

# ADAPTAÇÃO DO MÉTODO DA REDUTASE PARA DETECTAR ANTIBIÓTICOS NO LEITE

BRANCHER, Carmem C. & FAGUNDES, Celso M.

UFPEL/FAEM - Dept<sup>o</sup> Ciência e Tecnologia Agroindustrial - Campus Universitário -  
Cx Postal, 354 - CEP 96010-900 - Telefone (0532) 75 72 58 - Pelotas/RS - Brasil

## RESUMO

Visou-se adaptar o método de redutase, utilizando-se azul de metileno como indicador, para detectar, presuntivamente, resíduos de antibióticos no leite. Para testar o método foram utilizadas amostras de leite normal tratadas com gentamicina, oxitetraciclina e penicilina em níveis que variaram de 1 a 80µg/ml para os primeiros e 0,001 a 0,008UI/ml para o último e amostras provenientes de vacas mamíticas, inoculadas com antibióticos, por via intramamária, de acordo com a prescrição do Médico Veterinário de cada propriedade. Na metodologia utilizada, a amostra em teste foi aquecida a 85-95°C por 10 minutos e resfriada até 37°C, seguindo-se adicionada de 2% fermento láctico (*Streptococcus thermophilus*) e de 1% azul de metileno. O tempo para completa descoloração do azul de metileno constituiu-se em parâmetro para avaliar a atividade do *Streptococcus thermophilus*. Verificou-se que as amostras de leite adicionadas de gentamicina e oxitetraciclina a partir de 10µg/ml e amostras de leite adicionadas de mais de 0,01UI/ml de penicilina, quando submetidas ao método em teste demandaram intervalos de tempo significativamente maiores do que os observados para testemunha. Concluiu-se que o método adaptado é sensível para os antibióticos testados e pode ser utilizado na pesquisa presuntiva dos mesmos.

Palavras-chave: Tecnologia Agroindustrial, Antibióticos, Leite, Detecção de Antibióticos

## ABSTRACT

REDUTASE METHOD ADAPTATION FOR DETECT ANTIBIOTICS IN THE MILK. This search to adapt the method of redutase (methylene), for detect residues of antibiotics in the milk at level of laboratory and in mamitics animals. Utilized "in vitro" gentamicyn, oxytetracycline and penicillin in levels that varied of 1 at 80µg/ml and penicillin 0.001 at 0.008 UI/ml. The mamitics cows, were inoculated with the same antibiotics by intramammary way obeying veterinary doctor prescription of each propriety. In the methodology of the redutase test to add culture lactic 2% (*Streptococcus thermophilus*) that would be the witness, the others samples were adds of varied concentrations

of antibiotic already quotids. The mamitics cows milk, treateds with this activies beginnings, fallowed the technique abone quoted, being that all the samples "in vitro" or experiment on field were warned at 85°C - 95°C for 10 minutes, before of the normal process of the redutase method. Verified that the adapted test, detect residues in the milk of gentamicyn and oxytetracycline 10µg/ml and penicillin 0,01 UI/ml. The time of reduction of the samples of milk addies of gentamicyn oscillated of 115 at 130 minutes, the oxytetracycline varied of 120 at 140 minutes, and for penicillin the time was of 100 at 130 minutes.

Key words: Agroindustrial Technology, Milk, Antibiotic, Antibiotic Detect.

## INTRODUÇÃO

A antibioteoterapia massiva provoca a presença intensa de resíduos de antibióticos no leite, acarretando sérias dificuldades especialmente tecnológicas. Dai a preocupação de pesquisar novas técnicas para identificar estes resíduos no leite, para que a indústria laticinista possa rapidamente, classificar ou selecionar, e assim dispor de matéria prima isenta de inibidores resultando num produto final de qualidade.

