEMAS CAUSADOS POR ANTIBIÓTICOS	37
4. MÉTODOS DE DETECÇÃO DE ANTIBIÓTICOS NO LEITE	39
4.1 TESTES BASEADOS NA INIBIÇÃO DE CRESCIMENTO BACTERIANO	39

4.2 TESTES RECEPTORES E ENZIMAS	40
4.3 TESTES IMUNOLÓGICOS	40
4.4 CROMATOGRAFIA GASOSA (GC)	40
4.5 CROMATOGRAFIA EM CAMADA FINA (TLC)	41
4.6 METODO MICROBIOLOGICO PARA O RASTREIO DE ANTIBIOTICOS	41
4.7 TESTE REDUTASE	42
4.8 TESTE DO HALO	42
5. APLICAÇÃO NO ENSINO MÉDIO	43
5.1 EXPERIÊNCIA PARA UTILIZAR NO ENSINO MÉDIO	43
5.1.1 Material por grupo	44
5.2 MÉTODO	44
6. MATERIAIS E MÉTODOS	45
6.1 MATERIAIS	45
6.1.1 Material para o método de Redutase	45
6.1.2 Material para o método do Halo	46
6.2 MÉTODOS	47
6.2.1 Coletas	47
6.2.2 Método de Redutase	47
6.2.2.1 Interpretação método redutase	48
6.2.3 Método do Halo	48
6.2.3.1 Preparo do meio Agar Mueller Hinton.....	48
6.2.3.2 Preparo ABP	49
6.2.3.3 Preparo EMB	49
6.2.3.4 Preparo do inóculo	49
6.2.3.5 Semeadura	49

6.2.3.6 Aplicação dos discos	50
6.2.3.7 Interpretação método halo	50
7. RESULTADOS E DISCUSSÃO	51
7.1 MÉTODO DE REDUTASE	51
7.2 MÉTODO DO HALO	53
7.2.1 Meio EMB = Levine com cepa <i>Escherichia coli</i>	53
7.2.2 Meio Agar Mueller Hinton com cepa <i>Escherichia coli</i> e <i>staphylococcus Aureus</i>	57
7.2.3 Meio ABP = Baird Agar com cepa <i>staphylococcus aureus</i>	62
8. CONCLUSÃO	67
REFERÊNCIAS	68

1. INTRODUÇÃO

O leite é amplamente consumido pela população na forma de leite, iogurte, queijo, leite em pó, leite condensado, manteiga e sobremesas. É composto por uma mistura complexa de lipídeos, proteínas, carboidratos, vitaminas e minerais, além de componentes secundários que derivam do mecanismo de síntese celular. O leite cru ou pasteurizado tem como composição nutricional nutrientes como vitamina A, vitamina C, tiamina, riboflavina, niacina, vitamina B₆, folacina, vitamina B₁₂, cálcio, fósforo, magnésio, ferro, zinco (DAMODARAN; PARKIN; FENNEMA, 2007, p.692).

O Brasil tem evoluído no mercado mundial de lácteos investindo na melhoria da produtividade e estabelecendo padrões de qualidade para a matéria - prima. Para garantir a qualidade é necessário seguir critérios estabelecidos e controlar os resíduos de antibiótico atendendo os parâmetros exigidos na Instrução normativa 51 (IN51). Segundo Bosquiroli (2004, p.6) os leites podem ser "leite tipo A, Leite tipo B e Leite Tipo C", porém a metodologia utilizada para esta denominação não oferece garantia de que o produto chegará ao mercado realmente livre de resíduo de antibiótico, ou que não oferecerá risco ao consumidor (DIETRICH, 2008, p.156).

A presença de antibióticos no leite ocorre devido às inflamações como mastite, altamente associadas às condições sanitárias na ordenha, saúde dos animais, ao manejo e à alimentação dos animais, e representam perdas significativas de produtividade chegando a níveis de 30% a 50%. Uma dose de 50mg de antibiótico aplicada em um animal poderá contaminar até 100 mil litros de leite (DIETRICH, 2008, p.157).

A aplicação de antibióticos aumenta a eliminação de resíduos no leite onde variam em função de concentração, estágio de lactação volume de leite produzido e intensidade de infecção, dose administrada, excipiente e via de aplicação (BRANCHER, FACUNDES, 1998, p.80).

A mastite bovina é uma doença multifatorial, de etiologia complexa e variada, e se encontra disseminada em todas as regiões produtoras de leite. A maioria das

infecções tem origem bacteriana, predominando o *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus agalactiae* (NASCIMENTO; MAESTRO; CAMPOS, 2001, p.120).

Deve-se garantir a ausência dos antibióticos no leite devido sua utilização em processos de produção que envolve fermentações como iogurtes e queijos, pois os mesmos são altamente prejudicados pela contaminação, levando a atrasos no processo fermentativo, perdas de rendimentos, inibição total da fermentação como perda do leite ou dos produtos finais (DIETRICH, 2008, p.157).

A presença de antibióticos no leite e seus derivados pode prejudicar a saúde humana, os sinais observados na maioria dos casos são de vômitos, náuseas, contrações abdominais, diarreia, sudorese e cefaleia. A intoxicação geralmente não é letal, sendo que a duração dos sintomas é de 1 a 2 dias, podendo evoluir para quatro dias nos casos mais severos (DIETRICH, 2008, p.158).

Existem diversos métodos que podem ser utilizados para identificar a presença de antibióticos no leite tais como os testes inibidores de crescimento microbiano utilizando Devolteste P/SP, ADM, método da redutase modificado, método de adificação do iogurte indicador, testes imunológicos, testes receptores e enzimas utilizando o SNAP, e alguns métodos especiais teste do halo (DIETRICH, 2008, p.158).

O método de redutase e o método do halo são utilizados para detectar presuntivamente a presença de antibióticos no leite, devido a seu baixo custo quando comparado com os demais (BRANCHER, 1998, p.80).

É importante garantir que o leite consumido não contenha antibiótico, sua presença no organismo humano pode prejudicar a saúde e ocasionar resistência bacteriana (BOSQUIROLI, 2004, p.2-4).

Este trabalho tem como objetivo determinar a qualidade e presença dos antibióticos no leite cru, pasteurizado e UHT comercializado na região de Assis- SP, utilizando o método de redutase e o método do halo.

2. LEITE

A origem do leite consumido no Brasil está intimamente ligada à exploração do gado trazido durante o período de colonização. O gado foi utilizado primeiramente como força de trabalho nos engenhos de cana de açúcar e posteriormente a pecuária de corte se desenvolve. No século XIX o consumo de leite teve caráter secundário.

No Brasil, até o século XX, o leite era consumido sem nenhum tipo de tratamento, podendo por isso causar uma série de doenças aos consumidores (ALVES, 2000, p.75-76).

Em muitas cidades do interior é mais fácil encontrar leite cru do que o leite pasteurizado. Sendo encontrado facilmente em padarias e em pequenos mercados e mercearias sem que haja nenhuma fiscalização (NERO, 2005).

A tabela 1 mostra a produção total de leite bem como o leite inspecionado e a diferença em porcentagem no Brasil entre 2000 a 2011.

Ano	Produção total	Leite inspecionado	Dif %
	(mil litros)	(mil litros)	2010/2009
2000	19.767.206	12.107.741	61,3
2001	20.509.953	13.212.445	64,4
2002	21.642.780	13.221.307	61,1
2003	22.253.863	13.627.205	61,2
2004	23.474.694	14.495.145	61,7
2005	24.620.859	16.284.267	66,1
2006	25.398.219	16.669.742	65,6
2007	26.137.266	17.888.643	68,4
2008	27.579.383	19.285.077	69,9
2009	29.105.495	19.601.655	67,3
2010	30.715.460	20.975.501	68,3
2011*	32.296.120	21.594.502	66,9

Tabela 1 - Leite inspecionado no Brasil, 2000/2011. ZOCCAL, R. (In: <http://www.cnpqi.embrapa.br/>)

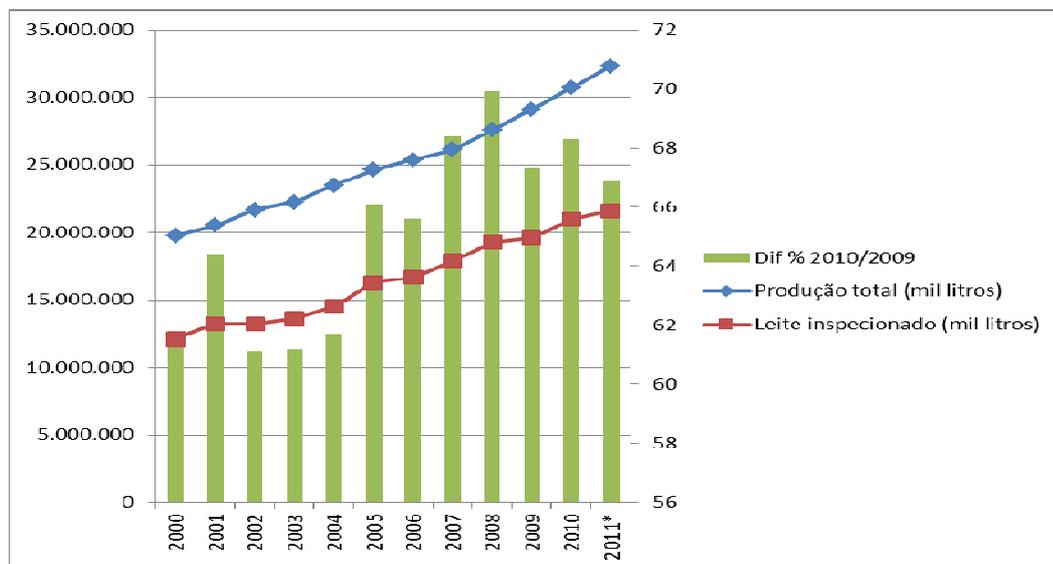


Figura 1 - Leite inspecionado no Brasil, 2000/2011. ZOCCAL, R. (In: <http://www.cnpqi.embrapa.br/>).

O leite é um produto comum da secreção da glândula mamária, sendo um produto complexo e nutritivo que contém mais de 100 substâncias que estão em solução, suspensão ou emulsão.

Dentre estes nutrientes estão proteínas, gorduras, lactose e minerais que pode ter suas porcentagens alteradas de acordo com a espécie que o produz. A tabela 2 mostra a composição do leite em diferentes espécies.

Nutrientes	Vaca	Búfala	Humana
Água, g	88.0	84.0	87.5
Energia, Kcal	61.0	97.0	70.0
Proteína, g	3.2	3.7	1.0
Gordura, g	3.4	6.9	4.4
Lactose, g	4.7	5.2	6.9
Minerais, g	0.72	0.79	0.20

Tabela 2 - Composição do leite de diferentes espécies (quantidade por 100g) (In: WATTIAUX, p.73).

O leite de composição normal tem densidade específica que varia normalmente de 1.023 a 1.040 (a 20°C) e ponto de congelamento que varia de -0.518 a -0.543°C. O

leite é um produto altamente perecível que deve ser refrigerado a 4°C o mais rápido possível após a coleta.

O úbere de uma vaca como mostra a figura 1 é composto por quatro glândulas mamárias ou quartos. Cada quarto é uma entidade funcional própria que opera independente e secreta o leite por seu próprio teto. Geralmente os quartos traseiros produzem mais leite (60%) do que os quartos dianteiros (40%).

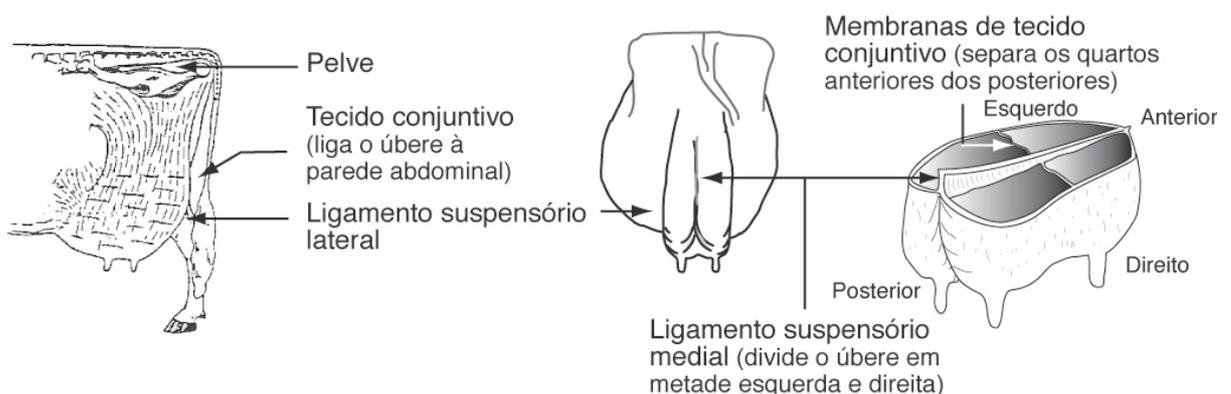


Figura 2- Sistema de suporte do úbere da vaca (In: WATTIAUX, p.77).

O alvéolo como mostra a figura 2 é uma unidade funcional de produção onde umas únicas camadas de células secretoras de leite estão agrupadas, numa esfera com um centro oco. Tecidos de capilares sanguíneos e células mioepiteliais (como células musculares) circundam o alvéolo, e o leite secretado é encontrado na cavidade interna (Lúmen). O alvéolo tem por função remover nutrientes do sangue, transformar esses nutrientes em leite e descarregar o leite dentro do lúmen.

