

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA**  
**MESTRADO PROFISSIONAL EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DO LEITE E**  
**DERIVADOS**

**FERNANDA PYRAMIDES DO COUTO GOMES**

**RESÍDUOS DE ANTIMICROBIANOS EM LEITE PASTEURIZADO E O EFEITO**  
**INIBIDOR SOBRE BACTÉRIAS LÁCTICAS PARA ELABORAÇÃO DE**  
**PRODUTOS LÁCTEOS FERMENTADOS**

**Juiz de Fora**

**2017**

**FERNANDA PYRAMIDES DO COUTO GOMES**

**RESÍDUOS DE ANTIMICROBIANOS EM LEITE PASTEURIZADO E O EFEITO  
INIBIDOR SOBRE BACTÉRIAS LÁCTICAS PARA ELABORAÇÃO DE  
PRODUTOS LÁCTEOS FERMENTADOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Mestrado Profissional em Ciência e Tecnologia do Leite e Derivados, área de concentração: Ciência e Tecnologia do Leite e Derivados, da Universidade Federal de Juiz de Fora como requisito parcial para obtenção do título de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Marccone Augusto Leal de Oliveira.  
Co-orientador: Prof. Dr. Marcelo Bonnet Alvarenga.

**Juiz de Fora**

**2017**

**RESÍDUOS DE ANTIMICROBIANOS EM LEITE PASTEURIZADO  
E O EFEITO INIBIDOR SOBRE BACTÉRIAS LÁCTICAS NA  
PRODUÇÃO DE QUEIJOS E IOGURTES**

**FERNANDA PYRAMIDES DO COUTO GOMES**

**ORIENTADOR (A): Prof. Dr. Marcone Augusto Leal de Oliveira**

Dissertação de Mestrado submetida ao Mestrado Profissional em Ciência e Tecnologia do Leite e Derivados, da Universidade Federal de Juiz de Fora - UFJF, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Ciência e Tecnologia do Leite e Derivados.

Aprovada em 31/08/2017.



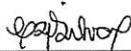
---

Dra. Célia Lúcia de Luces Fortes Ferreira



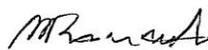
---

Dr. Rodrigo Stephani



---

Dra. Carolina dos Santos Fernandes da Silva



---

Dr. Marcelo Bonnet Alvarenga



---

Dr. Marcone Augusto Leal de Oliveira

Ficha catalográfica elaborada através do programa de geração automática da Biblioteca Universitária da UFJF, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Gomes, Fernanda Pyramides do Couto.

RESÍDUOS DE ANTIMICROBIANOS EM LEITE PASTEURIZADO E O EFEITO INIBIDOR SOBRE BACTÉRIAS LÁCTICAS PARA ELABORAÇÃO DE PRODUTOS LÁCTEOS FERMENTADOS / Fernanda Pyramides do Couto Gomes. -- 2017. 95 f.

Orientador: Marcone Augusto Leal de Oliveira Coorientador: Marcelo Bonnet Alvarenga

Dissertação (mestrado profissional) - Universidade Federal de Juiz de Fora, Faculdade de Farmácia e Bioquímica. Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia do Leite e Derivados, 2017.

1. Resíduos de antimicrobianos em leite. 2. Inibição de cultura láctica. 3. Fermento láctico comercial. 4. Limite Máximo de Resíduo. 5. Antimicrobiano efeito em fermentos comerciais. I. Oliveira, Marcone Augusto Leal de , orient. II. Alvarenga, Marcelo Bonnet , coorient. III. Título.

Dedico este trabalho ao meu orientador, Dr. Marcone Leal, ao meu co-orientador Dr. Marcelo Bonnet e a Jaime Dietrich, importantes e essenciais para que este trabalho fosse idealizado, desenvolvido e concluído.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço à Universidade Federal de Juiz de Fora, EMBRAPA Gado de Leite e Instituto de Laticínios Cândido Tostes, pela oportunidade de fazer parte do corpo discente do Mestrado Profissional em Ciência e Tecnologia do Leite e Derivados.

Agradeço às empresas DSM® – Bright Science. Brighter Living.™ e Globalfood® Sistemas, Ingredientes e Tecnologia de Alimentos LTDA, por acreditar, confiar e financiar toda a execução o projeto.

Especialmente à Globalfood® Sistemas, Ingredientes e Tecnologia de Alimentos LTDA, por me receber e permitir a execução dos experimentos em seu laboratório e pela ajuda diária de seus colaboradores. Agradeço principalmente a Jaime Dietrich, que participou desde o início, no desenvolvimento das ideias e na logística de execução do trabalho. Você tornou possível que este estudo fosse realizado. Obrigada pela confiança e apoio.

Agradeço a todos os colaboradores da Globalfood® Sistemas, Ingredientes e Tecnologia de Alimentos LTDA, por toda a atenção, todo o auxílio, troca de conhecimentos, pela receptividade e por incluírem o projeto em parte de suas rotinas. Registro meu sincero agradecimento aos que estiveram diretamente ligados à execução experimento: Giovana, Alex, Joaquim, Clécio, Romildo, Kleber e Paulo. A ajuda de vocês foi imprescindível para o bom desenvolvimento desta pesquisa.

Ao Senhor Wilson Massote, Diretor Executivo do G100, por me auxiliar na obtenção de leite rastreável e de qualidade. Especialmente ao Senhor Pedro Guimarães, Presidente da Cooperativa de Laticínios Serramar, pelo fornecimento do leite, base para a experimentação.

Ao LANAGRO/MG pela gentil disponibilização de material de uso interno, especificamente, os padrões de antimicrobianos e seus certificados de análise. Agradeço especialmente à Mary Anne e Josefa pela boa vontade e fornecimento dos padrões.

À Fátima Pinhel, LANAGRO/SP e Leonardo Novo, MAPA, por auxiliarem na obtenção de material específico na execução do projeto.

Agradeço, também, ao Cristiano Amâncio, EMBRAPA Gado de Leite, por toda ajuda, paciência, e por ter sido tão solícito em todas as vezes que busquei sua ajuda. Ao Professor Márcio Roberto, pela boa amizade e por toda a ajuda fornecida.

Agradeço aos componentes desta honrosa banca examinadora, Dra. Célia Ferreira, Dr. Rodrigo Stephani e Dra. Carolina Silva, por prestarem seu profissionalismo e competência na avaliação deste projeto acadêmico, que só tende a contribuir para o bem social.

Ao meu orientador Dr. Marcone Leal, por todo o auxílio, toda a calma, todo o diálogo, pelas milhares de mensagens respondidas, meu sincero “Obrigada”. Me sinto honrada em tê-lo como orientador.

Ao meu co-orientador, Dr. Marcelo Bonnet, principal incentivador na busca por conhecimento e para que eu iniciasse o mestrado, agradeço pela confiança e por sempre tentar extrair o melhor de mim. Obrigada por me guiar neste caminho evolutivo. Cresci, evoluí, aprendi muito e você fez parte de tudo isso. Obrigada.

Ao Laboratório de Qualidade do Leite – EMBRAPA Gado de Leite, por me disponibilizarem à execução das tarefas acadêmicas, bem como de desenvolvimento deste projeto. Aos colegas de trabalho, pela paciência, cooperação e aprendizado. Particularmente à Raquel Rubiale e Fabiana Santos Silva Bittencourt, pela companhia, pela ajuda, pela amizade, que muito contribuíram na superação das dificuldades.

Ao meu querido/primo/amigo/irmão/padrinho, Daniel de Paula, que me ajudou incansavelmente com a parte estatística. Te agradeço de todo coração, pelas horas de estudo, por tentar sanar cada dúvida que aparecia, por me ajudar com os gráficos e mais que qualquer coisa, obrigada por fazer tudo isso de coração.

Aos meus amigos (especialmente Sarah) queridos e família, que compreenderam minha ausência em tantos momentos importantes. Agradeço aos meus irmãos Daniella, Denise e Guto, que desde sempre me apoiam, incentivam e acreditam que eu sempre posso mais. Todo este amor, me fez e faz ser quem eu sou. Agradeço ao meu sobrinho Rafael, que com apenas um sorriso, é capaz de iluminar meus dias. À prima Regina Cerizza, que mesmo de longe, sempre esteve ao meu lado. À minha mãe, minha vida, minha rainha, a super-heroína da vida real, minha inspiração. Obrigada “Régis”, por ser a melhor mãe do mundo, por me guiar no caminho do bem e lapidar meu caráter e personalidade.

Agradeço especialmente ao meu esposo, Leandro Gomes, que tornou tudo isso possível. Meu amigo, companheiro, confidente e ajudante. Esteve ao meu lado em todos os momentos, inclusive em longas horas de estudo. Poderia escrever uma página em seu agradecimento. Obrigada pelo apoio, foi fundamental.

Agradeço a Deus, acima de todas as coisas, Senhor de misericórdia, de tantos milagres. Sem Ti, Senhor, nada posso, nada sou, nada sei.

“O conhecimento liberta o homem de qualquer  
limitação, até mesmo de sua própria  
ignorância”  
(Dark Poet).

“A arte de ouvir é, também, a ciência de ajudar”  
(Joanna de Ângelis).

## RESUMO

A presença de resíduos de antimicrobianos em leite pode representar grave problema de saúde pública. Por este motivo, algumas medidas legais foram tomadas pelos órgãos competentes, como a venda de medicamentos antimicrobianos sob prescrição médica ou médico veterinária, a observância de Boas Práticas Agropecuárias, e a definição de limites máximos de resíduos (LMR) em alimentos de origem animal. No entanto, os LMR estabelecidos não visam os efeitos sobre tecnologia e fabricação de produtos lácteos, mas sim a proteção da saúde pública. Sob o aspecto tecnológico, as bactérias lácticas são indispensáveis na produção de derivados lácteos fermentados, pois promovem a acidificação controlada e melhoram a textura e o sabor do produto. Assim, a hipótese norteadora deste estudo é que resíduos de antimicrobianos em leite, mesmo abaixo do LMR, são capazes de alterar negativamente a resposta fermentativa das bactérias lácticas. Para tal, foram empregados cinco antimicrobianos (amoxicilina, ceftiofur, gentamicina, sulfametazina e tetraciclina, representante dos cinco principais grupos de antimicrobianos constantes do Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento - MAPA), em cinco diferentes concentrações (0; 0,50; 0,75; 1,0 e 1,25 do respectivo LMR), que foram testados frente a três fermentos comerciais, DELVO® FRESH FC-211 (*Lactococcus lactis* subsp. *lactis* e *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*), DELVO® CHEESE CP-101 (*Streptococcus thermophilus*) e DELVO® FRESH YS-131 (*Lactobacillus bulgaricus* e *Streptococcus thermophilus*), amplamente utilizados na fabricação de queijos e iogurtes. O leite foi proveniente de três animais diferentes, comprovadamente não-tratados com antimicrobianos. Os controles e tratamentos experimentais foram analisados com respeito à cinética fermentativa. O efeito inibitório das substâncias antimicrobianas foi determinado pela variação na curva de acidificação, bem como quanto ao tempo para se atingir o pH final de referência de cada fermentação. Ceftiofur e tetraciclina inibiram a atividade de cultura contendo *Streptococcus thermophilus*, mesmo quando empregados em concentrações abaixo de seus respectivos LMR. A cultura composta por *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* e *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* foi inibida pelos antimicrobianos ceftiofur e gentamicina, mesmo quando empregados em concentrações abaixo dos respectivos LMR. Ceftiofur também inibiu a cultura mista de *Streptococcus thermophilus* e *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*, em concentrações abaixo de seu LMR. Assim, os resultados do presente estudo indicam que concentrações abaixo do LMR de antimicrobianos em leite podem interferir negativamente na atividade fermentativa de bactérias lácticas.

**Palavras chave:** Leite. Antimicrobianos. Resíduos de Antimicrobianos, resíduos de antimicrobianos. Limite máximo de resíduo. Inibição de Culturas Lácticas. Inibição de Bactérias lácticas. Produtos lácticos fermentados. Fermentos comerciais.

## ABSTRACT

The presence of antimicrobial residues in milk represents a serious public health problem. For this reason, some legal measures have been taken by the governments, as a sale of antimicrobial drugs under medical or veterinary medical prescription, observation of Good Agricultural Practices, and the definition of maximum residue limits (MRLs) in foods of animal origin. However, the established MRL do not take into account effects on technology and manufacturing of dairy products, but only the protection of public health. Under the technological aspect, lactic bacteria are indispensable in the production of fermented dairy products, because promote controlled acidification and improve the texture and flavor of the product. Thus, the guiding hypothesis of this study is that antimicrobial residues in milk, even below the MRL, are capable of negatively altering the fermentative response of lactic bacteria. Five antimicrobials (amoxicillin, ceftiofur, gentamicin, sulfamethazine and tetracycline, representing the five main antimicrobial groups included in the National Plan for the Control of Residues and Contaminants of the Ministry of Agriculture, Livestock and Supply (MAPA), in five different concentrations (0, 0.50, 0.75, 1.0 and 1.25 of the respective MRL), which were tested against three commercial lactic cultures, DELVO® FRESH FC-211 (*Lactococcus lactis* subsp. *lactis* e *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*), DELVO® CHEESE CP-101 (*Streptococcus thermophilus*) and DELVO® FRESH YS-131 (*Lactobacillus bulgaricus* e *Streptococcus thermophilus*). Widely used in the manufacture of cheeses and yogurts. The milk came from three different animals, proven untreated with antimicrobials. Experimental controls and treatments were analyzed with respect to fermentative kinetics. The inhibitory effect of the antimicrobial substances was determined by the variation in the acidification curve as well as the time to reach the final reference pH of each fermentation. Ceftiofur and tetracycline inhibited the culture activity containing *Streptococcus thermophilus*, even when employed at concentrations below their respective MRL. The culture composed of *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* and *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* was inhibited by ceftiofur and gentamicin antimicrobials, even when used at concentrations below their MRL. Ceftiofur also inhibited the mixed culture of *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*, at concentrations below its MRL. Thus, the results of the present study indicate that concentrations below the antimicrobial MRL in milk may negatively interfere with the fermentative activity of lactic acid bacteria.

**Key words:** Milk. Antibiotics. Antimicrobials. Antibiotic residues, antimicrobial residues. Maximum Residue Limit. Inhibition of Lactic Cultures. Inhibition of lactic bacteria. Fermented dairy products. Commercial ferments.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Quadro 1</b> – Culturas lácticas, gêneros e características gerais.....	20
<b>Quadro 2</b> – Culturas lácticas e suas aplicações.....	22
<b>Quadro 3:</b> Antimicrobianos de interesse e características gerais.....	28
<b>Figura 1</b> – Origem e transferência de resistência antimicrobiana.....	31
<b>Quadro 4</b> – Mecanismos de resistência antimicrobiana.....	32
<b>Figura 2</b> – Transferência de resistência antimicrobiana no ambiente.....	35
<b>Quadro 5:</b> Limite Máximo de Resíduo e Valores de Ingestão Diária Aceitáveis em leite.	38
<b>Quadro 6</b> – Antimicrobianos utilizados no experimento, LMR e volumes de dopagem em leite.....	41
<b>Quadro 7</b> – Fermentos comerciais utilizados no estudo e condições experimentais.....	43
<b>Figura 3</b> – Esquema simplificado do preparo das amostras para análise.....	44
<b>Gráfico 1</b> – Diferenças médias entre o tempo (minutos) de obtenção do valor de pH 5,0 entre amostras dopadas com antimicrobianos selecionados e a amostra controle, para o fermento DELVO® CHEESE CP-101.....	48
<b>Gráfico 2</b> – Diferenças médias entre o tempo (minutos) de obtenção do valor de pH 5,1 entre amostras dopadas com antimicrobianos selecionados e a amostra controle, para o fermento DELVO® CHEESE CP-101.....	48
<b>Quadro 8</b> – Comparação de médias para o fermento DELVO® CHEESE CP-101, referentes aos tempos (minutos) de fermentação requeridos para atingimento de valores de pH 5,0 e 5,1.....	50
<b>Quadro 9</b> – Comparação de médias para o fermento DELVO® CHEESE CP-101, referente à variação de pH nos tratamentos, relativo ao tempo (minutos) de atingimento do pH 5,0 e pH 5,1 pela amostra controle.....	50
<b>Gráfico 3</b> – Diferenças médias entre o tempo (minutos) de obtenção do pH 4,6 entre amostras dopadas com antimicrobianos selecionados e a amostra controle, para o fermento DELVO® FRESH FC-211.....	52
<b>Gráfico 4</b> – Diferenças médias entre o tempo (minutos) de obtenção do pH 5,4 entre amostras dopadas com antimicrobianos selecionados e a amostra controle, para o fermento DELVO® FRESH FC-211.....	53
<b>Quadro 10</b> – Tempo (minutos) de atingimento do pH pelo fermento DELVO® FRESH FC-211, sob adição de concentrações de ceftiofur em torno do LMR.....	54

<b>Gráfico 5</b> – Tempo (minutos) de atingimento do pH pelo fermento DELVO® FRESH FC-211, sob adição de concentrações de ceftiofur em torno do LMR, em três repetições..	55
<b>Quadro 11</b> – Comparação de médias para o fermento DELVO® FRESH FC-211, referentes aos tempos (minutos) de fermentação requeridos para atingimento de valores de pH 4,6 e 5,4.....	56
<b>Quadro 12</b> – Comparação de médias para o fermento DELVO® FRESH FC-211, referente à variação de pH nos tratamentos, no tempo (minutos) de atingimento do pH 4,6 e pH 5,4 pela amostra controle.....	56
<b>Gráfico 6</b> – Diferenças médias entre o tempo (minutos) de obtenção do pH 4,6 entre amostras dopadas com antimicrobianos selecionados e a amostra controle, para o fermento DELVO® FRESH YS-131.....	59
<b>Quadro 13</b> – Tempo (minutos) de atingimento do pH pelo fermento DELVO® FRESH YS-131, sob adição de concentrações de ceftiofur em torno do LMR.....	60
<b>Quadro 14</b> – Comparação de médias para o fermento DELVO® FRESH YS-131, referentes aos tempos (minutos) de fermentação requeridos para atingimento de pH 4,6..	61
<b>Quadro 15</b> – Comparação de médias para o fermento DELVO® FRESH YS-131, referente à variação de pH nos tratamentos, no tempo (minutos) de atingimento do pH 4,6 pela amostra controle.....	62

