

**INFLUÊNCIA DA PRESENÇA DE RESÍDUOS
DE ANTIBIÓTICOS NOS ASPECTOS
TECNOLÓGICOS E NAS
CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS E
MICROBIOLÓGICAS DO QUEIJO PRATO**

CRISTIANE GATTINI SBAMPATO MENDONÇA

2003

56891
048673

CRISTIANE GATTINI SBAMPATO MENDONÇA

**INFLUÊNCIA DA PRESENÇA DE RESÍDUOS DE
ANTIBIÓTICOS NOS ASPECTOS TECNOLÓGICOS E NAS
CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS E MICROBIOLÓGICAS DO
QUEIJO PRATO**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação "Stricto Sensu" em Ciência dos Alimentos, para obtenção do título de "Doutor".

Orientador

Prof. Dr. Luiz Ronaldo de Abreu

**LAVRAS
MINAS GERAIS -
2003**

**Ficha Catalográfica Preparada pela Divisão de Processos Técnicos da
Biblioteca Central da UFLA**

Sbampato-Mendonça, Cristiane Gattini

Influência da presença de resíduos de antibióticos nos aspectos tecnológicos e nas características físico-químicas e microbiológicas do queijo prato / Cristiane Gattini Sbampato-Mendonça. -- Lavras : UFLA, 2003.

87 p. : il.

**Orientador: Luiz Ronaldo de Abreu.
Tese (Doutorado) – UFLA.
Bibliografia.**

1. Queijo prato. 2. Característica físico-química. 3. Antibiótico. 4. Microbiologia. 5. Aspecto tecnológico. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

**CDD-576.163
-637.35**

CRISTIANE GATTINI SBAMPATO MENDONÇA

**INFLUÊNCIA DA PRESENÇA DE RESÍDUOS DE ANTIBIÓTICOS NOS
ASPECTOS TECNOLÓGICOS E NAS CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS E
MICROBIOLÓGICAS DO QUEIJO PRATO**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras
como parte das exigências do Programa de Pós-
Graduação "Stricto Sensu" em Ciência dos
Alimentos, para obtenção do título de "Doutor".

APROVADA em 09 de OUTUBRO de 2003

Profa. Dra Roberta Hilsdorf Piccoli **UFLA**

Profa. Dra Celeste Maria Patto de Abreu **UFLA**

Profa. Dra Verônica Lobato **UFLA**

Dra Ana Helena Romaniello Coelho


Prof. Dr. Luiz Ronaldo de Abreu UFLA
(Orientador)

LAVRAS
MINAS GERAIS – BRASIL

A Deus, pelas graças alcançadas e pelo dom da vida.

Ao meu marido, Alexandre, pelo companheirismo, cumplicidade, incentivo e constantes demonstrações de amor.

Aos meus pais, Adolpho e Aída, pelo incentivo, exemplo e carinho.

À minha querida irmã, Cynthia, pela amizade, confiança, e apoio.

A “Vó Lourdes”, *in memorian*, pelas lições de vida jamais esquecidas.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Lavras – UFLA, através do DCA, pela oportunidade de realização do curso.

Aos meus orientadores, Prof. Luiz Ronaldo de Abreu e Profa Roberta Hilsdorf Piccoli, pela orientação, amizade e pelos conhecimentos transmitidos.

Aos meus sogros, José e Otilia, pelo carinho e confiança.

Às grandes amigas Roberta Hilsdorf Piccoli e Emília Cristina Mões Oliveira, pela confiança, apoio e sincera amizade, minha eterna gratidão.

Às professoras Vânia Déa de Carvalho e Eliana Pinheiro de Carvalho, pelo incentivo e amizade.

Aos professores Henrique César Pereira Figueiredo, Celeste Maria Patto de Abreu, Ana Helena Romaniello Coelho, Joelma Pereira, Eduardo Valério Vilas Boas e Verônica Lobato, pela colaboração, sugestões e incentivo.

Aos amigos Allan Kardec Carlos Dias e Rozane Aparecida da Silva, pelas orações e amizade.

A toda minha família, pelas orações e incentivo.

À UNINCOR, pelas oportunidades.

A São Judas Tadeu, pelas graças e pela força espiritual.

Aos amigos Cleuza e Paulo, pelo apoio, orações, amizade e pela grande ajuda no experimento.

Aos colegas Gilson, Alessandra, Simone, Cleube, Rodrigo e Flávia, pela ajuda nas análises e companheirismo.

Aos irmãos por opção, Anna Christina e Luidi, que, mesmo de longe, foram muito presentes.

Aos colegas de curso, Luiz Miccoli, Patrícia, Beto, Gabi, Vaninha, Marluce, Sandra, Adenilde, Gracinha, Fernando e Giuliano, pela convivência e aprendizado.

Aos funcionários Sr. Miguel, Sr. Piano e Cidinha e às laboratoristas Tina e Sandra, pela ajuda e pelo convívio.

Às secretárias Gicelda, Helena Cristina e Dulcinéia, pela atenção, ajuda e amizade.

Aos Professores Julio Sílvio Bueno e Celeste Maria Patto de Abreu, pela ajuda nas análises estatísticas.

Aos professores, funcionários e alunos do DCA, pela agradável convivência.

Enfim, a todos que direta ou indiretamente colaboraram para a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

RESUMO.....	i
ABSTRACT.....	ii
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 REFERENCIAL TEÓRICO.....	5
2.1 Considerações gerais sobre o uso de antibióticos na pecuária leiteira.....	5
2.2 Características dos antibióticos.....	15
2.3 Influência dos antibióticos no fermento láctico.....	19
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	27
3.1 Levantamento dos antibióticos mais utilizados no tratamento da mamite bovina e de seu perfil de eliminação.....	27
3.2 Obtenção da matéria prima e fraude do leite.....	28
3.2.1 Matéria prima.....	28
3.2.2 Análises físico-químicas e teste de antibiótico.....	28
3.2.3 Adição de antibióticos ao leite.....	29
3.3 Fabricação dos queijos.....	30
3.3.1 Coadjuvantes de processamento.....	30
3.3.1.1 Fermento láctico.....	30
3.3.1.2 Cloreto de cálcio.....	30
3.3.1.3 Coalho.....	30
3.3.2 Parâmetros observados durante a fabricação dos queijos.....	32
3.4 Análises físico-químicas do soro.....	32

3.5 Cálculo de rendimento da fabricação.....	32
3.6 Cálculo das porcentagens de transição de gordura e sólidos totais do leite para o queijo.....	32
3.7 Maturação dos queijos.....	33
3.7.1 Análises físico-químicas do queijo Prato.....	33
3.7.2 Cálculo dos Índices de maturação do queijo prato.....	35
3.8 Análises microbiológicas do queijo prato.....	35
3.8.1 Quantificação das bactérias pertencentes à família <i>Enterobacteriaceae</i>	36
3.8.1.1 Identificação das <i>Enterobacteriaceas</i>	36
3.8.2 Enumeração de <i>Staphylococcus coagulase positiva</i>	37
3.8.3 Bactérias lácticas.....	37
3.9 Antibiograma.....	37
3.9.1 Preparo da suspensão de esporos.....	37
3.9.1.1 Penicilina.....	37
3.9.1.2 Estreptomicina e tetraciclina.....	38
3.9.2 Preparação das placas.....	38
3.9.3 Solução padrão dos antibióticos.....	38
3.9.3.1 Penicilina.....	38
3.9.3.2 Estreptomicina.....	39
3.9.3.3 Tetraciclina.....	39
3.9.4 Curva padrão.....	39
3.9.4.1 Penicilina.....	39
3.9.4.2 Estreptomicina.....	40
3.9.4.3 Tetraciclina.....	40
3.10 Determinação da concentração residual de antibióticos.....	40

3.10.1 Leite.....	40
3.10.2 Soro.....	41
3.10.3 Queijo.....	41
3.11 Delineamento estatístico.....	41
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	42
4.1 Leite.....	42
4.1.1 Composição físico-química média do leite utilizado na fabricação dos queijos.....	42
4.1.2 Determinação da presença de resíduos de antibióticos adicionados ao leite.....	43
4.2 Composição físico-química média do soro dos queijos prato obtidos nas duas etapas.....	43
4.2.1 Determinação da presença de resíduos de antibióticos no soro.....	47
4.3 Coagulação, transição dos componentes do leite para a coalhada e rendimento.....	48
4.4 Composição físico-química do queijo prato.....	52
4.4.1 pH.....	55
4.4.2 Índice de extensão e profundidade de maturação do queijo prato.....	58
4.4.3 Tirosina e triptofano.....	61
4.4.4 Presença de resíduos de antibióticos no queijo.....	63
4.5 Pesquisa de microrganismos no queijo prato.....	65
4.5.1 Pesquisa de enterobactérias e bactérias lácticas em queijos prato fabricados com leite adicionado ou não de antibióticos.....	65
4.5.2 Pesquisa de <i>Staphylococcus</i> coagulase positiva.....	70
5 CONCLUSÕES.....	72
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	73
Anexos.....	82

RESUMO

SBAMPATO-MENDONÇA, C. G. Influência da presença de resíduos de antibióticos nos aspectos tecnológicos e nas características físico-químicas e microbiológicas do queijo prato. 2003. 87 p. Tese (Doutorado em Ciência dos Alimentos) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.*

Esse trabalho teve como objetivos avaliar os efeitos da presença de três antibióticos de grande utilização terapêutica nas práticas veterinárias (penicilina, estreptomicina e tetraciclina) sobre os aspectos tecnológicos de fabricação, desenvolvimento do fermento láctico, nas características físico-químicas e na microbiota do queijo prato e avaliar a transição dos resíduos presentes no leite para o queijo e sua permanência durante o período de maturação. Após análises físico-químicas, o leite destinado à fabricação dos queijos foi dividido em quatro frações e adicionado dos antibióticos, sendo que em uma das frações nenhum medicamento foi adicionado, constituindo-se do tratamento controle. O experimento foi conduzido em duas etapas: o leite foi encaminhado à fabricação dos queijos prato e posteriores análises do soro e do queijo durante o período de maturação. Pode-se observar que, nas concentrações utilizadas, a presença de resíduos dos três antibióticos em estudo afetou negativamente a qualidade dos queijos. Nos queijos contendo resíduos, houve queda no rendimento e atraso na coagulação, tendo sido a penicilina o antibiótico que mais afetou o rendimento causando perdas de 13,60%; em relação ao tempo de coagulação, o maior atraso foi observado para a tetraciclina. Ocorreram alterações no pH dos queijos levando a um grande desenvolvimento de microrganismos indesejáveis e redução no desenvolvimento do fermento láctico. Os queijos fabricados com leite contendo resíduos dos antibióticos utilizados apresentaram menores índices de extensão e profundidade de maturação e teores de tirosina e triptofano inferiores aos do tratamento controle em todo o período de maturação. A maior parte dos resíduos do leite passou para o soro; as porcentagens de transição foram de 91,5%, 90,35% e 95% para penicilina, estreptomicina e tetraciclina, respectivamente e a quantidade presente nos queijos reduziu durante o período de maturação. Os resultados obtidos permitem concluir que a presença de resíduos nas concentrações utilizadas torna o queijo impróprio para consumo e altera as características físico-químicas e microbiológicas do queijo, causando prejuízos para a indústria. Outro fato preocupante observado foi a grande quantidade de resíduos presente no soro, visto que o mesmo é utilizado na fabricação de vários produtos, o que coloca em risco a saúde do consumidor.

*Comitê Orientador: Luiz Ronaldo de Abreu – UFLA (Orientador)
Roberta Hilsdorf Piccoli - UFLA

ABSTRACT

SBAMPATO-MENDONÇA, C. G. Influence of antibiotic residues on technological aspects and physico-chemical and microbiological characteristics of Prato cheese. 2003. 87 p. Thesis (Doctorate in Food Science) – Federal University of Lavras, Lavras, MG.*

This work aimed to evaluate the effects of three antibiotics residues on technological aspects of prato cheese manufacturing, including starter culture development, physico-chemical and microbiological aspects of cheeses and to evaluate the antibiotic transition from milk to cheeses and its residence along the ripening period. The antibiotic selected were: penicillin, streptomycin and tetracycline, which have large therapeutic utilization in veterinary practices. After physico-chemical analysis milk utilized in cheese manufacturing was divided into four fractions, each antibiotic was added to a fraction being the last one without antibiotic, considered as the control treatment. Each fraction was utilized for prato cheese manufacturing being the drained whey analyzed as well the cheeses along the ripening period. The presence of all three antibiotics in all concentrations utilized had negative effect on cheese quality. Treatments containing antibiotics residues had longer clotting time and lower cheese yield being penicillin the antibiotic with the highest negative effect on cheese yield with losses of 13,60%. Concerning clotting time the highest effect was observed for tetracycline. Occurred in all cheese with antibiotic residues independently of the type negative pH alterations which brought about a considerable development of undesirable microorganisms. Cheeses manufactured from milk containing antibiotic residues had their ripening factors and tyrosine and tryptophane indexes significantly decreased along the entire ripening period compared to the control treatment. The largest part of antibiotic residues present in milk was carried to whey with transition ratio of 91,5%, 90,35% and 95% for penicillin, streptomycin and tetracycline respectively. Residues contents in cheeses constantly decreased along the ripening period. The results obtained in this work allow one to conclude that the presence of antibiotic residues even in small concentration makes cheeses inappropriate for consumption and alters the physico-chemical and microbiological properties which causes considerable economical losses to dairy industry. Other important observation was the great quantity of residue present in whey which, has become an import ingredient in several products.

*Guidance Committee: Luiz Ronaldo de Abreu – UFLA (Advisor)
Roberta Hilsdorf Piccoli - UFLA

1 INTRODUÇÃO

As instituições de saúde e nutrição apontam o leite como um dos produtos mais completos e de maior valor nutricional para a alimentação humana. O destaque se dá por ser um produto rico em proteínas, vitaminas, açúcares e, em especial, cálcio e fósforo, elementos particularmente importantes para crianças.

O leite normal é aquele proveniente de uma fêmea sadia e com trato regular; é um líquido branco, ligeiramente opaco, homogêneo e limpo, de sabor suave e ligeiramente adocicado (Albuquerque, 1994). Segundo Brasil (2002), leite é o produto obtido de uma ou de várias vacas, sem adição de nenhuma substância estranha ou extração de quaisquer de seus componentes. Este mesmo órgão relata que os produtos lácteos devem ser elaborados sem conter resíduos de pesticidas, hormônios, antibióticos, preparados farmacológicos e outras substâncias contaminantes.

Como o leite e seus derivados são consumidos por quase todos os setores da população, especialmente por crianças, as prescrições básicas sobre a qualidade do leite cru exigem uma constante preocupação relacionada com a presença de substâncias estranhas ou produtos que influenciam negativamente o seu estado higiênico, valor nutritivo e características tecnológicas. (Sokolow et al., 1980).

Hoje, resíduos químicos veiculados pelos alimentos são uma indesejável realidade, em virtude da não observação dos cuidados exigidos para as boas práticas do manejo animal e da ineficiente fiscalização governamental nesta área. Assim, drogas veterinárias são utilizadas indiscriminadamente e têm, como consequência, níveis consideráveis de resíduos nos alimentos.

Dentre as classes de drogas veterinárias, as de efeito antimicrobiano, ou seja, antibióticos e quimioterápicos, representam o principal problema em

função da grande utilização na prática do manejo pecuário (Gelinas & Goulet, 1982).

O emprego de produtos farmacológicos, especialmente antibióticos, é um grave problema por seu poder residual em alguns alimentos, e no leite este problema é especialmente grave. A quantidade veiculada pelo leite é variável e a duração da secreção depende da forma do emprego da droga, da sua classe química, da quantidade utilizada, porém a maneira de difusão para o leite é a mesma (Sokolow et al., 1980).

Segundo Fagundes & Molin (1988), os antibióticos podem estar presentes no leite devido à introdução voluntária e/ou fraudulenta pelo criador, visando melhorar a qualidade bacteriológica do leite cru, mas o fato que mais contribui para o seu aparecimento no leite é a terapêutica antiinfeciosa, em menor grau na alimentação para aumentar a conversão alimentar. E o fator mais agravante é a não observação do prazo de carência destes produtos, acarretando um grande prejuízo à saúde pública e à tecnologia.

Nascimento et al. (2001) ressaltaram a importância de se compreender que, baseado no modelo de produção que se tem hoje, é praticamente impossível almejar a produção de leite totalmente isento de antibióticos, pois a sua utilização é disseminada e importante para a viabilização da produção de leite e a manutenção da saúde animal. O que se chama de “tolerância zero” é tecnicamente impraticável para a maioria dos antibióticos, exceto para aqueles banidos pela lei, como, por exemplo, o cloranfenicol. Isso significa que para todos os demais antibióticos registrados e aceitos pela legislação, deve-se trabalhar com uma perspectiva de níveis de tolerância aceitáveis. Atualmente, o leite contém, em grande parte das vezes, resíduos de antibióticos. A preocupação maior é que os limites tecnicamente aceitáveis e regulados pela legislação não vêm sendo respeitados.

Os tipos de drogas antimicrobianas mais utilizadas pertencem à classe dos β lactâmicos (penicilinas e cefalosporinas), aminoglicosídeos (estreptomincinas), tetraciclina e sulfonamidas. Todas essas drogas e/ou seus metabólitos são potencialmente veiculados pelo leite, acarretando grande risco à saúde do consumidor, podendo desencadear um processo alérgico, alterar a flora intestinal, prejudicar processos metabólicos, induzir a processos de resistência dos microrganismos às suas fórmulas, além do possível efeito toxicológico, como teratogênese, mutagênese e carcinogênese. A oxitetraciclina, por exemplo, não deve ser administrada para crianças, principalmente abaixo de 7 anos, devido à sua ação nos dentes, descolorindo-os, além dos depósitos nos ossos, podendo deprimir o seu desenvolvimento (IDFS, 1991).

Quanto aos aspectos de saúde pública, estão incluídas as reações alérgicas desencadeadas pela penicilina, estreptomincina e neomicina, o poder complexante da tetraciclina com o cálcio, podendo provocar distúrbios ósseos e dentários na infância, o comprometimento da medula óssea provocado pelo cloranfenicol e o desenvolvimento de resistência terapêutica a estes compostos.

Do ponto de vista tecnológico, os antibióticos inibem os fermentos lácticos, trazendo problemas na fabricação de queijos, iogurte e manteiga. Também afetam os testes de controle de qualidade bacteriológica (Fagundes & Molin, 1988).

Além dos efeitos orgânicos, os resíduos das drogas interferem substancialmente nos processos tecnológicos que necessitam dos fenômenos de fermentação e coagulação, como na fabricação de iogurtes, coalhadas e queijos (Sudershan & Bhat, 1995; Furtado, 1999) acarretando grandes perdas econômicas para as indústrias.

É de grande importância zelar para que o Plano Nacional de Controle de Resíduos Biológicos (PNCRB), implantado em 1999 pelo Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento o qual oficializa e normatiza a questão da

presença de resíduos de produtos farmacológicos no leite, seja respeitado. Também é necessário o estabelecimento de um programa de vigilância e monitoramento do leite e educação dos produtores e técnicos do setor, no sentido de prevenir a ocorrência de resíduos em níveis anormais no leite, o que causaria danos à saúde pública bem como à indústria de laticínios.