A mamite, enfermidade do rebanho leiteiro acarreta maiores problemas, uma vez que a aplicação de antibióticos, aumenta a eliminação de resíduos no leite. A presença destes anti-bacterianos no leite, variam em função de fatores, como concentração, estágio de lactação volume de leite produzido, intensidade de infecção, dose administrada, excipiente e via de aplicação (FAGUNDES, 1980; MARTH & ELLICKSON, 1959). Os antibióticos utilizados no tratamento das mamites podem aparecer no leite até 144 horas (FAGUNDES, 1980) após sua aplicação dependendo dos intereferentes acima citados. Os resíduos de antimicrobianos, são resistentes à pasteurização (TRAMER 1964) e a penicilina no leite só é destruído totalmente a 100°C após 3 horas (PILET et al.). A termoresistência destas drogas, traz transtornos tecnológicos à indústria laticinista especialmente no processamento do iogurte, queijos e manteiga (MOLL, 1976; VILELA, 1984; EECKOUT, 1978).

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 (FAGUNDES, 1997).

O objetivo desta pesquisa foi adaptar o método de redutase para detectar antibióticos no leite, além de ser um método de baixo custo, rápida identificação, fácil manuseio e seja acessível aos laticínios de médio e pequeno porte.

## MATERIAL E MÉTODOS

Foi utilizado leite "in natura" obtido através de ordenha mecânica, de vacas sadias e mamíticas, no período de agosto a novembro de 1996.

O leite, das vacas mamíticas tratadas com os mesmos antibióticos, utilizados na fase "in vitro", foi coletado em propriedades que abrange vários municípios da zona sul do Rio Grande do Sul com produção superior a 200 l/dia, perfazendo ao todo, 23 propriedades de exploração leiteira, sendo 13 criação de holandes e 10 criação da raça jersey. Foram efetuadas coletas de 130 vacas com mamite clínica ao CMT (Califórnia Mastitis test). Animais em condições de manejo sanitário diversificado e diferentes estágios da lactação, gestação, idade, condições nutricionais e produtividade.

O leite foi submetido a temperatura de (85 a 90°C/10min.) após, resfriado a 37°C e posteriormente separado em diversas alíquotas de 10ml, contendo 1ml de azul de metileno, (0,02%) e 2% de cultura lática sensível (*Streptococcus thermophilus*), constituindo a amostra testemunha.

A seguir adicionou-se os antibióticos selecionados. Destes princípios ativos fez-se as seguintes diluições para cada amostra: gentamicina µg/ml 8, 1, 10, 20, 40, 80; penicilina UI/ml 0,001, 0,03, 0,04, 0,05, 0,08; oxitetraciclina µg/ml 5, 1, 10, 20, 30 e 40.

Após inoculação as amostras foram homogeneizadas e colocadas em banho-maria (37°C). A seguir procedia-se conforme a metodologia do teste de redutase (DEMETER & ELBERTZHAGEN, 1971)

A leitura foi efetuada no momento da viragem da testemunha e, a partir deste momento acompanhava-se o tempo de redução das demais diluições, verificando a

interferência do antibiótico no tempo de descoloração. Após detectou-se a eficiência do método de adaptação do teste de redutase em leite coletado de vacas mamíticas positivas ao CMT (Califórnia Mastitis Test) e tratadas com os mesmos princípios ativos testados em laboratório, via intramamária. As dosagens utilizadas de gentamicina, oxitetraciclina e penicilina, foram usadas conforme prescrição do médico veterinário responsável. Salienta-se que antes de efetuar a dinâmica do método (redutase) as amostras de leite mamítico foram submetidas ao aquecimento (85°C a 90°C/10min.), visando inibir os mais variados interferentes.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para verificar a eficiência do método testado, determinou-se o tempo médio de redução da testemunha que foi de 105 minutos.

Na Tabela 1, observou-se que a gentamicina, nas concentrações de 10 a 80µg/ml, teve tempo médio de redução de 130 a 140 minutos, enquanto os níveis de 1 a 8µg/ml, acompanharam a redução da testemunha.

