

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA

SIMONE CRISTINA COUTINHO

**AVALIAÇÃO DE DESEMPENHO DO MÉTODO MICROBIOLÓGICO
DO TIPO DIFUSÃO EM ÁGAR UTILIZADO NA DETECÇÃO DE
RESÍDUOS DE ANTIMICROBIANOS EM LEITE**

BELO HORIZONTE

2010

Simone Cristina Coutinho

**AVALIAÇÃO DE DESEMPENHO DO MÉTODO
MICROBIOLÓGICO DO TIPO DIFUSÃO EM ÁGAR
UTILIZADO NA DETECÇÃO DE RESÍDUOS DE
ANTIMICROBIANOS EM LEITE**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Microbiologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Microbiologia.

Orientadora: Prof^a Maria Auxiliadora Roque de Carvalho

Co-orientadores: Prof. Luiz de Macêdo Farias

Prof^a Kênia Valéria dos Santos

Colaborador: Rafael Mangerotti Castro Mendonça

Belo Horizonte

2010

AGRADECIMENTOS

- ★ A minha família, meu alicerce: onde estou vocês estão sempre comigo. Amo vocês!
- ★ A Dodora, ao Luiz e a Kênia, pela enorme confiança depositada, oportunidade de fazer parte da família MOA e de desenvolver este projeto e por colaborarem, cada um da sua forma, no que era possível.
- ★ A Ana Carolina, amiga de longa data, por lembrar sempre de mim e me trazer para o laboratório! E também por toda lealdade, carinho, presteza e alegria.
- ★ Ao José Sérgio e a Luzia, pessoas maravilhosas e preciosíssimas, sempre sorridentes e prontas para ajudar. Sem vocês, não sei o que seria de todos nós no MOA!
- ★ À farmacêutica Míriam de Fátima Vianna Leonel e ao Laboratório de Controle de Qualidade do Departamento de Produtos Farmacêuticos da Faculdade da Farmácia da UFMG, por gentilmente cederem duas das amostras de referência cruciais para o desenvolvimento deste trabalho.
- ★ A todo o pessoal do Laboratório de Ecologia e Fisiologia de Microrganismos (LEFM) e do Laboratório de Ecologia e Biotecnologia de Leveduras, pela atenção e prontidão em ajudar.
- ★ A Andrea, do laboratório de Apoio da Pós-Graduação, pela boa vontade e disponibilidade. Sem você, acho que nunca conseguiria ver os meus esporos todos coradinhos de verde, tão lindos!
- ★ Ao Douglas, a Fatinha e todos das secretarias de Graduação e Pós-Graduação do Departamento de Microbiologia que tentavam resolver as questões burocráticas que surgiam.
- ★ À professora Ana Gabriela Reis Solano e Roberto Gonçalves Junqueira, pelas valiosas sugestões.
- ★ Aos professores Luiz Simeão do Carmo e Mônica Maria Oliveira Pinho Cerqueira pela gentileza, disponibilidade e contribuições.
- ★ Às professoras Vera Lúcia dos Santos e Regina Maria Nardi Drummond, pelo apoio, ensinamentos, disposição e incentivo.
- ★ À bibliotecária Ana Paula Martins Oliveira, pela enorme disposição e simpatia. Todos os artigos que você conseguiu para mim foram importantíssimos!
- ★ A João Paulo Lopes de Andrade, companheiro de mestrado, por me aturar esse tempo todo! Por toda ajuda (às vezes tão sutil e anônima), mas grandiosa e sempre tornando até mesmo os dias mais difíceis muito mais leves. Obrigada pela enorme paciência, querido!