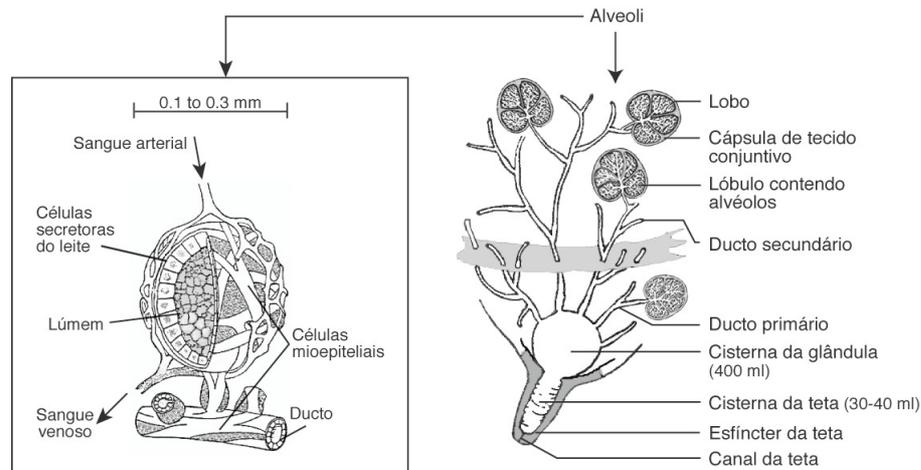


Figura 3 - Alvéolos e ductos formam o sistema secretor de leite (In: WATTIAUX, p.78).

Na produção do leite acontece à síntese de lactose como mostra a figura 3, sendo controlada por uma enzima chamada lactose sintetase. A sub-unidade α -Lactoalbumina é encontrada no leite como uma proteína do soro. Para o leite normal, um balanço é atingido quando há 4,5 a 5% de lactose no leite. A produção de lactose como mostra a figura 4, atua como uma válvula que regula a quantidade de água liberada no alvéolo e, portanto, o volume de leite produzido (WATTIAUX, p.73-80).

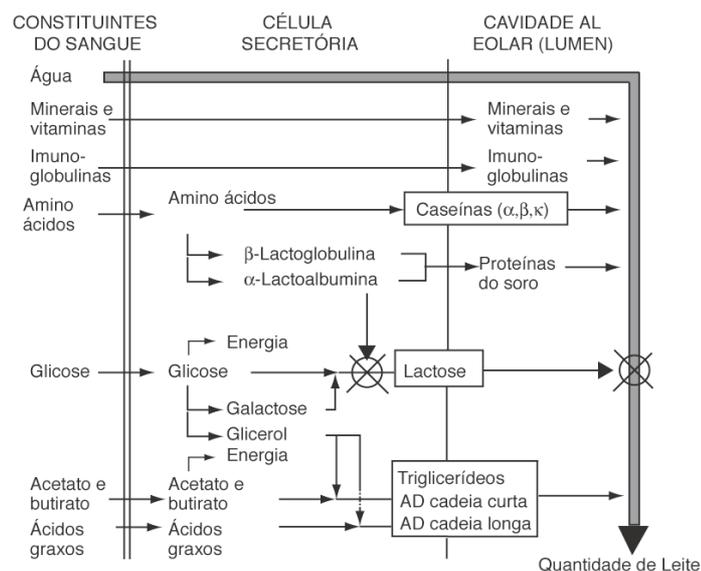


Figura 4 - Secreção do leite nas células secretórias (os círculos com um X são passos regulatórios essenciais) (In: WATTIAUX, p.80).

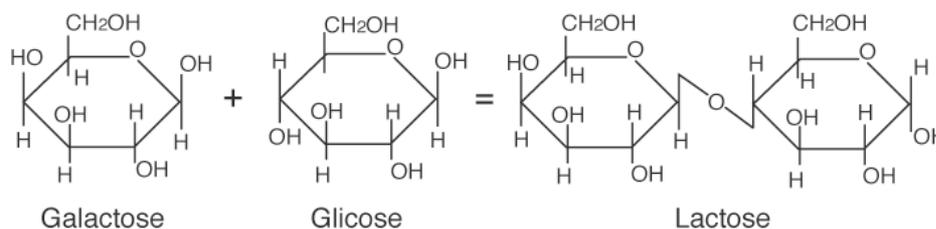


Figura 5 - Lactose sintetizada no úbere a partir de glicose e galactose (In: WATTIAUX, p.73).

O Brasil tem evoluído no mercado mundial de lácteos visando grandes esforços para a melhoria da produtividade e os padrões da qualidade para a melhoria da matéria - prima (DIETRICH, 2008, p.156).

O sistema agroindustrial do leite é um dos mais importantes no agronegócio brasileiro, sendo esta atividade praticada em mais de um milhão de propriedades rurais, onde estima-se que estejam envolvidas somente na produção primária 3,6 milhões de pessoas. No cenário mundial, o Brasil é o sexto maior produtor de leite, com 4,3 % da produção mundial. Em 2002 a produção foi de 21,1 bilhões de litros e o volume do leite produzido na maioria das propriedades rurais não chegou a 250 litros/dia. Estatísticas mostram que no país há aproximadamente a 4,8 milhões de estabelecimentos rurais, dos quais cerca de 85% podem ser considerados de produção familiar, onde a pecuária de leite constitui-se em uma das principais atividades (SOUZA, 2006, p.2).

O leite pode ser classificado como tipo A, B ou C, essa denominação é determinada a partir da contagem de microrganismos presente no leite.

O leite tipo A é oriundo de um controle mais rigoroso na produção e higienização do leite. O leite pasteurizado e embalado na própria fazenda, existindo, portanto, uma menor quantidade de microrganismos. O leite tipo B é transportado sob-refrigeração para indústria em qual ele é pasteurizado e embalado. O leite tipo C é transportador sem refrigeração, pasteurizado e embalado na indústria tendo uma maior quantidade de microrganismo.

O leite tipo A e B possuem mais de 3% de gordura, enquanto no leite tipo C, essa quantidade é reduzida para menos de 3%. Os tipos de leite são classificados de

acordo com a quantidade de microrganismos (VENTURINI; SARCINELLI; SILVA, 2007, p.1-2).

A tabela 3 mostra a classificação dos tipos de leite conforme a legislação brasileira.

Tipo	A	B	C
Carga Bacteriana col/ml (leite cru)	10.000	500.000	Sem Limites
Carga Bacteriana col/ml (leite pausteriz.)	5.000	40.000	150.000
Coliformes	Ausência em 1ml	Tolerância em 0,5ml	Tolerância em 0,2ml
Matéria -gorda (% m/V)	Integral	Integral	3
Acidez (Dornic)*	15-18	15-18	15-18
Densidade (g/l)	1.028-1.033	1.028-1.033	1.028-1.035
Crioscopia (H*)	-0,54 a -0,56	-0,54 a -0,57	-0,53 a -0,58
Alizarol (68° GL)	Normal	Normal	Normal
Lactose (% m/V)	4,3	4,3	4,3
Fosfatase	+	+	+
Peroxidade	+	+	+

Tabela 3 - Classificação dos tipos de leite conforme a legislação brasileira (VENTURINI; SARCINELLI; SILVA, 2007. P.2).

O leite cru ou pasteurizado tem em sua composição os nutrientes: vitamina A (figura 6), vitamina C (figura7), tiamina (figura 8), riboflavina (figura 9), niacina (figura 11), vitamina B₆ (figura 10), folacina, vitamina B₁₂ (figura 12), cálcio, fósforo, magnésio, ferro, zinco (DAMODARAN; PARKIN; FENNEMA, 2007, p.692).

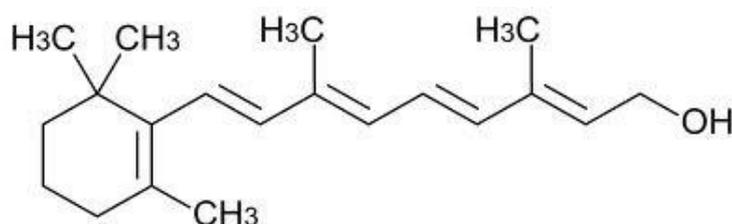


Figura 6. Estrutura Química da Vitamina A (In: <http://www.entrenalinea.com.br/>)

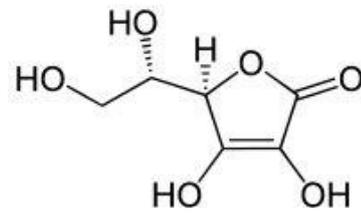


Figura 7. Estrutura Química da Vitamina C (In: <http://www.entrenalinea.com.br/>)

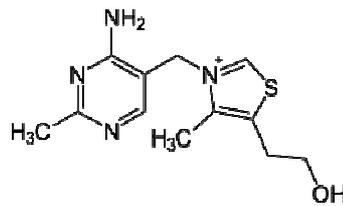


Figura 8. Estrutura Química da Tiamina (In: <http://pt.wikipedia.org/>)

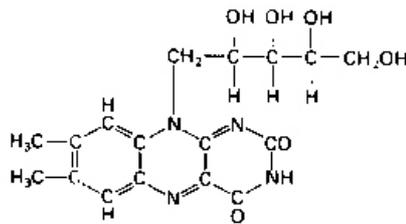


Figura 9. Estrutura Química da Riboflavina (In: <http://es.wikipedia.org/>)

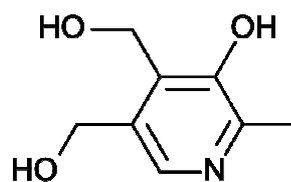


Figura 10. Estrutura Química da Vitamina B₆. (In: <http://www.pt.wikipedia.org/>)

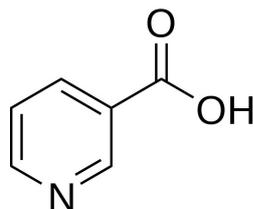


Figura 11. Estrutura Química da Niacina. (In: <http://www.infoescola.com/>)

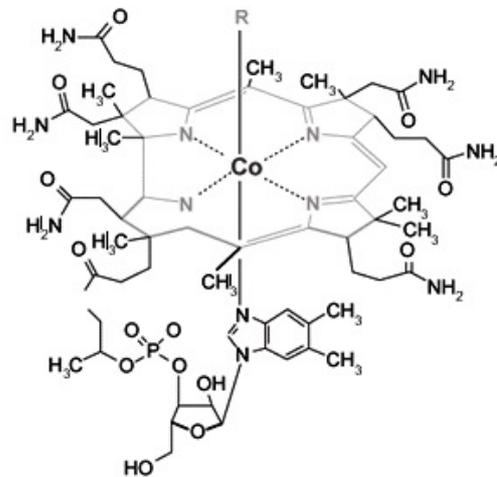


Figura 12. Estrutura Química da Vitamina B₁₂. (In: <http://www.nutricao.inf.br/>)

2.1 QUALIDADE DO LEITE

A qualidade do leite é definida por parâmetros de composição química, características físico-químicas e higiene. A presença e os teores de proteína, gordura, lactose, sais minerais e vitaminas determinam a qualidade da composição, que, por sua vez, é influenciada pela alimentação, manejo, genética e raça do animal. Fatores ligados a cada animal, como o período de lactação, o escore corporal ou situações de estresse também são importantes quanto à qualidade composicional. As exigências de qualidade e higiene para o leite cru e derivados lácteos são definidas com base em postulados estabelecidos para a proteção da saúde humana e preservação das propriedades nutritivas desses alimentos (BRITO, 2000, p.61).

Se acrescentarmos a importância nutricional do leite como alimento, estaremos diante de um dos produtos mais importantes da agropecuária brasileira. O leite é rico em uma grande quantidade de nutrientes essenciais ao crescimento e a manutenção da vida saudável. A indústria de laticínios tem potencializado o valor nutritivo do produto. Existem no mercado uma série de bebidas lácteas enriquecidas com

vitaminas, minerais e ômega. Há ainda o leite produzido para as pessoas que não conseguem digerir a lactose ou seja que possuem a intolerância a lactose (VILELA, 2002, p.1-2).

2.1.1 Padrões Físico Químicos

São avaliadas características físico-químicas e sensoriais como sabor, odor e são definidos parâmetros de baixa contagem de células somáticas, ausência de conservantes químicos e de resíduos de antibióticos, pesticidas ou outras drogas (BRITO, 2000, p.61).

No Brasil novas regulamentações estão sendo propostas por intermédio da Portaria nº 56. Essa portaria acrescenta aos testes potencialmente empregados a determinação da concentração de gordura, acidez titulável, densidade relativa, crioscopia, redutase e estabilidade ao alizarol, além de outras análises quantitativas que incluem a determinação dos teores de proteína, sólidos totais, contagem de células somáticas, contagem total de bactérias e detecção de resíduos de antibióticos betalactâmicos (BRITO, 2000, p.61-62).

2.1.1.1 Sabor

O leite fresco possui um sabor levemente adocicado e agradável, devido essencialmente a alta quantidade de lactose. Além disso, os outros elementos do leite direta ou indiretamente influenciam na sensação de sabor. Porém pode ocorrer variações no sabor devido ao manejo dos animais ao processo de pasteurização e embalagem, podendo absorver sabores indesejáveis, lembrando que o teor de gordura também pode influenciar, quanto maior o teor de gordura mais saboroso o leite (VENTURINI; SARCINELLI; SILVA, 2007, p.3-4).

2.1.1.2 Odor

O leite possui odor suave, levemente ácido. Os principais elementos que influenciam o odor do leite são provenientes de alimentos, meio ambiente, utensílios que entram em contato com o leite e microrganismos (VENTURINI; SARCINELLI; SILVA, 2007, p.3-4).