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA	Análise de Variância
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ATP	Adenosina Trifostato
BNDES	Banco Nacional de Desenvolvimento Econômico e Social
CDC	Centers for Disease Control and Prevention
CDDEP	Center for Disease Dynamics, Economics & Policy
ECDC	European Centre for Disease Prevention and Control
EFFCA	European Food and Feed Cultures Association
EMEA	European Agency for the Evaluation of Medicinal Products
FAO	Food and Agriculture Organization of the United Nations
FDA	Food and Drug Administration
FIL / IDF	International Dairy Federation / Federação Internacional do Leite
GRAS	Geralmente Reconhecidos como Seguros
IDA	Ingestão Diária Aceitável
JECFA	Joint FAO/WHO Expert Committee On Food Additives
LANAGRO-MG	Laboratório Nacional Agropecuário de Minas Gerais
LMR	Limite Máximo de Resíduo
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
NOEL	Níveis de Efeitos Não Observados
OCDE	Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico
OECD	Organization for Economic Co-operation and Development
OMS	Organização Mundial de Saúde
PABA	Ácido Paraminobenzênico
PEP	Fosfoenol Piruvato
PEP-PTS	Fosfotransferase Fosfoenolpiruvato-dependente
PNCRC	Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes
RAM	Resistência Antimicrobiano
RDC	Resolução da Diretoria Colegiada – ANVISA
SNK	Student-Newman-Keuls
UHT / UAT	Ultra High Temperature / Ultra Alta Temperatura
USP	United States Pharmacopeial Convention
WHO	World Health Organization

## LISTA DE SÍMBOLOS

°C	Temperatura em Graus Celsius
pH	Potencial Hidrogeniônico

## SUMÁRIO

1	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	13
2	<b>OBJETIVOS</b> .....	15
2.1	OBJETIVOS GERAIS.....	15
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	15
3	<b>REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	16
3.1	PRODUÇÃO DE LÁCTEOS.....	16
3.2	BACTÉRIAS ÁCIDO LÁCTICAS.....	19
3.3	ANTIMICROBIANOS.....	25
3.3.1	<b>Resistência antimicrobiano (RAM)</b> .....	31
3.3.2	<b>Legislação</b> .....	32
4	<b>MATERIAL E MÉTODO</b> .....	39
	PREPARO DE SOLUÇÕES ESTOQUE DE PADRÕES	
4.1	ANTIMICROBIANOS.....	40
4.2	PREPARO DOS FERMENTOS LÁCTEOS COMERCIAIS.....	41
4.3	PREPARO DAS AMOSTRAS PARA ANÁLISE.....	41
4.3	DELINEAMENTO EXPERIMENTAL E ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	45
5	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	46
5.1	DELVO® CHEESE CP-101 ( <i>Streptococcus thermophilus</i> ).....	47
5.2	DELVO® FRESH FC-211 ( <i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>lactis</i> e <i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>cremoris</i> ).....	51
5.3	DELVO® FRESH YS-131 ( <i>Streptococcus thermophilus</i> e <i>Lactobacillus delbrueckii</i> ssp. <i>bulgaricus</i> ).....	58
6	<b>CONCLUSÃO</b> .....	63
7	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	64
8	<b>PERSPECTIVAS FUTURAS</b> .....	65
	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	66
	<b>APÊNDICES</b> .....	73

## 1 INTRODUÇÃO

O Brasil está entre os maiores produtores mundiais de leite, ocupando a quarta posição. No entanto, apresenta baixas taxas de exportação, com maior parte destinada a países da América Latina e África. Um dos entraves à exportação está relacionado à baixa qualidade média do produto, quando comparado aos padrões americanos e europeus (BNDES, 2013; CONAB, 2016).

Visto que a qualidade do leite é criticamente dependente dos processos de produção primária, a saúde do gado leiteiro e a observância de boas práticas agropecuárias são primordiais (FAO/IDF, 2011).

Neste intuito, alguns pontos devem ser bem definidos, como controle e prevenção de doenças, o descarte do leite de animais doentes e sob medicação, utilização de fármacos registrados e devidamente prescritos, e cumprimento dos períodos de carência dos medicamentos veterinários (FAO/IDF, 2011).

As Boas Práticas Agropecuárias (BPA) e de Fabricação (BPF) devem ser adotadas desde a fazenda à indústria, visando maximizar a qualidade e segurança dos produtos, como parte de um amplo programa de qualidade sistemático, preventivo, integrado e pró-ativo. A busca da garantia da qualidade é primordial na indústria de alimentos e reflete diretamente na segurança do alimento (WALSTRA; WOUTERS; GEURTS, 2006).

Dentre as medidas para a garantia da qualidade, o monitoramento e controle analítico de resíduos de antimicrobianos em leite e seus produtos deve representar etapa de verificação e validação da adequação dos autocontroles implantados, notadamente as BPA, sendo sempre secundários a estes (BRASIL, 2011). A presença de resíduos de medicamentos veterinários em alimentos pode causar danos à saúde do consumidor e prejuízos à indústria láctea por inibir os fermentos e interferir nos processos fermentativos (ROBINSON, 2002).

O emprego de bactérias lácticas para a obtenção de fermentação controlada é tradicional na fabricação de alimentos, pela capacidade de aumentar tanto a durabilidade de produtos perecíveis como seu valor nutricional, além de produzir modificações bioquímicas desejáveis no produto (FIL/IDF, 2012).

O emprego destas culturas na produção de iogurtes promove a formação de gel com um delicado sabor adocicado (SURONO, HOSONO, 2011). Na produção de queijos, a atividade fermentativa destas bactérias é importante no processo de formação da coalhada, no

desenvolvimento de acidificação controlada, na produção de sabor e textura (WALSTRA; WOUTERS; GEURTS, 2006; BROOME; LIMSOWTIN, 2011).

A busca incessante para máxima segurança dos alimentos, bem como os requerimentos do mercado internacional têm impulsionado os esforços para a melhoria da qualidade do leite brasileiro. Neste cenário, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), com base no *Codex Alimentarius*, desenvolve o Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes (PNCRC-Leite), para estabelecer o Limite Máximo de Resíduos (LMR) permitidos no leite destinado a processamento para fins de consumo (BRASIL, 1999).

Os LMR foram estabelecidos para atender a exigências internacionais, tendo como referência o bem estar e a manutenção da saúde pública (BRASIL, 1999).

Estes limites, no entanto, não foram desenvolvidos sob o enfoque tecnológico produtivo, restringindo-se aos aspectos de saúde pública. Sendo assim, é plausível examinar se o atendimento aos LMR também indica atendimento às necessidades tecnológicas, especificamente no tocante à possível inibição de fermentos comerciais.

Assim, a hipótese norteadora deste estudo sustenta que a presença de resíduos de antimicrobianos em leite, mesmo abaixo do respectivo LMR, é capaz de prejudicar a esperada atividade fermentativa de fermentos comerciais.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Correlacionar as concentrações de antimicrobianos selecionados em leite com a dinâmica do processo fermentativo de leite inoculado com fermentos lácticos mesofílicos ou termofílicos.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Avaliar o impacto gerado por cinco antimicrobianos selecionados (amoxicilina, ceftiofur, gentamicina, sulfametazina, tetraciclina) na dinâmica fermentativa do leite.

Medir a evolução fermentativa produzida por três fermentos lácticos comerciais. (*Lactococcus lactis* subsp. *lactis* e *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*; *Streptococcus thermophilus*; *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* e *Streptococcus thermophilus*) em leite, frente a níveis pré-determinados de antimicrobianos.

Correlacionar o efeito das concentrações dos antimicrobianos à evolução da fermentação do leite.

### 3 REVISÃO DE LITERATURA

#### 3.1 PRODUÇÃO DE LÁCTEOS

O Brasil é praticamente autossuficiente na produção de lácteos. Baseada no sistema de pastagens, a produção de leite do país tende a crescer lentamente, assim como o consumo, que acompanha o crescimento populacional (OCDE/FAO, 2015).

Para o fornecimento de alimentos seguros, é importante que cuidados de higiene e boas práticas sejam adotados. Neste ínterim, a produção de lácteos deve ser acompanhada sob rigorosa política da qualidade, desde a produção do leite, transporte, processo de fabricação, logística e distribuição do produto, posicionamento no mercado comercial, até a chegada ao consumidor final. A garantia da qualidade é primordial na indústria de alimentos e reflete diretamente na segurança do alimento (WALSTRA; WOUTERS; GEURTS, 2006).

A presença de resíduos de medicamentos veterinários em alimentos pode causar danos à saúde do consumidor e prejuízos à indústria láctea por inibir a ação dos fermentos comerciais e interferir nos processos fermentativos (ROBINSON, 2002).

O leite para consumo ou processamento deve ser de boa qualidade higiênica, o que é essencial em saúde pública, na adequação à manufatura e na qualidade dos produtos gerados. A presença de microrganismos exógenos ou resíduos de antimicrobianos podem representar risco inaceitável para a saúde e podem causar danos ao leite e aos produtos (WALSTRA; WOUTERS; GEURTS, 2006).

Com relação à presença de microrganismos, vários processos e operações unitárias são empregados no processamento de leite, visando sua eliminação ou controle de crescimento, como os tratamentos térmicos (pasteurização e tratamento à Ultra Alta Temperatura), resfriamento e/ou congelamento, redução do pH e do potencial redox com utilização de bactérias lácticas e a redução da atividade de água com a adição de sal (ROBINSON, 2002).

Todavia, estes procedimentos são utilizados para que o alimento esteja isento de bactérias, especialmente patogênicas, não representando etapa de redução ou eliminação de resíduos de antimicrobianos, visto estes serem tipicamente resistentes aos tratamentos térmicos empregados (ROCA *et al.* 2011).

As bactérias ácido lácticas, por outro lado, são adicionadas ao leite para favorecer a elaboração de produtos com maior qualidade e desenvolvimento de características previamente estabelecidas, de grande valor agregado (EMEA, 1999).

Em adição, a utilização de estirpes apropriadas, com efeito probiótico, pode trazer benefícios para à saúde humana (FAO, 2013).

As bactérias lácticas, conhecidas como fermentos, são tradicionalmente utilizadas na fabricação de alimentos para a obtenção de fermentação controlada, pela capacidade de aumentar a durabilidade de produtos perecíveis e o valor nutricional, além de produzir transformações desejáveis no produto (FIL/IDF, 2012).

A partir da fermentação do leite, podem-se produzir dois diferentes tipos de produtos: leites fermentados (inclusive o iogurte), em que a permanência do soro é desejável; e queijos, onde ocorre remoção parcial do soro. (ROBINSON, 2002).

Na fabricação de iogurtes, o leite pode ser enriquecido com proteína e sólidos adicionais, seguido de tratamento térmico e resfriamento da mistura à temperatura de ação das bactérias lácticas termofílicas (42 °C a 43 °C). A fermentação dura em torno de três a quatro horas; ao final, o produto apresenta pH entre 4,2 a 4,6, ocorrendo a coagulação da caseína e a formação de gel. A refrigeração subsequente interrompe o processo de acidificação (SURONO, HOSONO, 2011).

As bactérias lácticas utilizadas na produção de iogurtes são *Streptococcus thermophilus* e *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. Estas bactérias possuem ação simbiótica em que uma favorece o crescimento da outra por meio da produção de aminoácidos, peptídeos e folato. O emprego destas culturas, juntamente a tratamento térmico adequado, promove a formação de gel com delicado sabor adocicado (SURONO, HOSONO, 2011).

A fabricação de queijo é um processo mais complexo, podendo ser dividido em etapas de filtração, para remoção de impurezas; centrifugação, utilizada na separação da gordura na forma de creme ou partículas sólidas; padronização / fortificação, com possível adição de sólidos do leite para padronização das características do produto (leites provenientes de diferentes composições); e pasteurização (ROBINSON, 2002; JOHNSON, 2011).

Após a pasteurização ocorre o ajuste à temperatura ideal de ação do fermento utilizado, seguido da adição do coagulante e da cultura láctica específica. Isso leva à coagulação da mistura, com separação do soro, e permite os processos de fracionamento e concentração da coalhada (ROBINSON, 2002; JOHNSON, 2011).

O tipo de coalhada será compatível com a cultura utilizada e o produto final de interesse. Após a formação da coalhada, ocorre a dessoragem e salga e, em seguida, a prensagem para dar o formato desejado ao queijo. À partir de então, seguem-se as condições específicas de estocagem e/ou maturação, de acordo com o queijo fabricado (ROBINSON, 2002; JOHNSON, 2011).

As bactérias lácticas utilizadas na produção de queijos podem ser mesofílicas ou termofílicas. As culturas mesofílicas são basicamente compostas por *Lactococcus lactis*, que produzem ácido láctico em temperaturas que variam de 38°C a 40°C. (BROOME; LIMSOWTIN, 2011).

As culturas termofílicas permitem a produção de queijos em temperaturas mais altas, entre 37 °C a 50 °C. Normalmente, são compostas por culturas mistas, em sua maioria, *Streptococcus thermophilus* e espécies de *Lactobacillus* (BROOME; LIMSOWTIN, 2011).

A ação destas bactérias é importante para controlar a acidificação da massa até a formação da coalhada. A diminuição do pH apenas pela ação do coagulante levaria à retenção deste coagulante na coalhada, e as reações de proteólise continuariam durante o processo de maturação do queijo, o que desencadearia quebra gradual da estrutura do queijo e defeitos de sabor (BROOME; LIMSOWTIN, 2011).

O fermento láctico é importante na produção de queijos, por permitir a acidificação controlada. Além disso, sua ação proteolítica auxilia a maturação, por contribuir com textura, sabor, e por permitir a formação de olhaduras em determinados queijos (WALSTRA; WOUTERS; GEURTS, 2006).

Todavia, a segurança de utilização destes microrganismos na fermentação ainda não foi regulamentada, devido à dificuldade de consenso em suas atribuições taxonômicas. A utilização de técnicas avançadas de genética e fisiologia têm melhorado o conhecimento sobre a filogenia destes microrganismos e permitido uso mais apropriado e seguro (FIL/IDF, 2012).

Para *Food and Drug Administration* (FDA, 2017), os aditivos alimentares podem ser considerados Geralmente Reconhecidos como Seguros (GRAS), quando confirmados por métodos científicos ou para aditivos utilizados em período anterior a 1958 e que tenham atingido grande número de consumidores, sem que tenham ocorrido efeitos indesejáveis.

Considerando que o uso de microrganismos como ingrediente alimentar, especificamente para a fermentação de alimentos, é amplamente difundido anteriormente a 1958, pode-se dizer que estes organismos são Geralmente Reconhecidos como Seguros (FIL/IDF, 2012).

No Brasil, existe legislação específica apenas para a utilização destes microrganismos como probióticos, definida pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) (BRASIL, 1996; BRASIL, 2008). Probióticos são alimentos com microrganismos vivos, que quando inseridos no organismo humano, são capazes de produzir benefícios à saúde (FAO/WHO, 2001).

A indústria de laticínios é a principal fonte de alimentos com propriedades probióticas, como iogurtes e leites fermentados, utilizando principalmente cepas de *Lactobacillus acidophilus* e *Bifidobacterium* sp. (FERREIRA, 2012).

### 3.2 BACTÉRIAS ÁCIDO LÁCTICAS

As bactérias lácticas são naturalmente encontradas na microbiota intestinal em humanos, de diversos alimentos, bem como em plantas e em locais de processamento de leite. São organismos Gram-positivos, catalase negativos, e apresentam capacidade de se desenvolverem em valores de pH ácidos, próximos a 3,8. Algumas podem ser patogênicas, e outras possuem efeito antimicrobiano, com a produção de bacteriocinas (FORSYTHE, 2013).

O grupo é composto por cocos e bacilos não-esporogênicos, anaeróbios facultativos, heterofermentativos (produção de ácido láctico, dióxido de carbono, etanol, ácido fórmico e acético) ou homofermentativos (produção de ácido láctico) (TETRA PAK, 2015).

Muitas espécies são proteolíticas e requerem ambiente nutricionalmente rico para se desenvolverem. Este grupo, no entanto, é definido por propriedades bioquímicas e características taxonômicas. Dentre as bactérias ácido lácticas, destacam-se as bactérias fermentadoras utilizadas mundialmente na fermentação e produção de lácteos fermentados (FORSYTHE, 2013).

Por serem heterotróficas, tais bactérias fermentam a lactose para a obter energia, na forma de Adenosina Trifosfato (ATP), o que desencadeia na produção de ácido láctico ao final do processo fermentativo. O ácido cítrico também é metabolizado, podendo ser convertido em diacetil, composto aromatizante de fermentados (WALSTRA; WOUTERS; GEURTS, 2006).

As culturas lácticas fermentativas clivam a lactose em galactose e glicose. A absorção dos açúcares pelos organismos homofermentativos é realizada por mecanismo de

transporte em grupo, com fosforilação da lactose via sistema fosfotransferase fosfoenolpiruvato-dependente (PEP-PTS), tendo como fonte inicial de fosfato o fosfoenol piruvato (PEP) (WALSTRA; WOUTERS; GEURTS, 2006; FORSYTHE, 2013).

A partir disso, a lactose-fosfato é hidrolisada, e os fosfatos de glicose são metabolizados pela via glicolítica, enquanto os fosfatos de galactose pela via tagatose, ambos com produção única de ácido láctico. Para cada molécula de lactose são geradas 4 moléculas de ácido láctico (WALSTRA; WOUTERS; GEURTS, 2006).

Em um segundo sistema utilizado por culturas heterofermentativas, o transporte da lactose se dá ativamente através das permeases, proteínas transmembranares, enquanto ocorre o transporte das moléculas de galactose para fora da célula. Algumas bactérias metabolizam apenas glicose a partir da lactose, utilizando o efluxo de galactose para suprir o gasto energético da absorção de lactose. Neste caso, para cada molécula de lactose são produzidas duas moléculas de ácido láctico (WALSTRA; WOUTERS; GEURTS, 2006).

*Leuconostoc* e alguns lactobacilos utilizam a via fosfocetolase para fermentar a glicose e transformar a galactose. Ademais, aproveitam o gliceraldeído via glicólise para produzir ácido láctico e etanol. Alguns lactobacilos, em situações limitantes em carboidratos, produzem ácido láctico, ácido acético, ácido fórmico e etanol, chamados heterofermentativos facultativos (WALSTRA; WOUTERS; GEURTS, 2006).

As culturas mais utilizadas como fermentos na produção de lácteos são os gêneros *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, e *Lactobacillus* (TAMIME, 2002) (**Quadro 1**).

**Quadro 1** – Culturas lácticas, gêneros e características gerais.

<b>Gêneros</b>	<b>Morfologia</b>	<b>Fermentação da lactose</b>	<b>Temperatura</b>
<i>Lactococcus</i>	Cocos	Homofermentativos	Mesofílicos
<i>Leuconostoc</i>	Cocos	Heterofermentativos	Mesofílicos
<i>Pediococcus</i>	Cocos	Homofermentativos	Termofílicos
<i>Streptococcus</i>	Cocos	Homofermentativos	Termofílicos
<i>Lactobacillus</i>	Bacilos	Homofermentativos, heterofermentativos ou heterofermentativos facultativos	Termofílicos ou mesofílicos

Fonte: Adaptado de Forsythe (2013) e Walstra *et al.* (2006).

Embora a produção de ácido láctico seja a principal atividade atribuída às culturas lácticas, estes microrganismos também atuam no prolongamento da vida útil do produto, por

auxiliarem na conservação do alimento, especialmente, por inibirem o crescimento de psicrotróficos (TORTORA; FUNKE; CASE, 2012).

Esta inibição se torna possível com a diminuição do pH, produção de compostos inibidores e diminuição do potencial redox, o que permite apenas o crescimento de microrganismos anaeróbios facultativos ou obrigatórios. Esta diminuição do potencial de oxidação-redução é também essencial para conferir sabor ao queijo cheddar (MULLAN, 2005).