Em face do exposto, o presente trabalho teve como objetivos:

- avaliar a influência de resíduos de antibióticos nos aspectos tecnológicos da fabricação e nas características físico-químicas do queijo prato;
- avaliar a transição dos resíduos de antibióticos presentes no leite para o queijo e a quantidade retida no soro;
- avaliar a permanência de resíduos durante o período de maturação do queijo prato;
- avaliar o efeito dos resíduos de antibióticos no desenvolvimento do fermento láctico e nas características microbiológicas do queijo prato.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Considerações gerais sobre o uso de antibióticos na pecuária leiteira

Resultado de uma síntese perfeita da natureza, o leite é fundamental para a alimentação humana; no entanto, é altamente perecível, exigindo grandes cuidados e procedimentos tecnológicos adequados, desde a produção até atingir o consumidor final, para que sejam mantidas suas características de qualidade como alimento. Uma série de fatores pode alterar sua composição, dentre estes pode-se citar as infecções no úbere que, em estados mais avançados, levam à obtenção de um leite com composição química diferente do normal (Oliveira & Caruso, 1984; Borges & Oliveira, 1988).

Em função dessas infecções, os antibióticos têm sido bastante utilizados e, em muitos casos, de maneira indiscriminada, resultando na presença de resíduos de antibióticos no leite, representando um risco ao consumidor e, portanto, um sério problema na área econômica e de saúde pública (Nascimento et al., 2001).

O leite cru é o componente básico de todos os produtos lácteos. As alterações de sua qualidade, em especial quando se referem à sua composição e propriedades físicas, podem influir sobre a aptidão para o leite ser transformado em produtos lácteos. Como o leite e os subprodutos são consumidos por quase todos os setores da população e, especialmente, por crianças, as prescrições básicas sobre a qualidade do leite cru exigem uma constante preocupação com substâncias estranhas ou de produtos que influenciem negativamente o seu estado higiênico, valor nutritivo e características tecnológicas (Sokolow et al., 1980).

A qualidade dos alimentos, principalmente no que se refere a alimentos básicos como o leite, é uma das mais importantes e atuais preocupações

públicas. Os benefícios econômicos do uso de drogas veterinárias tornaram essa prática muito difundida entre os criadores de gado leiteiro e de corte, mas ela pode se constituir em um risco à saúde do consumidor. Isto porque o uso incorreto de drogas farmacologicamente ativas leva à presença de resíduos no leite e nas partes comestíveis do animal. Geralmente, o controle é baseado na segurança toxicológica, bem como na segurança tecnológica (Aureli et al., 1996).

Nos últimos anos, a questão da presença de resíduos de antibióticos no leite vem tomando uma proporção significativa na cadeia do leite. Esta preocupação aliás, é bastante pertinente, pois, sem dúvida, este é um problema de alta significância, uma vez que vários fatores associam a presença desses resíduos a problemas de saúde pública. Dentre estes, destacam-se reações alérgicas que podem até mesmo desencadear choque anafilático em indivíduos particularmente sensíveis, o risco imunológico, o risco microbiológico (geração de cepas bacterianas de múltipla resistência) e o risco carcinogênico/mutagênico. Segundo Costa (1996), deve se considerar que o fator idade é extremamente relevante em relação a algumas das reações adversas aos antimicrobianos. Também devem ser considerados os riscos de consumo de leite com resíduos de antibióticos por gestantes devido ao potencial teratogênico destes, podendo causar ototoxicidade e alteração no desenvolvimento ósseo fetal.

No entanto, além dessa tradicional associação com problemas de saúde pública, existem várias outras consequências negativas da presença de resíduos de antibióticos no leite. Pode-se, por exemplo, destacar também o impacto dos resíduos sobre o processo de industrialização de produtos lácteos, como iogurte, queijos e até manteiga. O impacto sobre os produtos fermentados é significativo, uma vez que o desenvolvimento dos microrganismos dos fermentos é afetado. Além disso, determinados tipos de queijos podem apresentar alterações nas suas

características organolépticas e físicas, o que gera inúmeras perdas para a indústria.

A presença de resíduos de antibióticos no leite é indesejável por várias razões, entre elas o impacto negativo na imagem dos produtos lácteos para o consumidor. Este talvez seja o efeito mais devastador. Evidências provam que o consumidor está se tornando mais exigente e esclarecido, o que leva à rejeição de produtos alimentícios que supostamente possam apresentar resíduos de qualquer produto químico, sejam antibióticos, hormônios, pesticidas, etc. O que se observa é o crescimento vertiginoso da demanda por produtos “ecológicos”, “orgânicos” ou “naturais” (McEwen et al, 1991).

Os antibióticos são amplamente utilizados na pecuária leiteira para o tratamento de infecções e, em alguns casos, como complemento alimentar. Podem ser administrados por via oral, como aditivo na ração ou diretamente por injeções. O uso de antibióticos pode resultar na presença de resíduos no leite, especialmente se não for utilizado segundo as normas (Schenck & Callery, 1998).

O uso difundido de antibióticos como penicilina e tetraciclina tem contribuído significativamente para o controle das enfermidades bovinas. Porém as vias de aplicação utilizadas permitem que o antibiótico atinja o leite de abastecimento, causando problemas para o produtor, indústria e consumidor (Cova, 1984).

A mamite é uma das maiores causas de perdas econômicas na indústria de laticínios e deve ser controlada por boas práticas de manejo combinadas com o uso racional de agentes antimicrobianos. Uma maior rigorosidade na estipulação do período de carência para agentes antimicrobianos utilizados em animais pode reduzir a prevalência de resíduos em leite (Adesiyun et al., 1997).

Um dos principais problemas na pecuária leiteira atualmente são os processos patológicos que acometem a glândula mamária. A maioria das

infecções tem origem bacteriana, predominando o *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus agalactiae* (Pelczar et al., 1997).

A mamite é uma doença multifatorial, de etiologia complexa e variada, e se encontra disseminada em todas as regiões produtoras de leite; afeta cerca de 40% do rebanho leiteiro brasileiro e o seu tratamento impróprio e sem critérios é o principal causador da presença de resíduos de antimicrobianos no leite (Sudershan & Bhat, 1995; Albuquerque et al., 1996).

Devido à diversidade dos agentes patogênicos presentes nas práticas de manejo que podem estar relacionadas com a mamite, pode-se considerar que o tratamento é bastante complexo. Para seu controle nos animais infectados, diversos antibióticos e quimioterápicos são administrados, geralmente em soluções ou suspensões difundidas diretamente no úbere infectado, por via sistêmica ou com as duas formas combinadas. A ordenha dos animais tratados, em um período de 72 horas após a última aplicação, revela nitidamente a presença de antibióticos em uso (Souza & Benedet, 2000).

Calcula-se que entre 30% e 80% dos antibióticos aplicados na glândula mamária passam da corrente sanguínea para o leite, e sua presença no leite dependerá da dose administrada e da natureza do veículo.

Atualmente, um grande número de drogas veterinárias é utilizado no tratamento e na profilaxia de um amplo espectro de doenças em animais. Este é o caso dos animais utilizados na exploração leiteira, na qual são empregadas drogas antimicrobianas, antiparasitárias e antiinflamatórias, dentre outras, muitas vezes em níveis acima dos tolerados (IDFS, 1991). Resíduos de antibióticos em leite devem ser evitados por várias razões, dentre elas: alguns deles podem causar reações em consumidores sensíveis e essas podem ser extremamente sérias; resíduos geralmente são ilegais; podem levar à obtenção de organismos resistentes; alguns são capazes de interferir nas culturas utilizadas em produtos

lábteos processados e queijos e, finalmente resíduos são indicativo de que o leite pode ter sido obtido de animais com infecções sérias (Brady & Katz, 1988).

Um estudo envolvendo três mil produtores escolhidos ao acaso foi realizado para determinar as técnicas de manejo que podem estar associadas à presença de resíduos, as atitudes e conhecimentos dos produtores sobre eles e como essas variáveis influenciam na ocorrência de resíduos no leite e produtos lábteos. Este estudo concluiu que a ocorrência de resíduos está associada principalmente aos erros cometidos pelos empregados, a conhecimentos insuficientes sobre o período de carência e à não observação do mesmo, não identificação e grande número de animais tratados. Concluiu ainda, que, a maioria dos fatores associados à presença de resíduos está relacionada ao tratamento de mamites (Kaneene & Ahl, 1987). Esses mesmos autores relataram que maior evidência dos problemas causados à saúde deve ser observada, pois 34% dos produtores acham que a preocupação com a saúde pública é menos importante que a parte econômica.

Segundo Chen & Chang (1994), uma vez que os antibióticos estão presentes no leite, são difíceis de serem eliminados e a presença dessas drogas se torna um grave problema.

A FAO/WHO (1990) e Brasil (2002) preconizam que "a denominação de leite refere-se exclusivamente ao produto obtido pela ordenha de uma ou várias vacas, sem que se tenha adicionado ou subtraído nada". E citam ainda que "os produtos lábteos devem ser elaborados sem conter resíduos de pesticidas, hormônios, antibióticos, preparados farmacológicos e outras substâncias contaminantes, ou pelo menos reduzi-los a valores os mais baixos possíveis".

Para estabelecer-se um início de discussão, é preciso definir os conceitos de resíduos e contaminantes no leite. O Codex Comitê da OMS para Resíduos Pesticidas (CCPR), revisa periodicamente os termos que são adicionalmente considerados pela Comissão do *Codex Alimentarius*. Este órgão, em documento

de 1991, definiu drogas veterinárias, antibióticos, quimioterápicos, pesticidas para plantas e outros como resíduos que podem ser limitados, como proibição de aplicação de certos compostos em plantas e animais, fixação de prazo de carência entre a aplicação e o uso do alimento e fixação de limite residual máximo. Como contaminantes, são considerados aqueles elementos que entram não intencionalmente e de forma não controlada na cadeia alimentar, especialmente metais pesados, micotoxinas, nitrosaminas, bifenis policlorados e outros.

Devido ao crescente interesse, por parte dos consumidores por produtos derivados do leite e da carne, devem ser criados programas educacionais direcionados à indústria e aos produtores com o objetivo de prevenir a ocorrência de resíduos de antibióticos nesses alimentos. Antes da implantação destes programas, é essencial avaliar cientificamente as atitudes e os conhecimentos dos produtores sobre resíduos de drogas, a relação entre técnicas de manejo e a ocorrência desses resíduos e sua importância para saúde pública e economia (Pearce, 1978; Scott, 1991).

Nos últimos anos, a produção de leite nos países em desenvolvimento vem se modernizando consideravelmente. Entretanto a transformação de práticas tradicionais de pecuária em fazendas leiteiras modernas envolve o uso de raças mais puras e o uso de drogas para combater as doenças. Muitas drogas utilizadas como medicamento ou como auxiliar na produção animal podem levar à presença de resíduos em leite e/ou carne, tornando-se um perigo para os consumidores (WHO, 1991). Em países como Canadá e EUA, amostras de leite são rotineiramente monitoradas pelos órgãos governamentais ou pela indústria, para verificar a presença de resíduos de antibióticos. O leite é considerado adulterado se os resíduos excederem os limites de tolerância fixados pelo FDA (Bishop et al., 1984).



Praticamente todos os países que apresentam uma cadeia láctea minimamente organizada possuem legislação própria para regulamentar a questão da presença de resíduos de antibióticos. Os limites máximos residuais para os antibióticos mais utilizados na pecuária leiteira, de acordo com a legislação de vários países estão descritos no Quadro 1.

QUADRO 1 – Limites máximos residuais dos principais antibióticos de acordo com a legislação de alguns países produtores de leite

Limite máximo residual ($\mu\text{g}/\text{kg}$)				
	Canadá**	União Européia**	EUA**	Brasil*
Estreptomicina	125	125	125	200
Tetraciclina	150	100	30	100
Penicilina	6	4	5	4
Sulfametazin	10	100	10	100

* Instrução Normativa nº 42 – DIPOA – MAPA, (1999)

** FDA

Observa-se que há uma certa discordância a respeito dos níveis de segurança apresentados pelas legislações dos países citados no Quadro 1. Nota-se uma maior severidade nas legislações brasileira e da União Européia no que se refere à penicilina. No caso da tetraciclina, os níveis aceitáveis pela legislação brasileira excedem em muito a legislação americana, sendo mais rígida que a canadense e semelhante à União Européia. Por outro lado, observa-se que na legislação brasileira há uma forte liberalidade nos níveis de segurança que regulamentam a estreptomicina em relação às outras legislações citadas (Nascimento, 2001).

O uso de antimicrobianos, em especial aqueles para tratamento local das mastites, ou então os sistêmicos diluídos em veículos oleosos, não é aprovado pela legislação brasileira para vacas em lactação dentro do período de carência. Esta legislação vigente também não aprova a venda de leite proveniente de vacas tratadas com antibióticos intramamários ou sistêmicos no decorrer do tratamento e três dias após o término do mesmo. Esta norma porém não é obedecida por muitos produtores pelo fato de não ser realizado exame de rotina no leite, já nas plataformas de recepção, para detectar presença de antibióticos (Costa, 1996).

Segundo Albuquerque et al. (1996), na prática, dosagens cada vez mais altas têm sido utilizadas nas propriedades, com o intuito de obter os bons resultados terapêuticos anteriores, já não possíveis, devido à seleção de bactérias resistentes aos antibióticos usados incorretamente ao longo dos anos.

Várias pesquisas visando determinar a presença de resíduos de antibióticos em leite comercializado já foram realizadas, podendo-se citar algumas: Mello Filho (1969) avaliou o leite comercializado em São Paulo e observou que 1,9% das amostras analisadas apresentou resíduos de penicilina em concentrações consideradas de risco para ingestão por pessoas sensíveis a essa droga. Silva & Sena (1984) observaram a prevalência de resíduos no leite pasteurizado distribuído na cidade de Belo Horizonte, MG e concluíram que 4,1% do leite tipo B e 3,2% do leite tipo A continham resíduos de antibióticos. Albuquerque et al. (1996), analisando leite comercializado em Fortaleza-CE, encontraram 69,7% das amostras com resíduos de antibióticos, sendo que, destas, 28% continham resíduos de penicilina. Nascimento et al. (2001), analisando 96 amostras de leite de seis diferentes marcas comercializadas na cidade de Campinas, SP encontraram 50% das amostras com resíduos de antibióticos e, destas, 34,8% continham resíduos de beta lactâmicos.

Porto et al. (2002) avaliaram a ocorrência de resíduos de beta lactâmicos no leite entregue à indústria na região sudeste do Rio Grande do Sul, durante um

ano e concluíram que das 10.464 amostras analisadas, 121 (1,16%) apresentaram resíduos. Os autores observaram ainda que no final do outono e no inverno, o índice de amostras com resíduos atingiu 2,82%, caracterizando esse período como uma época crítica para a sanidade animal, com reflexos na qualidade do leite.

De acordo com os resultados obtidos nessas pesquisas, observou-se um aumento significativo da presença de resíduos nos últimos anos, devido à maior frequência de utilização de antibióticos pelos produtores de leite. Além disso, não deve estar ocorrendo, em muitos casos, a obediência do período de carência recomendado.

Adesiyun et al. (1997), estudaram a prevalência de resíduos de antibióticos em leite pré-processado, pasteurizado e esterilizado em alguns países em desenvolvimento, dentre eles Trinidad e Tobago. Estes autores observaram que 9,6% do leite pré-aquecido, 21,3% do leite pasteurizado e 8,3% do leite esterilizado continham resíduos de antimicrobianos e que 90,3% dos resíduos detectados nas amostras eram de penicilina. Os pesquisadores atribuem esses índices à facilidade que os produtores em países em desenvolvimento tem de adquirir esses medicamentos e à falta de regulamentação em alguns desses países.

Os antibióticos entram na cadeia alimentar pelas seguintes fontes de contaminação: pelo uso intramamário, pela via sanguínea após aplicação parenteral, pelas vias intra-uterina, subcutânea, intramuscular, intradérmica e intravenosa (IDFS, 1991; Hawronskyj et al., 1993).

Antibióticos vêm sendo utilizados na pecuária leiteira por mais de quatro décadas. São administrados aos animais por um dos quatro métodos tradicionais: infusão no úbere para tratamento de mamites; uso parenteral (intramuscular, intravenosa e subcutânea) para tratamento de várias enfermidades; por via oral para tratamento de doenças e como suplemento alimentar e reprodutivo e “jatos”

para infecções uterinas e cervicais. Todos esses métodos de aplicação levam à contaminação de leite e derivados com resíduos. O uso de antibióticos de infusão para tratamento de mamites em vacas leiteiras é um problema de saúde pública, pois esses produtos são, na maioria das vezes, utilizados sem se observar as recomendações, ou seja, não se respeitam os períodos de carência e dosagens excessivas são utilizadas (Bishop & White, 1984).

O regulamento para o controle sanitário do leite Brasil (2002) estipula que o mesmo e seus derivados, destinados ao consumo humano, devem estar livres de antibióticos. Para que esta norma seja cumprida é necessário manter uma amostragem constante desses produtos e proceder a identificação de resíduos (Cova, 1984).

O abuso de medicamentos veterinários, especialmente nos países onde o seu emprego não é controlado rigorosamente, poderia ser corrigido por meio de informações suficientes e exatas aos usuários, veiculadas por cooperativas e centros de apoio técnico governamentais. A difusão de boas práticas veterinárias e agrícolas levaria a uma redução destas substâncias, deixando de ser motivo de preocupação pública. Segundo Miniussi (1992) e Brito et al. (1997), o sucesso desses programas depende de mudança de atitude e de manejo, em que produtores, funcionários e técnicos desempenham papel primordial.

Segundo Vilela (1984), a presença de resíduos de antibióticos no leite é consequência de tratamentos terapêuticos aplicados no animal em lactação, principalmente no combate às doenças infecciosas da glândula mamária. A presença de pequenas quantidades dessas substâncias no leite acarreta sérios prejuízos ao consumidor, induzindo à resistência de bactérias patogênicas. Por outro lado são responsáveis por reações alérgicas em indivíduos predispostos. Para a indústria, torna-se difícil o aproveitamento da matéria-prima com resíduos de antibióticos porque essas substâncias atuam diminuindo ou inibindo

a atividade das bactérias responsáveis pelas diversas fermentações desejadas nos diferentes produtos lácteos.

2.2 Características dos antibióticos

A penicilina, a tetraciclina e a estreptomicina são alguns dos antibióticos mais utilizados no Brasil para o tratamento da mamite.

A tetraciclina é um composto antibacteriano comumente utilizado na prevenção e/ou tratamento de doenças na pecuária e tem provado ser clinicamente eficiente como agente terapêutico contra bactérias gram positivas e gram negativas (Guillot et al., 1989). Como suplemento na alimentação animal, em doses subterapêuticas, a tetraciclina é utilizada para manter uma saúde perfeita e como promotor de crescimento. O uso destes compostos pode resultar em resíduos que estarão presentes em alimentos de origem animal, especialmente se o período de eliminação não for respeitado. Esses resíduos podem ser uma ameaça à saúde do consumidor, dependendo do composto, do tipo do alimento e da taxa residual presente. Por estas razões, órgãos governamentais estabelecem níveis de tolerância máxima para essas drogas em produtos de origem animal. O limite máximo legal varia com o tipo de alimento e/ou a espécie animal do qual o alimento se originou (Fletouris et al., 1990)

Collins-Thompson (1998) ressalta que, embora os níveis aceitáveis de resíduos de antibióticos no leite sejam abaixo do mínimo necessário para produzir reações alérgicas, não existe informação sobre quais níveis de resíduos podem levar a problemas de toxicidade. A maioria das informações sobre hipersensibilidade é relatada para a penicilina.

Segundo Katz (1983), aminoglicosídeos (estreptomicina), cloranfenicol e novobiocina são fortemente alergênicos em indivíduos sensíveis.

A tolerância máxima para tetraciclina na forma de oxitetraciclina (OTC), tetraciclina (TC) e clortetraciclina (CTC) varia de zero para CTC em leite e ovos a 4µg/g para CTC em tecidos de aves, suínos e gado. Resíduos de tetraciclina, quando excedem o nível máximo, podem ter efeitos toxicológicos preocupantes (Long et al., 1990).