- ★ A Carol Valeff: é uma honra ser sua amiga! Divertida, gentil, atenciosa, prestativa... Inúmeras vezes me tranquilizando e botando a mão na massa comigo! Obrigada por toda ajuda e amizade.
- ★ Tássia, amiga querida, sempre tão reconfortante! Quando você dizia “*Eu te entendo, amiga. Também já passei por isso! Você quer que eu te ajude?*”, era ao mesmo tempo um alívio, um ânimo, uma esperança e, claro, a resposta: “*Uai, que dia você pode?*” Além de toda ajuda, sua disponibilidade e sua alegria me fizeram mais feliz todos os dias!
- ★ Natália, amiga fiel, com seu jeitinho bicho-do-mato, correndo, apertada, mas sempre pronta pra me escutar, pra rirmos ou chorarmos juntas sobre as coisas da vida, nem que fosse por cinco segundos. Espero dar muitas gargalhadas com você ainda (menos quando estivermos assistindo seminários...).
- ★ Fê Piló, não esqueço os artigos que você viu, achou que poderiam me servir e separou pra mim (eles estão nas minhas referências), sua calculadora está comigo até hoje, já dormi na sua casa, ri das suas histórias, desabafei e escutei seus desabafos, e ah, aquele sanduíche de pernil no Mineirão estava uma “deelíííícia”, não estava? Que ótimo foi ter a sua companhia!
- ★ Ao Luciano: adoro conversar com você, escutar os seus “casos e acasos” e contar os meus dilemas. Pena que às vezes eu estava tão ocupada, né?
- ★ Renata de Oliveira e Raquel, vocês são tão engraçadas! Ótimo conversar com vocês, de preferência nas nossas confraternizações!
- ★ A todos os colegas de mestrado e do departamento de Microbiologia, obrigada pela companhia agradável e pela torcida.
- ★ Jane e Simone Queiroz, irmãs queridas, hoje cada uma de nós tomou um rumo diferente, e é sempre bom lembrar o quanto vocês me ajudaram. Sei que estaremos sempre juntas!
- ★ Renata (Ingrs, o Fenômeno): entramos praticamente juntas no lab. e já me recebeu com um abraço. E depois, haja suco, iogurte, remedinhos, biscoitinhos, falcons de 50, tubos gordinhos, “*pesa um meio pra mim?*”, e mais lanchinhos e remedinhos... Não vale cobrar, hein! Obrigada por tudo.
- ★ Rafael de Castro Faria, meu primeiro amore no lab., meu chuchu: todo o seu carinho, atenção, companhia e enorme amizade são valiosíssimos para mim! A minha história sem você jamais ficaria completa.
- ★ Ao Diego (Didi Mocó!), pela ajuda na bancada, pelas palavras de incentivo e brincadeiras para me fazer rir!
- ★ Ao João Fernando, por toda ajuda, sempre escutando minhas piadinhas e me ajudando até mesmo nos dias em que estava mais mal-humorado. Ah, já ia esquecendo: “*Oi, Fernando! Você vem sempre aqui?*”

- ★ Érika (Erikít), tão observadora. Quando eu assustava, lá estava você com alguma coisa na mão, que eu mesma ainda nem sabia que precisaria!
- ★ Super Augusto César, o que seria de mim sem as suas caronas mágicas, seus conselhos, frases de encorajamento e toda a sua filosofia?
- ★ A todas as pessoas que conheci no lab. MOA, em especial: Luciana Gaia, Carol Vieira (amiga dos tempos antigos de CEFET...), Patrícia Rangel, Morgana, Renata Barreto, Gabi (minha irmã gêmea), Letícia Silvestre (companheira de FAFAR, futsal e Iniciação Científica), Renato, Luana, Simone Gonçalves, Cristina Magalhães, Cris Dutra, Mireille, Janir (o TTC foi um sucesso!), Patrícia Luciana, Jaqueline, Jamil, Mari e Dani. Todo carinho, atenção, ajuda e torcida significaram muito para mim.
- ★ Valdinha, que missão difícil a sua de tentar me deixar ainda mais bonita, hein? Obrigada pelo carinho e atenção, desde que eu nasci!
- ★ Michelle, Fernandinha (minha amiga solteira!), Pri, Ka, Eliane, Celim, Mariana, Leo Netto, Leo Gonçalves, Thiago, Val e Mel, que mais eu quero da vida, tendo amigos como vocês? Obrigada por existirem e entenderem as mil e tantas vezes que eu não pude estar presente (em corpo físico, porque o coração e a mente estão sempre com vocês!).
- ★ Aos meus mais novos amigos: João Paulo Nunes e Joyce Pedra. Jonnes, meu “miguxo” quase 100% virtual (temos que melhorar isso, hein?), companheiro inigualável nas minhas longas jornadas em frente ao computador, sempre me “tirando do sério”. Joycinha, companheira de 5000km de viagem, minhas férias foram 5000 vezes mais divertidas com você, voltei 5000 vezes mais renovada!
- ★ A todos os amigos e colegas que encontrei pelo caminho, a torcida de vocês foi o meu maior estímulo.
- ★ À Coordenação de aperfeiçoamento de pessoal de nível superior (CAPES), ao Conselho nacional de desenvolvimento científico e tecnológico (CNPq), à Fundação de amparo à pesquisa do estado de Minas Gerais (FAPEMIG) e à Universidade Federal de Minas Gerais pelo suporte financeiro.
- ★ Rafael Mangerotti, amore, podia dizer tantas coisas... Você é: inexplicável; amizade inenarrável; escudeiro fiel; parceiro dos melhores e piores momentos desse último ano inteiro; meu porto seguro; meu cúmplice; minha tranquilidade; minha paz. Por você e com você saímos do controle, extrapolamos limites, sonhamos um sonho impossível, voamos num limite provável e realizamos tudo o que era possível. Brincadeiras mil, muito sono, cansaço físico e mental, agitação, esperança, concentração, conversas rápidas e outras intermináveis... E por aí foram caminhando todos os nossos experimentos: experiências incríveis e inesquecíveis. Cumprimos nossa missão, construímos nossa eterna amizade.