Devido às atividades metabólicas, as bactérias lácticas propiciam a produção de dióxido de carbono, que favorece a formação de olhaduras em queijos (EMEA, 2000). Estas olhaduras são essenciais para alguns tipos de queijos, como *blueveined*, Cambazola ou Blue Brie, o que pode ser obtido com fermentos lácticos contendo *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis* e / ou espécies de *Leuconostoc* (MULLAN, 2005).

Algumas culturas produzem polissacarídeos que influenciam a consistência de leites fermentados, a produção de compostos aromáticos em manteiga, além de melhorar a viscosidade de iogurtes e o rendimento de queijos (EMEA, 2000; MULLAN, 2005).

A presença de ácido láctico auxilia na formação do gel, na texturização da coalhada e na formação de aroma de leites fermentados (TAMIME, 2002). Para *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, destaca-se ainda o metabolismo do citrato e a capacidade de atribuir o sabor característico à manteiga e a alguns iogurtes (FORSYTHE, 2013).

Estes microrganismos utilizam as caseínas como fonte de nitrogênio e degradam proteínas para obter os peptídeos necessários para atender à necessidade de aminoácidos (WALSTRA; WOUTERS; GEURTS, 2006). Especificamente para a produção de queijos, essa proteólise é essencial para atribuir textura e sabor característicos (FORSYTHE, 2013). O quadro abaixo mostra algumas das aplicações das bactérias lácticas como culturas fermentativas (**Quadro 2**).

A atividade dos fermentos é diretamente dependente do leite isento de resíduos, especialmente de antimicrobianos, e de fatores ambientais, como temperatura e pH. (EMEA, 2000).

As bactérias fermentativas são divididas em mesofílicas, com temperatura ótima de crescimento em torno de 30°C, e termofílicas, com temperaturas ótimas entre 40°C a 50°C. As cepas mesofílicas, são utilizadas na produção de queijos, como cheddar, gouda e camembert, enquanto as cepas termofílicas são utilizadas na produção de iogurtes e alguns tipos de queijo, como mussarela, parmesão e emmenthal. As culturas termofílicas podem ser utilizadas como monoculturas ou em associação com outras cepas (EMEA, 2000).

**Quadro 2** – Culturas lácticas e suas aplicações.

<b>Microrganismo</b>	<b>Características de interesse</b>	<b>Produto final</b>
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	Produção de ácido.	Manteiga, queijo prato, mussarela, queijos frescos, como minas frescal e queijos de baixa aromatização.
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i>	Produção de ácido.	Manteiga, queijo prato, mussarela e queijos frescos como cottage e minas frescal.
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> biovar. <i>diacetylactis</i>	Produção de ácido e diacetil.	Leites fermentados, queijo cottage, manteiga e produtos aromatizados e queijos com olhaduras.
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>cremoris</i>	Produção de diacetil.	Leites fermentados, queijo cottage, manteiga, produtos aromatizados e queijos com olhaduras.
<i>Streptococcus thermophilus</i>	Produção de ácido e acetaldeído.	Queijos de massa cozida ou semi-cozida, como mussarela, parmesão e provolone, além de iogurtes e leites fermentados.
<i>Lactobacillus helveticus</i>	Produção de ácido e proteólise.	Queijos de massa cozida ou semi-cozida, como mussarela, parmesão e provolone.
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>	Produção de ácido e acetaldeído.	Queijos de massa cozida ou semi-cozida, como mussarela, parmesão e provolone, além de iogurtes e leites fermentados.

Fonte: Adaptado de Paula, Carvalho e Furtado (2009); Cornell University (2008).

A utilização de diferentes culturas capazes de ocupar um mesmo nicho permite que uma espécie se adapte melhor durante um determinado tempo e, à medida que o meio sofre as alterações de pH e diminuição de nutrientes, seja substituída por outra melhor adaptada às condições modificadas. Desta forma, as bactérias contribuem para a fermentação em diferentes fases do processo (FAO, 2013).

Ademais, a combinação de diferentes cepas visa promover efeito simbiótico, aumentar a tolerância das culturas ao meio, e favorecer características básicas como a tolerância ao sal e temperatura ótima de crescimento. Assim, os fermentos para comercialização apresentam propriedades específicas para a elaboração de determinado produto (TETRA PAK, 2015).

Os fermentos comerciais podem ser líquidos, congelados (*deep-frozen*) ou liofilizados (*freeze-dried*) (FAO, 2017). Os fermentos líquidos ou naturais são obtidos a partir da fermentação do leite da última produção e utilizadas na fermentação de novos produtos. Porém, a composição de sua microbiota tende a apresentar alta variabilidade de desempenho e desbalanceamentos em caso de culturas mistas, entre outros, o que prejudica a qualidade do produto final (EFFCA, 2017).

Atualmente, os fermentos líquidos não são muito usuais devido às dificuldades de transporte, correto cultivo, facilidade de contaminação e curta vida útil (TETRA PAK, 2015). Embora o método não fosse bem controlado, fomentou a base para os produtos mais avançados e, desta forma, as culturas fermentadoras se tornaram parte importante e integrante da indústria de laticínios (TAMIME, 2002).

Nos tempos atuais, parte substancial dos fermentos para fins industriais são produzidos comercialmente, e podem ser encontrados altamente concentrados nas formas congelada ou liofilizada (em pó). Os fermentos comerciais devem conter  $10^8$  UFC/ g (ou ml) de uma ou mais espécies microbianas viáveis (EFFCA, 2017).

Estes fermentos podem ser utilizados a base de repicagem, com produção da cultura-mãe e da cultura intermediária, ou podem ser utilizados diretamente no tanque (**Figura 1**). As culturas concentradas de uso direto no tanque ou no produto têm sido as mais empregadas (TETRA PAK, 2015).

Para o melhor aproveitamento dos fermentos, sua viabilidade deve estar assegurada com a utilização de corretas condições de armazenamento e aplicação (USP, 2012). Vários fatores podem afetar sua atividade, como a acidificação excessiva do meio, variações na temperatura de incubação e falhas na transferência e utilização da cultura, o que torna a acidificação lenta e desencadeia perdas financeiras (SURONO, HOSONO, 2011).

Ademais, além da observância dos controles de produção de qualquer alimento, cuidados adicionais com higiene, limpeza e controle de matéria prima devem ser feitos desde o início do processo de produção de produtos fermentados. Em especial, fatores intrínsecos ao leite que afetam negativamente a atividade dos fermentos lácticos estão relacionados a mudanças nas características físico-químicas ou microbiológicas do leite, seja por efeitos sazonais ou relacionados a mastite e às condições higiênicas de sua obtenção; presença de inibidores naturais do leite; presença de vírus bacteriófagos (ou fagos) e resíduos de sanitizantes e antimicrobianos (SURONO, HOSONO, 2011).

A infecção de bactérias por fagos constitui um sério problema tecnológico, principalmente por estes vírus sobreviverem à pasteurização, por alterarem o metabolismo celular ou levarem à lise celular, e conseqüentemente, por dificultarem a obtenção do pH ideal no produto acabado (BROOME; LIMSOWTIN, 2011).

Em geral, culturas termofílicas são menos propensas à infecção por fagos do que as culturas mesofílicas. No caso da fermentação do iogurte, onde a fermentação ocorre de forma relativamente rápida (entre 3 e 4 horas), todas as cepas bacterianas precisariam ser simultaneamente atacadas para afetar a produção (SURONO, HOSONO, 2011).

Todavia, baixos níveis de bacteriófagos não afetam a produção de queijos, especialmente com a utilização de culturas mistas. Ainda assim, níveis de infecção maiores podem comprometer a produção de ácido láctico devido ao desequilíbrio metabólico das culturas, o que por sua vez causa defeitos nas características do queijo, especialmente no sabor (BROOME; LIMSOWTIN, 2011).

De toda forma, evitar a contaminação por fagos é a melhor maneira de minimizar perdas de produção. Algumas medidas podem ser tomadas neste sentido, como a utilização de culturas mistas resistentes, adoção de severas medidas de assepsia e aplicação de correto tratamento térmico do leite (SURONO, HOSONO, 2011).

No mais, o prévio tratamento térmico pode reduzir a atividade de fosfatases, proteinases, enzimas lipolíticas e oxido-redutases, como catalase e lactoperoxidase, inibidores naturalmente presentes no leite, que também podem inibir a ação dos fermentos lácticos (WALSTRA; WOUTERS; GEURTS, 2006).

Cabe ressaltar que o inibidores naturais podem ser inativados com o tratamento térmico, ao contrário da maioria dos inibidores artificiais, como os resíduos de sanitizantes e antimicrobianos (WALSTRA; WOUTERS; GEURTS, 2006).

A contaminação do leite por sanitizantes pode ocorrer por falha humana ou por falhas no ciclo de limpeza automático. Cumprir corretamente o ciclo de limpeza preconizado,

especialmente o enxágue, tende a garantir a eficácia na eliminação dos sanitizantes (TAMIME, 2002).

Os resíduos de antimicrobianos provêm do animal em uso destes medicamentos, cujo leite não foi descartado. A presença deste tipo de resíduo pode interferir ou interromper a atividade de bactérias lácticas. No entanto, o nível de interferência varia de acordo com a espécie bacteriana e seu grau de sensibilidade aos compostos considerados (NAMPOOTHIRI; DOMINIQUE, 2014).

Todavia, além dos negativos efeitos tecnológicos, a maior urgência para o devido controle de uso de antimicrobianos na produção animal, em particular de leite, está associada aos riscos para a saúde pública, com o aumento dos casos de resistência a essas drogas (FIL/IDF, 2012).

De fato, a resistência aos antimicrobianos (RAM) representa o mais complexo desafio de saúde pública da atualidade (WHO, 2015).

### 3.3 ANTIMICROBIANOS

Durante muitos anos, as doenças infecciosas representaram uma grave ameaça à saúde e vida humana. A partir de 1930, a descoberta e desenvolvimento de substâncias antimicrobianas reduziram drasticamente os níveis de mortalidade provocados por infecções bacterianas (GUARDABASSI; JENSEN; KRUSE, 2010).

Os antibióticos são considerados substâncias naturalmente produzidas por microrganismos ou seus equivalentes sintéticos que, em dosagens relativamente baixas, têm a capacidade de inibir o crescimento microbiano ou eliminar os microrganismos. Já os quimioterápicos se diferenciam dos antibióticos por não serem normalmente produzidos por microrganismos, sendo então obtidos por síntese química (SPINOSA; GÓRNIAK; BERNARDI, 2006).

Busca-se que as substâncias antimicrobianas tenham toxicidade seletiva, que permite a ação direta sobre as células microbianas com danos mínimos às células humanas, podendo atuar como bactericidas, que promovem a eliminação bacteriana, ou bacteriostáticos, que inibem o crescimento bacteriano e permitem a atuação do sistema imune do hospedeiro na gradual diminuição destes organismos (LEVINSON, 2016).

Características específicas das células bacterianas, procarióticas, diferem-nas de células eucariotas, permitindo ação seletiva dos antimicrobianos na parede celular, nos ribossomos, nos ácidos nucleicos e na membrana celular (LEVINSON, 2016).

Alguns antimicrobianos são capazes de alterar a produção de peptideoglicanos, moléculas características da parede celular de células bacterianas, o que promove o enfraquecimento da parede celular e a consequente lise bacteriana; neste caso, apenas células em crescimento ativo podem ser afetadas (TORTORA; FUNKE; CASE, 2012). Desta forma, estes antimicrobianos são mais efetivos durante a fase logarítmica de crescimento microbiano.

Neste grupo, encontram-se as penicilinas e cefalosporinas, antimicrobianos da classe dos  $\beta$ -lactâmicos, caracterizados pela presença do anel  $\beta$ -lactâmico em sua estrutura química. Devido à menor proporção de peptideoglicano nas células Gram-negativas e à dificuldade de penetração celular, os primeiros antimicrobianos desta classe eram mais eficazes contra bactérias Gram-positivas, mas mudanças estruturais têm permitido melhor efeito bactericida de penicilinas, amoxicilina e ampicilina sobre bacilos Gram-negativos (LEVINSON, 2016).

São poucos os antimicrobianos que atuam sobre a membrana plasmática. Devido à sua maior facilidade para causar danos a células humanas, normalmente são indicados apenas para uso tópico ou como coadjuvantes em drogas antifúngicas. Estas substâncias promovem mudanças na permeabilidade da membrana e a consequente perda de íons e macromoléculas, acarretando lesão e morte celular (QUINN *et al.*, 2005).

A atuação seletiva na síntese de proteínas se dá pela diferença estrutural entre os ribossomos, onde as células eucariotas apresentam ribossomos 80S, enquanto as células bacterianas são constituídas por ribossomos 70S, com subunidades 50S e 30S (TORTORA; FUNKE; CASE, 2012).

Os antimicrobianos cloranfenicol, eritromicina e clindamicina atuam especificamente sobre a região 50S, nas subunidades ribossômicas, enquanto que as tetraciclina e os aminoglicosídeos agem sobre a unidade 30S (LEVINSON, 2016).

Antimicrobianos da classe das tetraciclina e da classe dos aminoglicosídeos se ligam a uma proteína receptora específica na subunidade 30S do ribossomo, bloqueiam a atividade de formação de peptídeos e levam à síntese de proteínas não funcionais (QUINN, *et al.*, 2005; SPINOSA; GÓRNIK; BERNARDI, 2006).

O cloranfenicol se liga à subunidade 50S e por inibição da enzima peptidil transferase, impede a ligação de novos aminoácidos à cadeia polipeptídica, impedindo a

formação de novas proteínas. Os macrolídeos e lincomicinas também se ligam à subunidade 50S, porém, interferem na produção de compostos necessários para a síntese de cadeias polipeptídicas (SPINOSA; GÓRNIK; BERNARDI, 2006).

Outros antimicrobianos interferem na replicação e transcrição do DNA bacteriano, inibindo a síntese de ácidos nucleicos. Isso ocorre com as quinolonas, que agem sobre a DNA-girase e impedem a separação das fitas de DNA durante a replicação bacteriana (QUINN, *et al.*, 2005), e com as sulfonamidas, que bloqueiam a síntese de precursores de ácidos nucleicos, por competirem pelo mesmo sítio de ligação do ácido paraminobenzóico (PABA). Este é precursor da síntese de ácido fólico, essencial na produção de ácidos nucleicos e aminoácidos (TORTORA; FUNKE; CASE, 2012). Os antimicrobianos de interesse para este estudo são abordados no **Quadro 3**.

Apesar das características conhecidas dos antimicrobianos, em alguns casos, a terapia pode não surtir o efeito desejado. Isso pode ocorrer quando o tratamento é iniciado em atraso, no tratamento de viroses ou de agentes desconhecidos, na indicação errônea da substância ou da dose, bem como em casos de persistência onde o microrganismo sensível não sofre a ação de antimicrobianos, ou ainda, em casos de resistência bacteriana (SPINOSA; GÓRNIK; BERNARDI, 2006).

Desta forma, o sucesso do tratamento com antimicrobianos é dependente da identificação do microrganismo causador da doença e sua sensibilidade ao fármaco, do estado de saúde do hospedeiro, bem como, sua faixa etária e grau de imunidade, além de conhecimento adequado do antimicrobiano, seu mecanismo de ação, nível de toxicidade seletiva e propriedades farmacocinéticas (DEL FIOL; BARBERATO FILHO, 2010).

Quando necessário, para evitar o insucesso do tratamento, é comum a utilização de antimicrobianos associados para conter ou eliminar o microrganismo alvo em situações específicas, como o tratamento de infecções por microrganismos com diferentes sensibilidades, a aplicação de diferentes mecanismos de ação para evitar ou retardar o aparecimento de resistência a antimicrobianos (SPINOSA; GÓRNIK; BERNARDI, 2006).

Em especial, a associação busca maior efeito terapêutico em pacientes imunodeprimidos que respondem vagarosamente ao tratamento convencional, bem como, no tratamento de infecções graves para potencializar a ação dos antimicrobianos via sinergismo (SPINOSA; GÓRNIK; BERNARDI, 2006).

Contudo, apesar da toxicidade seletiva e do conhecimento dos mecanismos de ação, alguns antimicrobianos podem apresentar efeitos colaterais ao paciente, interferindo na terapêutica adotada (TORTORA; FUNKE; CASE, 2012; LEVINSON, 2016).

**Quadro 3:** Antimicrobianos de interesse e características gerais.

<b>Classe</b>	<b>Substância</b>	<b>Característica e ação biológica</b>	<b>Modo de ação</b>
Aminoglicosídeos	Gentamicina	Antimicrobiano de maior eficácia sobre Gram-negativos. Bactericida.	Inibição da síntese de proteínas. Liga-se à subunidade 30S ribossomal.
$\beta$ -lactâmicos	Amoxicilina	Antimicrobiano de amplo espectro. Bactericida.	Inibição da síntese da parede celular.
$\beta$ -lactâmicos	Ceftiofur	Antimicrobiano de maior eficácia sobre Gram-negativos. Bactericida.	Inibição da síntese da parede celular
Sulfonamidas	Sulfametazina	Quimioterápico de amplo espectro. Bacteriostático. Bactericida em doses elevadas.	Antagonismo competitivo por PABA
Tetraciclina	Tetraciclina	Antimicrobiano de amplo espectro. Bacteriostático.	Inibição da síntese de proteínas. Liga-se à subunidade 30S ribossomal.

Fonte: Adaptado de Spinosa, Górnaiak e Bernardi, 2006.

Devido à semelhança ribossômica (ribossomos 70S) das células procariotas com as mitocôndrias das células eucariotas, antimicrobianos que afetam a síntese de proteínas podem apresentar efeitos indesejáveis às células eucariotas. Neste caso, a seletividade se deve à maior sensibilidade aos ribossomos bacterianos (TORTORA; FUNKE; CASE, 2012).

Em altas concentrações, antimicrobianos como cloranfenicol, os aminoglicosídeos e tetraciclina podem inibir a síntese de proteínas mitocondriais e desencadear maiores efeitos colaterais (TORTORA; FUNKE; CASE, 2012; MOULLAN, *et al.*, 2015).

O uso de doses superiores a 50mg/kg/dia de cloranfenicol pode levar a distúrbios da medula óssea, que podem evoluir à anemia aplásica letal (SPINOSA; GÓRNIAK;

BERNARDI, 2006). Por este motivo, frente a avaliações toxicológicas e devido ao surgimento de substitutivos eficazes, no Brasil e em outros países, é proibida a fabricação, manipulação, comercialização, importação e uso de substâncias à base de cloranfenicol para uso veterinário ou como aditivo alimentar (BRASIL, 2003).

As tetraciclinas podem comprometer as funções hepática e renal e, quando administradas em crianças, podem afetar a formação dos ossos e dentes. Com relação aos aminoglicosídeos, seu uso pode levar à perda da audição, à hepatotoxicidade e em doses muito elevadas podem resultar em paralisia respiratória (SPINOSA; GÓRNIK; BERNARDI, 2006).