A penicilina é um antibiótico do grupo dos beta lactâmicos, os quais são ativos para bactérias gram positivas e gram negativas e são amplamente utilizados para tratamento de infecções. A penicilina é muito utilizada como medicamento veterinário, sendo administrada em animais com fins terapêuticos e como profilaxia (Farag et al., 1998).

Segundo Fletouris et al. (1992), existe uma preocupação com a presença de resíduos deste antibiótico em alimentos, devido ao alto potencial em causar reações alérgicas. Em leite, a presença de resíduos deve ser monitorada, visto que a presença de traços deste composto é suficiente para a observação de reações alérgicas em indivíduos sensíveis e causar inibição das culturas na fabricação de produtos lácteos. Estima-se que 6% a 10% dos americanos adultos sejam hipersensíveis a antibióticos

A penicilina é o antibiótico que provoca um efeito secundário mais perigoso, uma vez que provoca intensa alergia em pessoas sensíveis; também a estreptomicina, a neomicina e a tetraciclina são capazes de desencadear um processo alérgico, porém, em menor grau. O *codex Alimentarius* estipulou um valor máximo de 0,006 ug/mL no leite quando se analisa o produto, pela inibição de crescimento de *Bacillus stearothermophilus*, evidenciado pela difusão em disco (Sokolow et al., 1980).

A importância de se detectar níveis reduzidos de concentrações de resíduos de penicilina em leite se deve ao fato de se desconher até o momento, qual seria a faixa de concentração que traria risco de hipersensibilidade aos consumidores que são principalmente crianças e idosos (Albuquerque et al.,

1996). Estudos realizados por Chen & Chang (1994), concluíram que a ingestão de apenas 0,003 UI de penicilina pode levar à ocorrência de reações alérgicas.

A estreptomicina é um antibiótico pertencente ao grupo dos aminoglicosídeos, muito utilizado em animais no controle de infecções, principalmente mamite, o que pode resultar na presença de resíduos no leite e na carne. Os resíduos de estreptomicina podem causar problemas renais, nervosos e perda de audição (Schenck & Callery, 1998).

Santos (1985) relatou que o uso indiscriminado de antibióticos em vacas tem criado problemas ao homem, pela presença de resíduos nos laticínios. Esse mesmo autor ressalta que os antibióticos são amplamente utilizados no tratamento de mamites, podendo aparecer no leite por mais de 72 horas e até mesmo 144 horas após sua aplicação, dependendo da via de inoculação, do tipo específico de antibiótico e da natureza do veículo utilizado. Formas aquosas são eliminadas em três dias, porém as oleosas podem permanecer no leite por até seis dias.

Estudos realizados por Fagundes (1981), comprovaram que em vacas mamíticas, a PPD (dehidroestreptomicina + penicilina procaína) permanece no leite por 117 horas, quando aplicada via intramuscular e por 126 horas, quando aplicada por via intramamária. A clortetraciclina, quando inoculada por via intramuscular, permanece 96 horas e por via intramamária perdura por 141 horas no leite.

Os antibióticos utilizados na terapêutica da mamite podem ser detectados no leite até 141 horas após aplicação. Quanto à termoresistência, verifica-se que a penicilina e a tetraciclina resistem a 100°C após três horas e que a penicilina, estreptomicina e neomicina resistem ao congelamento por 12 semanas, sem perda de ação residual (Fagundes & Molin, 1988).

Um dos diversos problemas tecnológicos resultantes da presença de resíduos de antibióticos no leite é sua interferência no teste de fosfatase, que é

utilizado para confirmação da pasteurização. Apesar de ser um sério problema, poucos trabalhos foram realizados para verificar como a presença destes resíduos interfere no teste de fosfatase.

Manolkidis et al. (1971) concluíram que a presença de certos antibióticos no leite afeta o resultado do teste de fosfatase. Leite pasteurizado pode apresentar-se como não pasteurizado na presença de penicilina e tetraciclina.

Pesquisas realizadas por Fagundes & Molin (1988) concluíram que estreptomicina não exerce influência alguma sobre o teste de fosfatase. Já a tetraciclina e a penicilina induzem a uma fosfatase negativa em leite cru, onde deveria ser positiva.

Segundo Furtado (1999), os antibióticos, em sua maioria, são fortemente resistentes à pasteurização e mesmo à esterilização do leite, conforme dados da Federação Internacional de Laticínios (FIL), descritos no Quadro 2. Como são resistentes à temperatura de pasteurização do leite, os antibióticos podem ser encontrados no leite do tanque de fabricação de queijos. Sabe-se que o leite proveniente da primeira ordenha após o tratamento via intravenosa ou intramuscular contém milhões de unidades internacionais do antibiótico utilizado.

QUADRO 2 – Estabilidade térmica dos antibióticos

Antibiótico	% de destruição		
	72°C/15seg	90°C/30min	100°C/30min
Penicilina	8%	20%	50%
Estreptomicina	–	–	66%
Tetraciclina	–	–	90%

FIL citado por Furtado (1999)

Bishop et al. (1984) avaliaram o perfil de retenção de dois antibióticos, Forte® (penicilina + novobiocina) e Combiotic® (penicilina + diidroestreptomicina), aplicados por vias intramamária e intramuscular, respectivamente, em animais de três raças (Jersey, Holandês e Guernsey) com mamite. Concluíram que, para o Forte®, o período de carência especificado pelo fabricante é suficiente para a eliminação dos resíduos e que a presença destes no leite deve-se à não observação do período e para o Combiotic®, o período de carência deveria ser reavaliado pelo fabricante. Esses autores relataram que a raça não influencia na retenção de resíduos e que a maior concentração destes na raça Jersey deve-se à menor produção de leite por ordenha.

IDFS (1991) recomenda que o tratamento das fêmeas afetadas por mamite seja o controle veterinário e que as mamites clínicas devem ser tratadas assim que sintomáticas, afastando-se estas fêmeas e as mamites subclínicas devem ser tratadas durante o período seco, observando-se o período de carência determinado para cada produto.

2.3 Influência dos antibióticos no fermento láctico

O queijo é o derivado do leite que mais se difundiu pelo mundo e o que recebeu maiores modificações nas técnicas de elaboração. Em consequência disso, têm-se hoje centenas de tipos desse produto. É considerado uma excelente fonte de cálcio, fósforo e proteínas. Possui período de conservação muito superior ao do leite e, por ser um produto que possui muitas variedades, oferece ao consumidor possibilidade de escolher, dentre muitos, aquele que melhor lhe convier.

A fabricação de queijos no Brasil é relativamente recente tendo se firmado do ponto de vista industrial no início do séc XX e, sobretudo a partir da década de 20, com a chegada de imigrantes dinamarqueses e holandeses que se

estabeleceram principalmente na região sul do estado de Minas Gerais (Abreu, 1986).

A indústria queijeira do Brasil tem conseguido elaborar produtos que estão atingindo, gradativamente, melhor aceitação no mercado. Com o passar dos anos, novas tecnologias surgiram, inovando a indústria laticinista. A maneira pela qual os antigos fabricavam queijos, como forma de preservação do leite ou para pequenas comercializações, foi marcante na economia do setor. Entretanto, novos investimentos tecnológicos e financeiros foram necessários para acompanhar o avanço da sociedade como um todo. Vários tipos e formas de processamento de queijos surgiram e continuam surgindo, muitos dos quais adaptados daqueles já existentes.

Dentre os tipos de queijos mais consumidos e existentes em maior quantidade no Brasil e principalmente na região sudeste, destacam-se o queijo prato, a mussarela e o minas (Brasil, 1990).

O queijo prato foi introduzido no Brasil por imigrantes dinamarqueses, e originou-se dos queijos tybo e danbo, dinamarqueses e do gouda, holandês. Possui grande importância no meio comercial, ocupando o segundo lugar em consumo no Brasil. Em 1999, a produção de queijo prato atingiu 27% da produção total de queijos no país (Oliveira, 2001).

Nos últimos anos, a indústria produtora de queijos obteve o maior crescimento, em kilogramas, de produtos fabricados e consumidos que qualquer outro segmento da indústria de alimentos. Para conseguir e manter essa superioridade, a indústria de laticínios tem se submetido a significativas mudanças tecnológicas e psicológicas. Essa mudança tem impacto direto na qualidade do leite, que é a matéria prima básica para a fabricação de produtos lácteos.

Segundo Dallas & Lagrange (1998), o número de novos produtos lácteos está, em todo o mundo, crescendo a uma taxa muito superior à de qualquer outra


categoria de alimentos. Isto porque os derivados do leite se inserem perfeitamente na atual tendência de valorização da saúde. Outro aspecto importante no desenvolvimento de produtos lácteos é o aproveitamento do soro que é um subproduto obtido em grande quantidade durante a fabricação de queijos e que há até pouco tempo era descartado ou destinado à alimentação animal. Porém, devido ao seu alto valor nutricional, contendo 1% de proteína de alto valor biológico e baixo teor de gordura, muitos produtos à base de soro estão sendo desenvolvidos, como, por exemplo, bebidas lácteas, achocolatados, bebidas destinadas a atletas e produtos de panificação, dentre outros.

O impacto do controle da mamite é bem conhecido pela indústria queijeira, pois, acidentalmente ou por negligência, leite proveniente de animais tratados chegam à indústria com resíduos resultando em perdas consideráveis.

Atenção considerável vem sendo direcionada ao desenvolvimento de técnicas que possam detectar a presença de resíduos com maior precisão e que reduzam a porcentagem da presença de resíduos no leite que chega à indústria (Claypool, 1984).

As culturas utilizadas na fabricação de queijos e leites fermentados podem ser inibidas por inibidores naturais do leite, por contaminação bacteriana, por fagos, colostro, resíduos químicos e fatores do manejo. Estas inibições influenciam a produção e a qualidade do queijo, por reduzir a síntese de ácidos, aumentar o pH e favorecer o crescimento de esporos. Para prevenir estas inibições, deve-se melhorar a qualidade da produção, proceder a um resfriamento adequado do leite e mantê-lo sob refrigeração, observando-se a limpeza, a sanitização dos equipamentos, uso de culturas resistentes a fagos, o treinamento de pessoal, filtro de ar e todas as medidas necessárias para manutenção da higiene do ambiente (Limsowtin, 1992; Burt & Wellsted 1991).

Santos (1985) relatou que as consequências da aplicação indiscriminada de antibióticos são observadas pelos prejuízos na indústria de laticínios, onde



ocorre a inutilização de grandes quantidades de leite fermentado e interferência na qualidade dos queijos devido à inibição dos fermentos lácticos.

A preocupação com a presença de resíduos é fortemente motivada pelas perdas econômicas, pois afeta as culturas utilizadas em produtos fermentados resultando em declínio ou paralisação de sua atividade (Chaganda & Ndikuwera, 1989).

Segundo Furtado (1999), em uma situação em que leites de diversos produtores poderiam conter diferentes doses residuais de antibióticos, mesmo havendo uma considerável diluição com volumes de leite isentos de resíduos, o teor final, mesmo sendo mínimo, poderia ser suficiente para inibir uma fabricação de queijos ou de iogurte, tão grande é a sensibilidade das culturas lácticas a estes inibidores.

A presença de resíduos de antibióticos influencia nos testes de controle de qualidade do leite, dentre eles: o teste de redutase, que se fundamenta no tempo de redução do azul de metileno pelas enzimas redutase dos microrganismos. A presença de resíduos inibe a ação microbiana e o tempo de redução será muito maior, dando um resultado que indicaria falsamente uma boa qualidade microbiana e o teste de fosfatase alcalina. Resíduos de antibióticos como tetraciclina e penicilina poderão mascarar o controle da eficiência da pasteurização, feito pelo teste da fosfatase, uma vez que poderão induzir a coloração do teste para um leite eficientemente pasteurizado e com contagem microbiana baixa, sendo que o leite poderá apresentar baixa contagem devido à inibição pela presença de resíduos o que não traduz a verdadeira qualidade higiênico-sanitária deste leite (Donnelly, 1991)

A presença de antibióticos no leite, mesmo em quantidades diminutas, acarreta problemas na fabricação de queijos, por produzir uma coagulação inadequada e cura imprópria, decréscimo da produção de ácido e *flavor* menos acentuado durante a fabricação de manteiga e produtos similares, diminuição do

crescimento das bactérias do fermento láctico e dificuldades de produção de leite fermentado. Estes fatores levam à obtenção de produtos inferiores, causando prejuízos à indústria e aos consumidores que podem sofrer alergias ou intoxicações (IDFS, 1991).

O transtorno tecnológico ocasionado por resíduos de antibióticos no leite está na diminuição da capacidade de acidificação, influenciando negativamente a produção de iogurte, uma vez que a cultura láctica utilizada para tal é uma das mais sensíveis à ação da maioria dos antibióticos (Sokolow et al., 1980). Os estreptococos são muito sensíveis à penicilina e esta sensibilidade é maior que a dos estreptococos causadores de mamite. Já a tetraciclina não apresenta esta diferenciação.

A presença de resíduos de antibióticos no leite tem causado problemas para a indústria de laticínios. Os resíduos levam à inibição parcial ou total da produção de ácidos pelas culturas lácticas, causando maturação inadequada e afeta a textura e o “flavor” dos produtos. Pode ainda causar um crescimento indesejável de coliformes resistentes a antibióticos e interfere no teste de fosfatase (Collins-Thompson et al, 1988).

Fagundes & Molin (1988) também citaram que os antibióticos inibem fortemente os fermentos lácticos, que são muito sensíveis, havendo um desenvolvimento excessivo de coliformes, estreptococos, micrococos e estafilococos, uma vez que no leite normal estes coliformes teriam seu desenvolvimento limitado pelo fermento. Segundo os autores, a fabricação de iogurte e queijos é fortemente influenciada pela presença de antibióticos.

Em fermento de iogurte, a penicilina promove uma inibição precoce do *S. thermophilus* e, com isso, o *Lactobacillus bulgaricus*, que é mais proteolítico e é mais resistente à penicilina, predomina no meio, ocasionando um desequilíbrio nas ações, resultando em maior proteólise, produzindo gosto de peptona e exsudação excessiva de soro.

No creme utilizado para manteiga pode ocorrer inibição parcial ou total da acidificação, limitando, portanto, a produção de diacetil, substância responsável pelo *flavor* da manteiga.

Angevine (1979) citou alguns fatores que causam problemas na fabricação do queijo Cottage, como bactérias psicrotróficas, tempo prolongado de estocagem do leite na fazenda, proteases, antibióticos, inibidores produzidos por bactérias e rancidez.

Furtado (1990) ressalta que em regiões onde há grande incidência de mamite, são comuns os problemas de má fermentação na fabricação de queijos. Esses problemas podem se manifestar de diversas maneiras: a massa não dá “ponto”, fica úmida e pastosa; o queijo não dessora bem e, mesmo após a prensagem, fica macio demais e, quando pressionado, solta soro em excesso; o queijo não fermenta adequadamente e, portanto, seu pH não baixa aos níveis desejados; aumenta o risco de formação de gás por coliformes e, finalmente, o queijo não matura adequadamente, vindo a constituir o chamado queijo “morto”.

Nos queijos, os resíduos antibióticos influenciam a ação do fermento e os queijos podem apresentar-se com estrutura esponjosa e sabor ligeiramente amargo. Mesmo que os fermentos para fabricação de queijos apresentem-se com menor sensibilidade a antibióticos, podem aparecer defeitos pela irregularidade da acidificação, principalmente em queijos duros que utilizem *S. thermophilus* (Sokolow et al., 1980; Gleeson, 1991).

Dunsmore et al. (1985) relataram que no queijo cheddar, um problema causado pelos resíduos é a inibição da produção de ácidos pelas culturas utilizadas em sua fabricação. A inibição da atividade da cultura leva a produção de ácido a níveis muito baixos ou até mesmo cessa, o que pode afetar consideravelmente a qualidade dos queijos e, conseqüentemente, seu valor de mercado.

Segundo Fagundes & Molin (1988), os principais problemas que ocorrem nos queijos oriundos de leites com antibióticos incluem uma má-dessoragem da coalhada, fermentação indesejável com produção de gás e uma maturação inadequada, que acontecem pela interferência dos antibióticos sobre os fermentos utilizados para o fabrico de queijos que, sendo inibidos, favorecem o desenvolvimento de coliformes e leveduras. A influência negativa da penicilina já se manifesta a 10 UI/ml e inibe totalmente o fermento a 500 UI/ml. No queijo tipo camembert, com 0,5-1,0 IU/ml, obtém-se um produto impregnado de gás. Para queijo cottage, pequenas concentrações de tetraciclina interagem com a caseína e cálcio, atrasando ou até impedindo a coagulação. Os mesmos autores citam alguns valores residuais que interferem com a fermentação de microrganismos do iogurte e queijos. Chen & Chang (1994) relataram que 0,2 UI de penicilina causam 50% de inibição dos fermentos utilizados na fabricação de queijos e iogurtes e concluem que, para que estes resíduos inibam totalmente a coagulação do leite seriam necessárias doses muito elevadas, o que normalmente não ocorre.

Após o tratamento da mamite (via intramamária e/ou sistêmica), a penicilina e a estreptomicina podem ser encontradas em concentrações suficientes para inibir culturas lácticas e causar perdas econômicas na indústria de queijos e leites fermentados (Brady & Katz, 1988)

Para exemplificar esta situação, resíduos de penicilina no leite da ordem de 0,5 a 1 UI/mL podem ter efeito inibidor sobre culturas lácticas empregadas na produção de queijo, resultando em deterioração da qualidade final do produto e aumento no tempo de processamento (Packhan et al , 2001).

Albuquerque et al. (1996) observaram a putrefação de queijos por coliformes resistentes à ação de antibióticos, fazendo com que não ocorresse a fermentação pelas cepas selecionadas, acarretando em modificações nas características do produto.

É interessante ressaltar que as bactérias do grupo coliforme são sete vezes mais resistentes a antibióticos que aquelas do fermento láctico mesofílico; no caso de um leite contendo pequenas concentrações de penicilina, a cultura láctica será parcial ou totalmente inativada, porém os coliformes sobreviverão para causar o estufamento dos queijos (Furtado, 1990).

A presença de antibióticos no leite é um problema grave e de difícil resolução, porém, com boas práticas de manejo, utilização racional de antibióticos, controle de venda e aplicação e conscientização de técnicos e produtores, pode ser amenizado. Atualmente, existem testes de plataforma para rápida detecção e seleção. Assim, todas as fábricas de queijos e leites fermentados deveriam fazer controle periódico da presença de antibióticos no leite e promover uma atividade constante de conscientização do produtor para separar o leite dos animais tratados. A indústria deve estar ciente de que exames de antibióticos são uma necessidade, fazendo parte não somente da triagem do leite, como também de qualquer programa de pagamento por qualidade (Furtado, 1999).

3 MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido nos Laboratórios de Laticínios e de Microbiologia de Alimentos do Departamento de Ciência dos Alimentos (DCA/UFLA).

3.1 Levantamento dos antibióticos mais utilizados no tratamento da mamite bovina e de seu perfil de eliminação:

A seleção dos antibióticos utilizados foi feita por pesquisas entre técnicos e produtores para identificar os antibióticos mais utilizados no tratamento da mamite. Baseando-se em pesquisas bibliográficas analisou-se o perfil de eliminação dos antibióticos, definindo suas concentrações a serem utilizadas no experimento (Tabela 1)

TABELA 1 Apresentação das concentrações de antibióticos adicionados ao leite destinado à elaboração dos queijos prato.