2.1.1.3 Cor

A cor característica do leite (branco-amarelado opaca) é devido à dispersão da luz pela micelas de caseína, sendo que glóbulos de gordura dispersam a luz, mas pouco contribui para a cor branca. A cor amarelada do leite é devido a substâncias lipossolúveis (caroteno e a riboflavina) (VENTURINI; SARCINELLI; SILVA, 2007, p.3-4).

2.1.1.4 Aspecto

O leite deve ter o aspecto líquido, homogêneo, formado uma camada de gordura na superfície quando deixado em repouso (VENTURINI; SARCINELLI; SILVA, 2007, p.3-4).

2.1.1.5 Acidez

O acidez natural do leite varia entre 0,13 a 0,17%, expressa como ácido láctico. A elevação da acidez é determinada pela transformação da lactose por enzimas microbianas, caracterizando a acidez desenvolvida no leite (SILVA, 1997, p.5).

2.1.1.6 pH

O pH (Potencial Hidrogênionico) varia entre 6,6 a 6,8 com média de 6,7 a 20°C ou a 6,6 a 25°C. O leite apresenta considerável efeito tampão, especialmente em pH entre 5 e 6, em razão da presença de dióxido de carbono, proteínas, citratos, lactatos e fosfatos (SILVA, 1997, p.5).

2.1.1.7 Densidade

A densidade do leite varia entre 1,023 g/mL e 1,040 g/mL a 15°C; o valor médio é 1,032g/mL. O leite com alto teor de gordura apresenta densidade maior em relação ao leite com menor teor de gordura (SILVA, 1997, p.5).

2.1.1.8 Viscosidade

O leite é mais viscoso que a água, em razão da presença de proteínas e lipídios, podendo sofrer alterações com o processamento industrial. O leite integral e o desnatado têm viscosidade médias, a 20°C, de 1,631mPa s e 1,404mPa s, respectivamente (SILVA, 1997, p.5).

2.1.1.9 Condutividade Elétrica

A presença de íons no leite, particularmente na forma de sais, possibilita a passagem de corrente elétrica, dependente da atividade desse íons. Em média, a condutividade do leite varia entre 4,61ms/cm a 4,92ms/cm (SILVA, 1997, p.5).

2.1.2 Padrões Microbiológicos

Um dos fatores que determina a qualidade do leite é a sua acidez, o leite fresco é levemente ácido (acidez natural), devido à presença de caseína, fosfatos, albumina, dióxido de carbono e citratos. A acidez pode aumentar através da hidrólise da lactose por enzimas microbianas, que leva a formação de ácido láctico. Se essa acidez desenvolvida for muito elevada, o leite é impróprio para o consumo, pois ela indica alta atividade microbiana (FERREIRA; RODRIGUES; HARTWING; DERISSO, 1997, p.32).

A acidez do leite decorre da presença de ácidos orgânicos fracos. Portanto, a simples medida do seu pH não permite o cálculo da quantidade de ácido presente (FERREIRA; RODRIGUES; HARTWING; DERISSO, 1997, p.32).

A qualidade microbiológica pode ser analisada sob o enfoque de qualidade industrial e riscos para a saúde pública. A qualidade microbiológica indica:

- Estado sanitário do rebanho produtor.
- Condições gerais de manejo e higiene na ordenha.
- Eficiência de processo de resfriamento da matéria-prima após a ordenha.

As bactérias podem ser classificadas quanto a temperatura ótima de crescimento e multiplicação, sendo:

- Mesófilas: 20 a 40°C.
- Termófilas: 45 a 55°C
- Psicrófilas: 0 a 15°C

Existem ainda, as bactérias do grupo Psicotróficas,(7°C a menos) das Termodúricas (63 a 72°C) e das Psicotróficas-Termodúricas (COSTA, 2003,p.8).

Um único fator ou vários fatores associados podem ocasionar uma baixa qualidade microbiológica do leite. Assim, podem ser citados as principais causas determinantes:

- Limpeza / sanitização inadequada do equipamento de ordenha e do tanque de resfriamento.
- Ordenha de animais com úberes e tetos sujos.
- Falta de resfriamento ou resfriamento insatisfatório do leite e derivados.
- Leite com altas contagens bacterianas provenientes de vacas com mastite (COSTA, 2003,p.8).

2.2 CONTAMINAÇÃO DO LEITE

Existem vários tipos de contaminação do leite por meio de mastite, mamite e antibióticos.

2.2.1 Contaminação por mastite, mamite

Dentre os diversos tipos de microorganismos patogênicos que podem ser transmitidos através do leite e derivados, destaca-se o *Staphylococcus aureus*, cuja importância na epidemiologia das doenças veiculadas por alimentos decorre de sua alta prevalência e do risco de produção, nos alimentos contaminados, de toxinas causadoras de gastroenterites alimentares.

Os animais em lactação estão suscetíveis às inflamações nas glândulas mamárias, conhecidas como mastite. A origem do problema é oriunda das inflamações altamente associadas as condições sanitárias na ordenha, saúde dos animais, ao manejo e à alimentação dos animais, e representam perdas significativas de produtividade chegando a reduzir em níveis de 30% a 50%. O combate a estas inflamações passa necessariamente pela aplicação de injeção de antibióticos nas glândulas mamárias. Após a aplicação, o leite produzido pelo animal possui altas concentrações de antibióticos aplicado, não estando conforme para o consumo nem

para a produção de derivados. Sendo avaliada a sua contaminação em partes por bilhão (ppb) o que significa que uma dose de 50mg de antibiótico aplicada em um animal poderá contaminar até 100 mil litros de leite (DIETRICH, 2008, p.157).

A mastite é considerada como a doença que proporciona as maiores perdas econômicas na produção de leite.

A mastite bovina é uma doença multifatorial, de etiologia complexa e variada, e se encontra disseminada em todas as regiões produtoras de leite. A maioria das infecções tem origem bacteriana, além da *Staphyococcus aureus* existe a *Streptococcus agalactiae* (NASCIMENTO; MAESTRO; CAMPOS, 2001, p.120).

A mastite, inflamação na glândula mamária normalmente causada por uma infecção, continua sendo a doença de maior custo e frequência nas fazendas de gado leiteiro. Entre as perdas relacionadas com a doença estão: o descarte do leite, gastos com tratamento, redução da produção e diminuição da vida produtiva do animal no rebanho. Em geral, o descarte do leite e o preço dos medicamentos para tratar a mastite assumem a maior porcentagem dos custos da doença. Além disso, a realização de tratamento não necessariamente resulta em cura do animal. Devido à importância e às complicações da mastite, seu diagnóstico é de grande utilidade e desperta interesse dos envolvidos com a produção leiteira. A partir da identificação da mastite é possível tomar decisões de manejo e controle da doença no rebanho. Dessa forma, se a mastite for detectada precocemente as decisões a serem tomadas também podem ser antecipadas, o que reduz a persistência da doença e os custos gerados por ela (RODRIGUES, 2008, p.14,15).

Estas toxinas podem causar choque tóxico e estão comumente associadas com intoxicações alimentares e diversas formas de alergias e doenças autoimunes (BALABAN & RASOOLY,2000).

Os sinais observados na maioria dos casos de gastroenterite estafilocócica inclui náuseas, vômitos, contrações abdominais, diarreia, sudorese e cefaleia. A intoxicação geralmente não é letal, sendo que a duração dos sintomas é de 1 a 2 dias, podendo evoluir para quadro mais severos, dependendo da sua

susceptibilidade do indivíduo. A quantidade mínima de enterotoxina estafilocócica necessária para causar sintomatologia em humanos é de 200ng.

Um grande problema é a Mastite, enfermidade do rebanho leiteiro, uma vez que a aplicação de antibióticos, aumenta a eliminação de resíduos no leite onde variam em função de concentração, estágio de lactação volume de leite produzido e intensidade de infecção, dose administrada, excipiente e via de aplicação. Os antibióticos utilizados no tratamento das mastites podem aparecer no leite até 144 horas após sua aplicação dependendo dos interferentes presentes. Os resíduos de antimicrobianos, são resistentes à pasteurização e a penicilina no leite só é destruído totalmente a 100°C após 3 horas. A termoresistência destas drogas, traz transtornos tecnológicos à indústria laticínica especialmente no processamento do iogurte, queijos e manteiga (BRANCHER, FACUNDES, 1998 p.80).

2.2.2 Contaminação por antibióticos

Os antibióticos presente no leite têm duas origens, podem ser provenientes do tratamento mastite ou da adição de quimioterápicos no leite por produtores. Muitas vezes seu uso incorreto, quando não observado o período de metabolismo pelo animal, poderá haver eliminação no leite (SILVIA; SARMENTO; FRANCA; p 1-6).

O leite pode conter resíduos de substâncias como antibióticos, desinfetantes e pesticidas administrados aos animais ou usadas no ambiente da fazenda. Antibióticos podem ser detectados no leite após serem administrados pelas vias intramamária, intramuscular, intra-uterina, oral e subcutânea. Os antibióticos são comumente usados para tratar mastite e outras infecções das vacas leiteiras (BRITO, p.69)

As principais razões porque os produtores, a indústria, autoridades de saúde pública e consumidores se preocupam com os resíduos de antibióticos no leite se deve o fato de que uma pequena porcentagem de consumidores apresenta reação alérgica à penicilina, mesmo para as pequenas quantidades que podem aparecer no leite

como resíduos, alguns (nitrofuranos e sulfametazina) desenvolvem tumores malignos em animais de laboratório, havendo o potencial para causar mesmo efeito no homem. O cloranfenicol pode causar efeitos adversos sobre a medula óssea, causando anemia aplástica em indivíduos susceptíveis, independentemente da dose.

Os resíduos de antibióticos podem atuar sobre as bactérias do ambiente e / ou presente nos animais, selecionando amostras resistentes, o que pode prejudicar futuros tratamentos. Além disto pequenas concentrações de antibióticos podem inibir as espécies de bactérias usadas nos produtos lácteos fermentados, e o leite não poderá ser usado para o processamento.

A atividade dos antibióticos não é, geralmente, afetada pela pasteurização. Portanto, é importante que uma série de cuidados sejam tomados quando se administram antibióticos às vacas em lactação para que o leite com resíduos não seja comercializado. Alguns pontos principais são:

- a) Ler com atenção as instruções contidas nas bulas dos antibióticos e segui-las cuidadosamente;
- b) Ordenhar as vacas tratadas por último;
- c) Descartar o leite dos quatro quartos mamários, pois o antibiótico em um quarto é absorvido pela corrente sanguínea e secretado no leite dos quartos não tratados;
- d) Respeitar rigorosamente o prazo de retirada do leite consumo para cada produto utilizado. Este prazo varia de acordo com o produto. Antimicrobianos que não trazem esta informação não devem ser usados para tratamento de vacas em lactação (BRITO, p.69-71).

2.3 INSTRUÇÃO NORMATIVA Nº51/2002

A instrução normativa nº 51/2002 para o leite cru e pasteurizado trata-se do regulamento técnico (RT) de produção, identidade e qualidade do leite tipo A e B, RT de identidade e qualidade de leite pasteurizado.

São estabelecidos parâmetros e recomendações para:

- Ordenha
- Instalações e equipamentos
- Sanidade do rebanho
- Higiene da produção
- Controle da Produção
- Controle de qualidade da matéria prima.
- Transporte do leite do estábulo para a indústria
- Higiene geral e sanitização das instalações e equipamentos de beneficiamento.
- Industrialização e envase.
- Expedição e transporte do leite (tanque com temperatura inferior a 4°C no tempo máximo de 3h após o término, funcionário treinado, teste alizarol, controle da temperatura de recepção (ZACARCHENO, 2008, p.13-14).

3. ANTIBIÓTICOS

A preocupação com a origem dos alimentos, sua qualidade e possíveis riscos à saúde decorrentes de sua ingestão cresceu muito nos últimos anos. Houve uma conscientização por parte dos consumidores de que a política alimentar adotada no século XX, embora tenha gerado elevados índices de produtividade, também foi responsável por enormes prejuízos para a saúde e para o meio ambiente. Para alcançar tais índices, foi necessária a utilização de grandes quantidade de insumos como agrotóxicos, pesticidas, antibióticos, promotores de crescimento, hormônios, entre outros, na lavouras e na criação de animais, adotadas em vários países do mundo (CAMPOS, 2004, p1.).

3.1 BENEFÍCIOS DOS ANTIBIÓTICOS

O uso profilático em animais de corte em doses sub-terapêuticas evita infecções, melhora eficiência da ração, melhora o desempenho no cruzamento e aumenta a massa muscular (SOUZA, 2006, p.27).

Os benefícios da utilização correta de antibióticos para animais, humanos e ambiente:

- Animais: assegura o bem estar (incidência de doenças e morte);
- Humanos: animais saudáveis auxiliam a reduzir doenças veiculadas por alimentos e asseguram melhor fonte de proteínas;
- Ambiente: Proteção de fontes de recursos ambientais e produção de animais com menos dejetos, menos ração, menor uso de espaços e recursos hídricos (SOUZA, 2006, p.28-29).

3.2 PROBLEMAS CAUSADOS POR ANTIBIÓTICOS

Na indústria de laticínios, a presença de antibióticos no leite traz dificuldades técnicas, interferindo nos caracteres organolépticos e tecnológicos dos produtos lácteos industrializados principalmente no processamento tecnológico do iogurte, manteiga e queijo, à inibição da flora bacteriana. A pasteurização, fervura e esterilização do leite não destroem os resíduos para a indústria. Um ponto fundamental no leite é a ausência de antibióticos. Esses podem causar reações alérgicas, provocar resistência bacteriana, além de ser também um problema econômico, interferindo na indústria. Enfatiza-se a preocupação com os antibióticos no leite e os danos à saúde (SILVIA; SARMENTO; FRANCA; p 1-6).