As penicilinas, por outro lado, são normalmente bem toleradas e apenas cerca de 10% dos pacientes sofrem com reações de hipersensibilidade; em alguns destes casos, pode ocorrer choque anafilático. As sulfonamidas raramente causam efeitos colaterais, mas são o grupo de antimicrobianos mais associados ao eritema multiforme, podendo ainda ocorrer febre, vermelhidão e diminuição da produção de células sanguíneas (LEVINSON, 2016).

Levando em consideração as possibilidades de ação no tratamento com antimicrobianos e seus efeitos colaterais, sua prescrição deve ser feita de maneira correta e consciente. Para tal, deve-se considerar a tríade paciente, agente causador da doença e antimicrobiano específico (DEL FIOLE; BARBERATO FILHO, 2010).

Os mesmos preceitos valem para o uso veterinário destes medicamentos. Todavia, é comum a utilização de antimicrobianos em animais sadios como melhoradores de desempenho, sendo utilizados em maior quantidade do que no tratamento de doenças humanas. Ademais, alguns destes medicamentos utilizados como aditivos alimentares para animais sadios são de utilização para manutenção da saúde humana (OMS, 2012).

Desta maneira, considerando o potencial efeito nocivo destes fármacos na saúde humana e animal, além dos riscos relacionados ao desenvolvimento de resistência antimicrobiana, a utilização de anfenicóis, tetraciclinas,  $\beta$ -lactâmicos, sulfonamidas e quinolonas, como melhoradores de desempenho ou conservantes de alimentos para animais, está proibida no Brasil (BRASIL, 2009; OMS, 2012).

Com relação às doenças veterinárias, a mastite, inflamação do úbere, constitui expressiva causa de utilização de fármacos antimicrobianos em bovinos de leite. Os agentes etiológicos mais comuns são *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus dysgalactiae*, *Staphylococcus coagulase-negativos* e *Staphylococcus aureus* (MULLAN, 2003).

Os antimicrobianos veterinários mais utilizados estão contidos em seis grupos principais: Aminoglicosídeos,  $\beta$ -lactâmicos, Tetraciclinas, Quinolonas, Sulfonamidas e

Macrolídeos. Após ministrado, o antimicrobiano é metabolizado e excretado no leite, sendo que a quantidade eliminada pode variar de 8% a 80% da dose utilizada, a depender da dose e do tipo de fármaco aplicado (MULLAN, 2003).

Desta forma, todo o leite produzido pelo animal em tratamento deve ser descartado seguindo as recomendações da bula do medicamento, especificamente com relação ao período de carência (PEREIRA NETO, 2007).

O período de carência é o tempo necessário para que os níveis de excreção da droga atinjam concentrações seguras, e é dependente do tipo de droga, de aplicação, da quantidade utilizada e da espécie animal (SPINOSA; GÓRNIK; BERNARDI, 2006).

O consumo de leite contaminado por resíduos de antimicrobianos pode levar ao desequilíbrio da microbiota intestinal humana, o que tende a aumentar a susceptibilidade do consumidor a infecções por microrganismos patogênicos (TENÓRIO *et al.*, 2009). Além disso, quando consumidos por humanos sensíveis, podem levar ao desenvolvimento de sérios quadros alérgicos (SPINOSA; GÓRNIK; BERNARDI, 2006).

A utilização inapropriada ou prolongada destas substâncias, ou ainda, o consumo de resíduos de antimicrobianos em doses inseguras, causa problema ainda mais preocupante, que consiste no desenvolvimento e seleção de bactérias resistentes e a consequente transmissão de genes de resistência (QUINN, *et al.*, 2005).

A resistência a um agente antibacteriano pode repercutir em resistência cruzada com fármacos da mesma classe, como ocorre com tetraciclina, sulfonamidas, aminoglicosídeos e macrolídeos (QUINN, *et al.*, 2005).

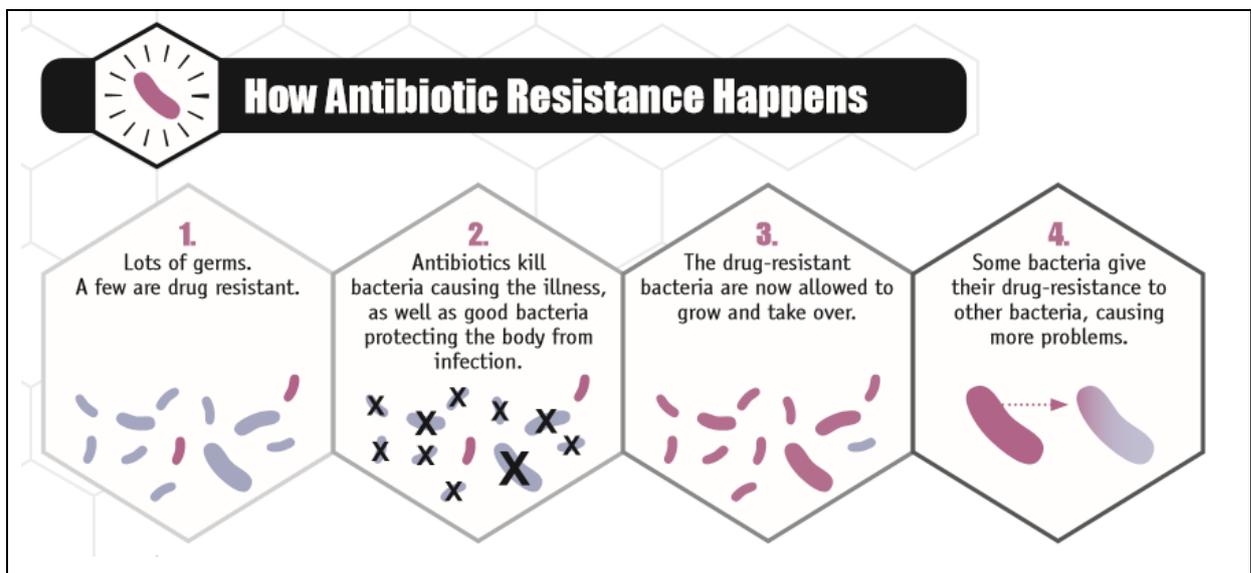
Devido ao aumento do número de patógenos resistentes a número cada vez maior de antimicrobianos, a Organização Mundial de Saúde (OMS) reconheceu a resistência antimicrobiana como um problema prioritário de saúde pública (OMS, 2012).

Por ser um problema complexo, a questão precisa ser enfrentada por toda a sociedade, especialmente pelos governos, para incentivar e sustentar os esforços necessários quanto ao uso prudente de antimicrobianos, e às pesquisas necessárias na temática (OMS, 2012).

### 3.3.1 Resistência antimicrobiana (RAM)

A resistência a antimicrobianos está associada a mutações genéticas que refletem na diminuição da eficácia do medicamento e na necessidade de maiores doses do fármaco para inibição dos microrganismos, quando comparado a cepas sensíveis (**Figura 1 e Quadro 4**) (HANDWERGER; TOMASZ, 1985; KESTER; FORTUNE, 2014).

**Figura 1** – Origem e transferência de resistência antimicrobiana.



FONTE: CDC, 2013.

A sobrevivência bacteriana ao estresse antimicrobiano pode ainda ocorrer por tolerância ou persistência. A tolerância está relacionada à capacidade de uma população sobreviver à exposição transitória a antimicrobianos bactericidas, com a necessidade de maior tempo de exposição à droga para a obtenção da eficácia esperada (CHAIT; CRANEY; KISHONY, 2007; WIEGAND; HILPERT; HANCOCK, 2008).

A persistência, por outro lado, pode ser caracterizada pela curva de letalidade bifásica, onde a rápida taxa de mortalidade evolui para taxas bem mais lentas, mesmo em presença de doses letais do antimicrobiano. Todavia, a subpopulação persistente não se reproduz durante a fase de exposição à droga, e seu fenótipo tolerante é perdido com o início das divisões celulares, sem a possibilidade de hereditariedade (MICHIELS, *et al.*, 2016).

**Quadro 4 – Mecanismos de resistência antimicrobiana.**

<b>Mecanismo de resistência</b>	<b>Efeito</b>	<b>Antimicrobiano afetado</b>
Inativação enzimática	Produção de $\beta$ -lactamase e clivagem do anel $\beta$ -lactâmico	$\beta$ -lactâmicos
	Modificação da substância por ação enzimática	Aminoglicosídeos
Modificação do sítio-alvo	Mutação das proteínas de ligação às penicilinas	Penicilinas
	Mutação na enzima-alvo e maior produção de PABA	Sulfonamidas
	Mutação das proteínas da subunidade 30S ribossomal	Aminoglicosídeos
	Mutação nas enzimas DNA-girase, RNA-polimerase e catalase-peroxidase	Quinolonas, Rifampina e Isoniazida
Redução da permeabilidade	Mutação em proteínas transmembranas	Penicilinas, aminoglicosídeos e outros
Efluxo dos fármacos	Proteínas de membrana que promovem o rápido efluxo dos antimicrobianos	Tetraciclinas, sulfonamidas e quinolonas

Fonte: Adaptado de Quinn, *et al.*, 2005; Spinosa, Górnaiak e Bernardi, 2006; Tortora, Funke e Case, 2012.

A resistência antimicrobiana constitui uma das mais graves ameaças à saúde pública. As infecções por bactérias resistentes ou multirresistentes são cada vez mais comuns, enquanto o número de antimicrobianos efetivos diminui. Isto potencializa o número de casos fatais, hospitalares e internações, bem como o aumento de gastos com saúde por parte do governo e do próprio paciente (FRIEDEN, 2013).

À medida que a resistência a antimicrobianos cresce, estes medicamentos perdem sua efetividade no tratamento de doenças e infecções, o que interfere desde o tratamento a doenças infecciosas de rotina, ao tratamento médico de outros quadros em que infecções bacterianas são particularmente preocupantes, como cirurgias, transplantes, terapia contra o câncer e de doenças crônicas (CDC, 2013).

A taxa de mortalidade anual devida a RAM, nos Estados Unidos da América e na Europa, está estimada em cerca de 50 mil vidas, compondo o total estimado de 700 mil em todo o mundo. Se providências não forem tomadas para conter o problema, estima-se que a taxa de mortalidade global possa atingir 10 milhões de pessoas ao ano, até 2050 (OECD, 2015; ECDC, 2016).

Pacientes infectados em quadro de resistência antimicrobiana têm três vezes mais chances de complicações seguidas de morte. Para cada paciente acometido, estima-se que os hospitais gastem entre US \$ 10.000 a 40.000. Os países da Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OCDE) podem sofrer perdas cumulativas de US \$ 2,9 trilhões até 2050 (OCDE, 2015).

O uso de antimicrobianos está mundialmente e diretamente ligado aos casos de resistência antimicrobiana (CDC, 2013). O próprio estresse ambiental, caracterizado pela presença de antimicrobianos no meio, pode aumentar a resistência via indução de alterações biofísicas na célula bacteriana, ou do rápido efluxo da droga inibidora (BONNET *et al.*, 2006; FAO, 2016b)

Ademais, um microrganismo que possui características genéticas que o permitem resistir à ação de um novo antimicrobiano pode transferir suas características de resistência a outros microrganismos (QUINN, *et al.*, 2005; TORTORA; FUNKE; CASE, 2012).

Cabe salientar que a resistência intrínseca a um antimicrobiano está relacionada a codificações cromossômicas características, e não pode ser horizontalmente transferida. A resistência adquirida emerge de mutações genéticas ou aquisição de genes resistentes em de plasmídeos e transposons, e pode ser transferida de forma horizontal, mais comumente por conjugação (BELLETTI *et al.*, 2009).

Todavia, as mutações genéticas aleatórias também podem ser transmitidas por conjugação, transformação e transposição. Os genes de resistência podem ser transmitidos a bactérias de diferentes gêneros e espécies, frequentemente carregados por plasmídeos ou transposons. Como as bactérias se reproduzem rapidamente, toda uma população pode se tornar resistente (QUINN, *et al.*, 2005; TORTORA; FUNKE; CASE, 2012).

A resistência antimicrobiana pode ser encarada como um fenômeno antigo e natural, possivelmente presente nos plasmídeos há mais de dois bilhões de anos (HALL; BARLOW, 2004; GARAU *et al.*, 2005; AMNOV, 2010) No entanto, esse fenômeno natural e antigo é magnificado pela forte pressão seletiva oriunda do uso generalizado de antimicrobianos. (FAO, 2016b).

De fato, a AMR se torna alarmante pela forma em que é disseminada, visto o fato de as substâncias antimicrobianas estarem entre os medicamentos mais prescritos e utilizados por seres humanos e animais. Cerca de até 50% das prescrições não atingem a eficácia desejada, ou são realizadas desnecessariamente (CDC, 2013).

Antimicrobianos para uso veterinário são mais utilizados do que em seres humanos (CDC, 2013). Isto porque são utilizados na alimentação de animais sadios para obtenção de ganho rápido de peso, o que constitui a principal diferença da utilização por animais e seres humanos. Cabe ressaltar que alguns destes medicamentos utilizados para ganho de peso são de utilização para saúde humana (OMS, 2012).

A ampla utilização destas drogas na agricultura e na saúde favorece a seleção de cepas resistentes e aumenta sua resistência nos ecossistemas microbianos, como o intestino, sendo dependente da quantidade e natureza dos antimicrobianos utilizados, bem como, da duração e frequência de exposição. No entanto, a utilização destes fármacos, mesmo em níveis subterapêuticos, pode estar associada ao desenvolvimento de resistência em rebanhos bovinos (FAO, 2016b).

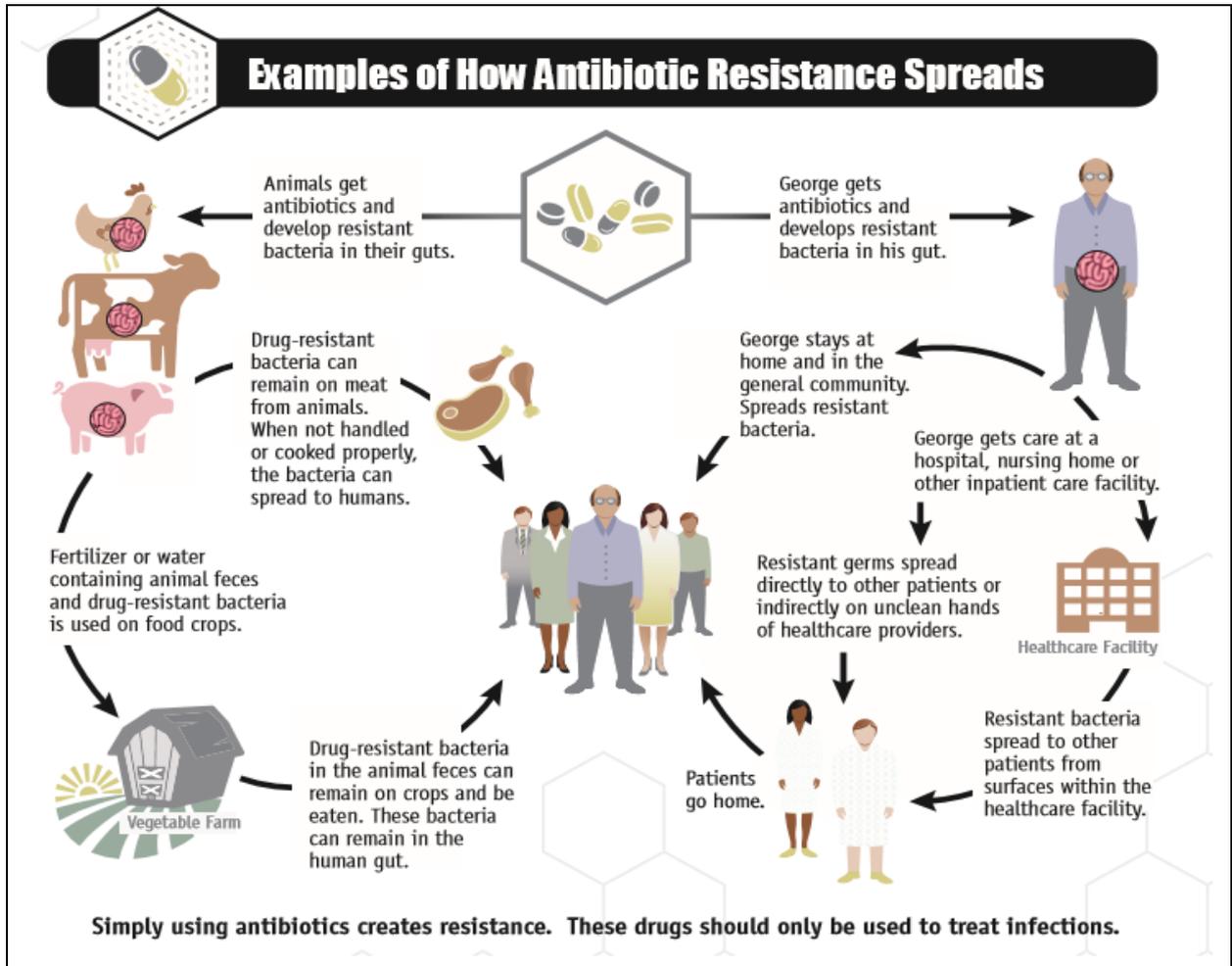
O emprego destes medicamentos na pecuária representa risco elevado de transferência dos genes de resistência, visto que podem ser transmitidos entre animais e humanos, seja por contato direto, através do meio ambiente ou pela ingestão de alimentos de origem animal (CDDEP, 2016). Consequentemente, a disseminação de genes resistentes de animais para humanos é perigo concreto, associado a risco mundial crescente (**Figura 2**) (OMS, 2012).

Sabe-se que o meio ambiente, no caso, o solo e oceanos, já apresentam microrganismos resistentes a vários antimicrobianos e se tornaram reservatórios de novos genes de resistência (HATOSY, MARTINY, 2015; LAU *et al.*, 2017).

A água contaminada se torna importante veículo de transferência de resíduos de antimicrobianos, podendo ser diretamente consumida, utilizada na irrigação de culturas ou na produção de alimentos. No entanto, atualmente não existem limites máximos de resíduos de antimicrobianos estabelecidos pelas diretrizes internacionais para a água (FAO, 2016a).

A transmissão via alimentos pode representar, quantitativamente, a via de transmissão mais importante entre animais e humanos, sendo agravada com o comércio globalizado de alimentos, e o número elevado de viagens humanas apesar de ainda não haver dados específicos ligando o consumo alimentar ao aparecimento de resistência antimicrobiana em humanos (FAO, 2016a).

**Figura 2** –Transferência de resistência antimicrobiana no ambiente.



FONTE: CDC, 2013.

Gueimonde *et al.* (2013), consideram que os probióticos podem representar preocupação pela possibilidade de transmitir os genes de resistência para bactérias intestinais, sendo que as bactérias patogênicas representam o grupo de maior preocupação. Nesse sentido, assinala-se a importância de se verificar a presença de genes de resistência em culturas probióticas, tal como preconizado pela legislação de diversos países, inclusive do Brasil. (FAO/WHO, 2001; ANVISA, 2016).