Antibiótico	Concentração
Penicilina	100UI/mL de leite
Estreptomicina	50µg /mL de leite
Tetraciclina	2 µg/mL de leite

3.2 Obtenção da matéria prima e fraude do leite

3.2.1 Matéria prima

O leite utilizado no experimento estava isento de antibióticos e foi fornecido pela Cooperativa Agrícola Alto Rio Grande (CAARG), Lavras – MG, a qual realizou o controle de qualidade rotineiro, a padronização para 3,5% de gordura e a pasteurização do mesmo.

O leite foi encaminhado adequadamente ao Laboratório de Laticínios – UFLA para, no mesmo dia, ser submetido a análises e fabricação dos queijos.

As amostras foram submetidas às análises físico-químicas, segundo métodos descritos por Brasil (1981) e pela AOAC (1995) e ao teste para certificar a ausência de antibióticos.

3.2.2 Análises físico-químicas e teste de antibiótico

Antes das fabricações, coletaram-se amostras de leite para a realização das seguintes análises:

PH:

utilizou-se um potenciômetro HANNA (modelo HI 8314).

Acidez titulável

Foi determinada em 10mL de leite, utilizando-se o método de titulação com hidróxido de sódio N/9 (solução Dornic), em presença de solução indicadora (fenolftaleína), como descrito por Brasil (1981)

Sólidos totais e desengordurados

Os teores de sólidos totais (EST) e sólidos desengordurados (ESD) das amostras de leite foram determinados pelo método de secagem em estufa da marca FANEM, modelo 315 SE à 105°C, como descrito pela A.O.A.C. (1995)

Gordura

Os teores de gordura das amostras foram determinados pelo método do butirômetro de Gerber-Van Gulik, descrito por Brasil (1981). Para esta análise, foi utilizada uma centrífuga do tipo Gerber da marca FANEM.

Densidade

Foi determinada por meio de leitura direta, utilizando-se um termolactodensímetro segundo Quevenne devidamente aferido. O efeito da temperatura foi corrigido segundo o método descrito pela AOAC (1995).

Crioscopia

A depressão do ponto de congelamento (DPC) foi determinada por meio de crioscópio eletrônico ITR (modelo MK 540), e o resultado expresso em graus Hotvert (°H).

Proteína

Foi determinada pelo cálculo do teor de nitrogênio total medido pelo método micrométrico de Kjeldahl (AOAC, 1995), utilizando-se o fator 6,38 para a estimativa do teor de proteína total, de acordo com Kosikowski (1977).

Presença de antibióticos

Para assegurar que o leite não possuía resíduos de antibióticos, todos os leites utilizados no experimento foram submetidos a exames, utilizando-se o kit “Delvo Test”

3.2.3 Adição de antibióticos ao leite:

O leite recebido foi dividido em quatro frações e fraudado com os antibióticos citados na Tabela 1, sendo que em uma das frações não foi adicionado nenhum antibiótico. As concentrações de antibióticos adicionadas ao leite foram baseadas em uma situação simulando um rebanho de vinte vacas e um rebanho de quarenta vacas, com produção média de 14L/animal/dia nos quais uma delas seria tratada com antibióticos. Esse procedimento foi utilizado para os três antibióticos em estudo.

3.3 Fabricação dos queijos:

Os processos de fabricação dos queijos prato foram idênticos para todos os tratamentos. A técnica de fabricação utilizada foi a descrita por Furtado & Lourenço Neto (1994) (Figura 1). As fabricações foram divididas em duas etapas, com três repetições cada e foram conduzidas utilizando-se 50 litros de leite por tratamento. A primeira etapa constituiu-se na simulação de um rebanho de 20 vacas, sendo uma tratada com antibiótico. Na segunda etapa, simulou-se um rebanho de 40 vacas, sendo uma tratada com antibiótico.

3.3.1 Coadjuvantes de processamento

3.3.1.1 Fermento láctico

O fermento láctico utilizado no processo de fabricação do queijo foi o tipo "O" mesofílico (R 704) composto de *Lactococcus lactis ssp. Lactis* (5%) e *Lactococcus lactis ssp. cremoris* (95%) proveniente da Chr. Hansen Indústria e Comércio ®. A quantidade utilizada foi 1,5% conforme recomendação do fabricante.

3.3.1.2 Cloreto de cálcio

Utilizou-se cloreto de cálcio em solução aquosa a 50% (p/v), Chr. Hansen Indústria e Comércio ®, na quantidade de 40 mL para cada 100 litros de leite.

3.3.1.3 Coalho

Utilizou-se coalho líquido comercial (Chr. Hansen ®) na proporção de 40mL/100 litros de leite, conforme recomendação do fabricante.

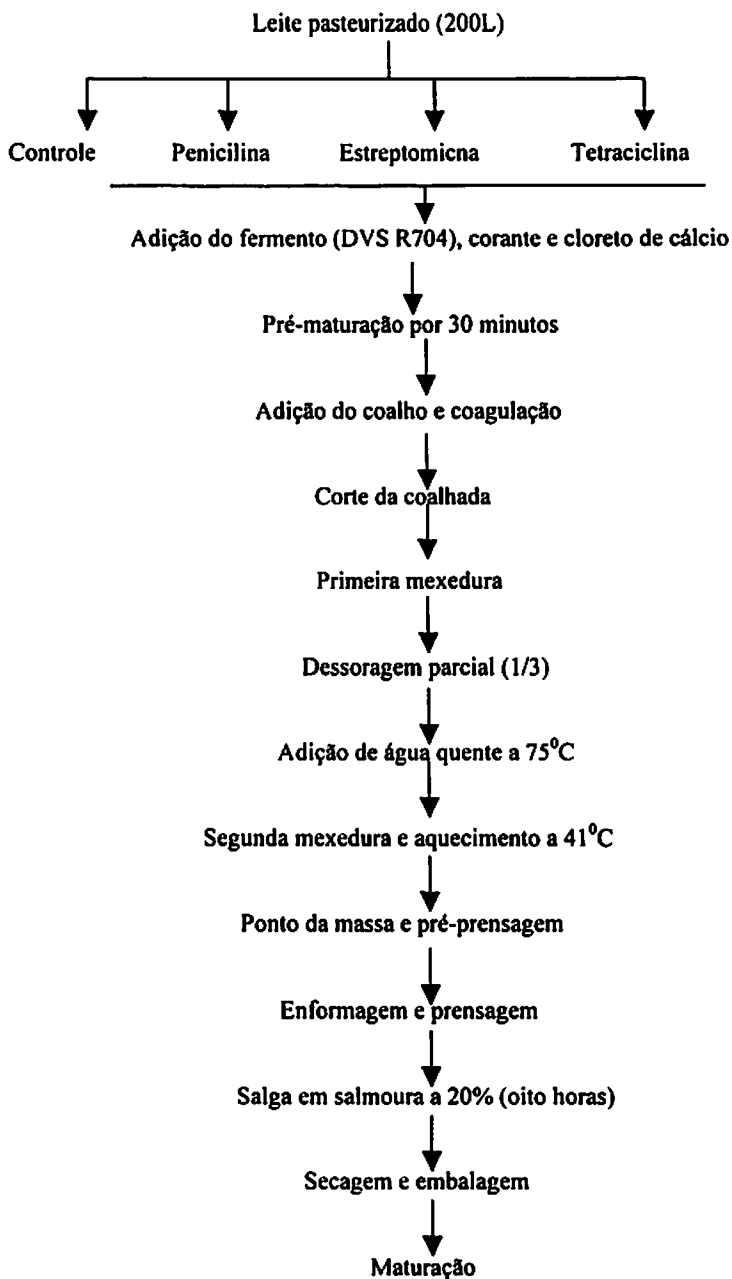


FIGURA 1 Fluxograma da fabricação do queijo prato (Furtado & Lourenço Neto, 1994)

extrato seco (GES), foram calculados dividindo-se os teores de gordura do queijo pelo seu teor de EST

Sal

Os teores de sal foram determinados segundo o método descrito por Kosikowski (1977)

Sal na umidade

Os teores de sal na umidade dos queijos foram determinados pela fórmula

$$\% \text{ sal/umidade} = \frac{\text{sal}}{\text{sal} + \text{umidade}} \times 100$$

Tirosina e Triptofano

Os teores de tirosina e triptofano das amostras de queijo foram determinados pelo método proposto por Vakaleris & Price (1959). As amostras de queijo foram trituradas e diluídas em citrato de sódio 0,5M e precipitadas a pH 4.6. Após filtragem desta mistura em papel de filtro WHATMAN nº 42, obteve-se uma solução límpida de citrato de sódio e ácido clorídrico, contendo a fração hidrolisada de proteína do queijo, solúvel a pH 4,6. A fração solúvel foi diluída (1:1) em água destilada e submetida à leitura no espectrofotômetro BEKMAN nos comprimentos de onda de 270 e 290 nm (ultravioleta). A concentração de tirosina (Tir) e triptofano (Trp) em mg/100g de queijo foi calculada pelas seguintes fórmulas

$$\text{Tir} = 906 (0,95 \times A_{270} - 1,31 \times A_{290})$$

$$\text{Trp} = 1021 (0,307 \times A_{290} - 0,020 \times A_{270})$$

Nitrogênio Total (NT), Nitrogênio Solúvel (NS) e Nitrogênio não Proteico (NNP)

As amostras de queijo (cerca de 100g) foram trituradas e diluídas em citrato de sódio 0,5M. As amostras foram digeridas em bloco aquecedor da marca SARGE, modelo 40-25, e destiladas em equipamento TECNAL, modelo TE-036. Finalmente, os teores de NT, NS e NNP foram determinados de acordo com o método semimicro-Kjeldahl proposto por Gripon et al. (1987).

3.7.2 Cálculo dos Índices de maturação do queijo prato

Os teores de NT, NS e NNP foram determinados segundo as metodologias descritas no item anterior e aplicados às fórmulas determinadas por Bondzynski citado por Wolfschoon-Pombo (1983). A determinação do índice de extensão de maturação é expressa pela fórmula:

$$\text{Extensão (\%)} = \frac{\text{NS}}{\text{NT}} \times 100$$

A determinação do índice de profundidade de maturação é expressa pela seguinte fórmula:

$$\text{Profundidade (\%)} = \frac{\text{NNP}}{\text{NT}} \times 100$$

3.8 Análises microbiológicas do queijo prato

Para a realização das análises microbiológicas e determinação da presença de resíduos de antibióticos foram utilizados os queijos produzidos na segunda etapa, pois os resultados obtidos na etapa 1 demonstraram que naquela concentração os queijos possuíam características de fabricação alteradas e

padrões sensoriais como textura, consistência, cor, odor e aparência inadequados, tornando os mesmos impróprios para comercialização e consumo.

Amostras de 25 g de queijo foram coletadas após 24 horas, 15 e 30 dias, diluídas em 225 mL de citrato de sódio 2% (p/v) e homogeneizadas. Após homogeneização as amostras foram diluídas em água peptonada a 0,1% (p/v).

Todas as análises foram realizadas de acordo com ICMSF (1982).

3.8.1 Quantificação das bactérias pertencentes à família *Enterobacteriaceae*.

A contagem de bactérias da família enterobacteriaceae foi realizada, utilizando-se o meio VRB (violeta red blue). A técnica utilizada foi o plaqueamento em superfície. Diluições adequadas foram plaqueadas e incubadas a 37° C por 24 horas.

Colônias foram isoladas e transferidas para tubos inclinados contendo ágar TSA (ágar tripticase de soja) e incubadas por 24 horas. Após esse período foram realizados os testes de catalase e oxidase e coloração de gram.

3.8.1.1 Identificação das enterobacteriaceas.

A identificação foi realizada utilizando-se o sistema de identificação API 20E bio Méreux ®. Os isolados obtidos em meio VRB foram purificados utilizando o mesmo meio. As colônias isoladas foram transferidas para tubos contendo TSA e submetidas a uma nova coloração gram para confirmação da pureza. As colônias gram negativas foram então transferidas para tubos contendo ágar TSA inclinado e incubadas a 37°C por 24 horas. Após esse período, os isolados foram semeados em caldo BHI (caldo infusão de cérebro e coração) e incubados por 18 a 24 horas a 37°C. Após a incubação alíquotas da cultura foram transferidas para solução salina de 0,85% até se obter turbidez 0,5 na escala de MacFarland (Albuquerque et al., 1996). Após o ajuste da

concentração da cultura alíquotas foram transferidas para as galerias regentes do API 20E bio Méreux ® e incubadas a 37° C por 18 a 24 horas.

3.8.2 Enumeração de *Staphylococcus* coagulase positiva

Staphylococcus coagulase positiva foi quantificado pelo plaqueamento de alíquotas das diluições adequadas em agar Baird-Parker. Após 24 horas de incubação, colônias típicas e atípicas foram retiradas aleatoriamente em um total de 10%. Essas foram transferidas para tubos contendo TSA para posterior realização de provas confirmativas de coagulase, catalase e coloração de gram.

3.8.3 Bactérias lácticas

Foram incubadas alíquotas de 1 mL das amostras das diluições apropriadas em meio MRS (ágar de Man, Rogosa & Sharpe), utilizando-se a técnica de plaqueamento em profundidade.

Após o endurecimento do ágar, foi colocada uma sobrecamada deste meio em cada placa. Estas foram incubadas a 30°C por 5 dias.

3.9 Antibiograma

3.9.1 Preparo da suspensão de esporos:

3.9.1.1 Penicilina

A cultura estoque (*Bacillus stearothermophilus* ATCC 10149) foi repicada em meio de ágar casoy inclinado e, após 6 horas a 55°C, as células foram suspensas em 12 mL de caldo Mueller Hinton, após a raspagem do ágar com alça de níquel-cromo e incubada a 55°C por 18 a 24 horas. Em seguida a cultura foi então diluída de forma seriada, utilizando-se água peptonada (0,1% p/v), obtendo turvação equivalente a 10⁸ UFC/mL, ajustada com auxílio da escala MacFarland (0,5 da escala) (Albuquerque et al., 1996).

3.9.1.2 Estreptomicina e tetraciclina

As culturas estoque de *Bacillus subtilis* ATCC 6633 e *Bacillus cereus* ATCC 11778 foram repicadas em meio de ágar casoy e incubadas por 6 horas à 30°C. As células foram coletadas pela adição de 12 mL de caldo Mueller Hinton aos tubos, voltando a serem incubadas a 30°C durante 18 a 24 horas. Em seguida, as culturas foram transferidas para tubo de água peptonada, adequando para que fosse obtida uma turvação equivalente a 10⁸ UFC/mL, ajustada com auxílio da escala MacFarland (0,5 da escala) (Albuquerque et al., 1996).

3.9.2 Preparação das placas

As placas com ágar Mueller Hinton foram inoculadas com a cultura bacteriana, com auxílio de swabs estéreis, por toda sua superfície, garantindo assim um crescimento uniforme. As placas foram preparadas de maneira idêntica para os três antibióticos em estudo.

3.9.3 Solução padrão dos antibióticos

3.9.3.1 Penicilina

Penicilina G potássica e G procaína 5.000.000 UI foi preparada para conter 100 UI/mL em tampão fosfato pH 6,5. A partir da solução estoque (100UI/mL), 600µl de solução estoque foram adicionados a 9400µl de tampão, obtendo-se 6 UI/mL. A partir desta solução, diluições subsequentes foram realizadas, obtendo-se as concentrações de penicilina utilizadas na curva padrão.

3.9.3.2 Estreptomocina

Estreptomocina foi preparada para conter 500µg/mL em água bidestilada. A partir da solução estoque (500µg/mL), 60µL de solução estoque foram adicionados a 9940µl de água bidestilada obtendo-se 3µg/mL. A partir desta solução, diluições subsequentes foram realizadas obtendo-se as concentrações de estreptomocina utilizadas na curva padrão.

3.9.3.3 Tetraciclina

Tetraciclina foi preparada para conter 200µg/mL em solução de HCl 0,1N. A partir da solução estoque (200µg /mL), 1000µl de solução estoque foram adicionados a 9000µl de solução de HCl 0,1N, obtendo-se 20µg /mL. A partir desta solução, diluições subsequentes foram realizadas, obtendo-se as concentrações de tetraciclina utilizadas na curva padrão.

3.9.4 Curva padrão

Foram utilizadas as informações dos rótulos para calcular as concentrações dos antibióticos a serem utilizados na elaboração da curva padrão. Conhecendo-se as concentrações de cada inoculado e obtendo-se o diâmetro dos halos, obteve-se a curva padrão.

3.9.4.1 Penicilina

Para a confecção da curva padrão, discos de papel de filtro inertes de 6mm foram umedecidos com 10µL de solução de diferentes concentrações de solução de penicilina em tampão fosfato e depositados sobre as placas previamente inoculadas com *Bacillus stearothermophilus* ATCC 10149. A curva padrão foi elaborada a partir da medida dos halos resultantes da inibição da cultura bacteriana pelo antibiótico.

3.9.4.2 Estreptomicina

Para a confecção da curva padrão, discos de papel de filtro inertes de 6mm foram umedecidos com 10 μ L de solução com diferentes concentrações de solução de esteptomicina em água bidestilada e depositados sobre as placas previamente inoculadas com *Bacillus subtilis* ATCC 6633. A curva padrão foi elaborada a partir da medida dos halos resultantes da inibição da cultura bacteriana pelo antibiótico.

3.9.4.3 Tetraciclina

Para a confecção da curva padrão, discos de papel de filtro inertes de 6mm foram umedecidos com 10 μ L de solução com diferentes concentrações de solução tetraciclina em tampão fosfato e depositados sobre as placas previamente inoculadas com *Bacillus cereus* ATCC11778. A curva padrão foi elaborada a partir da medida dos halos resultantes da inibição da cultura bacteriana pelo antibiótico.

3.10 Determinação da concentração residual de antibióticos

3.10.1 Leite

A quantificação de cada antibiótico foi determinada como se segue:

Após a adição de antibióticos ao leite e homogeneização, amostras de 50 mL de leite foram coletadas no tanque de fabricação para posteriores análises para verificar a quantidade de resíduos de antibióticos presente no leite

A metodologia utilizada foi a do método clássico descrito pela AOAC (1995) e modificada por Albuquerque et al. (1996), utilizando-se discos de papel de filtro e cultura teste. As amostras de leite foram homogeneizadas, os discos de papel inerte foram umedecidos com 10 μ L do leite e colocados nas placas já inoculadas, conforme o item 3.9.2. As placas foram levadas para incubadora

BOD a 55°C por 24 horas, observando-se a formação de halos de inibição. O procedimento foi o mesmo para os três antibióticos utilizados

3.10.2 Soro

As análises para determinação da concentração de antibióticos no soro foram realizadas conforme descrito para o leite no item 3.10.1 .

3.10 3 Queijo

Durante o período de maturação foram coletadas amostras aos 1, 15 e 30 dias de maturação, para a determinação da presença de resíduos de antibióticos nos queijos. O processo de preparo das amostras foi o mesmo para os três antibióticos utilizados. Como tratava-se de um produto sólido, o queijo foi transformado em pasta com o auxílio de um homogeneizador manual (polytrom). Após homogeneização, coletaram-se-se alíquotas da pasta, as quais foram colocadas em contato com os discos inertes e deixadas até completo umedecimento (5min). Em seguida, os discos foram colocados nas superfícies das placas conforme descrito no item 3.10.1.