Cabe lembrar que doses constantes de antibióticos são prejudiciais à saúde do animal e conseqüentemente à do homem podendo gerar organismos resistentes (SOUZA, 2006, p.08).

Existem desvantagens em resíduos de carnes, leite e ovos e o aparecimento de patógenos resistentes em ecossistemas específicos como hospitais, fazendas, alimentos, entre outros (SOUZA, 2006, p.28).

A presença de resíduos antibióticos no leite pode causar vários efeitos indesejáveis, como seleção de cepas bacterianas resistentes, no ambiente e no consumidor, hipersensibilidade e possível choque anafilático em indivíduos alérgicos a essas substâncias e desequilíbrio da flora intestinal. A presença destas substâncias pode causar inibição na multiplicação de sua microbiota, interferindo nos resultados de análises laboratoriais de controle de qualidade, bem como na fabricação de derivados como queijos e iogurtes (NERO, et al., 2007, p 391).

A tabela 4 mostra os limites máximos de resíduos (LMRs) tolerados pela Legislação Brasileiro de acordo com os resíduos de antibióticos.

Substância antimicrobiana	LMR ($\mu\text{g.kg}^{-1}$)
β-lactâmicos	
Penicilina G	4
Amoxicilina	4
Ampicilina	4
Ceftiofur	100
Cefapirina	NE*
Sulfametazina	100
Sulfadimetoxina	100
Gentamicina	NE*
Oxitetraciclina	100
Tilosina	NE*
NE* = não especificado	

Tabela 4 – Resíduos de antibióticos pela Legislação Brasileira (NERO; MATTOS; BELOTT, BARROS, FRANCO; 2007, p 392).

4. MÉTODOS DE DETECÇÃO DE ANTIBIÓTICOS NO LEITE

Os métodos para detecção de antibióticos no leite mais indicados são químicos, físicos, biológicos, tecnológicos e adição de corantes. Os métodos microbiológicos estão fundamentados na grande sensibilidade de alguns organismos (cultura lática) frente aos antibióticos (BRANCHER, FACUNDES, 1998 p.81).

Atualmente existem vários tipos de métodos de detecção normalmente utilizados para detecção de resíduos de antibióticos em leite, incluindo testes inibidores de crescimento microbiano, testes imunológicos, testes receptores e enzimas, e alguns métodos especiais (BRITO, 1998; MITCHELL et al., PHILPOT, 1998).

4.1 TESTES BASEADOS NA INIBIÇÃO DE CRESCIMENTO BACTERIANO

Nestes testes a amostra de leite é colocada em contato com um microrganismo sensível. Adicionam-se nutrientes e, após um período de incubação, se houver a presença de resíduos na amostra, observa-se a ausência do crescimento bacteriano. Na ausência de resíduo, o crescimento bacteriano é evidenciado pela produção ácido, pela redução de corantes ou pela formação de uma camada visível de crescimento na superfície de ágar.

As principais vantagens destes testes são seu baixo custo, a facilidade de execução e a possibilidade de diversas amostras poderem ser analisadas simultaneamente (MITCHELL et al. 1998). Como desvantagem, os testes microbiológicos apresentam um elevado tempo de incubação, além de poderem ser afetados por inibidores naturais (MITCHELL et al., 1998). Além disso, alguns testes não podem ser realizados pelo produtor na fazenda, pois exigem equipamentos, instalações e pessoal adequados (OLIVEIRA, 1998).

Como por exemplo destes testes, têm-se: Devolteste P/SP, ADM, método da redutase modificado para detectar antibióticos no leite e método de acidificação do iogurte indicador.

4.2 TESTES RECEPTORES E ENZIMAS

Diferente dos testes imunológicos, que empregam anticorpos específicos para detectar um antimicrobiano particular, alguns testes usam receptores específicos que detectam várias classes de substâncias antimicrobianas (BRITO,1998; MITCHEL et al., 1998). Como exemplo, pode ser citado SNAP, que é um teste enzimático, com receptor específico no qual b-lactâmicos são capturados por uma proteína em um suporte plástico.

4.3 TESTES IMUNOLÓGICOS

Estes testes são baseados na reação do antibiótico (antígeno) com um anticorpo específico. Os testes que utilizam este princípio empregam substâncias radioativas, ou empregam enzimas, na técnica como ELISA. Alguns exemplos são: CITE, Probe, LacTek e Charm II. Na técnica ELISA, quando uma amostra é positiva, há alteração de cor, que pode ser visualizada (BRITO, 1998; MITCHELL et al., 1998).

4.4 CROMATOGRAFIA GASOSA (GC)

Usa a GC/MS para detectar resíduos de clorafenicol em músculo de truta e a LC/MS para confirmar os resultados de amostras suspeitas, pois esta apresenta elevada sensibilidade, sem necessidade de derivatização. O reagente de derivatização do clorafenicol é uma mistura de dexametildisilasano-trimetilclorossilano-piridina, na

proporção 2:1:10. A técnica de GC exige um procedimento trabalhoso, pelo que existem poucos trabalhos publicados.

4.5 CROMATOGRAFIA EM CAMADA FINA (TLC)

A utilização da técnica de TLC para análise quantitativa das sulfonamidas pode reduzir o uso de solvente e o custo da análise. Efetuar a análise das sulfonamidas de amostra de leite, em que a preparação das amostras incluiu uma extração líquido-líquido com clorofórmico e SPE. A detecção é realizada por fluorescência induzida e obtém índices de recuperação na ordem dos 88,3-103,2%.

4.6 MÉTODO MICROBIOLÓGICO MODIFICADO PARA O RASTREIO DE ANTIBIÓTICOS

Os resíduos de antibióticos no leite podem ser detectados por diferentes métodos: teste com base na inibição de crescimento microbiano, testes imunológicos, testes que usam receptores e enzimas e também alguns testes físico-químicos, como por exemplo, a TLC.

Estes testes são qualitativos, quantitativos e semi-quantitativos. O teste denominado “*Bacillus stearothermophilus calidolactis disc assay*” (BSDA) é um exemplo de teste microbiológico de rastreio usado diariamente na indústria para determinar resíduos de antibióticos no leite de vaca. Este teste tem por base a inibição de crescimento microbiano, em que uma amostra de leite é submetida ao contacto com um microrganismo sensível (*Bacillus stearothermophilus*) (GUEDES; MATOS; MOUNTINHO; SILVA; 2009, p. 232-243).

4.7 TESTE REDUTASE

O método de redutase, utilizando-se azul de metileno como indicador, para detectar, presuntivamente, resíduos de antibióticos no leite, a partir da sua descoloração devido o azul de metileno pode ser avaliado a qualidade do leite podendo ser classificado como leite de boa qualidade, qualidade satisfatória, ligeiramente contraminado, bastante contaminado e altamente contaminado.

4.8 TESTE DO HALO

Ágar Mueller Hinton é um meio de cultura, recomendado para a realização de antibiograma (teste de sensibilidade) pela técnica de difusão de discos, tendo como princípio de ação uma substancial fonte de proteínas e carboidratos que proporcionam o desenvolvimento e crescimento de cepas bacterianas de interesse clínico. Além disso, a baixa concentração de timina e timidina e níveis adequados de Cálcio e Magnésio, evitam falsos resultados de sensibilidade ou resistência.

A classificação deste teste é baseada em resposta *in vitro* de um organismo a um agente antimicrobiano nas concentrações séricas ou teciduais que este agente pode alcançar quando as doses habitualmente prescritas deste agente são utilizadas. Estes testes podem classificar em sensível, intermediário e resistente (COSTA; PAULO, 2003).

5. APLICAÇÃO NO ENSINO MÉDIO

O leite pode ser discutido com alunos do Ensino Médio nas três séries em escola pública.

Na primeira série pode ser utilizado experimentos com os conteúdos: substâncias, misturas e as funções inorgânicas; na segunda série solubilidade e soluções; e na terceira série trabalhar as funções orgânicas. Cada grupo baseando-se nas observações, levantando assim hipóteses do que estará ocorrendo e por que está ocorrendo, socializarem para o grande grupo as observações, os questionamentos e as prévias conclusões. Ao trabalhar a Química do leite em aula de química se constitui como um canal para o desenvolvimento de debate, questionamento, exposições de dúvidas que conduziram a busca das respostas de forma diferenciada e significativa e sobretudo a construção de conceitos químicos tais como, substâncias, misturas, solubilidade, soluto, solvente, grupo funcional, acidez, basicidade, polaridade (SILVA; OLIVEIRA; FILHO,2011)

A partir destes temas poderemos discutir com os alunos do Ensino Médio, os seguintes tópicos: características do leite, teor de nutrientes, proteínas, tipo de antibióticos, determinação de densidade, teor de gordura, rancidez e acidez e materiais estranhos ao leite para esconder seu "Batismo" com água, urina, amido, bicarbonato de sódio, funções orgânicas e inorgânicas, grupo funcional, solvente, soluto.

5.1 EXPERIÊNCIA PARA UTILIZAR NO ENSINO MÉDIO

Sugere-se a comparação de diferentes tipos de leite quanto à quantidade de proteínas.

Nessa experiência serão separadas a caseína e a albumina, as principais proteínas do leite. É importante que cada grupo trabalhe com um tipo de diferente de leite para

que os resultados da classe possam ser comparados. É importante também comparar leites de mesmo tipo mais de diferentes fabricante.

5.1.1 Material por grupo

200 ml de leite (podendo ser tipo A, B ou C)

10 ml de vinagre

2 pedaços de pano fino (20cm X 20cm aproximadamente)

2 béqueres de 250 ml

Sistema de aquecimento (tripé com tela refratária, bico de gás)

5.2 MÉTODO

Aquecer o leite em um dos béqueres até ficar bem morno. Retirar do fogo e acrescentar vinagre aos poucos, até que se forme grumos de um material branco. Esse material é uma das proteínas do leite: a Caseína. Coar a caseína utilizando um dos pedaços de pano, recolhendo o soro no outro béquer. Lavar o béquer que continua o leite para utilização na próxima etapa.

Aquecer o soro, deixando-o ferver. Após algum tempo de fervura, formam-se grumos que são constituídos por outra proteína do leite: a albumina. Tal como procedeu com a caseína, coar o material para reter a albumina no pano e recolher o soro em outro béquer, que já deverá estar limpo.

Os grupos devem comparar as quantidades de caseína e de albumina que obtiverão e registrar as observações anotando tipos e marcas de leite de acordo com a quantidade de cada proteína que contêm (LISBÔA, 1997, p.30-31).

6. MATERIAIS E MÉTODOS

Foi utilizado leite pasteurizado, cru e UHT, obtidos através do comércio e fazendas da cidade de Maracaí e Cruzália região de Assis- SP, no período de Abril a Junho de 2012.

Foram coletadas 2 marcas de leite pasteurizado comercializadas, 2 leite cru e 2 marcas de leite UHT.

Os leite foram refrigerados para posterior análise.

6.1 MATERIAIS

6.1.1 Material para o método de redutase

01 Béquer 25mL

01 Béquer 500mL

01 Espátula

01 Frasco Estéril 1 litro para Água Destilada Estéril.

01 Frasco Estéril 1 litro para Azul de Metileno

04 Frasco Estéril 1 litro para coletar o Leite Cru

01 Caixa Isopor 10 litros para coletar

01 Pacote de gelo

01 par de Luvas descartável

16 Tubo de ensaio estéreis 20 ml

01 Grade para tubos

04 Folha de papel alumínio "Today"

01 Pipeta Volumétrica de 10mL

04 Pipeta de Plástico 3mL

01 Proveta 100mL

Aparelhos:

Autoclave "PHOENIX" Equipamentos Científicos - Ind. Brasileira Araquara - SP - 220 Volts

Banho Maria TE-054 - Tecnal - 220 Volts

6.1.2 Material para o método do halo

01 Alça de Drigalski

06 Pipeta Volumétrica de 10mL

12 Espátula "Esterilizada"

08 Tubo de ensaio estéreis 20mL

75 placa de Petri

As cepas utilizadas foram: *staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*.

❖ Os meio de cultura utilizados foram:

- ABP = Baird Agar - *Staphylococcus aureus*,
- EMB = Levine – EMB = Agar ou Agar – EMB segun Levine - *Escherichia coli*
- Agar Mueller Hinton - *Staphylococcus aureus e Escherichia coli*.

❖ Os antibióticos testados foram:

- Gentamicina;
- Penicilina;
- Oxitetraciclina.

Foram utilizados 1mL de cada antibiótico em 10ml de leite.

Aparelhos:

Fluxo laminar TROX série 1341.

Estufa Fanem.

6.2 MÉTODOS

6.2.1 Coletas

Foram coletados leite cru, pasteurizado e UHT na cidade de Maracaí e leite cru, pasteurizado e UHT na cidade de Cruzália como mostra a figura 13.



Figura 13 – Coleta das amostras: a) Leite coletado na cidade de Maracaí; b) Leite coletado na cidade de Maracaí de uma vaca que teve mastite, podendo visualizar dois tetos menores; c) Leite coletado na cidade de Cruzália; d) Pote esterilizado utilizado na coleta do leite cru.

6.2.2 Método de Redutase

Foram utilizados tubos de ensaio estéreis com tampa de rosca para evitar a entrada de oxigênio e a contaminação externa. Aos tubos foram adicionados 10,0 mL de leite, e 1,0 mL da solução indicadora (5 mg de azul de metileno dissolvidos em 100

mL de água destilada estéril) e em seguida todos os tubos foram homogeneizado e incubados em banho-maria a 37°C. Foram feitas leituras em intervalos de 15 minutos inicialmente e, após 1 hora, de 30 em 30 minutos, até que no mínimo dois terços do leite no tubo apresentasse descoloração ou descoloração total (voltar a cor branca do leite).