No entanto, são poucos os trabalhos relacionados à resistência antimicrobiana em bactérias ácido-lácticas utilizadas na fermentação de produtos lácteos, o que enfatiza a importância e necessidade de abordagem do tema em novos estudos.

Alguns mecanismos de desenvolvimento de resistência a antimicrobianos ainda não estão bem esclarecidos, assim como as interações nos ecossistemas microbianos e as vias de transmissão entre animais, alimentos e humanos (FAO, 2016b). O efeito da ingestão de baixos níveis de antimicrobianos frente às mudanças na microbiota intestinal também precisa

ser melhor elucidado, o que também contribuirá para evolução constante no estabelecimento dos limites máximos de resíduos desses compostos em alimentos (FAO, 2016b).

O Comitê Especialista em Aditivos Alimentares (JECFA) entende que a seleção de bactérias intestinais resistentes apenas se torna possível com níveis de antimicrobiano em doses maiores ou iguais à concentração inibitória mínima, ocorridas por um tempo suficientemente longo para que a resposta microbiana possa ocorrer (FAO/WHO, 2000).

Todavia, o próprio JECFA admite que mais estudos precisam ser realizados sobre o tema, para melhor abordar a concentração, tempo de exposição e tipo de droga utilizada, frente à quantidade e tipos de bactérias intestinais, suas interações, mudanças de pH, condições de crescimento e o desenvolvimento de resistência (FAO/WHO, 2000; WHO, 2016).

Em todo caso, a resistência antimicrobiana é caso prioritário de saúde pública, e medidas urgentes precisam ser tomadas para controlar a proliferação e desenvolvimento de novas formas de resistência (OMS, 2012).

Com este intuito, a Assembleia Mundial de Saúde adotou um plano global de ação sobre a resistência antimicrobiana com base em cinco estratégias: melhorar a compreensão sobre resistência com treinamentos e educação; expandir o conhecimento específico com o fortalecimento da pesquisa e vigilância; ampliar a utilização de medidas eficazes de higiene e saneamento para reduzir a prevalência e incidência de infecções; incentivar o uso adequado de antimicrobianos na saúde humana e animal; e aumentar o investimento em pesquisa e desenvolvimento de novos medicamentos, vacinas e otimização de diagnósticos (WHO, 2015).

A utilização prudente de antimicrobianos, é sem dúvida, uma das ferramentas mais importantes no combate à resistência a antimicrobianos. Quando aliada à aplicação de boas práticas de higiene, tende a diminuir os índices de desenvolvimento de resistências e da contaminação ambiental (FAO, 2016b).

A resistência antimicrobiana vem minando a economia global, repercutindo em grandes gastos com saúde pública. Cabe ressaltar que esta questão não pode ser vencida por entidades ou repartições isoladas, e exigirá a adoção de novas medidas políticas, como o controle inteligente do uso de antimicrobianos em saúde humana e animal (WHO, 2015).

### 3.3.2 Legislação

A exigência e retenção de receituário médico foi iniciado em 2011 mediante Resolução da Diretoria Colegiada da ANVISA, RDC n° 20 de 05 de maio de 2011, que também regulamenta a prescrição e especificações de embalagem e rotulagem de medicamentos que contenham antimicrobianos isolados ou associados em sua formulação (BRASIL, 2011).

Em 2013, a ANVISA incluiu o registro obrigatório de antimicrobianos no Sistema Nacional de Gerenciamento de Produtos Controlados, que permite melhor acompanhamento de medicamentos empregando um sistema único, desde a fabricação à dispensação com retenção de receituário em farmácias (BRASIL, 2013).

A RDC n° 20/2011 foi atualizada em 2014 por meio da RDC n° 68, de 28 de novembro de 2014, que amplia o número de antimicrobianos registrados de 119 para 128 substâncias. (BRASIL, 2014).

No Brasil, o controle da comercialização e uso de antimicrobianos ocorre apenas no âmbito da saúde humana, não havendo, lamentavelmente, controles similares no que tange a saúde animal. Como a utilização de medicamentos veterinários pode levar à contaminação de alimentos de origem animal, os resíduos destas substâncias precisam ser monitorados e controlados segundo níveis que minimizem os riscos à saúde animal, pública e ao meio ambiente (ANVISA, 2017).

Desta forma, o Comitê Especialista em Aditivos Alimentares (JECFA), criado em 1987 e administrado pela Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura (FAO) e a Organização Mundial de Saúde, avalia a segurança dos aditivos alimentares, contaminantes, toxinas naturais e resíduos de medicamentos veterinários em alimentos (FAO/WHO, 2012).

O JECFA estabelece os valores de Ingestão Diária Aceitável (IDA) como função dos níveis de efeitos não observados (NOEL), considerando quesitos de alteração da microbiota intestinal, o efeito toxicológico das substâncias, o potencial alergênico e o efeito farmacológico em humanos e animais (FAO/WHO, 2000).

A IDA é a “estimativa da quantidade de um composto de interesse em alimentos ou água potável, expresso em proporção ao peso corporal, que pode ser ingerido diariamente durante toda a vida, sem risco de saúde considerável para o consumidor”. Normalmente, é expressa em miligramas da substância por quilograma de peso corporal (WHO, 2016).

O *Codex Alimentarius* fixa os LMR recomendados pelo JECFA, que as desenvolve com base na IDA, comparados a estimativas médias de ingestão de resíduos no alimento, em uma dieta típica. Especificamente, considera-se a ingestão de 1500g de leite ao dia (**Quadro 5**) (FAO/WHO, 2009).

No Brasil, as normas de aditivos alimentares seguem as referências internacionais, baseadas primariamente no *Codex Alimentarius*, e, conforme aplicável, o Regulamento Técnico do Mercosul (ANVISA, 2017a).

Atualmente, utiliza-se a Instrução Normativa nº 09, de 21 de fevereiro de 2017, que institui os limites de referência para o Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes em Produtos de Origem Animal – PNCRC, estabelecidos pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e abastecimento (**Quadro 5**) (BRASIL, 2017).

Desta forma, concentrações dos analitos dentro dos respectivos LMR não desencadeiam alterações na microbiota intestinal, reações alérgicas ou quaisquer efeitos adversos ao consumidor (JECFA, 2014; FDA, 2015).

**Quadro 5:** Limite Máximo de Resíduo e Valores de Ingestão Diária Aceitáveis em leite.

<b>Antimicrobiano</b>	<b>LMR (µg/Kg)</b>	<b>IDA (µg/Kg)</b>
Amoxicilina	4	0 – 0,07
Ceftiofur	100	0 – 0,50
Gentamicina	200	0 – 0,20
Sulfametazina	100	0 – 0,50
Tetraciclina	100	0 – 0,30

Fonte: Adaptado de Brasil, 2017; *Codex Alimentarius*, 2015, JECFA, 2014.

Contudo, cabe salientar que os LMR são estabelecidos para a manutenção da saúde pública e animal, e não contemplam questões de tecnologia de fabricação de produtos lácteos. Assim sendo, parece plausível examinar a presença de resíduos de antimicrobianos em leite – ainda que em conformidade com o LMR relevante - quanto a sua capacidade para interferir na atividade de bactérias lácticas, causando prejuízos na fabricação de produtos lácteos fermentados.

## 4 MATERIAL E MÉTODO

O experimento foi integralmente realizado na empresa Globalfood® Sistemas, Ingredientes e Tecnologia de Alimentos LTDA, na cidade de São Paulo. Leite de vaca cru foi fornecido por fazenda do Estado de São Paulo, sendo proveniente de três diferentes animais, pertencentes a um grupo homogêneo de novilhas isentas de tratamento com antimicrobianos por período mínimo de 90 dias. Suplementarmente, todas as amostras de leite foram testadas em Delvotest® SP NT (Lote 15H26/85, DSM®, Delft, Holanda). Cada porção de leite recebida (5 litros) foi pasteurizada a 65°C por 30 minutos (Stephan, Geiger LTDA, Pinhais, Paraná, Brasil). Foram preparadas amostras de leite pasteurizado, adicionadas dos antimicrobianos amoxicilina, ceftiofur, gentamicina, sulfametazina e tetraciclina em cinco níveis de concentração (0; 0,50; 0,75; 1,0; 1,25) de seu respectivo limite máximo de resíduo (LMR), constantes no PNCRC-Leite (BRASIL, 2017) e *Codex Alimentarius* (2015). Três tipos de fermentos lácticos comerciais foram avaliados nas amostras assim preparadas, a saber: DELVO® FRESH FC-211 (*Lactococcus lactis* subsp. *lactis* e *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*), DELVO® CHEESE CP-101 (*Streptococcus thermophilus*), DELVO® FRESH YS-131 (*Lactobacillus bulgaricus* e *Streptococcus thermophilus*) (DSM®, Delft, Holanda). O efeito inibitório das substâncias antimicrobianas foi determinado pela diferença no tempo necessário para se atingir o valor de pH final ideal de fermentação de cada fermento comercial (informado pelo fabricante), quando comparado à amostra controle, considerada a zero LMR do respectivo antimicrobiano (EMEA, 1999). O controle da temperatura de incubação e das variações de pH foi realizado com o equipamento iCinac (AMS Systea, Frépillon, França) (**Figura 2**). O delineamento experimental seguiu esquema fatorial (SAMPAIO, 2010). Os resultados foram analisados por análise de variância, sendo as médias comparadas pelo Teste de Student-Newman-Keuls (SNK), empregando Software SISVAR versão 5.3 (FERREIRA, 1999). No total, foram realizadas 225 análises, com a obtenção de aproximadamente 63.675 medições de pH, o que permitiu o desenvolvimento das curvas de acidificação.

#### 4.1 PREPARO DE SOLUÇÕES ESTOQUE DE PADRÕES ANTIMICROBIANOS

Padrões analíticos certificados e rastreáveis dos antimicrobianos foram gentilmente fornecidos pelo Laboratório Nacional Agropecuário de Minas Gerais (LANAGRO-MG). Amoxicilina, tetraciclina, gentamicina (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA), ceftiofur e sulfametazina (Dr. Ehrenstorfer, Algsburg, Alemanha) foram pesados exatamente em torno de 10 miligramas. Para os padrões antimicrobianos de amoxicilina, ceftiofur e gentamicina, utilizou-se diluição em água purificada e para os demais antimicrobianos, utilizou-se metanol de grau cromatográfico (Merck, Darmstadt, Alemanha). Os padrões foram diluídos e tiveram seu volume completado a 250,00 ml em balões volumétricos calibrados, exceto para o padrão de amoxicilina, que foi diluído e completado em balão volumétrico de 500,00 ml. Soluções-estoque foram armazenadas em frascos de vidro individuais, devidamente identificados e armazenados a 4 °C. Cálculos das diluições foram desenvolvidos de forma a contemplar o nível de concentração do antimicrobiano, tendo como referência o limite máximo residual de cada droga (BRASIL, 2017; *Codex Alimentarius*, 2015) para porções de 200 mL de leite (**Quadro 6**).

**Quadro 6** – Antimicrobianos utilizados no experimento, LMR e volumes de dopagem em leite.

<b>Antimicrobiano</b>	<b>LMR</b>	<b>Fator do LMR</b>	<b>Quantidade dopada em 200 ml de leite</b>
Amoxicilina	4 µg/L	0,5	19,14 µl
		0,75	28,72 µl
		1,0	38,29 µl
		1,25	47,86 µl
Ceftiofur	100 µg/L	0,5	300,71 µl
		0,75	451,06 µl
		1,0	601,42 µl
		1,25	751,77 µl
Gentamicina	200 µg/L	0,5	821,98 µl
		0,75	1232,98 µl
		1,0	1643,97 µl
		1,25	2054,96 µl
Sulfametazina	100 µg/L	0,5	231,67 µl
		0,75	347,51 µl
		1,0	463,35 µl
		1,25	579,19 µl
Tetraciclina	100 µg/L	0,5	218,95 µl
		0,75	328,43 µl
		1,0	437,91 µl
		1,25	547,39 µl

Legenda: Para fator do LMR, interpretar como: 0,50 = 50% do LMR (0,50 x 1 LMR); 0,75 = 75% do LMR (0,75 x 1 LMR); 1,0 = 100% do LMR (1 LMR); 1,25 = 125% do LMR (1,25 x 1 LMR).

#### 4.2 PREPARO DOS FERMENTOS LÁCTICOS COMERCIAIS

Os fermentos lácticos comerciais utilizados são destinados ao uso direto em tanques, com capacidade para fermentar de dois mil a cinco mil litros de leite, conforme

necessário. Devido à baixa quantidade de leite utilizada, foi necessário diluir o fermento e proceder à repicagem, de forma que a quantidade de fermento adicionada às porções de 200 ml de leite fossem equivalentes às recomendações do fabricante. Desta forma, o fermento foi primeiramente adicionado em um litro de leite UHT, de onde obteve-se a cultura-base. Vinte gramas dos fermentos DELVO® FRESH FC-211 e DELVO® CHEESE CP-101; e 50 gramas do fermento DELVO® FRESH YS-131 (*DSM*®, Delft, Holanda), provenientes da cultura base, foram adicionados em um litro de leite cada, de onde se obteve a cultura-final, para inoculação nas amostras para análise. As culturas-base e final foram armazenadas em frascos de 25 ml e imediatamente acondicionadas em freezer (-30 °C a -50 °C), conforme recomendações do fabricante. Para a ativação dos fermentos foi utilizado leite UHT (*Ultra High Temperature*), da marca Leco (Lote 07250H13:49, Vigor Alimentos, São Paulo, Brasil), de forma a evitar possíveis contaminações ao fermento. Todas as amostras de leite UHT foram também previamente testadas em Delvotest® SP NT (Lote 15H26/85, *DSM*®, Delft, Holanda). Dois gramas, de cada cultura-final, especificamente para os fermentos DELVO® FRESH FC-211 e DELVO® CHEESE CP-101 (*DSM*®, Delft, Holanda), e um grama da cultura-final DELVO® FRESH YS-131 (*DSM*®, Delft, Holanda), foram empregados para inoculação das porções de 200 mL de leite dopadas ou não com os diferentes antimicrobianos.

#### 4.3 PREPARO DAS AMOSTRAS PARA ANÁLISE

Após a pasteurização do leite a 65°C por 30 minutos, parte do leite foi resfriado entre 2 °C a 8 °C, e assim armazenado até o dia posterior para a realização dos ensaios. Porções a serem utilizadas no mesmo dia foram acondicionadas em banho-maria para estabilização da temperatura ideal de ação de cada fermento láctico 32 °C para o fermento DELVO® FRESH FC-211 (*DSM*®, Delft, Holanda); 42 °C para os fermentos DELVO® CHEESE CP-101 e DELVO® FRESH YS-131 (*DSM*®, Delft, Holanda), conforme recomendação do fabricante. Frascos de vidro (200mL), devidamente tarados em balança, foram adicionados do volume apropriado de solução de antimicrobiano, e preenchidos com leite até, aproximadamente, a metade de seu volume. O conteúdo foi uniformizado e acrescido da quantidade adequada do fermento láctico preparado; e preenchido com leite, até completar 206 gramas (correspondente ao volume final de 200 mL de densidade do leite, medida a 1,030 g/mL). O conteúdo do frasco foi então agitado e submetido a ensaio no equipamento iCinac

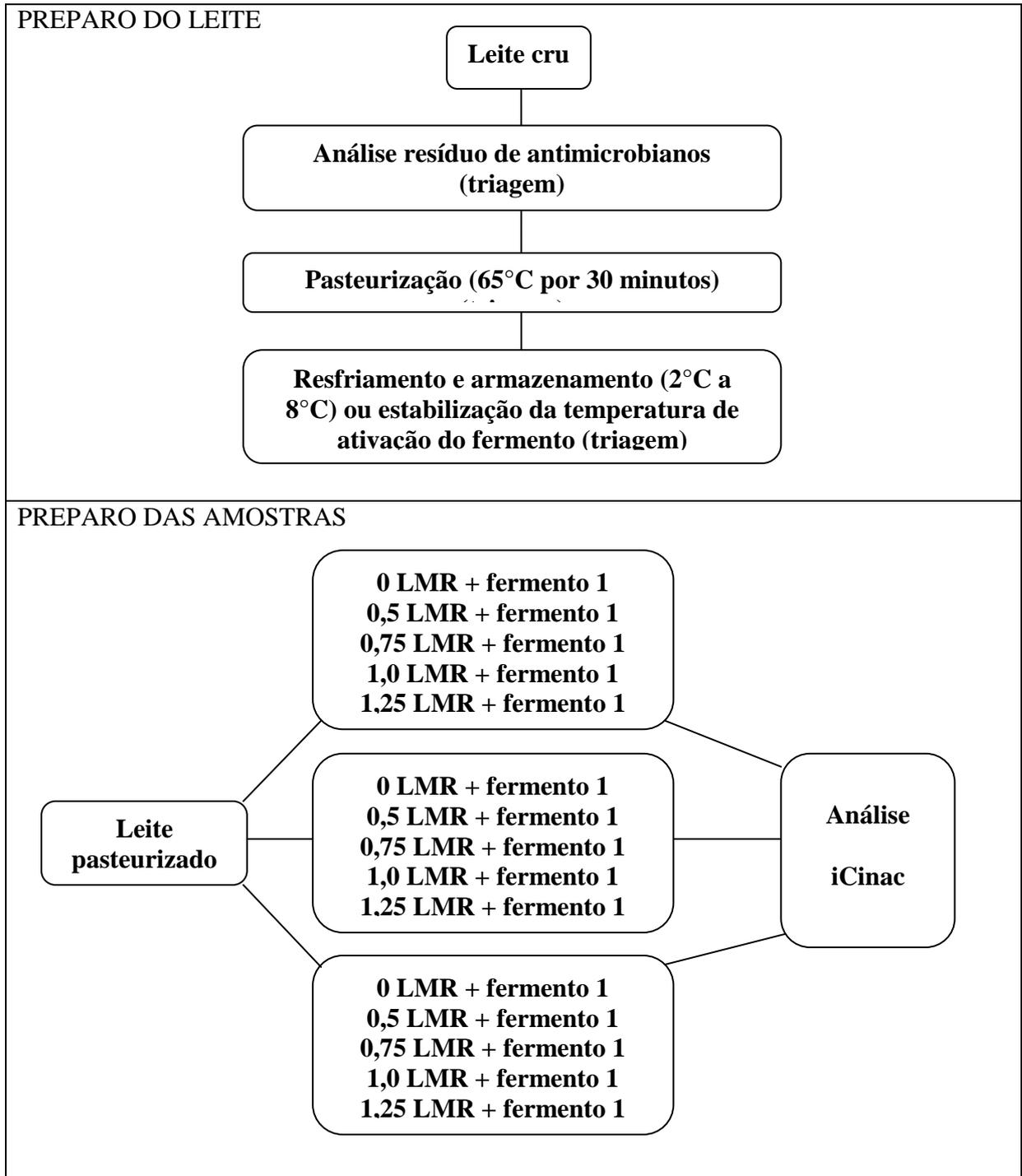
(MAS Systea, Frépillon, França), sendo as amostras incubadas em banho-maria à temperatura selecionada ao longo de todo o ensaio. Os resultados foram registrados automaticamente segundo o tempo necessário para se atingir o valor de pH ideal final de fermentação, estabelecido de acordo com as recomendações do fabricante, sendo pH 5,0 e 5,1 para o fermento DELVO® CHEESE CP-101 (DSM®, Delft, Holanda), respectivamente; pH 4,6 e 5,4 para o fermento DELVO® FRESH FC-211 (DSM®, Delft, Holanda), respectivamente; e pH 4,6 para o fermento DELVO® FRESH YS-131 (DSM®, Delft, Holanda), conforme **Quadro 7 e Figura 3**.