3.11 Delineamento estatístico

O delineamento experimental utilizado foi o de blocos casualizados em esquema fatorial $(4 \times 2) \times 3$, sendo quatro tratamentos (controle, penicilina, estreptomicina e tetraciclina) e duas concentrações com três repetições, para o soro e características de fabricação e $(4 \times 2 \times 3) \times 3$ quatro tratamentos (controle, penicilina, estreptomicina e tetraciclina), duas concentrações e três períodos de maturação para o queijo com três repetições. A análise de variância foi realizada, fazendo-se comparações entre médias pelo teste de tukey.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Leite

4.1.1 Composição físico-química média do leite utilizado na fabricação dos queijos

Os resultados relativos à composição média do leite utilizado na fabricação dos queijos nas duas etapas (concentrações) do experimento encontram-se na Tabela 2. Os valores obtidos estão de acordo com a legislação (Brasil, 2002). O leite utilizado para a fabricação dos queijos estava isento de resíduos de antibióticos de acordo com resultados do “Delvo test”, realizado para detecção dos mesmos.

TABELA 2 Composição físico-química média do leite utilizado na fabricação dos queijos.

Parâmetros	Média
Densidade	1.031
PH	6.60
Gordura	3.5%
Acidez	16 ^o D
Crioscopia	-0.538 ^o H
EST	12.35%
ESD	8.85%
Proteína	3.35%
Resíduos de antibióticos	ausente

4.1.2 Determinação da presença de resíduos de antibióticos adicionados ao leite.

Os dados relativos à concentração de penicilina, estreptomicina e tetraciclina presentes no leite após adição, encontram-se na Tabela 3. Conhecendo-se o diâmetro do halo, pode-se, por meio da equação de regressão encontrada nas curvas padrão (Anexos 1A, 2A e 3A), calcular a concentração dos antibióticos no leite.

TABELA 3 Concentração média* de estreptomicina ($\mu\text{g/ml}$), penicilina (UI/mL), e tetraciclina ($\mu\text{g/ml}$) no leite após adição dos antibióticos, nas duas etapas.

	Etapa 1		Etapa 2	
	ϕ halo (cm)	Concentração	ϕ halo (cm)	concentração
Estreptomicina	1,08	2,50 $\mu\text{g/ml}$	0,59	1,25 $\mu\text{g/ml}$
Penicilina	6,24	4,99 UI/mL	3,30	2,50 UI/mL
Tetraciclina	0,141	0,10 $\mu\text{g/mL}$	0,139	0,05 $\mu\text{g/mL}$

* médias obtidas de três observações

4.2 Composição físico-química média do soro dos queijos prato obtidos nas duas etapas

O conhecimento da composição do soro durante a fabricação de queijos é importante, pois sua maior ou menor riqueza fornecem boa indicação de perdas acontecidas durante a fabricação, uma vez que os sólidos do leite serão repartidos entre os grãos da coalhada, que irão formar o queijo e o soro. É importante que o soro seja o mais pobre possível, para se obter um maior rendimento de fabricação.

TABELA 4 Valores médios de gordura (%) do soro dos queijos prato, fabricados com leite adicionado ou não de antibióticos obtidos nas duas concentrações.

Tratamentos			
Controle	Penicilina	Estreptomicina	Tetraciclina
0,75b	0,98a	0,98a	0,97a
Concentrações			
1		2	
0,96a		0,87b	

Médias seguidas da mesma letra nas linhas não diferem estatisticamente, pelo teste de tukey, a 5% de probabilidade.

TABELA 5 Valores médios de proteína (%) do soro dos queijos prato, fabricados com leite adicionado ou não de antibióticos obtidos nas duas concentrações.

Concentrações	Tratamentos				Total
	Controle	Penicilina	Estreptomicina	Tetraciclina	
1	0,82b	0,96a	0,99a	0,98 ^a	0,94A
2	0,82c	0,97a	0,97a	0,88b	0,91B
Total	0,82c	0,96ab	0,98a	0,93b	

Médias seguidas da mesma letra minúscula nas linhas e maiúscula nas colunas não diferem estatisticamente, pelo teste de tukey, a 5% de probabilidade.

TABELA 6 Valores médios de sólidos totais (EST) do soro dos queijos prato, fabricados com leite adicionado ou não de antibióticos obtidos nas duas concentrações.

Tratamentos			
Controle	Penicilina	Estreptomicina	Tetraciclina
6,68c	7,14a	6,84b	6,96ab

Médias seguidas da mesma letra nas linhas não diferem estatisticamente, pelo teste de tukey, a 5% de probabilidade.

De acordo com os dados das Tabelas 4 a 6, observa-se que os soros provenientes dos leites contendo antibióticos possuem teores mais elevados de gordura, proteína e sólidos totais, em comparação com o soro proveniente do tratamento controle

Observa-se, de maneira geral, que a fabricação de queijo utilizando leite com resíduos de antibióticos, independente do tipo, levou a uma modificação na composição geral do soro, ocorrendo aumento dos teores de gordura, proteína, sólidos totais (EST).

Os resultados encontrados indicam que houve diferença significativa, quando se compara o tratamento controle com os demais. Para proteína e gordura, não houve diferença significativa entre os antibióticos, porém houve entre as concentrações utilizadas. Na concentração um, houve maior perda de gordura e proteína (Tabelas 4 e 5). A concentração utilizada não afetou a perda de sólidos totais. Houve diferença significativa entre os tratamentos, sendo que a penicilina foi o antibiótico que proporcionou maior perda de sólidos totais (Tabela 6).

A presença de resíduos de antibióticos no leite causa um enfraquecimento da coalhada com conseqüente aumento de sua porosidade, fazendo com que esta tenha sua capacidade de reter componentes diminuída. Dessa forma, durante o processo de corte e mexedura, mais componentes sólidos sairão dos grãos e enriquecerão o soro, causando, por sua vez, uma diminuição do rendimento do leite em queijos e, dessa forma, causando prejuízos à indústria queijeira.

TABELA 7 Valores médios de pH do soro dos queijos prato, fabricados com leite adicionado ou não de antibióticos em duas concentrações.

Tratamentos			
Controle	Penicilina	Estreptomicina	Tetraciclina
6,36b	6,38a	6,39a	6,40a

Médias seguidas da mesma letra nas linhas não diferem estatisticamente, pelo teste de tukey, a 5% de probabilidade.

Sabidamente, a formação da acidez durante todo o processo da fabricação de queijo é parâmetro extremamente importante e diretamente relacionado com o desenvolvimento do fermento lático. Como este é fortemente afetado por antibióticos, terá influencia direta na formação da acidez. Em função disso, no tratamento controle, o pH do soro durante a fabricação se comportou de forma adequada aos objetivos tecnológicos. Houve diferença significativa entre o tratamento controle e os demais, sendo que a concentração utilizada não influenciou nos resultados (Tabela 7).

A acidez titulável do soro foi mais elevada nos tratamentos com resíduos de antibióticos, muito provavelmente em função da maior concentração de sólidos nesse soro, já que essa acidez reflete a concentração de substâncias que reagem com hidróxido de sódio durante a titulação.

As bactérias do fermento lático utilizado na fabricação dos queijos possuem alta sensibilidade à presença de antibióticos. Assim, as duas dosagens utilizadas não apresentaram diferenças significativas, já que ambas foram suficientes para causar inibição.

Os resultados obtidos no tratamento controle estão de acordo com os obtidos por Ventura et al (1984) e Furtado & Wolfschoom Pombo (1979), que estudaram a composição do soro dos queijos prato e minas e concluíram que o soro proveniente da fabricação do queijo prato possui a seguinte composição:

gordura 0,70%-0,80%, proteína 0,75%-0,90%, sólidos totais 6,70-7,00 e pH 6,36-6,42.

Oliveira (2001), avaliando a composição média do soro de queijos prato fabricados com leite pasteurizado pelos sistemas HTST e injeção direta de vapor (IDV), encontrou valores próximos aos citados nas Tabelas 4 a 6, para o sistema HTST, que foi o utilizado para pasteurização do leite destinado à fabricação dos queijos no presente trabalho.

4.2.1 Determinação da presença de resíduos de antibióticos no soro

Os dados referentes à concentração de penicilina, estreptomicina e tetraciclina presentes no soro proveniente da fabricação dos queijos nas duas etapas do experimento encontram-se na Tabela 8.

TABELA 8 Concentração média* de penicilina, estreptomicina e tetraciclina encontrada no soro proveniente da fabricação dos queijos

	Etapa 1		Etapa 2	
	ϕ halo (cm)	Concentração	ϕ halo (cm)	concentração
Penicilina	5,70	4,54 UI/mL	3,10	2,30 UI/mL
Estreptomicina	0,98	2,25 μ g/ml	0,55	1,12 μ g/mL
Tetraciclina	0,14	0,95 μ g/ml	0,139	0,47 μ g/mL

* medias obtidas de três observações

Pode-se observar transição de 91% e 92% da concentração de penicilina do leite para o soro nas etapas 1 e 2, respectivamente. Para a estreptomicina, a transição foi de 90,35% nas duas etapas; os maiores índices de transição foram observados para a tetraciclina, 95% nas duas etapas.

Como o soro é utilizado na fabricação de vários produtos como ricota, bebidas lácteas, achocolatados dentre outros, esses resultados são preocupantes

do ponto de vista de saúde pública bem como tecnológico, pois quantidades consideráveis de antibióticos podem estar presentes nesses produtos, podendo causar problemas ao consumidor, tais como alergia e resistência bacteriana. A migração dos antibióticos para o soro também pode ser danosa à indústria por meio da inibição parcial ou total das culturas lácteas e obtenção de produtos com características indesejáveis.

4.3 Coagulação, transição dos componentes do leite para a coalhada e rendimento

Os valores médios de tempo de coagulação, transição de gordura, proteína e sólidos totais (EST) e rendimento nas duas etapas de fabricação dos queijos encontram-se nas Tabelas 9 a 13.

TABELA 9 Valores médios de tempo de coagulação (min) obtidos na fabricação dos queijos prato, elaborados com leite adicionado ou não de antibióticos em duas concentrações

Tratamentos			
Controle	Penicilina	Estreptomicina	Tetraciclina
40,00 c	45,67 b	46,00 b	49,00 a

Médias seguidas da mesma letra nas linhas não diferem estatisticamente, pelo teste de tukey, a 5% de probabilidade.

O tempo de coagulação dos tratamentos com resíduos de antibióticos foi maior que o observado para o tratamento controle. A atuação das enzimas do coalho e a consequente coagulação são dependentes da acidez desenvolvida durante o processo de fabricação. Dessa forma uma diminuição no desenvolvimento do fermento láctico causa um aumento no tempo de coagulação, fato este que justifica o maior tempo de coagulação para os tratamentos contendo resíduos de antibióticos.

O antibiótico que causou maior atraso no tempo de coagulação foi a tetraciclina, resultado este coerente com os encontrados por Fagundes & Molin (1988). Estes autores observaram, na fabricação de queijo cottage, que pequenas concentrações de tetraciclina interagem com a caseína e o cálcio, provocando atraso na coagulação.

Observa-se, na prática, que nas indústrias queijeiras, uma das maneiras de se suspeitar da presença de resíduos de antibióticos é pela observação do tempo de coagulação que, embora não seja um método científico é muitas vezes eficiente.

TABELA 10 Valores médios de transição de gordura (%) na fabricação dos queijos prato, elaborados com leite adicionado ou não de antibióticos em duas concentrações

Concentrações	Tratamentos				Total
	Controle	Penicilina	Estreptomina	Tetraciclina	
1	79,65 a	70,87 c	73,43 b	74,55 b	74,60 B
2	80,24 a	75,84 b	76,22 b	76,68 b	77,24 A
Total	79,94 a	73,56 c	74,78 bc	75,62 b	

Médias seguidas da mesma letra minúscula nas linhas e maiúscula nas colunas não diferem estatisticamente, pelo teste de tukey, a 5% de probabilidade.

TABELA 11 Valores médios de transição de proteína (%), obtidos na fabricação dos queijos prato, elaborados com leite adicionado ou não de antibióticos em duas concentrações

Tratamentos			
Controle	Penicilina	Estreptomicina	Tetraciclina
78,20 a	74,26 b	73,35 b	74,19 b

Médias seguidas da mesma letra nas linhas não diferem estatisticamente, pelo teste de tukey, a 5% de probabilidade.

TABELA 12 Valores médios de transição de sólidos totais (%), na fabricação do queijo prato elaborados com leite adicionado ou não de antibióticos em duas concentrações

Concentrações	Tratamentos				Total
	Controle	Penicilina	Estreptomicina	Tetraciclina	
1	51,02 a	46,65 c	48,30 b	48,57 b	48,64
2	51,39 a	48,00 b	47,03 b	48,23 b	48,66
Total	51,21 a	47,52 b	47,66 b	48,40 b	

Médias seguidas da mesma letra nas linhas não diferem estatisticamente, pelo teste de tukey, a 5% de probabilidade.

Observou-se que, nos tratamentos utilizando leite contendo resíduos de antibióticos, independente do antibiótico utilizado, a transição de gordura, EST e proteínas foi menor em relação ao tratamento controle. Para transição de gordura houve diferença significativa entre as concentrações e os antibióticos utilizados. Para transição de proteína, observou-se diferença significativa apenas entre os tratamentos.

TABELA 13 Valores médios de rendimento (L/kg), na fabricação do queijo prato elaborados com leite adicionado ou não de antibióticos em duas concentrações

Concentrações	Tratamentos				Total
	Controle	Penicilina	Estreptomicina	Tetraciclina	
1	9,00 c	10,34 a	9,76 b	9,73 b	9,71 A
2	8,96 d	10,14 a	9,87 b	9,72 c	9,67 B
Total	8,98 d	10,24 a	9,81 b	9,72 c	

Médias seguidas da mesma letra minúscula nas linhas e maiúscula nas colunas não diferem estatisticamente, pelo teste de tukey, a 5% de probabilidade.

A menor transição de componentes do leite para o queijo leva à redução de rendimento, considerando-se queijos de mesma umidade, o que foi observado para os leites contendo resíduos dos antibióticos utilizados. Houve diferença significativa entre os antibióticos e entre as concentrações utilizadas (Tabela 13), a concentração dois interferiu menos no rendimento. A penicilina, estreptomicina e tetraciclina causaram redução no rendimento de 14,89%, 8,44% e 7,88% respectivamente para a etapa 1 e 13,04%, 9,13% e 8,05% respectivamente para a etapa 2. A penicilina foi o antibiótico que mais afetou o rendimento, essa maior perda pode ser, supostamente, devido à maior porosidade observada na coalhada elaborada com esse leite, porosidade esta que permite maior evasão de componentes sólidos do grão durante a mexedura.

A maior porosidade do tratamento penicilina, muito provavelmente, foi devido ao maior desenvolvimento de coliformes nessa coalhada (Tabela 23).

O maior rendimento observado no tratamento controle está relacionado ao maior aproveitamento dos constituintes do leite, o que pode ser explicado

pelas diferenças encontradas nas porcentagens de transição de componentes entre o tratamento controle e os demais e pela composição do soro.

Os valores encontrados para o tratamento controle estão de acordo com os citados por Ventura et al. (1984) e Furtado & Wolfschoom Pombo (1979), que determinaram as cifras de transição de componentes e rendimento de queijos prato e minas. Furtado et al. (1988) e Oliveira (2001), analisando queijo prato encontraram valores de transição de gordura de 77,21% e 80,91% e de sólidos totais de 46,62% e 45,62%, respectivamente.

4.4 Composição físico-química do queijo prato

A composição média de alguns parâmetros físico químicos do queijo prato, 24 horas após a salga, elaborado nas duas etapas do experimento encontram se nas tabelas14 e 15.

De maneira geral, as características físico-químicas dos queijos do tratamento controle estão dentro dos padrões tecnicamente aceitáveis. Segundo Furtado & Lourenço Neto (1994), o queijo prato possui a seguinte composição: umidade 42-44%, gordura 26-29%, proteína 27-29%, teor de sal 1,6-1,9% e pH 5,2-5,4. Observam-se maiores valores de proteína, gordura e sólidos totais quando se compara o tratamento controle com os demais tratamentos.

TABELA 14 Composição físico-química média do queijo prato produzido na etapa um, com um dia de maturação.

	Tratamentos			
	Controle	Penicilina	Estreptomicina	Tetraciclina
pH	5,16	6,34	6,15	5,50
Proteína (%)	27	24,5	35,5	25,8
Gordura (%)	28	26	27	27
GES (%)	50,00	51,52	51,73	50,80
EST (%)	56,00	50,45	52,19	53,15
Umidade (%)	44,00	49,56	47,89	46,85
Sal (%)	1,67	1,99	1,82	1,60
Sal/umidade (%)	3,65	3,86	3,67	3,34

TABELA 15 Composição físico-química média do queijo prato produzido na etapa dois, com um dia de maturação.

	Tratamentos			
	Controle	Penicilina	Estreptomicina	Tetraciclina
pH	5,14	6,08	5,80	5,30
Proteína (%)	27	24,5	26	26
Gordura (%)	27	26	26	26
GES (%)	47,80	51,48	48,82	48,40
EST (%)	56,40	50,51	53,25	54,15
Umidade (%)	43,60	49,50	46,75	45,85
Sal (%)	1,67	1,97	1,81	1,62
Sal/umidade (%)	3,69	3,82	3,73	3,41

O desenvolvimento do fermento láctico é extremamente influenciado pela presença de antibióticos no leite, o que provocou menores reduções nos valores deste importante parâmetro da fabricação de queijos nos tratamentos com antibióticos. Tecnicamente, o queijo prato com 24 horas de fabricação deve possuir pH de 5,2, o qual só foi alcançado no tratamento controle.

A penicilina foi o tratamento que mais afetou a queda do pH, proporcionando, como consequência, ambiente mais favorável para desenvolvimento de coliformes que, por sua vez, produz gás e aumenta a porosidade do queijo. Junta-se a isso, o fato desses microrganismos serem proteolíticos, atacando as micelas de caseína. Esse conjunto de fatos promove maior saída de matéria protéica dos grãos durante o processo de mexedura, enfraquecendo a malha protéica e permitindo maior saída de sólidos para o soro. Este fato explica a razão do soro do queijo fabricado com leite contendo penicilina ter apresentado maiores teores de EST, gordura e proteína (Tabelas 4 a 6).

Como a coalhada é dividida durante a fabricação em grãos e soro, os componentes encontrados em maior quantidade no soro terão valores reduzidos nos grãos. Observa-se então que o tratamento controle apresentou maiores concentrações de proteína, gordura e sólidos totais.

Os queijos com resíduos de antibióticos apresentaram maior teor de umidade, ou seja, mesmo prolongando-se o período de mexedura, os grãos não conseguiram atingir a umidade adequada para o queijo prato. Sabidamente a acidez é um importante fator de sinérese, pois com o aumento da acidez há uma concentração dos grãos liberando água; como os antibióticos prejudicaram a formação de acidez, os queijos produzidos com leite contendo resíduos dos mesmos apresentaram maior teor de umidade

O teor de sal apresentou valores mais elevados nos queijos fabricados com leite contendo resíduos de penicilina e estreptomicina. Isso ocorreu devido

à maior umidade obtida, o que proporcionou maior difusão de sal na massa desses queijos. Foram observados teores de sal na umidade também superiores.

4.4.1 pH

A evolução do pH é um parâmetro fundamental na fabricação de queijos. O valor do pH diminui nas primeiras horas após a fabricação e tende a aumentar durante a maturação devido à geração de compostos de caráter alcalino.

O comportamento dos teores de ácido láctico durante a maturação é essencial para o desenvolvimento do “flavor” e para a manutenção da qualidade do queijo (Khatoun et al., 1990).

A evolução do pH durante a maturação dos queijos pode ser observada nas Figuras 2 e 3.