6.2.2.1 Interpretação método redutase

- a) Leite de boa qualidade: quando a descoloração ocorre após 5 horas;
- b) Leite bom (qualidade satisfatória): quando a descoloração ocorre após 3 horas;
- d) Leite ligeiramente contaminado: quando a descoloração ocorre entre 1 a 3 horas;
- e) Leite bastante contaminado: quando a descoloração ocorre entre 1 a 2 horas
- f) Leite altamente contaminado (péssima qualidade): quando a descoloração ocorre em tempo inferior a 1 hora.

6.2.3 Método do Halo

6.2.3.1 Preparo do meio Agar Mueller Hinton

Misturou-se a peptona de caseína 17,5 g/L, peptona de carne 2,0 g/L, amido 1,5 g/L, ágar 17,0 g/L e água destilada q.s.p. Aqueceu-se com agitação frequente até a completa dissolução do meio. Ajustou-se o pH $7,3 \pm 0,1$ e autoclavou-se a 121°C por 15 minutos. Depois de resfriar até 45 a 50°C, agitou-se bem e distribuiu-se em placas.

6.2.3.2 Preparo ABP

Dissolveu-se 60g do meio em 1L de água purificada. Aqueceu-se com agitação frequente até a completa dissolução do meio. Autoclavou-se a 121°C por 15 minutos. Depois de resfriar até 45 a 50°C adicionou-se 10 ml de solução de terulito de potássio 1% estéril e 50% de emulsão estéril de gema de ovo. Agitou-se bem e distribuiu-se em placas.

6.2.3.3 Preparo EMB

Dissolveu-se 36g do meio em 1L de água desmineralizada por aquecimento em banho maria a 100°C ou em fluxo de vapor. Ajustou-se o pH 7 ± 2 a 25° C e autoclavou-se a 121°C por 15 minutos e distribuiu-se em placas.

6.2.3.4 Preparo do inóculo

Em um tubo de ensaio estéril, dispensou-se 5mL de caldo soja tripticaseína (TSB), e repicou-se, neste meio, 4 a 5 colônias puras da bactéria. Incubou-se durante 2-6 horas à temperatura ideal para crescimento da bactéria (usualmente entre 35 e 37°C). Tomou-se o cuidado para não utilizar culturas mistas em provas de difusão, pois os resultados obtidos tendem a ser errôneos.

6.2.3.5 Semeadura

A semeadura do inóculo foi realizada com superposição da camada de inóculo. Delicadamente, aplicou-se o inóculo sobre a superfície da placa de Ágar Mueller

Hinton, ABP e EMB, em várias direções, de forma a cobrir toda a placa. Aguardou-se 15 minutos, para total secagem do inóculo aplicado.

6.2.3.6 Aplicação dos discos

Aplicou-se os discos com auxílio de uma pinça flambada e fria. Após aplicar o disco sobre a placa, fez-se leve pressão sobre o mesmo, de forma a melhorar a sua aderência ao meio. Deve-se permitir que a distância entre os discos seja suficiente para se evitar a sobreposição dos halos de inibição. Incubou-se a placa em posição invertida, durante 40 horas, a 37°C.

6.2.3.7 Interpretação método halo

Os halos de inibição foram qualificados com o auxílio de um paquímetro ou régua milimetrada. A expressão dos tipos de halos são: sensível, intermediário e resistente.

Colônias, diferentes da colônia da cepa testada, que crescem no interior de halos são sugestivas de impureza no inóculo empregado ou de linhagens diferentes da mesma espécie. Determinados antibacterianos promovem a formação de halos duplos, nestes casos deve-se considerar apenas o halo interno, mais claro, e ignorar o halo mais externo e denso.

7. RESULTADOS E DISCUSSÃO

7.1 MÉTODO DE REDUTASE

A figura 14 mostra o resultado do método de redutase constatando a descoloração a partir de azul de metileno nas amostras de leite UHT, cru e pasteurizado podendo assim classificar os leites 1, 2, 4, 5 e 6 como leite de boa qualidade e o leite 3 como de qualidade satisfatória.



Figura 14 – Resultado do Método de Redutase

A tabela 5 mostra o tempo gasto para a descoloração em cada amostra de leite.

Leite UHT									
Amostra	Duplicata	Início	15 Min.	30 Min.	30 Min.	30 Min.	30 Min.	Horário	Conclusão
		14:00	15:00	16:00	17:00	18:00	19:00	Total	
1	1A	Verde Claro	Manteve	Reduziu	Reduziu	Reduziu	Reduziu	5:00	Leite de Boa Qualidade
UHT	1B	Verde Claro	Manteve	Reduziu	Reduziu	Reduziu	Reduziu	5:00	Leite de Boa Qualidade
2	2A	Verde Claro	Manteve	Reduziu	Reduziu	Reduziu	Reduziu	5:00	Leite de Boa Qualidade
UHT	2B	Verde Claro	Manteve	Reduziu	Reduziu	Reduziu	Reduziu	5:00	Leite de Boa Qualidade
Leite Crú									
Amostra	Duplicata	Início	15 Min.	30 Min.	30 Min.	30 Min.	30 Min.	Horário	Conclusão
		14:00	15:00	16:00	17:00	18:00	19:00	Total	
3	3A	Verde	Manteve	Reduziu	Reduziu	Reduziu	Branco	4:00	Leite bom (Qualidade Satisfatória)
Crú	3B	Verde	Manteve	Reduziu	Reduziu	Reduziu	Branco	4:00	Leite bom (Qualidade Satisfatória)
4	4A	Verde	Manteve	Reduziu	Reduziu	Manteve	Reduziu	5:00	Leite de Boa Qualidade
Crú	4B	Verde	Manteve	Reduziu	Reduziu	Manteve	Reduziu	5:00	Leite de Boa Qualidade
Leite Pausterizado									
Amostra	Duplicata	Início	15 Min.	30 Min.	30 Min.	30 Min.	30 Min.	Horário	Conclusão
		14:00	15:00	16:00	17:00	18:00	19:00	Total	
5	5A	Verde mais escuro	Manteve	Reduziu	Reduziu	Manteve	Reduziu	5:00	Leite de Boa Qualidade
Pausterizado	5B	Verde mais escuro	Manteve	Reduziu	Reduziu	Manteve	Reduziu	5:00	Leite de Boa Qualidade
6	6A	Verde mais escuro	Manteve	Reduziu	Reduziu	Manteve	Reduziu	5:00	Leite de Boa Qualidade
Pausterizado	6B	Verde mais escuro	Manteve	Reduziu	Reduziu	Manteve	Reduziu	5:00	Leite de Boa Qualidade

Tabela 5 – Resultado do método de redutase.

7.2 MÉTODO DO HALO

7.2.1 Meio EMB = Levine com cepa *Escherichia coli*.

Para verificar a qualidade do meio e dos discos de papel foram feitas placa de controle, as quais mostraram resultado negativo para o crescimento de microrganismos como mostra a figura 15.

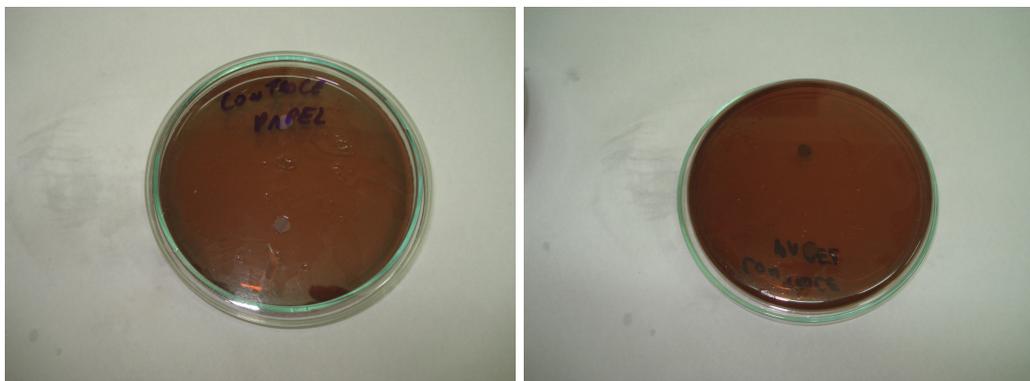


Figura 15 - controle de papel

Para verificar possíveis falso resultados podendo constatar antibióticos foram testados dois leite UHT, como mostra a figura 16.

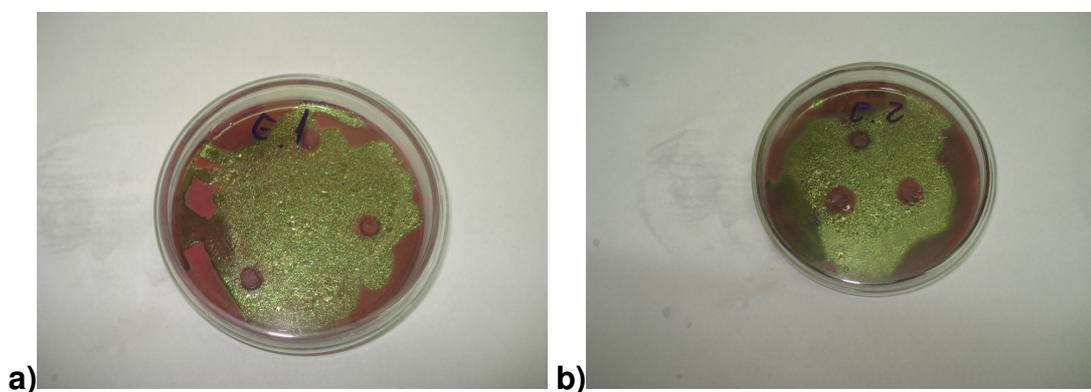


Figura 16 - Leite UHT 1 e 2 sem antibióticos: a) leite 1 sem antibiótico e b) leite 2 sem antibiótico.

O leite 2 (UHT) sem antibiótico apresentou um crescimento de halo o qual não era para ocorrer, constatando que o leite pode ter sido contaminado com antibiótico em alguma etapa do processo de coleta, transporte, pasteurização ou envase.

Para verificar a funcionalidade do método, foram utilizados os antibióticos gentamicina (A), penicilina (B) e oxitetraciclina (C), os quais são aplicados para tratamento de mastite (figuras 17, 18 e 19).

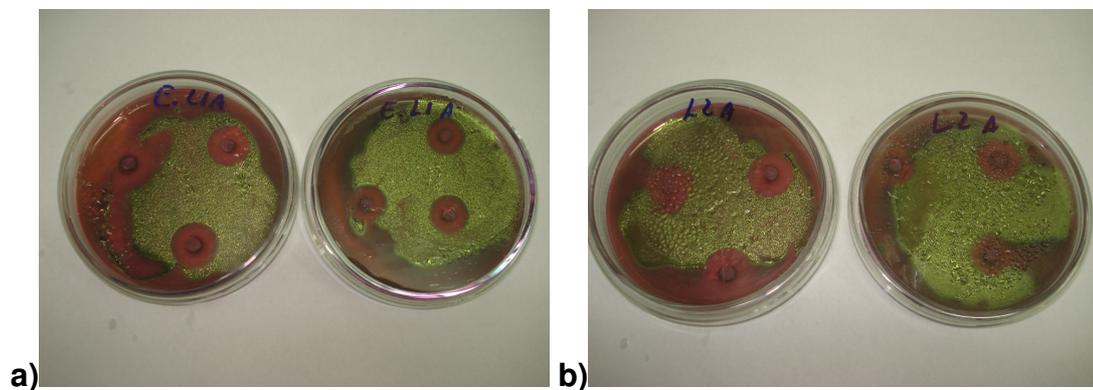


Figura 17 - Leite UHT 1A e 2A com Gentamicina: a) Leite 1 e b) Leite 2.

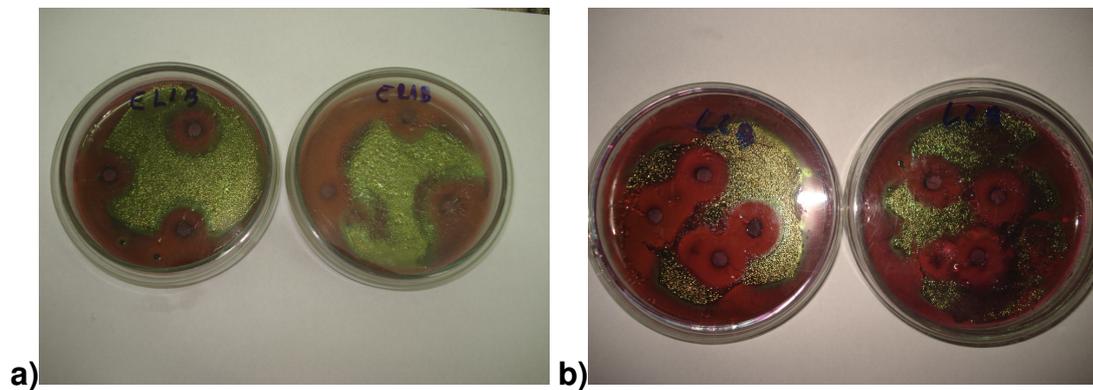


Figura 18 - Leite UHT 1B e 2B com Oxitetraciclina: a) Leite 1 e b) Leite 2.