**TABELA 1** - Tempo de redução do azul de metileno no leite com diferentes concentrações de gentamicina\*

GENTAMICINA (µg / ml)	REDUÇÃO (minutos)
Testemunha	105
1	105
8	105
10	130
20	130
40	140
80	140

\* 50 repetições

Pela Tabela acima fica evidenciado que o método em estudo detecta resíduos de gentamicina no leite a partir de 10µg/ml.

O método é menos sensível que o Antimicrobial Diffusion Method (ADM) que detecta 0,15µg/ml de gentamicina presente no leite.

A Tabela 2, demonstra que a oxitetraciclina nos níveis de 10 a 40µg/ml, apresentaram tempo médio de redução de 120 a 130 minutos. Níveis menores do que 5µg/ml reduziram junto com a testemunha.

**TABELA 2** - Tempo de redução do azul de metileno no leite com diferentes concentrações de oxitetraciclina\*

OXITETRACICLINA ( $\mu\text{g} / \text{ml}$ )	REDUÇÃO (minutos)
Testemunha	105
1	105
5	105
10	120
20	120
30	125
40	130

\* 50 repetições

O método foi capaz de detectar resíduos de oxitetraciclina no leite em níveis superiores a  $10\mu\text{g}/\text{ml}$ , semelhante aos resultados encontrados pela gentamicina.

O método mostrou menor sensibilidade que os métodos conhecidos para detecção de antibióticos, em relação a oxitetraciclina, pois o método de disco com *Bacillus subtilis* detecta  $> 1,5\mu\text{g}/\text{ml}$ , o Delvotest P 0,3 -  $0,15\mu\text{g}/\text{ml}$ , Método Cloreto 2, 3, 5 Trifenil Tetrazólio (TTC) de 0,2 a  $1,0\mu\text{g}/\text{ml}$ ; o método de acidificação do iogurte de 0,2 a  $0,5\mu\text{g}/\text{ml}$  e o Antimicrobial Diffusion Method (ADM) de 0,15 a  $0,50\mu\text{g}/\text{ml}$ , demonstrando serem mais sensível para a oxitetraciclina.

Na Tabela 3, pode-se verificar que a penicilina em doses que variaram de 0,01 a 0,08 UI/ml reduziram num tempo que oscilou de 110 a 115 minutos, ao passo que níveis menores que 0,001UI/ml levaram o mesmo tempo que a testemunha.

**TABELA 3** - Tempo de redução do azul de metileno no leite com diferentes concentrações de penicilina\*

PENICILINA (UI/ml)	REDUÇÃO (minutos)
Testemunha	105
0,001	105
0,01	110
0,03	110
0,04	110
0,05	110
0,08	115

\* 50 repetições

A Tabela 3, revela que o método, pode diagnosticar a presença de resíduos de penicilina no leite em doses acima de 0,01UI/ml sendo mais sensível a esta droga.

Dos testes existentes para detecção de antibióticos, em especial para penicilina, o método em

estudo mostrou resultados semelhantes ao método Cloreto 2, 3, 5 Trifenil Tetrazólio (TTC) que detecta de 0,01 a 0,02 UI/ml e ao de disco com *Bacillus subtilis* de 0,03 a 0,05 UI/ml. Os demais métodos apresentam maior sensibilidade para penicilina sendo o Delvotest P de 0,003 a 0,006UI/ml, o teste de acidificação do iogurte de 0,005 a 0,01 UI/ml e o Antimicrobial Diffusion Method (ADM) de 0,002 a 0,004UI/ml.

A Tabela 4, demonstra a eliminação pelo leite de resíduos de gentamicina, procedente de vacas mamílicas, evidenciando a interferência no tempo de alteração da cor do azul de metileno

**TABELA 4** - Tempo de redução do azul de metileno, em leite de vacas mamílicas, tratadas com gentamicina\*, via intramamária

PERÍODO PÓS- APLICAÇÃO (horas)	REDUÇÃO (minutos)
Testemunha	105
24	130
48	130
72	120
96	120
120	115
144	105

\* 30 repetições

Pela Tabela 4 pode-se presumir a eficiência do método, detectando resíduos da droga no leite até 120 horas, tendo o período de redução do corante oscilado de 130 a 115 minutos. A variação do tempo de redução está relacionado com a dose, número de quartos tratados, produtividade e grau de infecção da glândula mamária. A tabela evidencia que a partir de 120 horas a descoloração ocorreu junto com a testemunha.