**Quadro 7** – Fermentos comerciais utilizados no estudo e condições experimentais.

<b>Nome do fermento comercial</b>	<b>Cepas componentes</b>	<b>Peso (g) do fermento preparado utilizado em 206 g de leite</b>	<b>pH de interesse *</b>	<b>Temperatura de fermentação (°C)</b>
DELVO® CHEESE CP-101	<i>Streptococcus thermophilus</i>	2	5,0 e 5,1	42
DELVO® FRESH FC-211	<i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>lactis</i> ; <i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>cremoris</i>	2	4,6 e 5,4	32
DELVO® FRESH YS-131	<i>Streptococcus thermophilus</i> ; <i>Lactobacillus delbrueckii</i> ssp. <i>bulgaricus</i>	1	4,6	42

Legenda: O asterisco (\*) indica que os valores de pH foram definidos pelo fabricante dos fermentos comerciais utilizados.

**Figura 3** – Esquema simplificado do preparo das amostras para análise.



Legenda: Procedimentos para o preparo do leite, parte prévia às análises e Procedimento e preparo de amostras para a análise.

#### 4.4 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL E ANÁLISE ESTATÍSTICA

O delineamento experimental e a análise estatística do resultados foram realizados conforme protocolos clássicos empregados em experimentação animal (SAMPAIO, 2010). Especificamente, foram utilizados três animais, de um grupo homogêneo de novilhas leiteiras, cujo leite foi obtido em ordem aleatória. Cada animal foi considerado uma repetição. As amostras controle foram constituídas de leite pasteurizado, inoculado com o fermento a ser avaliado no dia, isentas de antimicrobianos. Para cada dia de experimentação foi avaliada uma amostra controle, base para todos os tratamentos testados em um mesmo dia, e sob as mesmas condições. O tempo necessário para a obtenção do pH de interesse na amostra controle foi utilizado como tempo padrão (ou de referência) para as amostras de tratamentos analisadas no mesmo dia. Cada fermento foi avaliado isoladamente, não foram feitas comparações entre os fermentos utilizados. O delineamento seguiu em esquema fatorial, sendo as médias comparadas com o Teste de Student-Newman-Keuls (SNK). Análise de variância (ANOVA) foi realizada por meio do Software SISVAR versão 5.3 (FERREIRA, 1999), considerando  $p < 0,05$  como critério para significância.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

As amostras foram analisadas em equipamento iCinac (AMS Systea, Frépillon, França) que permitiu a avaliação da evolução fermentativa através de medições contínuas do valor de pH das amostras.

O tempo gasto pelas amostras dopadas com antimicrobianos para atingir o pH de interesse foi comparado com o tempo medido para resultado equivalente da amostras controle, o que permitiu avaliar a ocorrência de inibição do fermento frente a diferentes concentrações de antimicrobianos em torno do LMR (EMEA, 1999). Adicionalmente, e de forma reversa, fixados os tempos de atingimento dos valores-alvo de pH pelas amostras controle, foi comparado o pH atingido pelos tratamentos no referido tempo.

A Agência Europeia de Medicamentos (EMEA) estabelece que diferenças maiores que 0,3 unidades de pH, entre as amostras dopadas com antimicrobianos, comparadas às amostras controle, são suficientes para representar o efeito inibitório da substância antimicrobiano. Analogamente, quando da utilização de valores de pH pré-fixados, a diferença estatisticamente significativa no tempo de atingimento do pH pela amostra dopada, quando comparado à amostra controle, também reflete o efeito inibitório do antimicrobiano sobre o fermento avaliado (EMEA, 1999).

A análise estatística dos dados se deu por utilização de ANOVA, tendo como fontes de variação o bloco de animal, os antimicrobianos, as concentrações e a interação entre antimicrobianos e concentrações. Os tratamentos estatísticos revelaram a interação entre concentração e antimicrobianos, isoladamente para cada fermento, em seu respectivo valor de pH de interesse.

A blocagem dos animais entre as fontes de variação da tabela de ANOVA permitiu a remoção das características intrínsecas e suas implicações sobre os tratamentos, o que favoreceu a melhor percepção dos efeitos dos tratamentos.

O delineamento se deu em esquema fatorial, sendo as médias comparadas com o Teste de Student-Newman-Keuls (SNK), o mais indicado para experimentos agrícolas com coeficiente de variação de até 30% e com até cinco tratamentos. Este teste permite controlar o erro tipo I (atribuir uma relevância quando esta não existe), diminuindo o risco de atribuição errônea de diferenças entre controle e tratamentos (SAMPAIO, 2010).

### 5.1 DELVO® CHEESE CP-101 (*Streptococcus thermophilus*)

O fermento composto por *Streptococcus thermophilus*, cultura termofílica, para inoculação direta, após prévia dissolução, é comumente aplicado na fabricação de queijo tipo muçarela. Para este fermento foram fixados os valores de pH de 5,0 e de 5,1, recomendados para a formação e aperfeiçoamento da massa base, na fabricação de produtos.

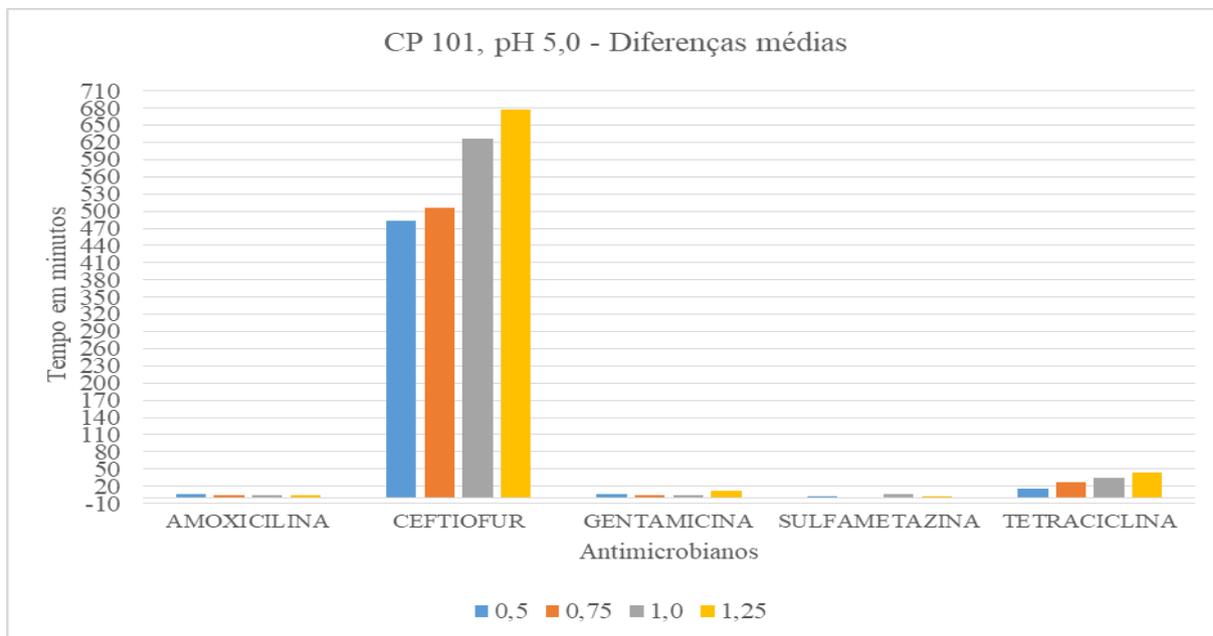
De acordo com os resultados obtidos, de maneira geral, para o fermento composto por *Streptococcus thermophilus*, não foram constatadas variações contrastantes entre os valores de pH de estudo (**Gráfico 1** e **Gráfico 2**). Os antimicrobianos amoxicilina, sulfametazina e gentamicina não produziram inibição fermentativa, com tempos de coagulação similares aos controles testados.

Considerando as médias avaliadas para ambos os valores de pH, o antimicrobiano tetraciclina gerou atrasos no processo fermentativo que variaram de 10 minutos, em concentração a 0,50 do LMR, a 60 minutos, em concentração a 1,25 do LMR. Na concentração correspondente a seu LMR, eram detectáveis cerca de 30 minutos de atraso de fermentação em relação ao controle.

Entretanto, o antimicrobiano ceftiofur (**Gráficos 1 e 2**) inibiu a fermentação mesmo em concentração equivalente a 0,50 de seu LMR, com atraso mínimo de 8 horas no processo produtivo. O tempo máximo para obtenção dos valores de pH de interesse ficou em torno de 11 horas, em concentração equivalente a 1,25 do respectivo LMR.

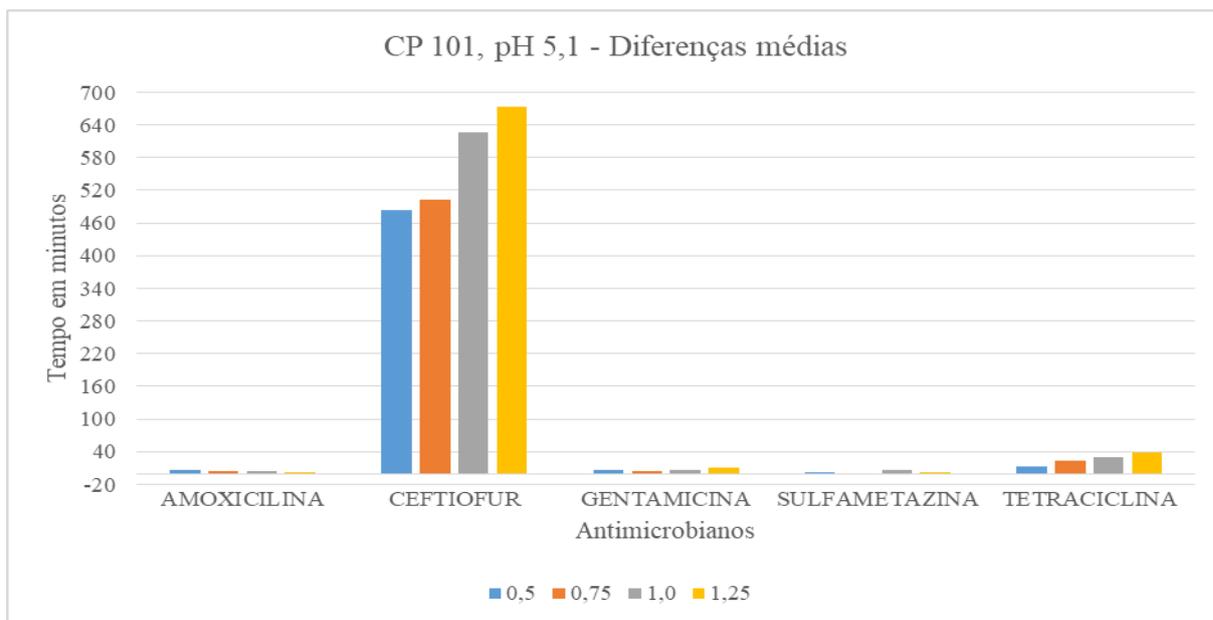
A blocagem dos animais permitiu que o experimento fosse bem controlado quanto às possíveis interferências de eventuais diferenças entre animais no resultado dos tratamentos. O bloco de animais não teve efeito significativo ( $p > 0,05$ ) na experimentação, ao contrários dos demais tratamentos utilizados ( $p < 0,05$ ). Com base nos valores de Quadrado Médio pode-se observar que os antimicrobianos representam o fator de maior impacto no estudo. O baixo coeficiente de variação, abaixo de 15%, demonstra que o experimento foi bem controlado e apresentou baixa instabilidade, considerando que para este tipo de estudo, o coeficiente de variação pode variar em até 30% (SAMPAIO, 2010).

**Gráfico 1** – Diferenças médias entre o tempo (minutos) de obtenção do valor de pH 5,0 entre amostras dopadas com antimicrobianos selecionados e a amostra controle, para o fermento DELVO® CHEESE CP-101.



Legenda: Eixo das abcissas (x) composto por cinco antimicrobianos selecionados e suas concentrações seletivas ao LMR; eixo das ordenadas (y) representa o a diferença média do tempo em minutos necessários para se atingir o pH 5,0 em relação ao controle.

**Gráfico 2** – Diferenças médias entre o tempo (minutos) de obtenção do valor de pH 5,1 entre amostras dopadas com antimicrobianos selecionados e a amostra controle, para o fermento DELVO® CHEESE CP-101.



Legenda: Eixo das abcissas (x) composto por cinco antimicrobianos selecionados; eixo das ordenadas (y) representa o a diferença média do tempo em minutos necessários para se atingir o pH 5,1 em relação ao controle.

Com base na comparação de médias relativas ao tempo (minutos) necessário para se atingir o pH de interesse da fermentação, os antimicrobianos amoxicilina, gentamicina, sulfametazina e tetraciclina apresentaram resultados semelhantes ao controle e não se diferenciaram estatisticamente ( $p > 0,05$ ), indicando que não houve inibição da ação fermentativa em quaisquer das concentrações testadas (**Quadro 8**).

Todavia, para as amostras dopadas com ceftiofur, o tempo para atingir os valores de pH de interesse foi significativamente maior que ( $p < 0,05$ ) a amostra controle e que para demais substâncias testadas, a partir de concentração equivalente à metade de seu respectivo LMR. À medida que as concentrações aumentaram, o tempo necessário para atingir o pH também foi aumentado, o que sugere interação entre fatores (**Quadro 8**).

Alternativamente, quando comparadas as médias das variações de valores de pH alcançados pelos tratamentos dentro do tempo de fermentação de referência obtido pela amostra controle para atingir o pH desejado, foram confirmados os achados anteriores para os antimicrobianos amoxicilina, gentamicina e sulfametazina. Independente da concentração utilizada, tais antimicrobianos não causaram diferença significativa ( $p > 0,05$ ) nos valores finais de pH da fermentação em relação ao controle (**Quadro 9**).

Entretanto, esse critério confirma o efeito inibitório do antimicrobiano ceftiofur em níveis abaixo de seu LMR (**Quadro 9**), reforçando os resultados obtidos para o caso em que o tempo para atingimento de pH é considerado. As comparações de médias mostram diferenças estatisticamente significativas ao nível de 5% de probabilidade ( $p < 0,05$ ) entre o controle e as amostras dopadas com este antimicrobiano. Assinala-se que a evolução das doses utilizadas não interferiu na progressão das médias, o que sugere que tal efeito já atinge seu ápice em concentração a partir do equivalente a 0,5 LMR.

O estudo aprofundado das variações de pH em tempo determinado permitiu a detecção do efeito inibidor de tetraciclina sobre o fermento a partir da concentração de 0,75 de seu LMR. Nesse caso, ao contrário do ceftiofur, doses crescentes afetaram a evolução do pH em relação ao controle.

**Quadro 8** – Comparação de médias para o fermento DELVO® CHEESE CP-101, referentes aos tempos (minutos) de fermentação requeridos para atingimento de valores de pH 5,0 e 5,1.

COMPARAÇÃO DE MÉDIAS						
CP 101 pH 5,0						
ANTIMICROBIANO	LMR (µg/L)	FATORES DO LMR				
		0	0,5	0,75	1,0	1,25
AMOXICILINA	4	188 A a	195 A a	192 A a	192 A a	192 A a
CEFTIOFUR	100	187 A a	671 B b	692 B b	814 B c	864 B c
GENTAMICINA	200	187 A a	193 A a	191 A a	192 A a	199 A a
SULFAMETAZINA	100	192 A a	193 A a	191 A a	198 A a	194 A a
TETRACICLINA	100	192 A a	208 A a	219 A a	226 A a	236 A a
CP 101 pH 5,1						
ANTIMICROBIANO	LMR (µg/L)	FATORES DO LMR				
		0	0,5	0,75	1,0	1,25
AMOXICILINA	4	177 A a	183 A a	182 A a	182 A a	180 A a
CEFTIOFUR	100	176 A a	660 B b	678 B b	803 B c	850 B c
GENTAMICINA	200	176 A a	183 A a	180 A a	182 A a	186 A a
SULFAMETAZINA	100	180 A a	182 A a	180 A a	187 A a	182 A a
TETRACICLINA	100	180 A a	194 A a	204 A a	211 A a	219 A a

Legenda: Letras maiúsculas comparam antimicrobianos (colunas), letras minúsculas comparam os fatores do LMR (linhas). Letras iguais indicam resultados estatisticamente iguais ( $p > 0,05$ ), letras diferentes indicam resultados estatisticamente diferentes ( $p < 0,05$ ). Fatores do LMR: 0 = isento de antimicrobiano; 0,5 = 50% do LMR; 0,75 = 75% do LMR; 1,0 = 1 LMR; 1,25 = 125% do LMR.

**Quadro 9** – Comparação de médias para o fermento DELVO® CHEESE CP-101, referente à variação de pH nos tratamentos, relativo ao tempo (minutos) de atingimento do pH 5,0 e pH 5,1 pela amostra controle.

COMPARAÇÃO DE MÉDIAS						
CP 101 pH 5,0						
ANTIMICROBIANO	LMR (µg/L)	FATORES DO LMR				
		0	0,5	0,75	1,0	1,25
AMOXICILINA	4	5,02 A a	5,09 A a	5,07 A a	5,07 A a	5,06 A a
CEFTIOFUR	100	5,04 A a	6,66 B b	6,65 C b	6,66 C b	6,65 C b
GENTAMICINA	200	5,04 A a	5,09 A a	5,06 A a	5,07 A a	5,12 A a
SULFAMETAZINA	100	5,03 A a	5,04 A a	5,02 A a	5,08 A a	5,04 A a
TETRACICLINA	100	5,03 A a	5,14 A b	5,23 B bc	5,29 B cd	5,36 B d
CP 101 pH 5,1						
ANTIMICROBIANO	LMR (µg/L)	FATORES DO LMR				
		0	0,5	0,75	1,0	1,25
AMOXICILINA	4	5,13 A a	5,19 A a	5,16 A a	5,17 A a	5,16 A a
CEFTIOFUR	100	5,13 A a	6,65 B b	6,65 C b	6,65 C b	6,65 C b
GENTAMICINA	200	5,13 A a	5,19 A a	5,16 A a	5,17 A a	5,23 A a
SULFAMETAZINA	100	5,14 A a	5,15 A a	5,12 A a	5,18 A a	5,15 A a
TETRACICLINA	100	5,14 A a	5,25 A b	5,35 B bc	5,41 B cd	5,48 B d

Legenda: Letras maiúsculas comparam antimicrobianos (colunas), letras minúsculas comparam os fatores do LMR (linhas). Letras iguais indicam resultados estatisticamente iguais ( $p > 0,05$ ), letras diferentes indicam resultados estatisticamente diferentes ( $p < 0,05$ ). Fatores do LMR: 0 = isento de

antimicrobiano / controle; 0,5 = 50% do LMR; 0,75 = 75% do LMR; 1,0 = 1 LMR; 1,25 = 125% do LMR.