RESUMO

O leite é considerado um alimento quase completo e consumido, universalmente, por indivíduos de todas as faixas etárias. Com o reconhecimento mundial da importância de se controlar os perigos microbiológicos e químicos presentes nos alimentos, a “qualidade” tornou-se requisito imperativo no cenário do agronegócio do leite mundial, sempre visando à segurança e a satisfação do consumidor final. De todos esses perigos químicos, os antimicrobianos são os que maiores implicações apresentam à saúde humana e animal e ao processamento industrial, devido ao seu amplo uso (e até mesmo abuso) na pecuária, seja para fins terapêuticos, profiláticos ou como promotores do crescimento animal. No Brasil, como em outros países, os antimicrobianos são resíduos químicos detectados com bastante frequência no leite. Assim, considerando a relevância dos possíveis impactos à saúde humana e animal e à crescente indústria laticinista nacional, e levando-se em conta a necessidade de se avaliar métodos de triagem eficazes que possam ser validados e adotados oficialmente no País, pretendeu-se, com esse trabalho contribuir para o Monitoramento de Resíduos de Medicamentos Veterinários em Leite no Brasil. A especificidade, a sensibilidade e a aplicabilidade do teste de triagem de inibição de *Bacillus stearothermophilus* var. *calidolactis* ATCC 10149, determinadas nas provas para sua validação, mostraram que o mesmo exibe desempenho adequado para ser utilizado na detecção de resíduos de beta-lactâmicos em leite bovino, mas não dos outros antimicrobianos estudados. Observaram-se indícios de que interações de sinergismo de penicilina com outros beta-lactâmicos e com aminoglicosídeos, assim como destes com a penicilina, podem levar ao aumento da sensibilidade do método. Os resultados mostraram que, no bioensaio avaliado, somente a utilização do sistema múltiplo com as placas de pós-triagem não permitiria inferir sobre a classe de antimicrobianos à qual o resíduo encontrado pertenceria.

Palavras-chave: qualidade do leite, resíduos antimicrobianos, validação de métodos microbiológicos

ABSTRACT

Milk is considered almost a complete food and is consumed universally by individuals of all age. With the global recognition of the importance of controlling microbiological and chemicals hazards in food, the "quality" became a mandatory requirement in the scenario of world-wide dairy agribusiness, in order to the safety and satisfaction of the consumer. Of all these chemical hazards, the antimicrobials are those that have major health and animal implications and industrial processing, because of its wide use (and even misuse) in livestock, whether for therapeutic and prophylactic purposes or as an animal growth promoter. In Brazil, as in other countries, antimicrobial agents are chemical residues that are very frequently detected in milk. Considering the relevance of possible impacts on health and in the national dairy industry, and taking into account the need to evaluate effective methods of screening which can be validated and adopted officially in the country, it was intended with this work to contribute for the Monitoring of Residues of Veterinary Drugs in Milk in Brazil. The specificity, sensitivity and applicability of the screening test of inhibition *Bacillus stearothermophilus* var. *calidolactis* ATCC 10149, proved for its validation, showed that it displays suitable performance for use in detection of beta-lactam antibiotics residues in bovine's milk, but not of the other antimicrobials studied. Indications had been observed that synergistics interactions of penicillin with other beta-lactamics and aminoglycosides, as well as these with penicillin, can lead to the sensitivity's increase of the method. The results showed that in the bioassay evaluated, only the use of the plates of post-screening multiple system would not allow to infer about the class of antimicrobials to which the residue found belong.

Key words: milk quality, antimicrobial residues, microbiological validation methods