A Tabela 5, expressa resultados da eliminação pelo leite de resíduos de oxitetraciclina, oriunda de animais mamílicos e sua influência no período de redução (azul de metileno).

A mesma Tabela 5, deixa transparecer, que o teste de redutase adaptado, detecta resíduos de oxitetraciclina no leite da mesma forma que a gentamicina, detectando resíduos até 120 horas num tempo de redução que oscilou de 140 a 120 minutos. A partir de 120 horas houve redução junto com a testemunha, semelhante aos encontrados "in vitro". Estes dados estão em discordância, ao período de eliminação da pesquisa de FINCHER, M. G. *et al*; (1962), onde em vacas mamílicas (via intramamária) o mesmo antibiótico foi eliminado até 180 horas. OVERBY (1952) detectou resíduos de oxitetraciclina até 96 horas, aplicados pela mesma via. KATZ *et al* (1973), observaram a eliminação deste antibiótico pela mesma

via até 130 horas. Atribui-se essa diferença de tempo a concentração, grau de infecção, excipiente, número de quartos tratados e sensibilidade do método.

**TABELA 5** - Tempo de redução do azul de metileno, em leite de vacas mamáticas tratadas com oxitetraciclina, via intramamária\*

PERÍODO PÓS APLICAÇÃO (horas)	REDUÇÃO (minutos)
Testemunha	105
24	140
48	130
72	130
96	130
120	120
144	105

\* 40 repetições

Na Tabela 6, verificou-se a eficácia do método em vacas mamáticas, via intramamária com penicilina e sua influência no tempo de redução.

**TABELA 6** - Tempo de redução do azul de metileno, em leite de vacas mamáticas tratadas com penicilina\*, via intramamária.

PERÍODO PÓS- APLICAÇÃO (horas)	REDUÇÃO (minutos)
Testemunha	105
24	130
48	130
72	130
96	130
120	110
144	110
168	110
192	105

\* 50 repetições

A tabela 6 demonstra, que o teste tem maior especificidade à penicilina em relação aos outros dois antibióticos testados, diagnosticando resíduos até 7 dias (168 horas). O método detectou resíduos no leite até 168 horas, resultado idêntico ao obtido por BRODIE *et al.* (1962), onde aplicou a mesma droga pela mesma via, persistindo no leite pelo mesmo tempo. Os pesquisadores EBERHART *et al.* (1963), FINCHER, M. G. *et al.* (1962) observando o tempo de eliminação da penicilina em vacas mamáticas via intramamária detectaram resíduos no leite pelo período de 180-240 horas. Os resultados obtidos por BLOBEL & BURCH (1960), KATZ *et al.* (1973) e SIDDIQUE, I. H.; LOREN, K. L.; HOKI, H. H. (1965) apresentaram um período de

eliminação após aplicação intramamária em animais com mastite de 84-144 horas.

#### CONCLUSÕES

O tempo de redução do azul de metileno no leite com gentamicina, penicilina e oxitetraciclina, permitem concluir que o método adaptado de redutase é:

Sensível aos três antibióticos testados; e

Maior sensibilidade e especificidade à penicilina.

#### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BLOBEL, H. & BURCH, C. W. **Oxytetracycline concentration in blood serum and milk secretion of cows following intravenous or intramammary treatment.** J. Am. Vet. Med. Assoc., Schaumburg, 137 (2); 701-4, 1960.
- BRODIE, B. O.; ALBRIGHT, J. L.; ORMISTON, E. E.; WITTER L.D. **Penicillin in milk after intramammary injection.** J. Am. Vet. Med. Assoc., 140(2):1293-94, 1962.
- BUSWELL, J. F.; KNIGHT, C. H.; BARBER, D. M. L. **Antibiotic persistence and tolerance in the lactating goat following intramammary therapy.** Veterinary Record, 125:301-3, 1989.
- DEMETER, J. K. & ELBERTZHAGEN, H. **Elementos de microbiologia lactológica.** 6 ed., Zargoza, Editorial Acríbia, 1971. 150 p.
- DROUILLOT, I. **Les résidus d'antibiotiques dans les danrées d'origine animals.** le lait, (523/524):194-5, 1973.
- EBERHART, R. J.; HOKANSON, J. F.; BURGH, G. E.; WATROUS, G. H. **Persistence of antibacterial agents in milk after intramammary treatment of clinical mastitis.** J. Am. Vet. Med. Assoc., Schaumburg, 143(4):390-95. 1963.
- ECKOUT, R. G. **Antibiotique et alimentation humaine.** Revue Med. Vet., 717-40, 1978.
- FAGUNDES, C. M. **Persistência de antibióticos no leite bovino em condições experimentais e prevalência no leite tipo B e C consumido em Belo Horizonte, 1978.** Belo Horizonte, Universidade Federal de Minas Gerais, 1980. 49 p. (Tese, M.Sc).
- FAGUNDES, C. M. **Estudo da prevalência de resíduos de antibióticos no leite produzido na bacia leiteira de Pelotas.** In: Trabalhos publicados: resumos. Pelotas, PRPPG, 1983. V. 2. p. 88-9.
- FAGUNDES, C. M. **Inibidores e controle de qualidade do leite.** Pelotas: Editora UFPEL, 1997. 128 p.
- FARRELY, B. T. **A survey of the incidence of antibiotics contamination of milk in the Dublin liquid milk area.** Ir. Vet. J., Dublin, 26(3):41-7, 1970.
- FINCHER, M. G.; KOSIKOWSKI, F. V.; GUTHRIE, R. S.; HODGES, H. G.; JOHSON, H. G. **Relative importance of persistence transfer and milking technique to antibiotic residue contamination of**

- milk.** J. Am. Vet. Med. Assoc., Schaumburg, 141(2):223-8, 1962.
- KATZ, S. E. ; FASSBENDERT, C. A.; HACKETT, A. J.; MITCHELL, R. G. **Oxytetraciline residue in milk following intramammary infusion.** J. Assoc. Off. Anat. Chem. Washington, **56**(3):706-12, 1973.
- MARTH, E. H. & ELLICKSON, B. E. **Antibiotic residues in milk products - A review.** J. Milk Food Technol., Ames. 22(7):241-9, 1959.
- MOLL, H. **Les Antibiotiques et le lait.** A. A. Belkema, Rotterdam, Postbus, 1976.
- OVERBY, A. J. **The effect of various antibiotics in milk following intramammary infusion.** Nord. Vet. Med., 4:993. 1952.
- PILET, C. & THOMA, B. **Essais sur la thermostabilité de quelques antibiotiques.** Cah. Med. Vet., Paris, 38(6):227-31, 1969.
- SCHOCKEN-ITURRINO, R. P. & NADER FILHO, A. **Ação de antibióticos e quimioterápicos sobre alguns agentes bacterianos de mastite bovina.** Rev. Inst. Latic. Cândido Tostes, Juiz de Fora, 39(233):29-33, 1984.
- SIDDIQUE, I. H.; LOREN, K. L.; HOKI, H. H. **Antibiotics residues in milk transferred from treated to untreated quarter in cattle dairy.** J. Am. Vet. Med. Assoc., Schaumburg, 146(6): 589-93, 1965
- TRAMER, J. **Les antibiotiques dans le lait.** J. Soc. Dairy Technol., 17(2):95. 1964.
- VEISSEYRE, R. **Lactologia Técnica.** Madrid. Editorial Acríbia, 1972.
- VILELA, C. S. **Identificação rápida de resíduos de antibióticos no leite.** Informe Agropecuário, Belo Horizonte, 10 (115) 1984.