Assim, o fermento composto por *Streptococcus thermophilus* foi inibido por ceftiofur ou tetraciclina em concentrações abaixo de seus respectivos LMR.

Em contraste, bombas de efluxo de tetraciclina ou multidrogas foram reportadas em cepas de *Streptococcus thermophilus* e a consequente resistência da cepa ao antimicrobiano (RIZZOTTI, *et al.*, 2009; ARIOLI, *et al.*, 2014). Todavia, os resultados aqui descritos coincidem com os achados de Liu *et al.* (2009), em que a cultura utilizada não se mostrou resistente à tetraciclina.

O desempenho da cultura frente ao ceftiofur também foi anteriormente citado, retratando o efeito inibitório da substância em concentração equivalente a 100 µg/Kg, equivalente ao seu LMR (EMEA, 1999).

Todavia, a espécie equivalente também é resistente a antimicrobianos da classe dos aminoglicosídeos, como é o caso da gentamicina (RIZZOTTI, *et al.*, 2009; ARIOLI, *et al.*, 2014). Ainda assim, o método de avaliação da atividade inibidora ocorreu de formas diferentes, com a utilização de discos e contagem padrão em placas, com meios específicos pelos autores citados.

A utilização do fermento diretamente no leite, com incubação em banho-maria e a medição contínua dos valores de pH, permitiram forma adicional de acompanhamento da evolução fermentativa e produziram resultados mais condizentes à realidade de utilização do fermento.

## 5.2 DELVO® FRESH FC-211 (*Lactococcus lactis* subsp. *lactis* e *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*)

Este fermento é composto por cultura láctica mista, mesofílica e altamente concentrada, para utilização direta no leite, após diluição inicial. É amplamente utilizado na produção de queijos frescos, com os valores pH de interesse fixados em 4,6 e 5,4.

Poucos resultados se mostraram estatisticamente diferentes entre os tratamentos, quando comparados aos ocorridos para o objetivo de pH 4,6.

Com base na comparação das diferenças médias (**Gráficos 3 e 4**), a princípio, observou-se que amostras dopadas com amoxicilina apresentaram tendência inversa à

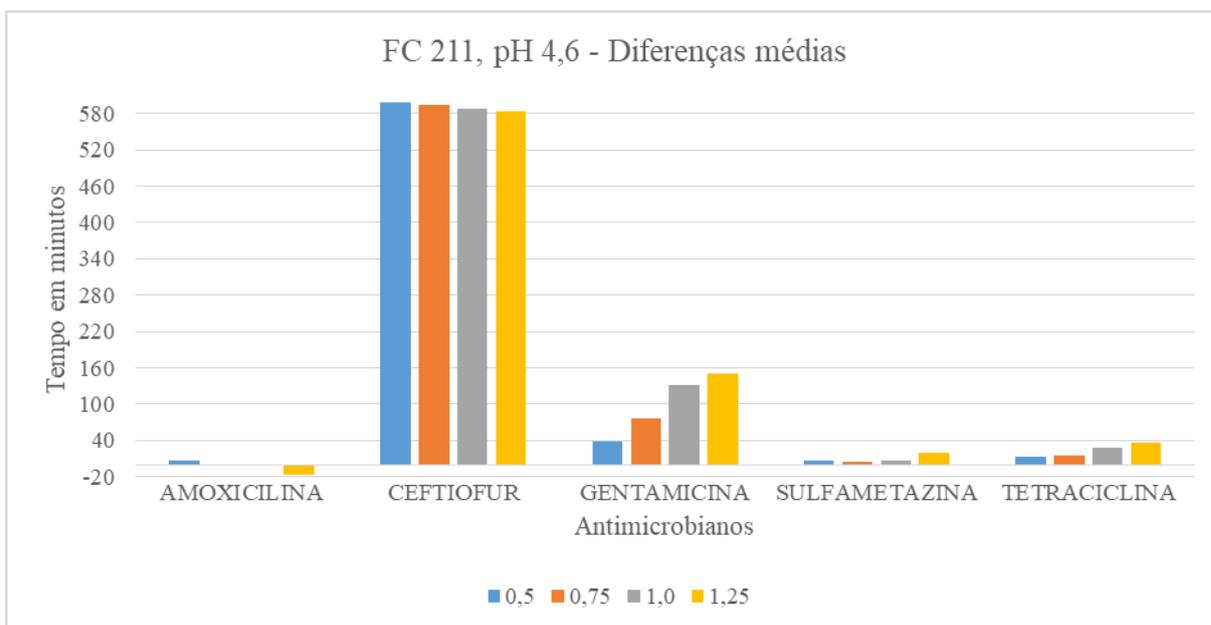
esperada, com uma sutil aceleração do processo fermentativo onde a comparação do tempo com a amostra controle revelou tempos inferiores ao controle para o pH 4,6 (**Gráfico 3**).

Contudo, amostras dopadas com ceftiofur e gentamicina apresentaram significativa inibição (**Gráficos 3 e 4**).

O antimicrobiano gentamicina, promoveu atrasos no processo fermentativo, que variaram de 16 minutos, em concentração equivalente a 0,50 do LMR, a até quatro horas, a 1,25 do LMR, para ambos os valores alvo de pH estabelecidos para este fermento.

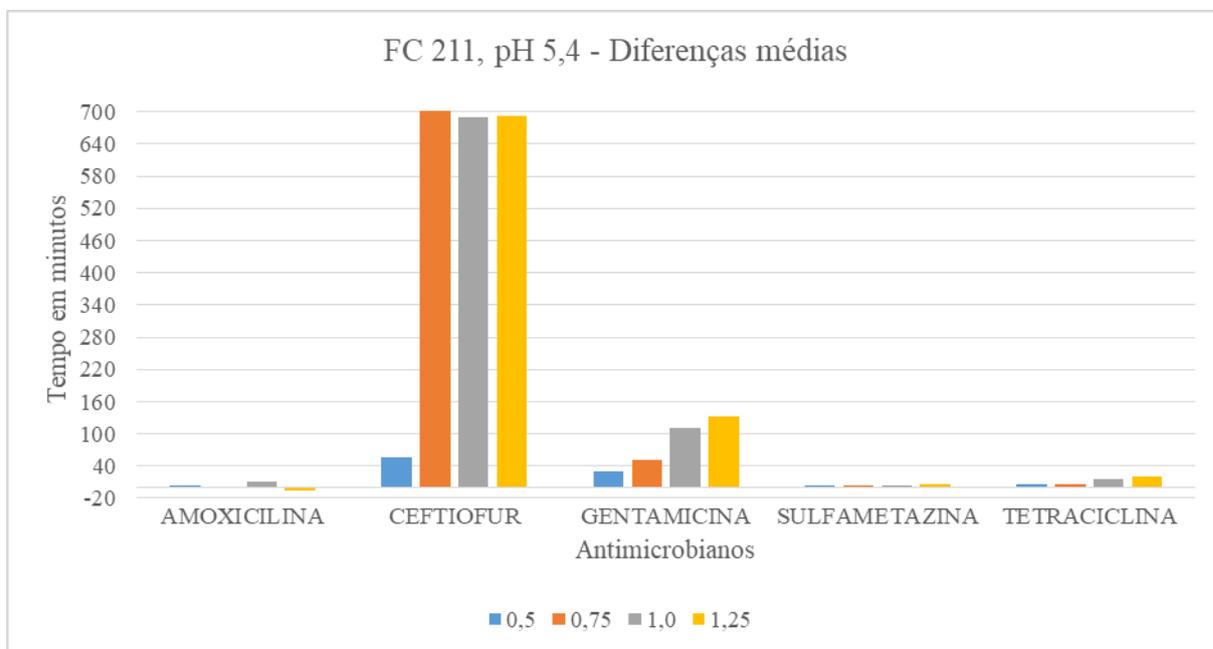
O antimicrobiano ceftiofur inibiu quase que completamente a atividade fermentativa do produto avaliado e, independentemente do tempo de incubação, nenhuma das amostras testadas atingiram o pH 4,6. Algumas amostras atingiram pH 5,4; todavia, o fármaco foi capaz de inibir a fermentação da maioria dos tratamentos testados.

**Gráfico 3** – Diferenças médias entre o tempo (minutos) de obtenção do pH 4,6 entre amostras dopadas com antimicrobianos selecionados e a amostra controle, para o fermento DELVO® FRESH FC-211.



Legenda: Eixo das abcissas (x) composto por cinco antimicrobianos selecionados; eixo das ordenadas (y) representa o a diferença média do tempo em minutos necessários para se atingir o pH 4,6 em relação ao controle.

**Gráfico 4** – Diferenças médias entre o tempo (minutos) de obtenção do pH 5,4 entre amostras dopadas com antimicrobianos selecionados e a amostra controle, para o fermento DELVO® FRESH FC-211.



Legenda: Eixo das abcissas (x) composto por cinco antimicrobianos selecionados; eixo das ordenadas (y) representa o a diferença média do tempo em minutos necessários para se atingir o pH 5,4 em relação ao controle.

O antimicrobiano ceftiofur inibiu quase que completamente a atividade fermentativa do produto avaliado e, independentemente do tempo de incubação, nenhuma das amostras testadas atingiram o pH 4,6. Algumas amostras atingiram pH 5,4; todavia, o fármaco foi capaz de inibir a fermentação da maioria dos tratamentos testados.

Devido à inibição microbiana observada (**Gráficos 3 e 4**) pelo antimicrobiano ceftiofur, quando do não atingimento do pH de interesse durante a experimentação, foi atribuído o tempo máximo de experimentação comum a todos os ensaios (946 minutos) para possibilitar a avaliação estatística dos dados, conforme descrito no **Quadro 10**.

**Quadro 10** – Tempo (minutos) de atingimento do pH pelo fermento DELVO® FRESH FC-211, sob adição de concentrações de ceftiofur em torno do LMR.

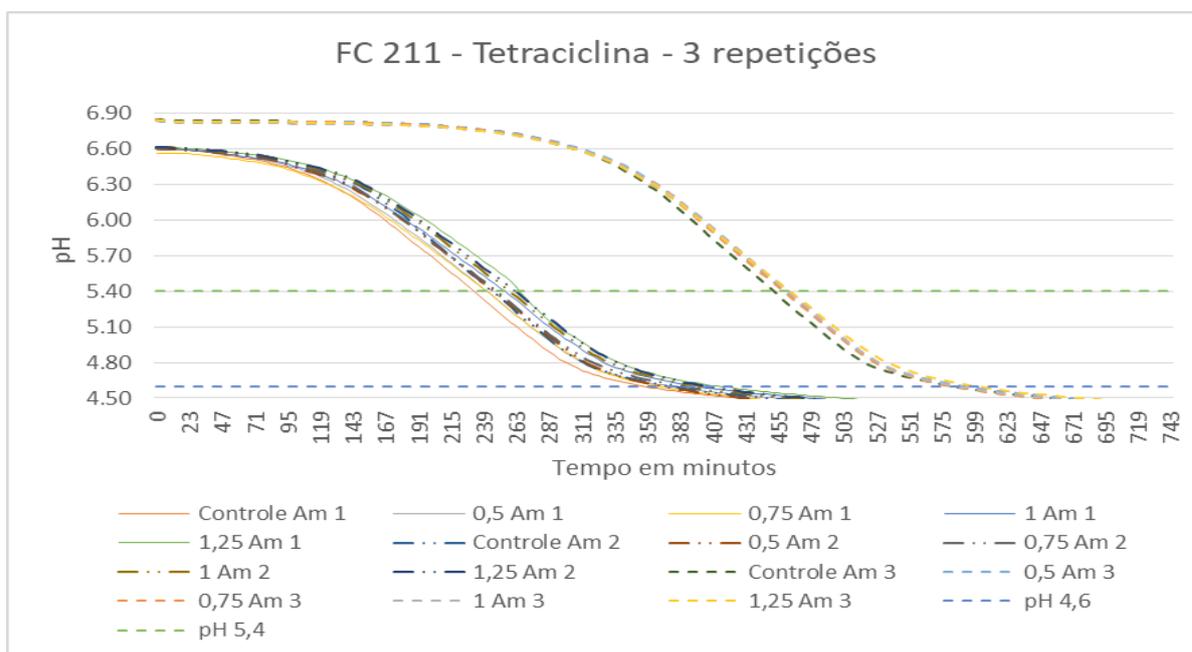
<b>FC 211 - pH 4,6</b>			
<b>Animal</b>	<b>Fator do LMR</b>	<b>Tempo (minutos) para atingir o pH</b>	<b>Tempo (minutos) atribuído</b>
1	0.5	Não observado	946
1	0.75	Não observado	946
1	1	Não observado	946
1	1.25	Não observado	946
2	0.5	Não observado	946
2	0.75	Não observado	946
2	1	Não observado	946
2	1.25	Não observado	946
3	0.5	Não observado	946
3	0.75	Não observado	946
3	1	Não observado	946
3	1.25	Não observado	946
<b>FC 211 - pH 5,4</b>			
<b>Animal</b>	<b>Fator do LMR</b>	<b>Tempo (minutos) para atingir o pH</b>	<b>Tempo (minutos) atribuído</b>
1	0.5	251	946
1	0.75	Não observado	946
1	1	991	946
1	1.25	Não observado	946
2	0.5	283	946
2	0.75	Não observado	946
2	1	Não observado	946
2	1.25	Não observado	946
3	0.5	535	946
3	0.75	Não observado	946
3	1	Não observado	946
3	1.25	Não observado	946

Legenda: Tempo (minutos) de atingimento do pH de interesse e tempo (minutos) atribuído (comum a todas as experimentações), quando do não atingimento do pH de interesse durante a experimentação. Fatores do LMR: 0 = isento de antimicrobiano / controle; 0,5 = 50% do LMR; 0,75 = 75% do LMR; 1,0 = 1 LMR; 1,25 = 125% do LMR.

Especificamente, quando da utilização do leite proveniente do animal três, observou-se um aumento expressivo no tempo de atingimento dos valores de pH fixados para este fermento, devido ao fato de que o pH inicial do leite foi maior para este animal. Possivelmente, esta variação pode ser atribuída ao metabolismo do animal e a alterações na concentração de extrato seco desengordurado. Este comportamento pôde ser observado nas

amostras dopadas com antimicrobianos, bem como nas amostras controle. Todavia, apesar da diferença no tempo médio de alcance dos valores de pH 4,6 e 5,4, as respostas avaliadas (tempo e pH) não foram influenciadas. O desempenho fermentativo do fermento frente aos antimicrobianos selecionados foi semelhante em todas as repetições, sob o aspecto da curva fermentativa, conforme exemplificado no **Gráfico 5**.

**Gráfico 5** – Tempo (minutos) de atingimento do pH pelo fermento DELVO® FRESH FC-211, sob adição de concentrações de ceftiofur em torno do LMR, em três repetições.



Legenda: Curva de acidificação das amostras sob adição de tetraciclina e inoculadas com o fermento DELVO® FRESH FC-211 para as três repetições realizadas. Eixo das abcissas (x): tempo em minutos; eixo das ordenadas (y): valores de pH. Linhas horizontais: pHs de interesse.

Devido a esta variação nas médias, o bloco de animal foi significativo ( $p < 0,05$ ) na comparação entre tratamentos. Todavia, a blocagem de animal permitiu a diminuição da instabilidade experimental, refletida no baixo coeficiente de variação observado para o experimento ( $CV < 15\%$ ) (SAMPAIO, 2010).

As comparações de médias, ao nível de significância estatística, mostraram que tratamentos com ceftiofur foram significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ) da amostra controle, em níveis equivalentes já à metade do LMR para o valor de pH 4,6, e a partir de 0,75 do LMR para o valor de pH 5,4. As concentrações não foram impactantes na evolução das médias; no entanto, o efeito inibitório se revelou ainda maior ao nível superior ao LMR (**Quadro 11**).

**Quadro 11** – Comparação de médias para o fermento DELVO® FRESH FC-211, referentes aos tempos (minutos) de fermentação requeridos para atingimento de valores de pH 4,6 e 5,4.

COMPARAÇÃO DE MÉDIAS						
FC 211 - pH 4,6						
ANTIMICROBIANO	LMR (µg/L)	FATORES DO LMR				
		0	0,5	0,75	1,0	1,25
AMOXICILINA	4	412 A a	419 A a	411 A a	410 A a	396 A a
CEFTIOFUR	100	408 A a	946 B b	946 B b	946 C b	946 C b
GENTAMICINA	200	408 A a	447 A ab	484 A ab	540 B b	559 B b
SULFAMETAZINA	100	419 A a	426 A a	424 A a	426 A a	438 A a
TETRACICLINA	100	414 A a	427 A a	428 A a	442 A a	450 A a
FC 211 - pH 5,4						
ANTIMICROBIANO	LMR (µg/L)	FATORES DO LMR				
		0	0,5	0,75	1,0	1,25
AMOXICILINA	4	300 A a	303 A a	300 A a	311 A a	295 A a
CEFTIOFUR	100	300 A a	356 A a	946 B b	961 B b	946 C b
GENTAMICINA	200	300 A a	330 A ab	352 A ab	410 A b	432 B b
SULFAMETAZINA	100	307 A a	310 A a	310 A a	310 A a	314 A a
TETRACICLINA	100	307 A a	314 A a	314 A a	322 A a	327 A a

Legenda: Letras maiúsculas comparam antimicrobianos (colunas), letras minúsculas comparam os fatores do LMR (linhas). Letras iguais indicam resultados estatisticamente iguais ( $p > 0,05$ ), letras diferentes indicam resultados estatisticamente diferentes ( $p < 0,05$ ). Fatores do LMR: 0 = isento de antimicrobiano / controle; 0,5 = 50% do LMR; 0,75 = 75% do LMR; 1,0 = 1 LMR; 1,25 = 125% do LMR.

**Quadro 12** – Comparação de médias para o fermento DELVO® FRESH FC-211, referente à variação de pH nos tratamentos, no tempo (minutos) de atingimento do pH 4,6 e pH 5,4 pela amostra controle.