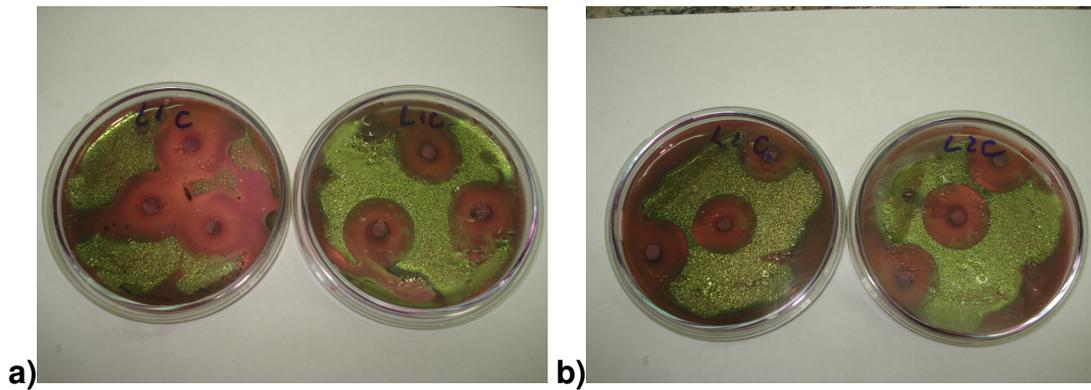


Figura 19 - Leite UHT 1C e 2C com Penicilina: a) Leite 1 e b) Leite 2.

A tabela 6 mostra os resultados obtidos utilizando o meio EMB com a cepa *Escherichia coli* utilizando os antibióticos gentamicina, penicilina e oxitetraciclina.

Meio EMB - <i>Escherichia coli</i>				
Amostra	Com antibiótico		Sem antibiótico	
	Halo (mm)		Halo mm)	
L1 - A	6	5,5	0	0
L1 - B	5,8	5,8		
L1 - C	10	10,7		
L2 - A	6,6	5,4	3,7	3,7
L2 - B	7,3	7,6		
L2 - C	10,1	10		

Tabela 6 - Meio EMB - Teste com leite UHT para validação do método

Nota se que o leite 1 (UHT) comercializado na região de Assis não apresentou halo indicando assim ausência de antibiótico ao contrário do leite 2 (UHT) comercializado na região de Assis que obteve resultado positivo indicando que nesse leite provavelmente há presença de antibiótico. Os leite 1 e 2 (UHT) acrescentados de antibióticos gentamicina (A), penicilina (B) e oxitetraciclina (C) apresentaram resultado positivo indicando que nesse leite há presença de antibióticos.

Os resultados referentes aos leites cru e pasteurizado utilizando o meio EMB estão indicados nas figuras 20 e 21.

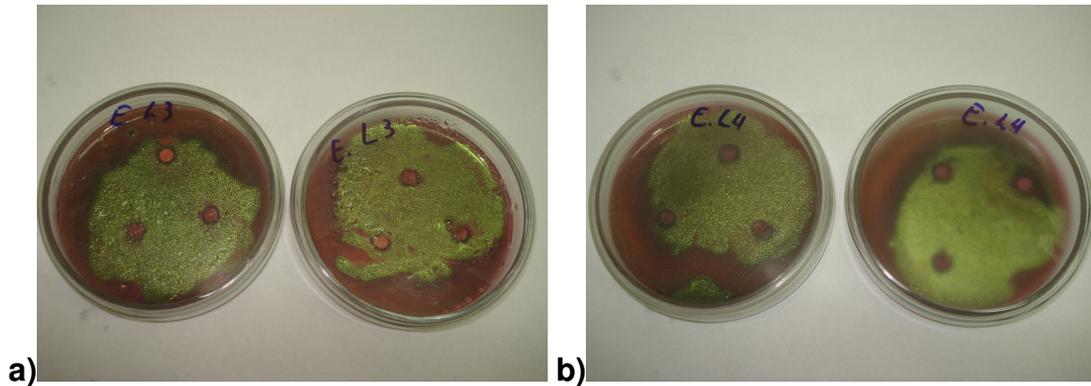


Figura 20 - Leite Cru 3 e 4 sem antibióticos: a) Leite 3 e b) Leite 4.

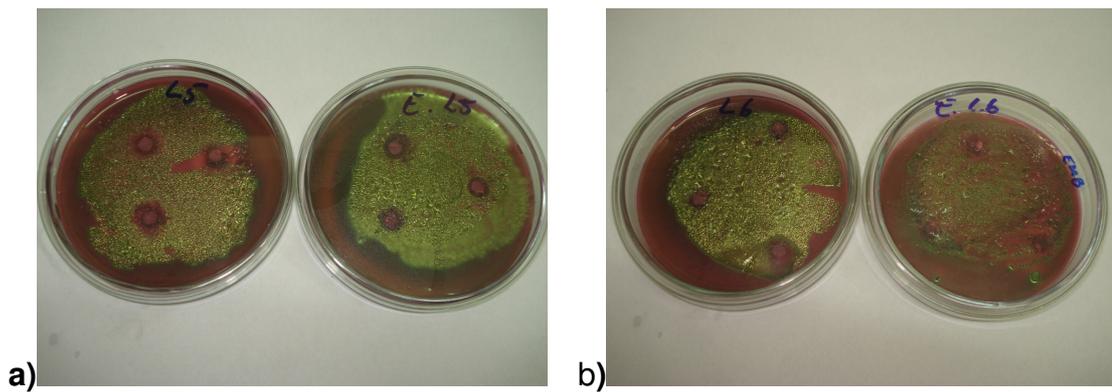


Figura 21 - Leite Pasteurizado 5 e 6 sem antibióticos: a) Leite 5 e b) Leite 6.

A tabela 7 mostra os resultados obtidos utilizando o meio EMB com a cepa *Escherichia coli* utilizando os leites cru e pasteurizado.

Meio EMB - <i>Escherichia coli</i>		
Amostra	Halo (mm)	
L3	0	0
L4	0	0
L5	0	0
L6	0	0

Tabela 7 - Meio EMB - Teste com leite cru e pasteurizado

Nota-se que os leites cru e pasteurizado coletados nas cidade de Cruzália e Maracaí não apresentaram halo indicando assim ausência de antibióticos.

7.2.2 Meio Agar Mueller Hinton com cepa *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*.

Para verificar a qualidade do meio e dos discos de papel foram feitos placa de controle, as quais mostraram resultado negativo para o crescimento de microrganismos como mostra a figura 22.

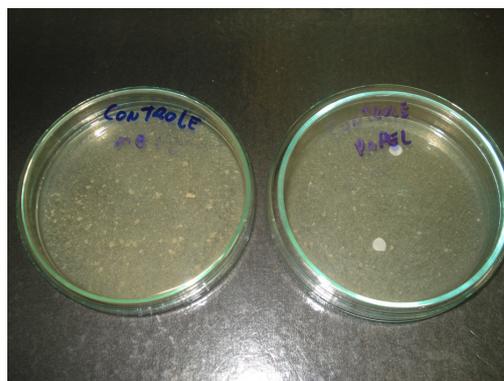


Figura 22 - controle de papel - para *Escherichia coli* (ESQUERDA) e *Staphylococcus aureus* (DIREITA).

Para verificar possíveis falso resultados podendo constatar antibióticos foram testados dois tipos de leite UHT, como mostra a figura 23.

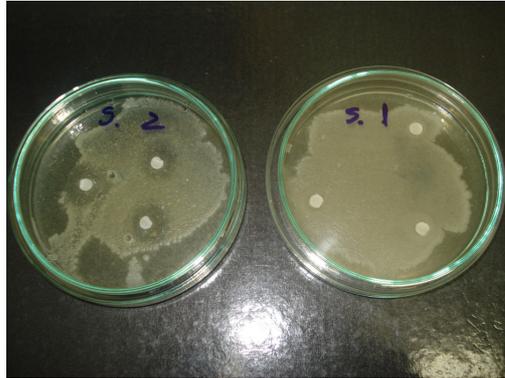


Figura 23 - Leite UHT 1 e 2 sem antibióticos: leite 1 e 2 *Staphylococcus aureus*.

O leite 2 (UHT) sem antibiótico com *Staphylococcus aureus* constatou um crescimento de halo o qual não era para ocorrer, constatando que o leite pode ter sido contaminado com antibiótico em alguma etapa do processo de coleta, transporte, pasteurização ou envase.

Para verificar a funcionalidade do método, foram utilizados os antibióticos gentamicina (A), penicilina (B) e oxitetraciclina (C), os quais são aplicados para tratamento de mastite (figuras 24, 25 e 26).

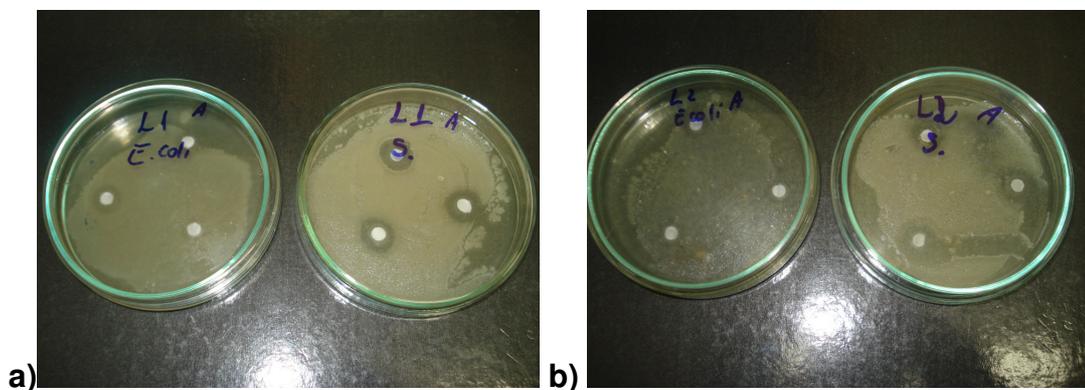


Figura 24 - Leite UHT 1A e 2A com Gentamicina: a) e b) Leite 1 e 2 *Escherichia coli* (ESQUERDA) e *Staphylococcus aureus* (DIREITA).

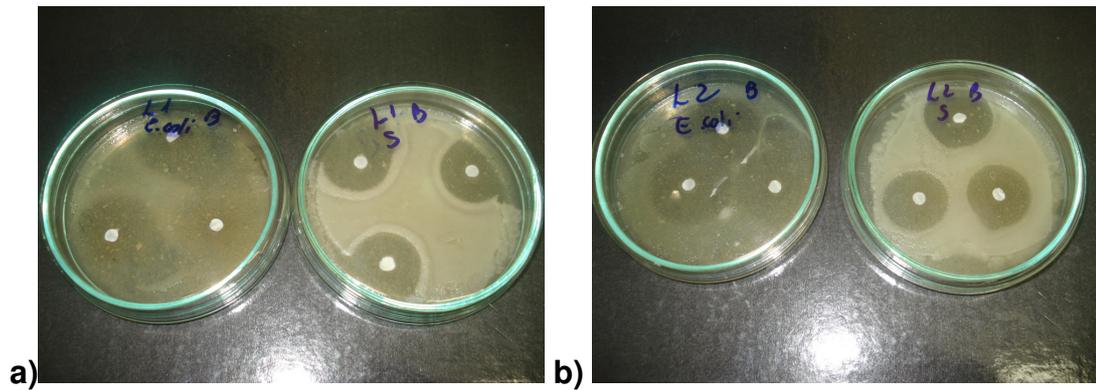


Figura 25 - Leite UHT 1B e 2B com Oxitetraciclina: a) e b) Leite 1 e 2 *Escherichia coli* (ESQUERDA) e *Staphylococcus aureus* (DIREITA).

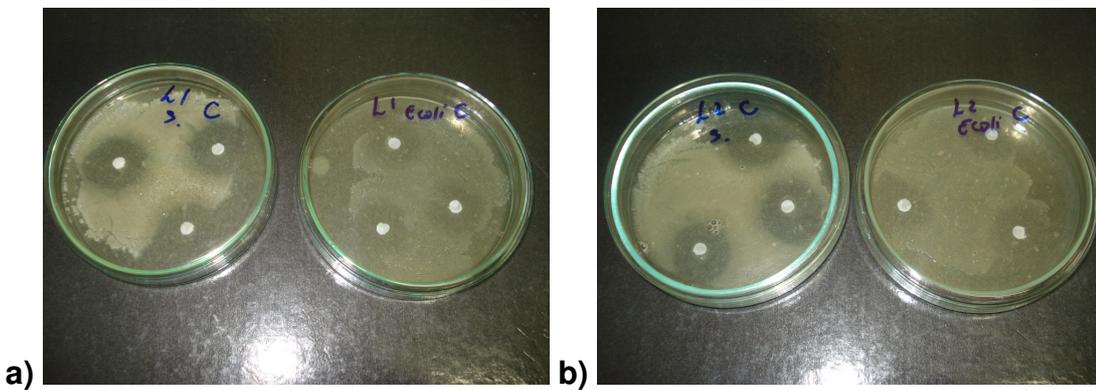


Figura 26 - Leite UHT 1C e 2C com Penicilina: a) e b) Leite 1 e 2 *Escherichia coli* (DIREITA) e *Staphylococcus aureus* (ESQUERDA).

A tabela 8 mostra os resultados obtidos utilizando o meio Agar Mueller Hilton com a cepa *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* utilizando os antibióticos gentamicina, penicilina e oxitetraciclina.

Meio Agar Mueller Hinton - <i>Staphylococcus aureus</i> e <i>Escherichia coli</i>		
Amostra	S. aureus Halo (mm)	E. coli Halo (mm)
L1	0	0
L1 - A	4,1	2,6
L1 - B	10	13,5
L1 - C	8,7	8,7
L2	3,4	3,4
L2 - A	4,5	2,8
L2 - B	10,4	12,2
L2 - C	8,1	8,3

Tabela 8 - Meio Agar Mueller Hilton - Teste com leite UHT para validação do método

Nota se que o leite 1 (UHT) comercializado na região de Assis não apresentou halo indicando assim ausência de antibiótico ao contrário do leite 2 (UHT) comercializado na região de Assis que obteve resultado positivo indicando que nesse leite provavelmente há presença de antibiótico. Os leite 1 e 2 (UHT) acrescentados de antibióticos gentamicina (A), penicilina (B) e oxitetraciclina (C) apresentaram resultado positivo indicando que nesse leite há presença de antibióticos.