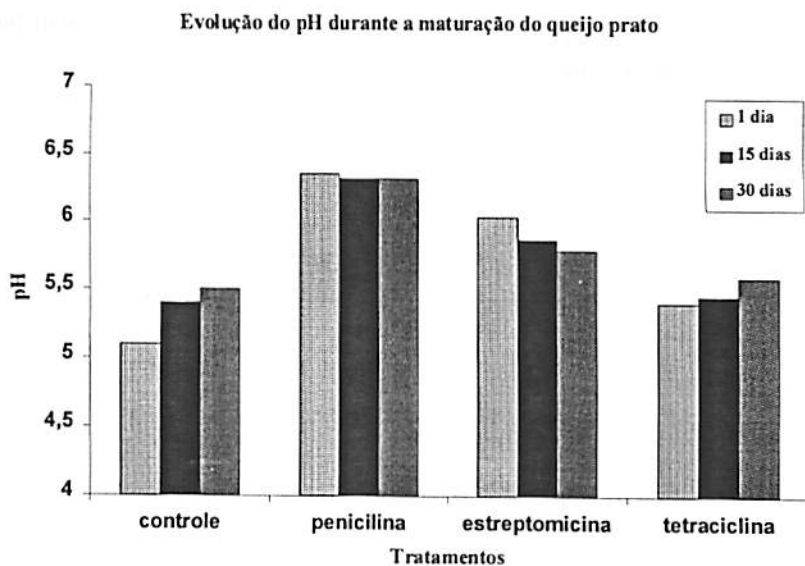


FIGURA 2 Valores médios de pH do queijo prato elaborado na etapa um, em diferentes períodos de maturação.

Evolução do pH durante a maturação do queijo prato

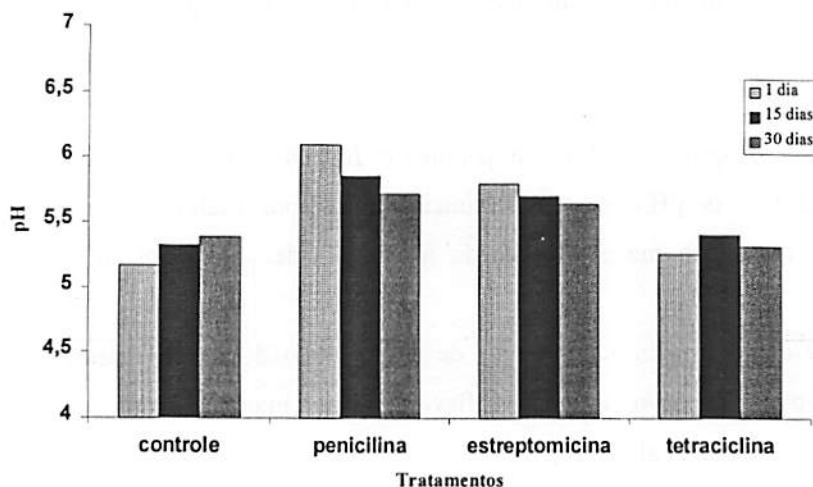


FIGURA 3 Valores médios de pH do queijo prato elaborado na etapa dois, em diferentes períodos de maturação.

O tratamento controle apresentou evolução tecnicamente normal para o queijo prato, enquanto que os outros tratamentos apresentaram valores mais elevados que o controle, ficando todos acima dos valores tecnicamente aceitáveis.

TABELA 16 Valores médios de pH, obtidos nas duas concentrações.

Concentrações	Tratamentos				Total
	Controle	Penicilina	Estreptomicina	Tetraciclina	
1	5,30 b	6,17 a	6,03 a	5,46 ab	5,74 A
2	5,29 c	5,90 a	5,72 b	5,33 bc	5,56 B
Total	5,29 c	6,04 a	5,87 b	5,39 bc	

Médias seguidas da mesma letra minúscula nas linhas e maiúscula nas colunas não diferem estatisticamente pelo teste de tukey, a 5% de probabilidade.

Houve diferença significativa entre os tratamentos e entre as concentrações utilizadas, tendo a concentração dois afetado menos os valores de pH. O tratamento com penicilina foi o que apresentou valores mais distantes em comparação ao controle, tendo inclusive, na concentração 1, mantido os mesmos valores durante o período de maturação.

Nos queijos com resíduos de estreptomicina, o pH experimentou uma ligeira queda, muito provavelmente em função de grande quantidade de lactose residual. Isso permitiu sua fermentação durante a maturação, fermentação esta ocasionada, provavelmente por outras bactérias que não as do fermento láctico.

A tetraciclina foi o antibiótico que menos afetou o pH, sendo seu comportamento semelhante ao do controle, embora com valores acima dos padrões do queijo prato.

O que se observou nos queijos elaborados com leite contendo resíduos dos antibióticos utilizados foi que o pH se comportou de maneira inadequada, sendo muito elevado no início da maturação, ocorrendo uma ligeira queda durante a maturação, porém, ficando ainda muito superior ao de um queijo prato normal que, segundo Furtado & Lourenço Neto (1994), é de 5,2 a 5,4. Os

queijos contendo resíduos de tetraciclina foram os que obtiveram valores mais próximos aos do controle (Figuras. 2 e 3).

Estes resultados são coerentes com os encontrados por Dunsmore et al. (1985) e Packhan et al. (2001), que observaram inibição na produção de ácidos pelas culturas utilizadas na fabricação de queijo cheddar.

O comportamento do pH nos queijos elaborados com leite contendo resíduos de antibióticos pode ser devido à inibição do crescimento dos microrganismos do fermento, resultando em pouca acidificação, o que favoreceu o desenvolvimento de microrganismos indesejáveis principalmente coliformes, causando estufamento dos queijos. Os queijos ficaram com aspecto inadequado, o que causa prejuízos para a indústria, pois, além de perdas econômicas, ocorre desconfiança do consumidor em relação ao produto e ao fabricante.

Resultados semelhantes foram encontrados por Albuquerque et al. (1996) que observaram a deterioração de queijos por coliformes resistentes à ação de antibióticos, fazendo com que não ocorresse a fermentação pelas cepas selecionadas, acarretando em modificações nas características do produto.

4.4.2 Índice de extensão e profundidade de maturação do queijo prato

A proteólise do queijo é considerada resultante de várias atividades enzimáticas (proteínases, peptidases). Os principais contribuintes são o coalho e as enzimas do fermento láctico (Wolfschoom Pombo & Lima, 1989).

A detecção e a quantificação dos produtos de degradação das proteínas dos queijos são usadas como parâmetros para expressar o índice de maturação, uma vez que a extensão da degradação das proteínas tem implicação direta no desenvolvimento da textura, sabor e aroma da maioria dos queijos maturados, como é o caso do queijo prato (Law, 1987).

Para se estabelecer a qualidade dos queijos distribuídos no mercado, tem sido comumente utilizada a determinação dos índices de extensão e profundidade de maturação e os teores de tirosina e triptofano. Segundo Furtado & Lourenço Neto (1979), o conhecimento desses dados em um queijo permite conhecer a atividade proteolítica do coalho e peptidolítica do fermento, bem como o momento ideal de lançamento do queijo no mercado.

A primeira degradação protéica é feita pelas enzimas do coalho que sofrem grande influência do pH, fato este responsável pelos índices do tratamento controle após 24 horas de fabricação. Após essa primeira proteólise, realizada pelas enzimas do coalho, entram em ação as peptidases do fermento láctico. Os tratamentos com antibióticos tiveram menor extensão de maturação até 30 dias após fabricação, não havendo diferença entre os antibióticos nem entre as concentrações.

Os índices de extensão de maturação obtidos durante a maturação dos queijos encontram-se na Tabela 17.

TABELA 17 Valores médios de extensão de maturação, dos queijos prato elaborados com leite adicionado ou não de antibióticos em duas concentrações

Tempo	Tratamentos				Total
	Controle	Penicilina	Estreptomomicina	Tetraciclina	
1	10,89 a	10,25 b	9,66 c	9,33 c	10,03 C
2	14,05 a	12,35 b	12,33 b	12,72 b	12,86 B
3	16,42 a	14,54 c	14,54 c	15,17 b	15,17 A
Total	13,78 a	12,38 b	12,18 b	12,41 b	

Médias seguidas da mesma letra minúscula nas linhas e maiúscula nas colunas não diferem estatisticamente, pelo teste de tukey, a 5% de probabilidade.

Os dados relativos ao tratamento controle variaram de 10,80% a 16,30% na etapa 1 e de 10,83% a 16,40% na etapa 2, no período de 1 a 30 dias de maturação.

Os valores encontrados são próximos aos observados por outros autores. Oliveira (2001) encontrou valores de 8,91% a 15,36% avaliando queijo prato de 1 a 40 dias de maturação. Baldini et al. (1998), estudando proteólise em queijo prato durante 40 dias de maturação, observaram valores de 10,67% a 14,89%. Alves et al. (1999) encontraram o valor de extensão de maturação de 17,80% em queijo prato com 50 dias de maturação.

Após a atuação do coalho sobre as proteínas com geração de peptídeos de menor peso molecular, as peptidases do fermento láctico atuam sobre esses gerando peptídeos de peso molecular ainda menor, chegando a nitrogênio não protéico (NNP). Dessa forma, quaisquer substâncias ou outros fatores que inibem o desenvolvimento microbiano afetam diretamente a formação de NNP e, conseqüentemente, a profundidade de maturação.

Os índices de profundidade de maturação obtidos durante a maturação dos queijos encontram se na Tabela 18

TABELA 18 Valores médios de profundidade de maturação, dos queijos prato elaborados com leite adicionado ou não de antibióticos em duas concentrações

Tempo	Tratamentos				Total
	Controle	Penicilina	Estreptomina	Tetraciclina	
1	8,67 a	8,52 a	8,35 a	8,38 a	8,48 C
2	11,81 a	9,97 c	10,33 bc	10,47 b	10,64 B
3	12,85 a	10,40 c	10,78 bc	11,33 b	11,34 A
Total	11,11 a	9,63 c	9,82 bc	10,06 b	

Médias seguidas da mesma letra minúscula nas linhas e maiúscula nas colunas não diferem estatisticamente, pelo teste de tukey, a 5% de probabilidade.

Houve diferença significativa entre o tratamento controle e os demais, não tendo a concentração utilizada influenciado nos resultados

Baldini et al (1998) e Oliveira (2001), avaliando proteólise em queijo prato durante 40 dias de maturação, encontraram valores de 8,17% a 16,43% e 7,89% a 12,75%, respectivamente.

Os valores médios de extensão e profundidade de maturação observados para os queijos produzidos com leite isento de resíduos (controle) foram superiores aos encontrados nos demais tratamentos. A menor proteólise nos queijos elaborados com leite contendo resíduos dos antibióticos utilizados pode ser em função de menor atividade do coalho que é o principal agente proteolítico na primeira fase do processo e menor atividade dos microrganismos do fermento, devido ao alto valor de pH encontrado nesses queijos.

4.4.3 Tirosina e Triptofano

Os teores de tirosina e triptofano são usualmente considerados como bons índices de maturação dos queijos maturados (Vakaleris & Price, 1959).

TABELA 19 Valores médios de tirosina, obtidos durante o período de maturação dos queijos prato elaborados com leite adicionado ou não de antibióticos em duas concentrações

Tempo	Tratamentos				Total
	Controle	Penicilina	Estreptomicina	Tetraciclina	
1	28,93 a	23,13 c	22,28 c	26,09 b	25,11 C
2	46,24 a	31,11 c	34,94 b	33,70 bc	36,49 B
3	73,35 a	58,38 bc	55,80 c	60,66 b	62,05 A
Total	49,51 a	37,54 c	37,67 c	40,15 b	

Médias seguidas da mesma letra minúscula nas linhas e maiúscula nas colunas não diferem estatisticamente, pelo teste de tukey, a 5% de probabilidade.

Houve aumento linear nos teores de tirosina em função da idade de maturação dos queijos. Observou-se diferença significativa entre o tratamento controle e os demais, tendo a tetraciclina sido o antibiótico que menos afetou os teores de tirosina. Não houve diferença significativa entre as concentrações utilizadas.

O aumento nos teores de tirosina durante a maturação pode ser explicado pela ação das peptidases do fermento láctico sobre os peptídeos liberados pela ação do coalho principalmente, formando mais aminoácidos e compostos de baixo peso molecular.

Nos queijos elaborados com leite contendo resíduos de antibióticos, os teores de tirosina foram inferiores aos do tratamento controle em todo o período de maturação, o que pode ser explicado pela menor atividade do fermento.

Os teores de triptofano obtidos durante a maturação dos queijos encontram-se na Tabela 20. Houve diferença significativa entre o tratamento controle e os demais. Não houve diferença entre os antibióticos utilizados não tendo a concentração influenciado nos resultados.

TABELA 20 Valores médios de triptofano, obtidos durante o período de maturação dos queijos prato elaborados com leite adicionado ou não de antibióticos em duas concentrações

Tempo	Tratamentos				Total
	Controle	Penicilina	Estreptomina	Tetraciclina	
1	50,26 a	43,00 b	44,89 b	48,65 ab	46,70 C
2	55,06 a	50,54 b	52,08 b	51,81 b	52,37 B
3	59,52 a	56,04 b	55,10 b	55,07 b	56,43 A
Total					

Médias seguidas da mesma letra minúscula nas linhas e maiúscula nas colunas não diferem estatisticamente, pelo teste de tukey, a 5% de probabilidade.

Observou-se que, em todos os tratamentos utilizados, no final do período de maturação, os teores de tirosina foram mais elevados que os de triptofano, concordando com os dados obtidos por Baldini et al. (1998). Fernandez del Pozo et al. (1992) encontraram comportamento semelhante nos teores de tirosina e triptofano do queijo La Serena.

Pacciulli (1996), avaliando proteólise em queijo gorgonzola encontrou teores de tirosina mais elevados que os de triptofano em todos os períodos de maturação.

4.4.4 Presença de resíduos de antibióticos no queijo

Os dados referentes à concentração de resíduos dos antibióticos durante a maturação dos queijos elaborados nas duas etapas do experimento se encontram nas Tabelas 21 e 22.

TABELA 21 Concentração média* de penicilina encontrada nos queijos durante o período de maturação

	PENICILINA (UI/mL)			
	Etapa 1		Etapa 2	
	ϕ halo (cm)	Concentração	ϕ halo (cm)	Concentração
1 dia	1,48	0,93	1,00	0,50
15 dias	1,09	0,61	0,80	0,36
30 dias	0,87	0,41	0,60	0,19

*média obtida de três observações

TABELA 22 Concentração média* de estreptomicina encontrada nos queijos durante o período de maturação

	ESTREPTOMICINA ($\mu\text{g/mL}$)			
	Etapa 1		Etapa 2	
	ϕ halo (cm)	Concentração	ϕ halo (cm)	Concentração
1 dia	0,20	0,25	0,16	0,12
15 dias	0,15	0,097	0,13	0,045
30 dias	0,13	0,045	0,12	0,019

*média obtida de três observações

De acordo com os dados das Tabelas 21 e 22, observa-se que a quantidade de resíduos nos queijos é inferior à quantidade encontrada no leite, pois a maior parte dos resíduos passou para o soro (Tabela 8). Porém, mesmo em pequenas quantidades, a presença de resíduos causou alterações nas características físico químicas, coagulação, rendimento, atividade do fermento, microbiota e aspecto dos queijos. Essas alterações prejudicam a indústria devido à necessidade de descarte de produtos e rejeição do consumidor, prejudicando a imagem do produto e do fabricante; além disso, deve-se ressaltar que em caso de pessoas sensíveis, pequenas quantidades são suficientes para causar danos à saúde. Observou-se também que, durante o período estudado houve redução nas concentrações de resíduos de penicilina e estreptomicina, o que pode ser devido à degradação dos antibióticos pelo microrganismo, causando alterações bioquímicas, tais como inativação de substância por enzima penicilinase que destrói o anel betalactâmico presente nas penicilinas; modificação da droga por enzimas aminoglicosidasas produzidas pelo microrganismo resistente e alteração do sítio ativo da droga no agente bacteriano (Tavares, 1996). Pelo método utilizado, não se detectou a presença de tetraciclina nos queijos.

4.5 Pesquisa de microrganismos no queijo prato

4.5.1 Pesquisa de enterobactérias e bactérias lácticas em queijos prato fabricados com leite adicionado ou não de antibióticos

Os resultados da análise de enterobactérias feita nos queijos fabricados com leite adicionado ou não de antibiótico estão descritos na Tabela 23.

TABELA 23 Número de enterobactérias presentes em queijos fabricados com leite adicionado ou não de antibiótico.

Tratamento	Contagem UFC/g		
	24 horas	15 dias	30 dias
Controle (T1)	$3,8 \times 10^1$	0	0
Penicilina (T2)	$2,9 \times 10^6$	$3,1 \times 10^6$	$3,5 \times 10^6$
Estreptomicina (T3)	$2,1 \times 10^4$	$3,1 \times 10^4$	$1,9 \times 10^4$
Tetraciclina (T4)	$3,2 \times 10^4$	$2,0 \times 10^3$	$4,2 \times 10^2$

Verifica-se que os queijos fabricados com a adição intencional de antibióticos apresentaram número de enterobactérias mais elevado. Isto ocorreu devido à multiplicação dessas bactérias oriundas do leite que persistiram no queijo. O queijo cujo leite de fabricação foi adicionado de penicilina (T2) apresentou alto grau de multiplicação de enterobactérias, chegando a $3,5 \times 10^6$ UFC/g após trinta dias de maturação. O queijo fabricado com estreptomicina (T3) também apresentou elevado crescimento destas bactérias. Contudo, o queijo fabricado com leite adicionado de tetraciclina manteve-se com contaminação baixa se comparado aos queijos adicionados de outros antibióticos. É interessante notar o decréscimo na concentração de bactérias no decorrer da maturação, diminuindo duas unidades logarítmicas, passando de 10^4

UFC/g para 10^2 UFC/g após trinta dias de maturação, nos queijos contendo resíduos de tetraciclina. Esta diminuição pode ser devido à perda da atividade antimicrobiana do antibiótico empregado pois a tetraciclina complexa-se com cálcio (Chen & Chang, 1994) e grande parte é perdida no soro (Tabela 8). Com isto ocorre multiplicação mais acentuada dos microrganismos do fermento (Tabela 24), sendo essa diferença de ± 4 ciclos logarítmicos quando comparado com a penicilina e ± 1 ciclo logarítmico para estreptomicina. A maior multiplicação do fermento inibe a proliferação das enterobactérias pela produção de compostos inibidores, como ácidos, dentre eles o láctico ou devido ao sistema lactoperoxidase (junção do tiocianato + peróxido de hidrogênio) (Wolfson & Summer, 1993; Furtado, 1994; Seifu et al. 2003).

TABELA 24 Contagem das bactérias lácticas do fermento em meio MRS dos queijos fabricados com leites adicionados e não adicionados de antibióticos.