Os resultados referentes aos leites cru e pasteurizado utilizando o meio Agar Mueller Hilton estão indicados nas figuras 27 e 28.

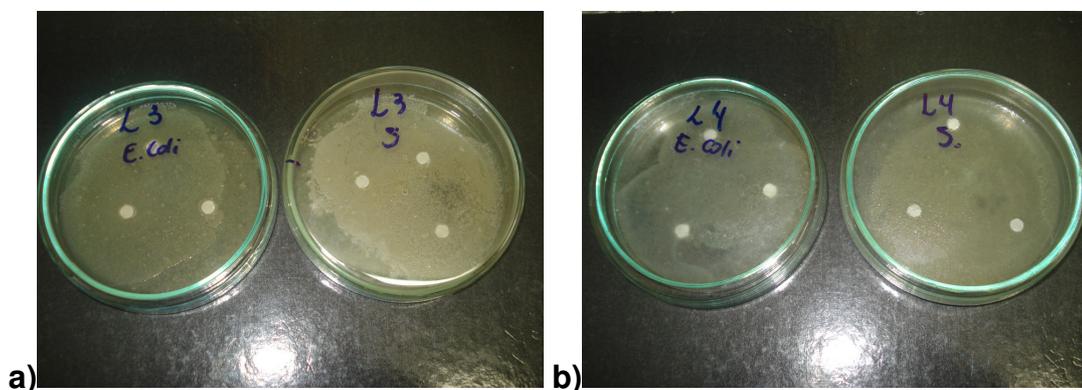


Figura 27 - Leite Cru 3 e 4 sem antibióticos: a) e b) Leite 3 e 4 *Escherichia coli* (ESQUERDA) e *Staphylococcus aureus* (DIREITA).

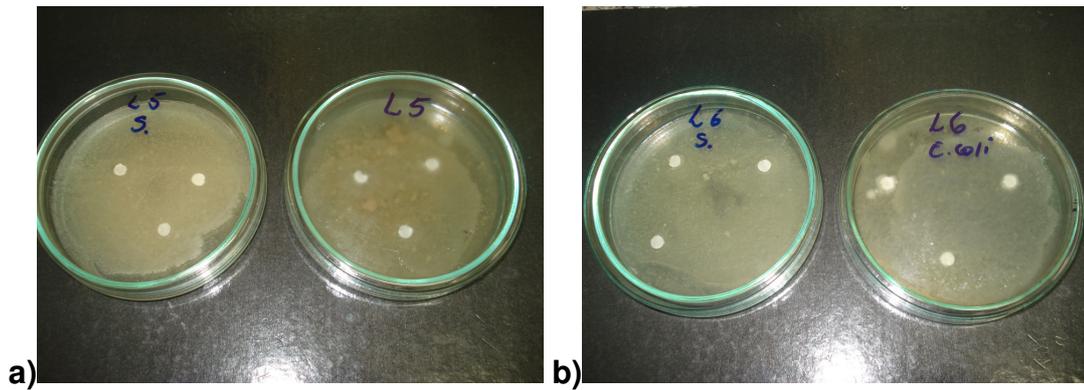


Figura 28 - Leite Pasteurizado 5 e 6 sem antibióticos: a) e b) Leite 5 e 6 *Escherichia coli* (DIREITA) e *Staphylococcus aureus* (ESQUERDA).

A tabela 9 mostra os resultados obtidos utilizando o meio Agar Mueller Hinton com a cepa *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* utilizando os leites cru e pasteurizado.

Meio Agar Mueller Hinton - <i>Staphylococcus aureus</i> e <i>Escherichia coli</i>		
Amostra	S. aureus Halo (mm)	E. coli Halo (mm)
L3	0	0
L4	0	0
L5	0	0
L6	0	0

Figura 9 - Meio Agar Mueller Hinton - Teste com leite cru e pasteurizado.

Nota-se que os leites cru e pasteurizado coletados nas cidade de Cruzália e Maracaí não apresentaram halo indicando assim ausência de antibióticos.

7.2.3 Meio ABP = Baird Agar com cepa *Staphylococcus aureus*.

Para verificar a qualidade do meio e dos discos de papel foram feitas placa de controle, as quais mostraram resultado negativo para o crescimento de microrganismos como mostra a figura 29.

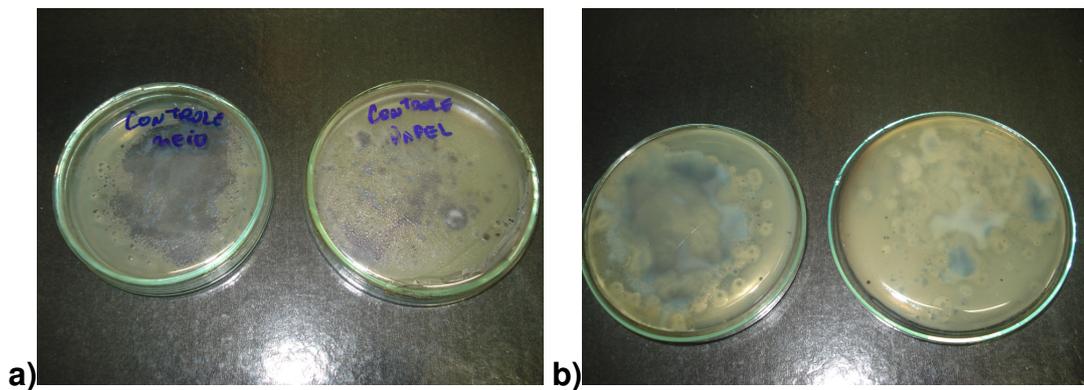


Figura 29 - controle de papel – a) e b) para *Staphylococcus aureus*.

Para verificar possíveis falso resultados podendo constatar antibióticos foram testados dois tipos de leite UHT, como mostra a figura 30.

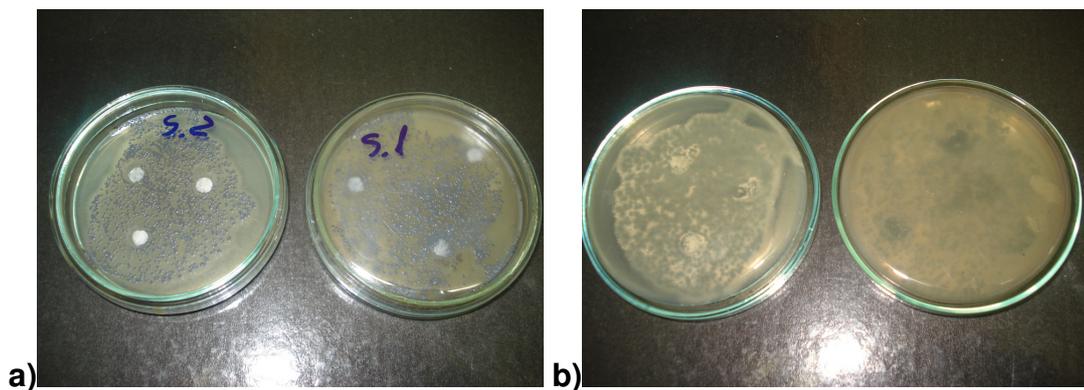


Figura 30 - Leite UHT 1 e 2 sem antibióticos: leite 1 e 2 *Staphylococcus aureus*.

O leite 2 (UHT) sem antibiótico com *Staphylococcus aureus* constatou um crescimento de halo o qual não era para ocorrer, constatando que o leite pode ter sido contaminado com antibiótico em alguma etapa do processo de coleta, transporte, pasteurização ou envase.

Para verificar a funcionalidade do método, foram utilizados os antibióticos gentamicina (A), penicilina (B) e oxitetraciclina (C), os quais são aplicados para tratamento de mastite (figuras 31, 32 e 33).

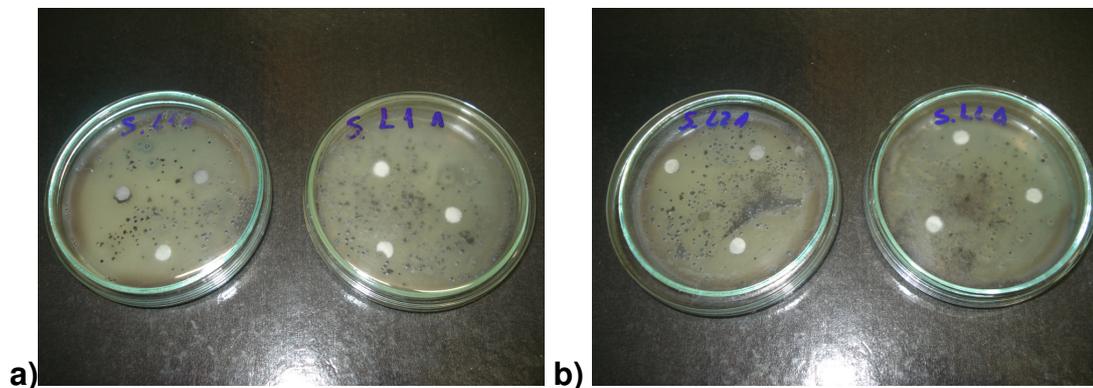


Figura 31 - Leite UHT 1A e 2A com Gentamicina: a) e b) Leite 1 e 2 *Staphylococcus aureus*.

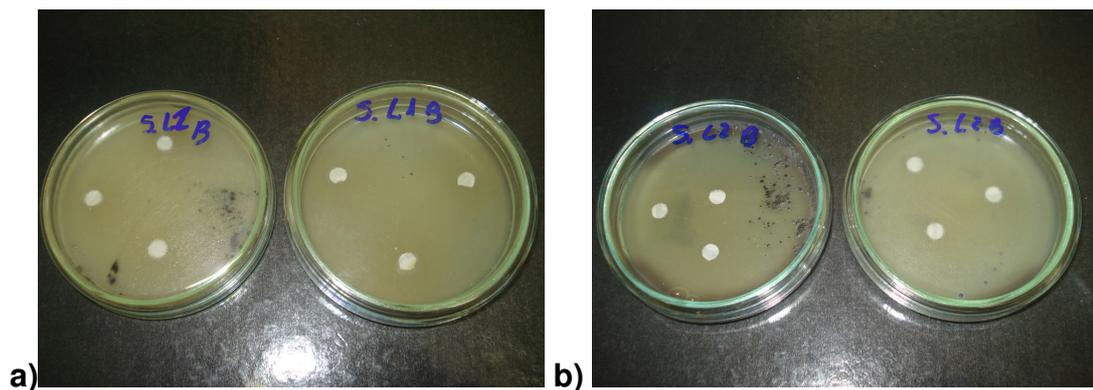


Figura 32 - Leite UHT 1B e 2B com Oxitetraciclina: a) e b) Leite 1 e 2 *Staphylococcus aureus*.

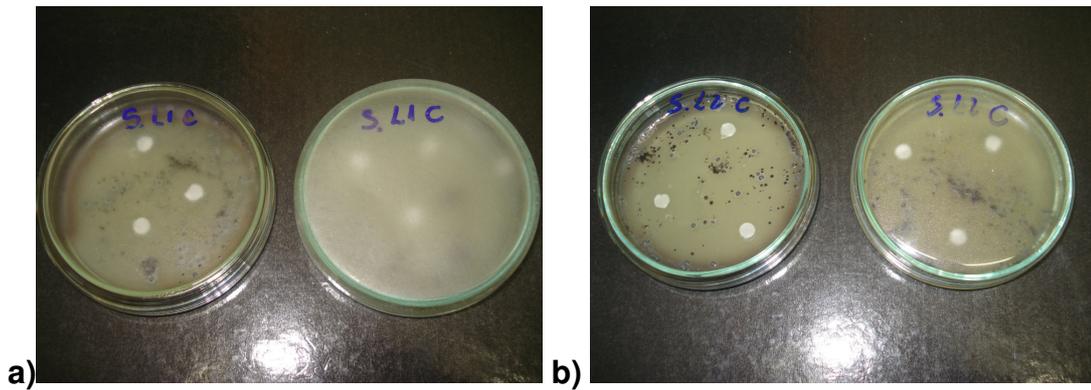


Figura 33 - Leite UHT 1C e 2C com Penicilina: a) e b) Leite 1 e 2 *Staphylococcus aureus*.

A tabela 10 mostra os resultados obtidos utilizando o meio ABP com a cepa *Staphylococcus aureus* utilizando os antibióticos gentamicina, penicilina e oxitetraciclina.

Meio ABP - <i>Staphylococcus aureus</i>				
Amostra	Com antibiótico		Sem antibiótico	
	Halo (mm)	Halo (mm)	Halo mm)	Halo mm)
L1 - A	1,9	1,8	0	0
L1 - B	9,4	13,1		
L1 - C	6,8	6,8		
L2 - A	3,4	1,8	1,8	1,8
L2 - B	7,4	9,8		
L2 - C	3,9	4,7		

Tabela 10 - Meio ABP - Teste com leite UHT para validação do método

Nota se que o leite 1 (UHT) comercializado na região de Assis não apresentou halo indicando assim ausência de antibiótico ao contrário do leite 2 (UHT) comercializado na região de Assis que obteve resultado positivo indicando que nesse leite provavelmente há presença de antibiótico. Os leite 1 e 2 (UHT) acrescentados de antibióticos gentamicina (A), penicilina (B) e oxitetraciclina (C) apresentaram resultado positivo indicando que nesse leite há presença de antibióticos.