Tratamento	Contagem UFC/g		
	24 horas	15 dias	30 dias
Controle (T1)	$1,2 \times 10^{11}$	$6,7 \times 10^{10}$	$1,65 \times 10^{11}$
Penicilina (T2)	$1,1 \times 10^5$	$2,2 \times 10^4$	$9,3 \times 10^4$
Estreptomicina (T3)	$1,0 \times 10^7$	$4,7 \times 10^7$	$1,3 \times 10^7$
Tetraciclina (T4)	$3,8 \times 10^8$	$5,3 \times 10^8$	$8,6 \times 10^8$

Na Tabela 24 pode-se notar elevada contagem de bactérias lácticas oriundas do fermento presentes no queijo sem adição dos antibióticos. Confrontando os resultados obtidos para bactérias lácticas com o número de enterobactérias obtidas para o mesmo tratamento (Tabela 23) pode-se afirmar

que neste queijo houve menor multiplicação de enterobactérias. Isto foi devido a vários fatores, tais como a produção de ácidos, dentre eles ácido lático que pode promover abaixamento do pH. Isto pôde ser observado no queijo isento de antibiótico o qual atingiu pH de 5,2 a 5,4 durante o período de maturação ou mesmo à ação específica do próprio ácido na inibição do crescimento bacteriano, pois o abaixamento do pH auxilia na ação do ácido lático sobre o microrganismo causando inibição do metabolismo normal da célula microbiana indesejável, inibindo sua multiplicação (Franco & Landgraf, 2001); também pode-se inferir sobre a inibição pelo sistema lactoperoxidase formado no leite pela ação das bactérias lácticas, que produzem pequenas quantidades de peróxido de hidrogênio capazes de ativar o sistema (Wolfson & Summer, 1993; Bousouel et al., 2000; Seifu et al., 2003)

A inibição do fermento pelos antibióticos é marcante nos queijos em que houve a adição de penicilina (2,5UI). O número de bactérias lácticas neste queijo foi, em média, $7,5 \times 10^4$ UFC/g, valor baixo se comparado ao controle, ficando na ordem de $1,1 \times 10^5$ UFC/g com 24 horas de fabricação, concentração microbiana muito abaixo da normatizada pela legislação, 10^9 UFC/g (Brasil,2002). A inibição por penicilina também foi observada por Champagne (1992) que observou a inibição de *Lactococcus lactis* após adição de 0,3 UI de penicilina e três horas de fermentação. Com relação à estreptomicina, a inibição do fermento foi menor do que aquela causada pela penicilina. Após 24 horas de fabricação, obteve-se $1,0 \times 10^7$ UFC/g, de bactérias lácticas, porém a multiplicação foi reduzida se comparada ao controle. A inibição do fermento pela tetraciclina foi menor comparando-se com os dois outros antibióticos. Após 24 horas de fabricação, o número de bactérias lácticas encontradas foi de $3,8 \times 10^8$ UFC/g, e após 30 dias, a fabricação já atingia níveis altos de bactérias lácticas na ordem de $8,6 \times 10^8$ UFC/g, porém ,abaixo do controle.

Segundo Fagundes & Molin (1988) os antibióticos inibem fortemente os fermentos lácticos, que são muito sensíveis, havendo desenvolvimento excessivo de coliformes e estafilococos, uma vez que no leite normal os coliformes teriam seu desenvolvimento limitado pelo fermento.

A resistência desses microrganismos é ressaltada por Furtado (1990), o qual cita que as bactérias do grupo coliforme são sete vezes mais resistentes a antibióticos que aquelas do fermento láctico mesofílico; no caso do leite contendo pequenas concentrações de penicilina, a cultura láctica será parcial ou totalmente inativada, porém os coliformes sobreviverão causando o estufamento dos queijos, o que pode ser observado nos queijos fabricados com leite contendo resíduos de penicilina e estreptomicina (Figura 4).

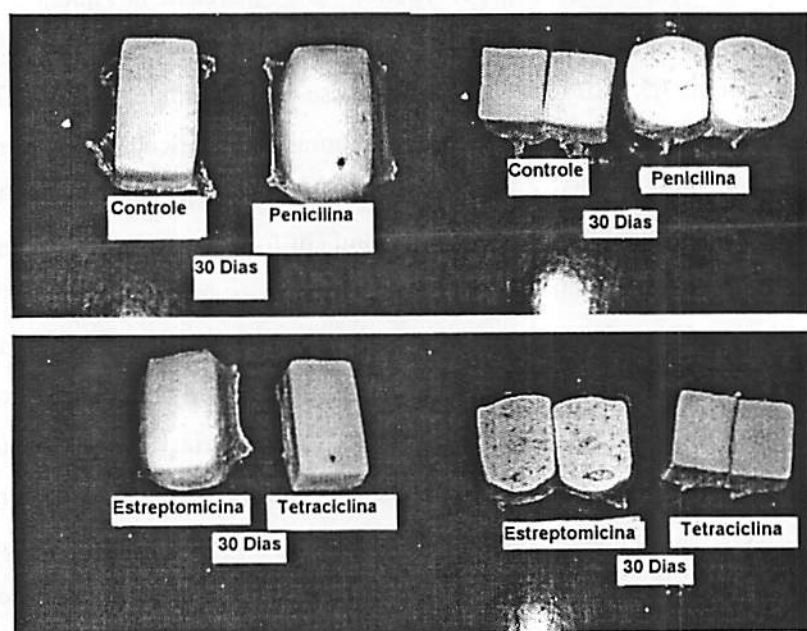


FIGURA 4 Fotografia dos queijos prato inteiros e partidos aos trinta dias de maturação

Considerando que dentro da família Enterobacteriaceae estão vários patógenos entéricos incluídos, os resultados obtidos caracterizam situação de risco potencial, tendo em vista a inter-relação entre bactérias desta família e as possíveis ocorrências de patógenos entéricos. Estes dados mostram que pequena população microbiana pode ser aumentada pela adição de antibióticos que mudarão a microbiota normal do queijo, aumentando o risco de ocorrência de toxinfecções pelo produto.

As espécies mais comumente encontradas nos queijos, pertencentes à família *Enterobacteriaceae*, estão relacionadas na Tabela 25.

TABELA 25 Porcentagem de espécies de enterobactérias isoladas em VRB.

	Controle	Penicilina	Estreptomina	Tetraciclina
<i>Enterobacter cloacae</i>	25,00%	35,71%	58,62%	30,43%
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	0%	9,52%	31,03%	8,70%
<i>Enterobacter sakazaki</i>	25,00%	38,10%	3,45%	43,48%
<i>Enterobacter amnigenus</i>	37,50%	2,38%	3,45%	0%
<i>Enterobacter aerogenes</i>	0%	2,38%	0%	0%
<i>Klebsiella oxytoca</i>	0%	2,38%	0%	0%
<i>Enterobacter intermedius</i>	0%	2,38%	3,45%	0%
<i>Cedecea neteri</i>	0%	2,38%	0%	0%
<i>Escherichia hermani</i>	12,50%	0%	0%	8,70%
<i>Enterobacter aglonerans</i>	0%	2,38%	0%	8,70%
<i>Serratia massem</i>	0%	2,38%	0%	0%

As bactérias da família Enterobacteriaceae identificadas nos queijos não apresentam grande risco à saúde do consumidor. Porém, algumas espécies, como *Klebsiella pneumoniae* podem ser responsáveis por infecções como pneumonia, septicemia e infecções do trato urinário e normalmente são encontradas em leite mastítico ou que sofreu tratamento térmico inadequado (El-Sukhon, 2003). Além disso, as bactérias pertencentes a esta família interferem muito nos

aspectos físicos do queijo, causando grande produção de gás, com conseqüente estufamento dos queijos, tornando a sua aparência do queijo desagradável.

4.5.2 Pesquisa de *Staphylococcus* coagulase positiva

A Tabela 26 mostra os resultados médios nas contagens totais de *Staphylococcus* sp e *Staphylococcus* coagulase positiva oriundos dos queijos fabricados com leite adicionados ou não de antibióticos. Dentre os 212 isolados um total de 37% foi classificado como plasma coagulase positiva.

TABELA 26 Contagem de *Staphylococcus* sp e *Staphylococcus* coagulase positiva em meio BP, em queijos elaborados com leite adicionado ou não de antibiótico.

Tratamento	Contagem UFC/g					
	24 horas		15 dias		30 dias	
	sp*	cp**	sp	cp	sp	cp
Controle (T1)	$1,9 \times 10^2$	0	0	0	0	0
Penicilina (T2)	$2,7 \times 10^7$	$1,04 \times 10^5$	$5,7 \times 10^6$	$5,7 \times 10^6$	$1,7 \times 10^5$	$1,7 \times 10^5$
Estreptomicina (T3)	$1,4 \times 10^5$	$1,40 \times 10^3$	$1,6 \times 10^4$	$1,6 \times 10^3$	$5,1 \times 10^4$	$5,2 \times 10^2$
Tetraciclina (T4)	$1,8 \times 10^4$	$1,82 \times 10^2$	$1,6 \times 10^3$	$1,6 \times 10^1$	$2,5 \times 10^4$	$2,5 \times 10^2$

*sp : *Staphylococcus* sp

**cp: *Staphylococcus* coagulase positiva

A contagem total média de microorganismos (UFC/g) foi bastante elevada quando adicionou-se antibiótico ao leite destinado à fabricação dos queijos. Estes microrganismos podem ter diversas origens. É importante salientar que as portarias do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento não estabelecem padrão para contagem de *Staphylococcus* em queijo, apenas os

coagulase positivas estão relacionados na portaria. Entretanto sabe-se que o crescimento destas bactérias em altos níveis em alimentos é extremamente perigoso, pois dentro deste gênero pode-se encontrar espécies produtoras de enterotoxinas termoestáveis (Bergdoll, 1991).

Os *Staphylococcus* coagulase positivas são em sua grande maioria produtores de enterotoxinas, e quando presentes nos alimentos (queijo) podem sintetizar toxinas principalmente se estiverem em contagem elevada. Resultados obtidos em outros trabalhos mostram que níveis acima de 10^3 a 10^4 UFC/g ou mL apresentam riscos crítico à saúde pública (ICMSF, 1998). A grande proliferação destes microrganismos parece também estar relacionada com a inibição do fermento pelo antibiótico o que pode ser notado quando comparado o valor encontrado para o queijo fabricado com adição de antibióticos e o isento. Esta grande incidência pode ser devido à presença de cepas produtoras de penicilinase ou aminoglicosidase que degradam o antibiótico, promovendo o aumento de outras espécies desta e outras bactérias ou pela elevação da concentração de algum metabólito que antagonize a droga inibidora (Tavares, 1996).

5 CONCLUSÕES

Nas condições experimentais utilizadas, os resultados obtidos permitem concluir que:

- Nas concentrações utilizadas, a presença de resíduos dos três antibióticos em estudo afetou negativamente a qualidade dos queijos, prolongando o tempo de coagulação e ocasionando queda no rendimento.
- As características físico-químicas dos queijos foram alteradas pela presença de resíduos, os queijos apresentaram menores teores de proteína, gordura e sólidos totais e alta concentração de sal.
- Os queijos elaborados com leite contendo resíduos de antibióticos apresentaram menores índices de extensão e profundidade de maturação e teores de tirosina e triptofano inferiores aos do tratamento controle em todo o período de maturação.
- A presença de resíduos causou alterações no pH dos queijos levando a um grande desenvolvimento de microrganismos indesejáveis e redução no desenvolvimento do fermento.
- A penicilina foi o antibiótico que mais afetou o desenvolvimento do fermento e as características do queijo.
- A maior parte dos resíduos passou do leite para o soro e a quantidade retida nos queijos reduziu durante o período de maturação.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABREU, L.R. **Efeitos dos diferentes níveis de nitrato de sódio adicionado ao leite, nos teores de nitrato e nitrato do soro e do queijo prato ao longo da maturação.** Lavras, ESAL. 1986. 89p. (Tese - Mestrado em Ciência dos Alimentos)
- ADESIYUN, A. A.; WEBB, L. A.; BALBIRSINGH, V. Prevalence of antimicrobial residues in preprocessed and processed cow's milk. **Journal of Food safety, Trumbull**, v. 16, n. 4, p. 301-310. Apr. 1997
- ALBUQUERQUE, L. C. de **Dicionário de termos laticinistas.** Juiz de Fora: Concorde, 1994. v. 1, 180 p.
- ALBUQUERQUE, L. M. B.; MELO, V. M. M.; MARTINS, S. C. S. Investigações sobre a presença de resíduos de antibióticos em leite comercializado em Fortaleza-CE **Higiene Alimentar, São Paulo**, v. 10, n. 41, p. 29-32, jan./fev. 1996
- ALVES, N. M.; FURTADO, M. M.; ABREU, L.R. Utilização de leite reconstituído na fabricação de queijo prato. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes, Juiz de Fora**, v. 54, n. 307, p 25-34, mar./abr. 1999.
- ANGEVINE, N. C. Cures for some Cottage cheese problemas. **Cultured Dairy Products Journal, Washinton**, v. 11, n. 2, p. 16-17, 1979.
- ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official methods of analysis.** 12. ed. Washington, 1995. 1094 p.
- AURELI, P.; FERRINI, A. M.; MANNONI, V. Presumptive identification of sulphonamide and antibiotics residues in milk by microbial inhibitor test. **Food Control, Oxford**, v. 7, n. 3, p.156-168, 1996.
- BALDINI, V. L. S.; CAMPOS, S. D. S.; SILVA, A. T. Alterações das características químicas e da textura do queijo tipo prato ao longo do processo de maturação. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes, Juiz de Fora**, v. 53, n. 304, p 53-59, jul./ago. 1998.
- BERGDOLL, H. H. S. *Staphylococcus aureus.* **Journal of AOAC, Galthersburg**, v. 74, n. 4 p. 706-710, July/Aug. 1991.

BISHOP, J. R.; WHITE, C. H. Antibiotic Residue Detection in Milk – A review. **Journal of Food Protection**, Ames v. 47, n. 8, p. 647-652, Aug 1984.

BISHOP, J. R.; BODINE, A. B.; O'DELL, G. D.; JANZER, J. J. Retention data for antibiotics commonly used for bovine infections. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 67, n. 6, p. 437-440, June 1984.

BORGES, S. F.; OLIVEIRA, J. S. O nosso leite de cada dia. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 13, n. 155, p. 3-5, jun. 1988

BOUSSOUEL, N.; MATHIEU, F.; REVOL-JUNELLES, A.; MILLIÈRE, J. B. Effects of combinations of lactoperoxidase system and nisin on the behaviour of *Listeria monocytogenes* ATCC 15313 in skim milk. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v 61, n. 2/3, p169-175, Nov. 2000.

BRADY, M. S.; KATZ, S. E. Antibiotic/Antimicrobial Residues in milk **Journal of Food Protection**, Ames, v. 51, n. 1, p. 8-11, Jan. 1988.

BRASIL. Leis, decretos, etc. **Regulamento de Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal**. RISPOA. Ministério da Agricultura. Instrução Normativa, nº51 de 19 de setembro de 2002.

BRASIL. Secretaria Nacional de Defesa Agropecuária. Laboratório Nacional de Referência Animal. **Métodos analíticos oficiais para controle de produtos de origem animal e seus ingredientes**. II. Métodos físicos e químicos. Brasília, 1981. p. ir.

BRITO, J. R. F.; BRITO, M. A.; VEIGA, V. M. O.; RIBEIRO, M. T. A. A pesquisa sobre mastite bovina na EMBRAPA gado de leite. In: PASSOS, L. P.;

BURT, R.; WELLSTEED, S. Food safety legislation in the dairy industry. **Journal Society Dairy Technology**, Huntington, v. 44, n. 3, p. 80-86, Aug.1991.

CARVALHO, M. M.; CAMPOS, O. F. **Gado de leite: 20 anos de pesquisa**. Juiz de Fora: EMBRAPA –CNPGL, 1997. p. 227-240.

CHAGONDA, L. S.; NDIKUWERA, J. A research note antibiotic residues in milk supplies in Zimbabwe. **Journal of Food Protection**, Ames, v. 52, n. 10, p. 731-732, Oct. 1989

- CHAMPAGNE, C. P. Effect of penicillin on free or immobilized lactococci: milk acidification and residual antibiotic level. *Journal of Food safety*, Trumbull, v. 12, n. 4, p. 327-339, Apr. 1992
- CHEN, H. C.; CHANG, T. C. Detection of penicillin G in milk using a conductimetric method. *Journal of Dairy Science*, Champaign, v. 77, n. 6, p. 1515-1520, June 1994.
- CLAYPOOL, L. L. Symposium: Concerns and problems of milk quality and procurement, processing and manufacturing, storage and marketing, and regulatory compliance of the cheese industry. *Journal of Dairy Science*, Champaign, v. 67, n. 9, p. 2091-2094, Sept. 1984
- COLLINS-THOMPSON, D. L.; WOOD, D. S.; THOMPSON, I. Q. Detection of antibiotic residues in consumer milk supplies in North America using the charm test II procedure. *Journal of Food Protection*, Ames, v. 51, n. 8, p. 632-633, Aug. 1998
- COSTA, E. D. Resíduos de antibióticos no leite: Um risco à saúde do consumidor. *Higiene Alimentar*, São Paulo, v. 10, n. 44, p. 15-17, jul./ago. 1996.
- COVA, W. G. Prática sensitiva de detecção de penicilina no leite. *Higiene Alimentar*, São Paulo, v. 1, n. 3/4, p. 207-212, Set./dez. 1984
- DALLAS, P.; LAGRANGE, V. Aplicações de derivados de soro em produtos lácteos. *Indústria de Laticínios*, São Paulo, v. 2, n. 13, p. 49-51, 1998
- DONNELLY, W. J. Applications of biotechnology and separation technology in dairy processing. *Journal Society Dairy Technology*, Huntingdon, v. 44, n. 3, p. 6772, Aug. 1991.
- DUNSMORE, D. G.; STANNARD, D. J.; HEYES, I. H. Quaternary ammonium compound sanitizers in milk. *New Zealand Journal of Dairy Technology*, Hamilton, v. 13, n. 1, p. 49, 1978.
- DUNSMORE, D. G.; MAKIN, D.; ARKINS, R. Effect of residues of 5 disinfectants in milk on acid production by strains of lactic starters used for Cheddar cheesemaking and on organoleptic properties of cheese. *Journal of Dairy Research*, Cambridge v. 52, n. 2, p. 287-297, May 1985.

EL-SUKHON, S. N. Identification and characterization of klebsiellae isolated from milk and milk products in Jordan. *Food Microbiology*, Amsterdam, v. 20, p. 225-230, 2003.

FAGUNDES, C. M. Persistência de antibióticos no leite bovino e em condições experimentais. *Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes*, Juiz de Fora, v. 36, n. 216, p. 27-30, jul./ago. 1981.

FARAG, A. S. Simultaneous liquid chromatographic analysis of the β -lactam antibiotics in solution. *Journal of AOAC International*, Galthersburg, v. 81, n. 2, p. 381-385, 1998.

FAGUNDES, C. M.; MOLIN, L. Interferência de resíduos de antibióticos no controle de qualidade do leite e derivados. *Informe Agropecuário*, Belo Horizonte, v. 13, n. 155, p. 24-30, jun. 1988.

FERNANDEZ DEL POZO, B.; GAYA, P.; MEDINA, M.; NÚÑEZ, M. Changes in chemical and reological characteristics of La serena ewes milk cheese during ripening. *Journal of Dairy Research*, London, v. 59, n. 2, p. 217-224, May 1992.

FLETOURIS, D. J.; PSOMAS, J. E.; MANTIS, A. J. Determination of some monobasic penicilins in milk by ion-par liquid chromatography. *Journal of agricultural and Food Chemistry*, Washington, v. 40, n. 4, p. 617-621, Apr. 1992

FLETOURIS, D. J.; PSOMAS, J. E.; BOTSOGLOW, N. A. Traca analysis of oxytetracycline and tetracycline in milk by HPLC. *Journal of agricultural and Food Chemistry*, Washington, v. 38, n. 10, p. 1913-1917, Oct. 1990.

FRANCO, B.D.G.M.; LANDGRAF, M. *Microbiologia dos alimentos*, 1. ed. São Paulo. Atheneu, 2001. 182p.

FURTADO, M. M. *A arte e a ciência do queijo*. 2. ed. São Paulo: Globo, 1990. 297 p.

FURTADO, M. M. *Principais problemas dos queijos Causas e Prevenção*. São Paulo: Fonte 1999. 176 p.

FURTADO, M. M.; LOURENÇO NETO, J. P. de M. *Tecnologia de queijos: manual técnico para a produção industrial de queijos*. São Paulo: Dipemar, 1994. 118 p.