Os resultados referentes aos leites cru e pasteurizado utilizando o meio Agar Mueller Hilton estão indicados nas figuras 34 e 35.

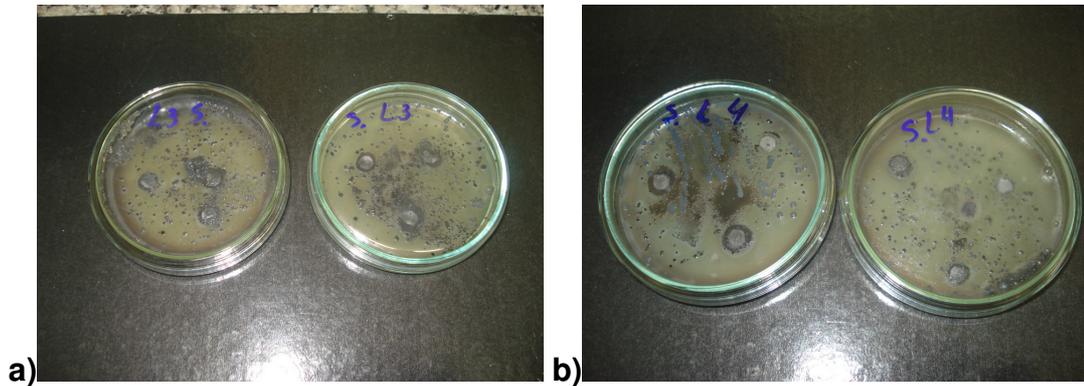


Figura 34 - Leite Cru 3 e 4 sem antibióticos: a) e b) Leite 3 e 4 *Staphylococcus aureus*.

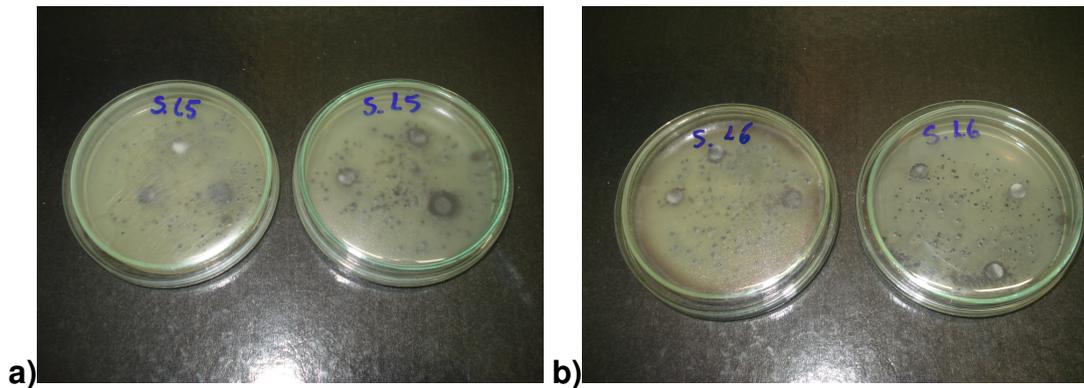


Figura 35 - Leite Cru 5 e 6 sem antibióticos: a) e b) Leite 5 e 6 *Staphylococcus aureus*.

A tabela 11 mostra os resultados obtidos utilizando o meio ABP com a cepa *Staphylococcus aureus* utilizando os leites cru e pasteurizado.

Meio ABP - <i>Staphylococcus aureus</i>		
Amostra	Halo (mm)	
L3	0	0
L4	0	0
L5	0	0
L6	0	0

Tabela 11 - Meio ABP - Teste com leite cru e pasteurizado

Nota-se que os leites cru e pasteurizado coletados nas cidade de Cruzália e Maracaí não apresentaram halo indicando assim ausência de antibióticos.

Todos os testes estão resumidos na tabela 12 que nos mostra os resultados obtidos de acordo com cada cepa (*Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*), meio (Agar Mueller Hilton, EMB e ABP) e leite (UHT, cru e pasteurizado) utilizados.

Microrganismos testados	<i>Staphylococcus aureus</i>		<i>Escherichia coli</i>	
	ABP = Baird Agar	Agar Mueller Hinton	Agar Mueller Hinton	EMB = Levine - EMB = Agar
Leite 1 UHT	-	-	-	-
Leite 1 A. Gentamicina µg/ml	+	+	+	++
Leite 1 B. Oxitetraciclina UI/ml	+++	++	+++	++
Leite 1 C. Penicilina µg/ml	++	++	++	+++
Leite 2 UHT	+	+	+	+
Leite 2 A. Gentamicina µg/ml	+	+	+	++
Leite 2 B. Oxitetraciclina UI/ml	++	+++	+++	++
Leite 2 C. Penicilina µg/ml	+	++	++	+++
Leite 3 Crú	-	-	-	-
Leite 4 Crú	-	-	-	-
Leite 5 Pateurizado	-	-	-	-
Leite 6 Pauterizado	-	-	-	-

+ halo presente < 05 mm; ++ halo presente entre 05 e 10mm; +++ halo presente > 10 mm.

Tabela 12 – Resultado dos meios Agar Mueller Hilton, ABP e EMB.

8. CONCLUSÃO

De acordo com as análises de redutase verificou-se que apenas a amostra 3 “leite cru” pode ser considerada de qualidade satisfatória as demais amostras 1, 2, 4, 5 e 6 foram consideradas leites de boa qualidade.

Os resultados positivos para os antibióticos mostram a sensibilidade do método para a detecção de antibióticos em leite.

De acordo com as análises do método do halo verificou-se que apenas a amostra Leite 2 UHT obteve resultado positivo indicando que nesse leite provavelmente há presença de antibióticos.

Os leites coletados na cidade de Maracá e Cruzália (região de Assis-SP) não apresentaram halo em nenhum dos testes realizados indicando que neles não há presença de antibióticos.

REFERÊNCIAS

ALVES, Daniela Rodrigues. **Industrialização e comercialização do leite de consumo no Brasil**. 2000, p.75-77.

ANDRESSA´S. Disponível em:
<<http://andressasquimicaces.blogspot.com.br/2010/06/zinco-o-metal-e-usado-na-galvanizacao-e.html>>. Acesso em: 28 julho 2012.

BOSQUIROLI, Silvana Lazaretti. Determinação de resíduos de antibióticos em leite. In: **Seção toxicologia / resíduos de drogas veterinárias**. Lacen PR, Curitiba, 2004, p.1-10.

BRANCHER, Carmem C. & FAGUNDES, Celso M. Adaptação do método da redutase para detectar antibióticos no leite. In: UFPEL/FAEM - Deptº Ciência e tecnologia agroindustrial,1998,Pelotas, Brasil. **Rev. Bras. de Agrociência**, volume 2, Maio, 1998. p.80-84.

BRITO, Maria Aparecida Vasconcelos Paiva; BRITO, José Renaldi Feitosa. **Qualidade do Leite**. 2000, p. 61-72.

CAMPOS, Elaine Pires de. **Qualidade Microbiológica, físico-química e pesquisa de resíduos de antibióticos e pesticidas no leite bovino e pelo sistema orgânico**. 2004. 58p. Dissertação (mestrado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual Paulista - UNESP, Campus de Botucatu, Botucatu, 2004.

COSTA, Elisabeth Oliveira da. **Qualidade do leite: Contagem de células somáticas e resíduos de antimicrobianos**. 2003. p.8.

COSTA, Sílvia Figueiredo. **Padronização dos Testes de Sensibilidade a Antimicrobianos por Disco-difusão**; Norma Aprovada—Oitava Edição, 2003.

DAMODARAN, Srinivasan; PARKIN, Kirk L.; FENNEMA, Ovven R. **Química de alimentos de fennema**. 4ª Edição, Editora Artmed LTDA, 2007, p 689-715.

DIETRICH, Jaime Marcos. Controle do resíduo de antibióticos no leite. In: **Qualidade - leite & derivados**. 2008, p.156-162.

FERREIRA, Luiz Henrique; RODRIGUES, HARTWIG, Dácio R., DERISSO, Cesar Roberto. Qualidade do leite e cola de caseína. **Química nova na escola - Experiências Lácteas**. 1997, p.32.

GUEDES, Cátia C.; MATOS, Carla M.; MOUNTINHO, Carla G.; SILVA, Carla Souza e. Avaliação da utilização da espectrofotometria de UV/ VIS na quantificação de antibióticos em extratos de leite de vaca. **Revista da Faculdade de Ciências da Saúde**. Porto: Edições Universidade Fernando Pessoa. ISSN 1646-0480. 2009, p.232-243.

LISBÔA, Júlio Cezar Foschini; BOSSOLANI, Monique Experiências Lácteas. **Química nova na escola**. 1997, p30-31.

MELDAU, Débora Carvalho. **Niacina**. Disponível em: <<http://www.infoescola.com/bioquimica/niacina/>>. Acesso em: 28 julho. 2012.

NASCIMENTO, Gislene Garcia Franco; MAESTRO, Vanessa; CAMPOS, Mara Sílvia Pires de. **Ocorrência de resíduos de antibióticos no leite comercializado em Piracicaba**, SP, 2001, Campinas, São Paulo, Brasil, p.119-129.

NERO, Luís Augusto; MATTOS, Marcos Rodrigues de; BERLOTI, Vanerli; BARROS, Márcia Aguiar Ferreira; FRANCO, Bernadette Dora Gombossy de Melo. Resíduos de antibióticos em leite cru de quatro regiões leiteiras no Brasil. **Ciência tecnologia alimentos**, abril - junho, 2007, p. 391-393.

OLIVEIRA, Carlos Augusto Fernandes; FAGUNDES Helena. Infecções intramamárias causadas por *Staphylococcus aureus* e suas implicações em saúde pública. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.34, n4, julho – agosto, 2004, p. 1315-1320.

OLIVEIRA, Carla Inácio de. **Você vai gostar de química e de física**. Disponível em: <<http://profcarlaquimica.blogspot.com.br/2010/07/fosforo-branco-vermelho-e-preto-o.html>>. Acesso em: 28 julho. 2012.

RIBEIRO, Cássio. **O ferro: da mina ao alto-forno**. Disponível em: <<http://orebate-cassioribeiro.blogspot.com.br/2008/07/o-ao-da-mina-ao-alto-forno.html>>. Acesso em: 28 julho. 2012.

RODRIGUES, Ana Carolina de Oliveira. **Identificação bacteriana a campo da mastite bovina para orientar protocolos de tratamento**. 2008. 95p. Tese (Doutorado) - Universidade de São Paulo - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Piracicaba, 2008.

SCHORR, Padre Beno J. **Cloreto de Magnésio P.A**. Disponível em: <<http://www.jornaldasaude.com.br/cloreto-de-magnesio-pa.htm>>. Acesso em: 28 julho. 2012.

SILVA, Edilma E.; OLIVEIRA, José Wescle B.; SILVA, Mônica A.; FILHO, João R. de Freitas. **A Química do leite - Uma proposta para o ensino de química**. 34^o Reunião anual da sociedade brasileira de química, 2011, Recife, Pernambuco.

SILVA, M.V.M.; SARMENTO, A.M.C.; FRANCA, A.P. **Resíduos de antibióticos no leite e seus efeitos na saúde pública: Uma preocupação constante**. 2008, p.1-5.

Disponível em: <http://www.sovergs.com.br/conbravet2008/anais/cd/resumos/R0568-1.pdf>. Acessado em: 05 abril. 2012.

SILVA, Paulo Henrique Fonseca da. Aspecto de composição e propriedades. **Química nova na escola** - Leite. 1997, p.3-5.

SOUZA, Viviane de. **Características físico-químicas, Microbiológicas, celulares e detecção de resíduos de antibióticos em amostra de leite de tanque comunitário**. 2006. 57p. Trabalho de Conclusão de Curso - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, São Paulo, Jaboticabal, 2006.

VENTURINI, Katiani Silva; SARCINELLI, Miryelle Freire; SILVA, Luís César da. **Característica do leite**. 2007. Universidade Federal do Espírito Santo - UFES - Programa Institucional de Extensão, Espírito Santo, 2007, p.1-4.

VILELA, Duarte. A importância econômica, social e nutricional do leite. 2002. 1-2P. **Revista Batavo** nº111, 2002.

Vitamina B12. **Metilcobalamina no Autismo**. Disponível em: <<http://nutricao.inf.br/tag/vitamina-b12/>>. Acesso em: 28 julho. 2012.

Vitaminado: saiba mais sobre a vitamina A. Disponível em: <<http://www.entrenalinea.com.br/vitaminado-letra-a/>>. Acesso em: 28 julho. 2012.

Vitaminado: saiba mais sobre a vitamina C. Disponível em: <<http://www.entrenalinea.com.br/vitaminado-saiba-mais-sobre-a-vitamina-c/>>. Acesso em: 28 julho. 2012.

WATTIAUX, Michel A. **Composição do leite e seu valor nutricional**. Instituto Babcock para pesquisa e desenvolvimento da pecuária leiteira internacional. University of wisconsin-madison. p.73-76.

WATTIAUX, Michel A. **Secreção do leite no úbere da vaca de leite**. Instituto Babcock para pesquisa e desenvolvimento da pecuária leiteira internacional. University of wisconsin-madison. p.77-80.

ZACARCHENCO, Patrícia Blumer. **Legislação e embalagem para leite**. Ital – Tecnolat. 2008, p. 13-14.

ZOCCAL, R. **Pesquisa trimestral do leite**. Disponível em: <<http://www.cnpqi.embrapa.br/nova/informacoes/estatisticas/producao/tabela0231.php>>. Acesso em: 29 julho. 2012.