- FURTADO, M. M.; LOURENÇO NETO, J. P. de M. Estudo rápido sobre a composição média dos queijos prato e minas no mercado. *Revista boletim do leite e seus derivados*, Rio de Janeiro, n. 605, v. 1, p. 4-38, mar 1979.
- FURTADO, M. M. ; WOLFSCHOON-POMBO, A. F.; VENTURA, R. F. Pasteurização do leite por efeitos de vapor: considerações sobre a diluição do leite e rendimento da fabricação do queijo prato. *Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes*, Juiz de Fora, v. 43, n. 256, p. 3-10, mar./abr. 1988.
- FURTADO, M. M.; WOLFSCHOON-POMBO, A. F. Fabricação de queijo prato em minas: estudo do rendimento. Parte I - Determinação das cifras de transição. *Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes*, Juiz de Fora, v. 34, n. 205, p. 3-9, set./out. 1979.
- GELINAS, P.; GOULET, J. Effect of low concentrations of eight disinfectants on a Cheddar cheese starter. *Lait*, Paris, v. 62, n. 621, p. 660-670, 1982.
- GLEESON, P. A. Challenges for dairy farmers in the 1990. *Journal Society Dairy Technology*, Huntingdon, v. 44, n. 3, p. 86-89, Aug. 1991.
- GRIPON, J. C. Mould-ripened cheeses. In: FOX, P. F. *Cheese chemistry, physics and microbiology*. London: AVI Publishing, 1987. v. 2, Cap. 4, p. 121-149.
- GUILLOT, P.; SANDERS, P.; MOUROT, D. Chloramphenicol and oxytetracycline residues in milk and tissues from cows and bullocks treated with na injectable formulation *Food Aditives and Contaminants*, London, v. 6, n. 4, p. 467-473, Oct./Dec. 1989
- HAWRONSKY, J. M.; ADAMS, M. R.; KYRIAKIDES, A. L. Rapid detection of antibiotics in raw milk by ATP bioluminescence *Journal of Dairy Technology*, Huntingdon, v. 46, n. 1, p. 31-33, Feb. 1993
- INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION SPECIAL - IDFS. *Monograph on residues and contaminantes in milk products*. Belgica: IDF, 1991. 189 p.
- INTERNACIONAL COMMISSION MICROBIAL SPECIFICATION FOR FOODS – ICMSF. *Microorganismsin foods*. 2. ed. Toronto: University of Toronto, 1982. 436 p.

INTERNATIONAL COMMISSION ON MICROBIOLOGICAL SPECIFICATIONS FOR FOODS OF THE INTERNATIONAL UNION OF BIOLOGICAL SOCIETIES (ICMSF). Microbiologia de los alimnetos: características de los patógenos microbianos. Zaragoza: Acriba, 1998. 606 p.

KANEENE, J. B.; AHL, A. S. Drug residues in dairy cattle industry. Epidemiological evaluation of factors influencing their occurrence. Journal of Dairy Science, Champaign, v. 70, n. 10, p. 2176-2180, Oct. 1987.

KATZ, S. G. Antibiotic residues and their significance. In: Antimicrobials in foods. Nova York: Marcell Dekker, 1983. p. 353-370.

KENNEDY, D. G.; McCracken, P. J.; Cannavan, A.; Hewitt, S. A. Use of liquid chromatography mass spectrometry in the analysis of residues of antibiotics in meat and milk. Journal of Chromatography, Amsterdam, v. 812, n. 1/2, p. p. 77-98, July 1998.

KHATOON, J. A.; HOSSAIN, M. A.; JOSHI, V. K. Biochemical changes during ripening of cheddar cheese made from cow and goat milk. Milchwissenschaft, Cork, v. 45, n. 7, p. 436-439, July 1990

KIJAK, P. J. Liquid Chromatographic Determination of Ivermectin in Bovine Milk Interlaboratory Study. Journal of AOAC International, Gaithersburg, v. 75, n. 4, 747-50, July/Aug. 1992.

KOSIKOWSKI, F. Cheese and fermented milk foods. 2. ed. Edwards: Ann Arbor, 1977. 711 p.

KOZACHA, L. G. Method for determination of antibiotics in milk is established. Molochnaya Promyshlennost, Moskva, n. 3, 17-18, 1979.

LAW, B. A. Proteolysis in relation to normal and accelerated cheese ripening. In: FOX, P. F. (Ed.). Cheese: chemistry, physics and microbiology general aspects. London: Elsevier Applied Science, 1987. v. 1, p. 365-400

LIMSOWTIN, G. Inhibition of starter cultures. Australian Journal of Dairy Technology, Melbourne, v. 47, n. 2, p. 100-102, 1992

LONG, A. R.; LILY, C.; HSIEN, M. S. STEVEN, A. B. Matrix solid-phase dispersion (MSPD) isolation and liquid chromatographic determination of oxytetracycline, tetracycline and clortetracyclin Journal of Association of Analytical Chemistry, Galthersburg v. 73, n. 3, p. 379-384, May/June 1990

- MANOLKIDIS, K. S.; ALICHANIDIS, E. S.; VARVOGLIS, A. G. Effects of some antibiotics on the milk phosphatase pasteurization test. *Journal of Dairy Science*, Champaign, v. 54, n. 3, p. 335-339, Mar. 1971
- McEWEN, S. A.; BLACK, W. D.; MEEK, A. H. Antibiotic residues prevention methods, farm management and occurrence of antibiotics in milk. *Journal of Dairy Science*, Champaign, v. 74, n. 7, p. 2128-2137, July 1991.
- MELO FILHO, A. Penicilina no leite de consumo na cidade de São Paulo e riscos de sensibilização. *Revista Paulista de Medicina*, São Paulo, v. 25, p. 21-34, 1969.
- MILLER, D. D.; ELIKER, P. R. Effect of quaternary ammonium compounds on activity of lactic acid starter bacteria in milk and cheese. *Journal of Dairy Science*, Champaign, v. 34, n. 3, p. 279-285, Mar. 1951.
- MINIUSSI, J. T. Resíduos de medicamentos veterinários em alimentos de origem animal. In: CHARLES, T. P.; FURLONC, J. (Ed.). *Doenças de bovinos de leite adultos*. Coronel Pacheco: EMBRAPA-CNPGL, 1992. p. 169-174
- NASCIMENTO, G. G. F.; MAESTRO, V.; CAMPOS, M. S. P. Ocorrência de resíduos de antibióticos no leite comercializado em Piracicaba-SP. *Revista de Nutrição*, Campinas, v. 14, n. 2, p. 119-124, maio/ago. 2001.
- OLIVEIRA, P. R. S. **Rendimento e proteólise do queijo prato elaborado com leite pasteurizado pelo sistema a placas e injeção direta de vapor.** 2001. 67 p. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.
- OLIVEIRA, A. J.; CARUSO, J. C. B. Leite: características, composição química, propriedades, obtenção higiênica, conservação e tratamento. In: CAMARGO, R. et al. (Ed). *Tecnologia de produtos agropecuários*. São Paulo: NOBEL, 1984. p. 191-203
- PACIULLI, S. O. D. **Proteólise em queijo tipo gorgonzola, elaborado com leite pasteurizado pelos sistemas HTST e ejetor de vapor.** 1996. 79 p. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

PACKHAN, W.; BROOME, M. C.; LIMSOWTIN, G. K. Y.; ROGINSKI, H. Limitations of standard antibiotic screening assays when applied to milk for cheesemaking. *Australian Journal of Dairy Technology*, Melbourne, v. 56, n. 1, p. 15-18, Apr. 2001

PEARCE, L. E. Quaternary ammonium detergent sanitizers and starter activity. *New Zealand Journal of Dairy Science*, Palmerston North, v. 13, n. 1, p. 56-58, 1978.

PELCZAR, J. M.; CHAN, E. *Microbiologia*. V. 2 São Paulo. Makron Books.1997. 524p.

PORTO, C. R.; ANSELMO, M. S.; TIMM, C. D. Ocorrência de resíduos de antibióticos beta lactâmicos no leite entregue à indústria na região sudeste do Rio Grande do Sul. CONGRESSO NACIONAL DE LATICÍNIOS, 19., 2002, Juiz de Fora. *Anais... Juiz de Fora, 2002. Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes*, Juiz de Fora, v. 57, n. 327, p 313-316, jul./ago. 2002.

SANTOS, E. C. dos Presença de inibidores no leite fresco e suas consequências *Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes*, Juiz de Fora, v. 40, n. 240, p. 3-16, jul./ago. 1985.

SCHENK, F. GJ.; CALLERY, P. S. Chromatographic methods of analysis of antibiotics in milk. *Journal of chromatography A*, Amsterdam, v. 812, n. 1/2, p. 99-109, July 1998.

SCOTT, R. *Fabricacion de queso*. 2. ed. Zaragoza: Acriba, 1991. 520 p.

SEIFU, E.; BUYS, E. M.; DONKIN, E. F.; Effect of lactoperoxidase system on the activity of mesophilic cheese starter cultures in goat milk. *International Dairy Journal*, Amsterdam, no prelo.

SILVA, T. P. J.; SENA, M. C. Prevalência de antibióticos no leite pasteurizado tipo B e especial 3,2% de gordura consumido em Belo Horizonte. *Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes*, Juiz de Fora, v. 39, n. 235, p 7-12, set./out. 1984

SOKOLOW, W. A. A.; TÉPLY, M.; MEYER, A. *Fabricacion de Productos Lacteos*. Zaragoza: Acribia, 1980. 343 p.

- SOUZA, N. G.; BENEDET, H. D. Ocorrência de resíduos de antibióticos no leite de consumo do Estado de Santa Catarina, Brasil. *Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes*, Juiz de Fora, v. 55, n. 315, p. 156-162, jul./ago. 2000.
- SUDERSHAN, R. V.; BHAT, R. V. A survey on veterinary drug use and residues in milk in Hyderabad. *Food Additives and Contaminants*, Andhra, v. 12, n. 5, p. 645-650, Sept./Oct. 1995.
- TAVARES, W. **Manual de antibióticos e quimioterápicos anti-infecciosos**. 2. ed. São Paulo: Editora Atheneu, 1996. 792 p.
- VAKALERIS, D. G.; PRICE, W. V. Rapid spectrophotometric method for measuring cheese ripening. *Journal of Dairy Science*, Champaign, v. 42, n. 2, p. 264-276, Feb. 1959.
- VENTURA, R. F.; FURTADO, M. M.; WOLFSCHOON, A. F.; LOURENÇO NETO, J. P. de M.; LIMA, A. de. Queijo prato - comparação de fabricação usando leite pasteurizado por sistema de placas e ejetor de vapor. *Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes*, Juiz de Fora, v. 39, n. 235, p. 59-70, set./out. 1984.
- VILELA, S. C. Detecção de resíduos inibidores no leite – método de acidificação do iogurte indicador. *Informe Agropecuário*, Belo Horizonte, v. 10, n. 115, p. 59-60, jul. 1984.
- WOLFSCHOON POMBO, A. F.; LIMA, A. Extensão e profundidade de proteólise em queijo Minas frescal. *Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes*, Juiz de Fora, v. 44, n. 261, p. 50-54, jul./ago. 1989.
- WOLFSON, L. M.; SUMNER, S. S. Antimicrobial Activity of the Lactoperoxidase system: A Review. *Journal Food Protection*, v. 56, n. 10, p. 887-892, Oct. 1993.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Evaluation of certain veterinary drug residues**. Genebra, Suíça, 1990. 131 p. (WHO Technical Report Series, n. 815).
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. **The role of research and information systems in decision-making for the development of human resources for health**. Genebra, Suíça, 1991. (Technical Report Series ; n. 802).

ANEXOS

ANEXO A

		Página
FIGURA 1A	Curva padrão de penicilina	83
FIGURA 2A	Curva padrão de estreptomicina	83
FIGURA 3A	Curva padrão de tetraciclina	84

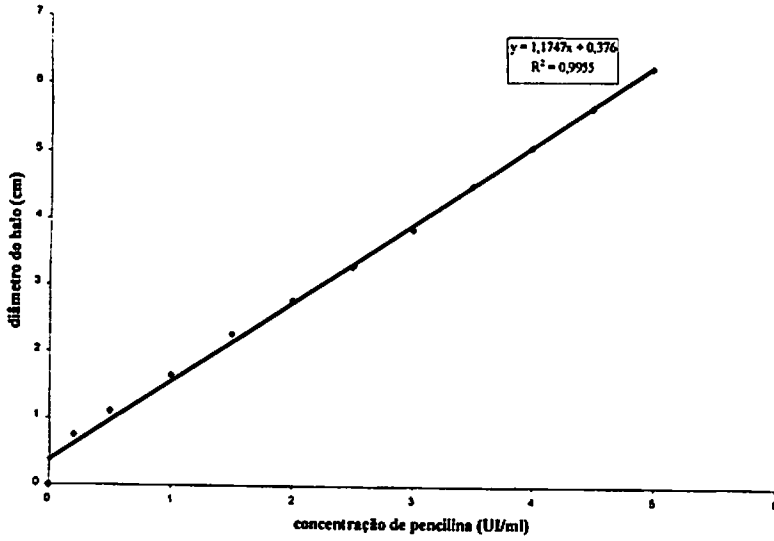


FIGURA 1A Curva padrão de penicilina

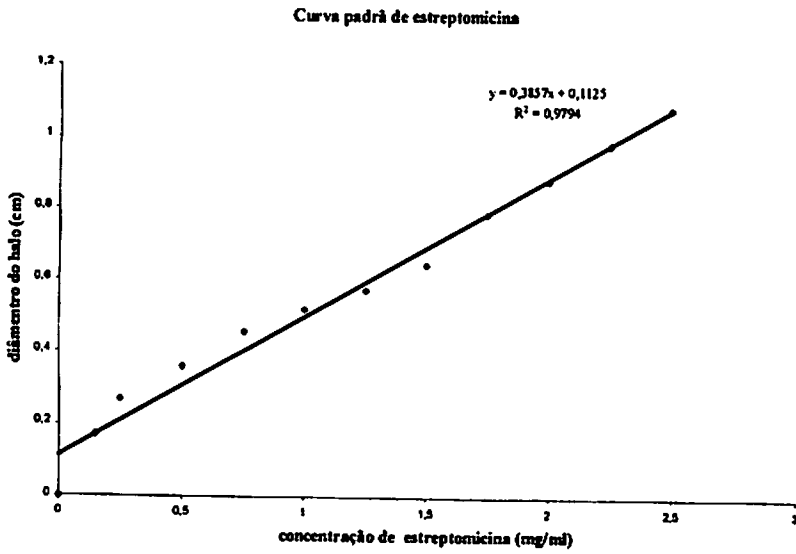


FIGURA 2A Curva padrão de estreptomicina

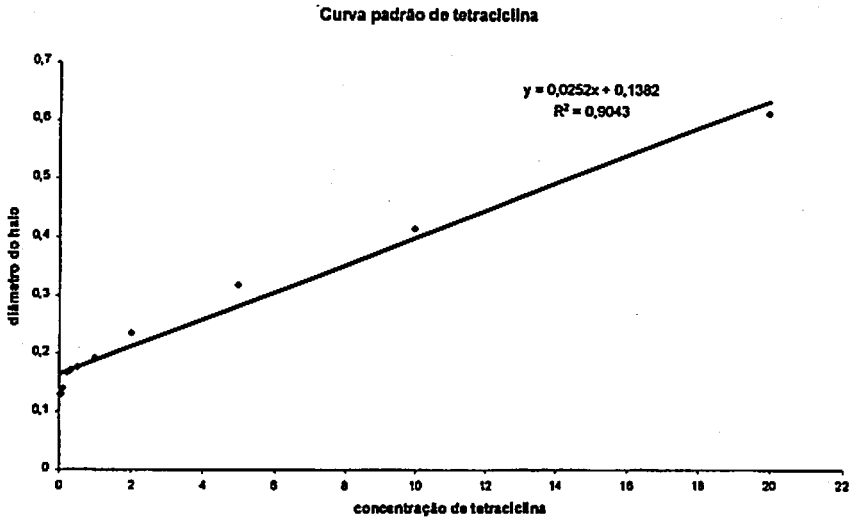


FIGURA 3A Curva padrão de tetraciclina

ANEXO B

	Página
TABELA 1B Resumo da análise de variância de transição de gordura, transição de EST, transição de proteína, coagulação e rendimento dos queijos	86
TABELA 2B Resumo da análise de variância de gordura, pH, EST, proteína e acidez do soro dos queijos	86
TABELA 3B Resumo da análise de variância de pH, extensão de maturação, profundidade de maturação, tirosina e triptofano dos queijos durante o período de maturação.	87

TABELA 1B Resumo da análise de variância de transição de gordura, transição de EST, transição de proteína, coagulação e rendimento dos queijos.

Quadrados Médios						
Causas de variação	GL	Trans. Gordura	Trans. EST	Trans. Proteína	Coagulação	Rendimento
Tratamento	3	48,31**	18,65**	28,35**	84,67**	1,49**
Concentrações	1	41,87**	0,003 ^{ns}	0,0134 ^{ns}	0,00 ^{ns}	0,006**
Trat. X Doses	3	4,97 [†]	1,84 [†]	0,48 ^{ns}	0,44 ^{ns}	0,177**
Resíduo	16	1,11	0,43	0,37	0,75	0,0005
CV(%)		1,39	1,35	0,81	1,92	0,23

ns, não significativo a 5% de probabilidade pelo teste F

* e **, significativo a 5% e 1% de probabilidade pelo teste F, respectivamente

TABELA 2B Resumo da análise de variância de gordura, pH, EST, proteína e acidez do soro dos queijos

Quadrados Médios						
Causas de variação	GL	Gordura	pH	EST	Proteína	Acidez
Tratamento	3	0,074**	0,0024*	0,227**	0,031**	0,26 ^{ns}
Concentrações	1	0,0504**	0,0016 ^{ns}	0,0045 ^{ns}	0,005**	0,042 ^{ns}
Trat. X Doses	3	0,0056 ^{ns}	0,0006 ^{ns}	0,0041 ^{ns}	0,0033**	0,042 ^{ns}
Resíduo	16	0,0021	0,0005	0,0124	0,0006	0,25
CV(%)		4,98	0,34	1,62	2,56	4,07

ns, não significativo a 5% de probabilidade pelo teste F

* e **, significativo a 5% e 1% de probabilidade pelo teste F, respectivamente

TABELA 3B Resumo da análise de variância de pH, extensão de maturação, profundidade de maturação, tirosina e triptofano do queijo prato.

Quadrados Médios						
Causas de variação	GL	pH	EM	PM	tirosina	triptofano
Tratamento (A)	3	2,315**	9,813**	7,92**	575,64**	89,50**
Concentração (B)	1	0,590**	0,020 ^{ns}	0,06 ^{ns}	4,02 ^{ns}	0,041 ^{ns}
Tempo (C)	2	0,133**	159,09**	53,26**	8589,53**	573,76**
A x B	3	0,088**	0,074 ^{ns}	0,07 ^{ns}	2,76 ^{ns}	2,30 ^{ns}
A X C	6	0,126**	0,817**	1,52**	56,01**	13,08**
B X C	2	0,039 ^{ns}	0,023 ^{ns}	0,017 ^{ns}	3,10 ^{ns}	1,35 ^{ns}
A X B X C	6	0,037 ^{ns}	0,0503 ^{ns}	0,015 ^{ns}	2,51 ^{ns}	2,08 ^{ns}
Resíduo	48	0,016	0,069	0,101	2,94	2,21
CV(%)		2,27	2,08	3,13	4,16	2,87

ns, não significativo a 5% de probabilidade pelo teste F

* e **, significativo a 5% e 1% de probabilidade pelo teste F, respectivamente