COMPARAÇÃO DE MÉDIAS						
FC 211 - pH 4,6						
ANTIMICROBIANO	LMR (µg/L)	FATORES DO LMR				
		0	0,5	0,75	1,0	1,25
AMOXICILINA	4	4,63 A a	4,64 A a	4,62 A a	4,64 A a	4,59 A a
CEFTIOFUR	100	4,64 A a	5,21 B b	6,01 B c	6,42 C d	6,51 C d
GENTAMICINA	200	4,60 A a	4,75 A ab	4,97 A abc	5,11 B bc	5,31 B c
SULFAMETAZINA	100	4,64 A a	4,65 A a	4,65 A a	4,65 A a	4,69 A a
TETRACICLINA	100	4,64 A a	4,66 A a	4,66 A a	4,70 A a	4,73 A a
FC 211 - pH 5,4						
ANTIMICROBIANO	LMR (µg/L)	FATORES DO LMR				
		0	0,5	0,75	1,0	1,25
AMOXICILINA	4	5,43 A a	5,45 A a	5,43 A a	5,53 A a	5,37 A a
CEFTIOFUR	100	5,42 A a	5,73 A b	6,14 C c	6,45 B d	6,53 C d
GENTAMICINA	200	5,42 A a	5,69 A b	5,85 B b	6,19 B c	6,23 B c
SULFAMETAZINA	100	5,43 A a	5,45 A a	5,46 A a	5,4 A a	5,50 A a
TETRACICLINA	100	5,43 A a	5,48 A a	5,48 A a	5,56 A a	5,61 A a

Legenda: Letras maiúsculas comparam antimicrobianos (colunas), letras minúsculas comparam os fatores do LMR (linhas). Letras iguais indicam resultados estatisticamente iguais ( $p > 0,05$ ), letras

diferentes indicam resultados estatisticamente diferentes ( $p < 0,05$ ). Fatores do LMR: 0 = isento de antimicrobiano / controle; 0,5 = 50% do LMR; 0,75 = 75% do LMR; 1,0 = 1 LMR; 1,25 = 125% do LMR.

Ao nível do LMR, houve aumento de tempo significativo ( $p < 0,05$ ) para o antimicrobiano gentamicina em relação ao controle, indicativo da existência de linha tênue entre processos fermentativos normais e possíveis consequências tecnológicas.

Estes achados indicam que concentrações superiores deste antimicrobiano tendem a desencadear falhas de processos e perdas produtivas na fabricação de lácteos fermentados, devido à possível inibição do fermento composto por *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* e *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*.

Não é significativo, porém, o aparente efeito acelerador da fermentação por adição de amoxicilina; apesar de haver aparente diminuição das médias em relação ao controle, as concentrações utilizadas não influenciaram significativamente ( $p > 0,05$ ) a acidificação do leite (**Quadro 11**).

Ainda que não tenham ocorrido diferenças significativas, a aceleração do processo de acidificação pode indicar um possível quadro de resistência antimicrobiana. De fato, Hill (2017) afirma que cepas resistentes tendem a aumentar as taxas de acidificação do meio, quando em contato com antimicrobianos em baixa atividade inibitória.

Na inibição da fermentação por resíduos de antimicrobianos, o crescimento inicial pode ser prejudicado e se tornar lento, ou mesmo levar ao bloqueio de produção de ácido láctico (EMEA, 2000; HILL, 2017). Em alguns casos, quando a inibição não é severa, cepas resistentes tendem a aumentar a acidificação (HILL, 2017).

Estudos anteriormente realizados já demonstravam comportamento semelhante de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* e *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* frente a baixas doses de penicilina (0,10 a 0,15 UI/mL) (HAMMER; BABEL, 1957).

Ao valor de pH 5,4, tratamentos com amoxicilina, sulfametazina e tetraciclina se mostraram iguais ao controle, independentemente da concentração utilizada ( $p > 0,05$ ).

A abordagem da variação de pH em tempo definido pela amostra controle permitiu a confirmação dos resultados observados para ceftiofur e gentamicina, em ambos os valores de pHs de interesse para esta cultura láctica comercial. Ambos os antimicrobianos causaram diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) em relação às médias de pH atingidas pelas amostras controle. Neste caso, as concentrações influenciaram no desenvolvimento da acidez, onde doses em torno de 0,5 do LMR já se demonstraram significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ) do controle testado, acarretando em atrasos na acidificação do meio. (**Quadro 12**).

Estes dados demonstram que dosagens inferiores aos respectivos LMR, para os antimicrobianos ceftiofur e gentamicina, foram capazes de promover inibição do fermento composto por *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* e *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris*.

De fato, a resistência à tetraciclina, por bombas de efluxo multidrogas, já foi anteriormente relatada, contribuindo para explicar o efeito observado para este estudo (PERRETEN *et al.*, 2001; POELARENDS, MAZERKIEWICZ, KONINGS, 2002).

Os achados para amoxicilina e sulfametazina podem refletir o estudo de Aziz, Abdulraman e Essa (2015), que demonstraram a resistência de cepas de *Lactococcus lactis* aos antimicrobianos citados.

Todavia, estes autores também encontram cepas resistentes a gentamicina e a ceftriaxona, uma cefalosporina de terceira geração, como o ceftiofur (AZIZ; ABDULRAMAN; ESSA, 2015).

As cefalosporinas de terceira geração possuem menor espectro de ação contra bactérias Gram-positivas (SPINOSA; GÓRNIAK; BERNARDI, 2006); contudo, o ceftiofur se mostrou ativo contra o fermento aqui testado. Diferenças nas cepas testadas, na qualidade e nas características intrínsecas de cada animal podem ter diferenciado o resultado entre estudos.

### 5.3 DELVO® FRESH YS-131 (*Streptococcus thermophilus* e *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*).

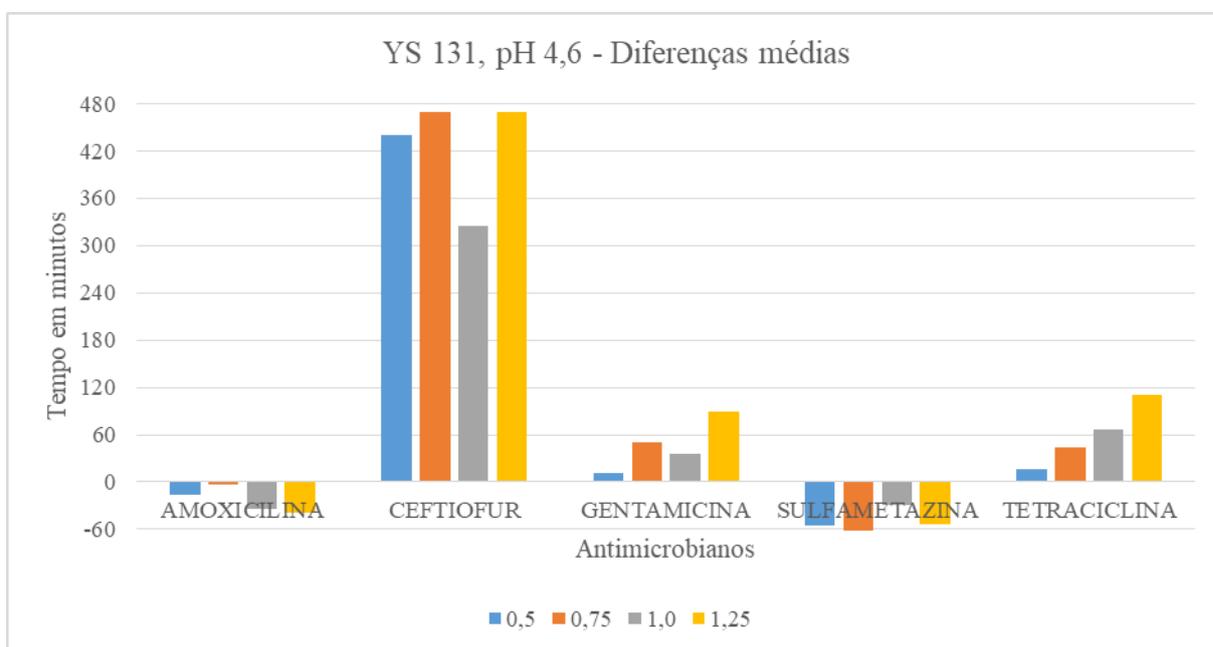
A cultura mista, termofílica, concentrada, composta por *Streptococcus thermophilus* e *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*, é utilizada na produção de iogurtes. Este fermento, fabricada para utilização direta, tem o valor de pH estabelecido para final da fermentação em 4,6, ideal para a formação do produto.

Em análise inicial, com base na comparação de diferenças entre as médias das amostras dopadas e as amostras controle, percebeu-se um comportamento inesperado do fermento frente aos antimicrobianos amoxicilina e sulfametazina, com tendências a acelerar o processo de acidificação do leite. As diferenças médias sugerem que amostras dopadas com amoxicilina aceleraram o processo em até 30 minutos. A sulfametazina parece ter auxiliado no processo fermentativo de maneira mais intensa, onde o tempo para se atingir o pH foi acelerado entre 30 a 70 minutos (**Gráfico 6**). Estes resultados podem representar um possível

quadro de resistência, em que, apenas dosagens maiores dos antimicrobianos selecionados seriam capazes de inibir o fermento testado (HANDWERGER; TOMASZ, 1985; KESTER; FORTUNE, 2014).

Entretanto, gentamicina e tetraciclina parecem ter exercido efeito inibitório sobre o fermento testado. Segundo as diferenças médias (**Gráfico 6**) observadas, estes antimicrobianos produziram atrasos que variaram de 10 minutos a 90 minutos cada.

**Gráfico 6** – Diferenças médias entre o tempo (minutos) de obtenção do pH 4,6 entre amostras dopadas com antimicrobianos selecionados e a amostra controle, para o fermento DELVO® FRESH YS-131.



Legenda: Eixo das abcissas (x) composto por cinco antimicrobianos selecionados; eixo das ordenadas (y) representa o a diferença média do tempo em minutos necessários para se atingir o pH 4,6 em relação ao controle.

Mais uma vez, o antimicrobiano ceftiofur foi capaz de inibir, quase que totalmente, as atividades fermentativas. Mesmo ao final do prazo máximo de incubação, a maior parte das amostras não atingiram o pH desejado. Desta forma, quando do não atingimento do pH de interesse durante a experimentação, foi atribuído o tempo máximo de experimentação comum a todos os ensaios (945 minutos) para possibilitar a avaliação estatística dos dados, conforme descrito no **Quadro 13**.

**Quadro 13** – Tempo (minutos) de atingimento do pH pelo fermento DELVO® FRESH YS-131, sob adição de concentrações de ceftiofur em torno do LMR.

YS 131 – pH 4,6			
Animal	Fator do LMR	Tempo (minutos) para atingir o pH	Tempo (minutos) atribuído
1	0.5	Não obtido	945
1	0.75	Não obtido	945
1	1	Não obtido	945
1	1.25	Não obtido	945
2	0.5	767	945
2	0.75	Não obtido	945
2	1	Não obtido	945
2	1.25	Não obtido	945
3	0.5	Não obtido	945
3	0.75	915	945
3	1	503*	945
3	1.25	Não obtido	945

Legenda: Tempo (minutos) de atingimento do pH de interesse e tempo (minutos) atribuído (comum a todas as experimentações), quando do não atingimento do pH de interesse durante a experimentação. O asterisco (\*) indica resultado associado a possível erro experimental relacionado à dupla adição da alíquota de fermento. Fatores do LMR: 0 = isento de antimicrobiano / controle; 0,5 = 50% do LMR; 0,75 = 75% do LMR; 1,0 = 1 LMR; 1,25 = 125% do LMR.

Novamente, o baixo coeficiente de variação ( $CV < 15\%$ ) demonstra que o experimento foi bem controlado e que a blocagem dos animais permitiu um controle mais eficaz quanto às possíveis interferências no resultado dos tratamentos. O bloco de animais não teve efeito significativo ( $p > 0,05$ ), quando comparado às demais fontes de variação, que apresentaram efeito significativo ( $p < 0,05$  na tabela de análise de variância).

A atividade fermentativa do fermento láctico composto por *Streptococcus thermophilus* e *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* não apresentou diferença significativa ( $p > 0,05$ ) quando testada frente a concentrações de amoxicilina e sulfametazina, apesar de as médias serem perceptivelmente menores que as médias apresentadas pelas amostras controle. Estes antimicrobianos mostraram efeitos estatisticamente iguais à amostra controle, independentemente da concentração utilizada ou da resposta pesquisada (tempo ou pH) (**Quadros 14 e 15**).

Ainda que não tenham ocorrido diferenças significativas, a aceleração do processo de acidificação pode indicar um possível quadro de resistência antimicrobiana. Novamente, Hill (2017) sugere que cepas resistentes tendem a aumentar as taxas de acidificação do meio,

quando em contato com antimicrobianos em baixa concentração. As baixas dosagens utilizadas podem justificar a possível aceleração do processo fermentativo.

As médias de tempo para se atingir o valor desejado de pH apresentadas pelo fermento, em presença de ceftiofur, foram significativamente maiores ( $p < 0,05$ ) que as médias para os demais antimicrobianos aos níveis testados e ao controle. Isso demonstra que o ceftiofur apresentou amplo efeito inibitório, mesmo abaixo do LMR estabelecido (**Quadro 14**).

Observa-se também que, em concentração equivalente a 1,25 do LMR, amostras dopadas com o antimicrobiano tetraciclina se mostraram significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ) do controle utilizado e das demais amostras dopadas com antimicrobianos em mesma concentração. Apesar de a concentração não ter interferido diretamente na diferenciação do antimicrobiano frente aos demais, o tempo médio para se atingir o pH foi maior que o gasto pela amostra controle, e superior às amostras dopadas com amoxicilina e sulfametazina, o que justifica a diferença encontrada.

Para as amostras dopadas com gentamicina a 1,25 do LMR, percebe-se semelhança ao controle, com tendência à diferenciação, e evolução em similaridade com amostras dopadas com tetraciclina em mesmo nível de concentração. De toda forma, esta análise permite sustentar que níveis marginalmente violativos de gentamicina podem gerar inibição do fermento e refletir em consideráveis perdas na produção de lácteos fermentados.

**Quadro 14** – Comparação de médias para o fermento DELVO® FRESH YS-131, referentes aos tempos (minutos) de fermentação requeridos para atingimento de pH 4,6.

COMPARAÇÃO DE MÉDIAS						
YS 131 - pH 4,6						
ANTIMICROBIANO	LMR ( $\mu\text{g/L}$ )	FATORES DO LMR				
		0	0,5	0,75	1,0	1,25
AMOXICILINA	4	510 A a	494 A a	506 A a	476 A a	471 A a
CEFTIOFUR	100	472 A a	886 B bc	935 B c	797 B b	945 C c
GENTAMICINA	200	472 A a	483 A a	523 A a	508 A a	562 AB a
SULFAMETAZINA	100	536 A a	480 A a	464 A a	507 A a	483 A a
TETRACICLINA	100	536 A a	552 A a	579 A a	603 A a	646 B a

Legenda: Letras maiúsculas comparam antimicrobianos (colunas), letras minúsculas comparam os fatores do LMR (linhas). Letras iguais indicam resultados estatisticamente iguais ( $p > 0,05$ ), letras diferentes indicam resultados estatisticamente diferentes ( $p < 0,05$ ). Fatores do LMR: 0 = isento de antimicrobiano / controle; 0,5 = 50% do LMR; 0,75 = 75% do LMR; 1,0 = 1 LMR; 1,25 = 125% do LMR.

A comparação de médias, com base na variação de pH no tempo fixado pela amostra controle reforçou a diferença significativa ( $p < 0,05$ ) do ceftiofur perante os demais tratamentos. No entanto, outras diferenças não foram encontradas (**Quadro 15**).

**Quadro 15** – Comparação de médias para o fermento DELVO® FRESH YS-131, referente à variação de pH nos tratamentos, no tempo (minutos) de atingimento do pH 4,6 pela amostra controle.

COMPARAÇÃO DE MÉDIAS						
YS 131 - pH 4,6						
ANTIMICROBIANO	LMR ( $\mu\text{g/L}$ )	FATORES DO LMR				
		0	0,5	0,75	1,0	1,25
AMOXICILINA	4	4,64 A a	4,62 A a	4,64 A a	4,60 A a	4,59 A a
CEFTIOFUR	100	4,64 A a	6,37 B c	6,53 B c	5,90 B b	6,56 B c
GENTAMICINA	200	4,64 A a	4,65 A a	4,69 A a	4,68 A a	4,73 A a
SULFAMETAZINA	100	4,64 A a	4,59 A a	4,57 A a	4,61 A a	4,59 A a
TETRACICLINA	100	4,64 A a	4,65 A a	4,68 A a	4,70 A a	4,74 A a

Legenda: Letras maiúsculas comparam antimicrobianos (colunas), letras minúsculas comparam os fatores do LMR (linhas). Letras iguais indicam resultados estatisticamente iguais ( $p > 0,05$ ), letras diferentes indicam resultados estatisticamente diferentes ( $p < 0,05$ ). Fatores do LMR: 0 = isento de antimicrobiano / controle; 0,5 = 50% do LMR; 0,75 = 75% do LMR; 1,0 = 1 LMR; 1,25 = 125% do LMR.

Os resultados demonstraram, ainda mais uma vez, que resíduos do antimicrobiano ceftiofur, em concentrações abaixo do respectivo LMR estabelecido, são suficientes para promover a inibição da atividade fermentativa desenvolvida pelo fermento comercial composto por *Streptococcus thermophilus* e *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*.

Estudos anteriores demonstraram a inibição desta cultura por gentamicina e tetraciclina ((RIZZOTTI, *et al.*, 2009; ARIOLI, *et al.*, 2014). Não obstante, Elkins e Mullis (2004), citam que *Lactobacillus* ssp. apresentam menor susceptibilidade a antimicrobianos aminoglicosídeos, pelo fato de apresentarem menor permeabilidade de membrana. Como a gentamicina atua na sub-unidade ribossômica 30S, é necessário que esta adentre o citoplasma para efeito antimicrobiano (SPINOSA; GÓRNIK; BERNARDI, 2006).

## CONCLUSÃO

A hipótese norteadora deste estudo não deve ser rejeitada segundo o conjunto de evidências obtidas experimentalmente. Houve inibição dos fermentos comerciais testados por concentrações de antimicrobianos abaixo e em torno dos LMR estabelecidos.

## 7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Amoxicilina e sulfametazina tiveram um comportamento semelhante com baixo ou nenhum efeito inibitório sobre os fermentos comerciais testados, o que deixa de ser uma característica intrínseca a um determinado microrganismo.

Analogamente, o ceftiofur também apresentou comportamento similar entre os fermentos testados, com ampla inibição da atividade fermentativa. Todavia, cabe salientar que o ceftiofur após metabolizado no organismo animal, é excretado na forma de desfuroilceftiofur (EMEA, 1999). Apesar disso, as legislações regulatórias nacionais ainda não estabelecem limites máximos para este metabólito (BRASIL, 2017), já que os limites fixados são relativos à substância-mãe, conforme empregada no presente estudo.

De toda forma, o ceftiofur foi capaz de inibir a maioria das bactérias lácticas testadas na forma dos fermentos comerciais aqui avaliados, o que se alinha a resultados publicados pela Agência Europeia de Medicamentos (EMEA, 1999).

Alguns achados desta experimentação se mostram diferentes dos reportados por estudos anteriores. Porém, cabe salientar que os estudos referentes à inibição de bactérias lácticas, especificamente as utilizadas na produção de lácteos fermentados, além da diminuta quantidade disponível, são realizados por outros métodos, especialmente via contagem padrão em placas.

Este estudo foi conduzido de maneira inédita, sem prejuízo de resguardar argumentação científica mecanisticamente equivalente aos poucos estudos existentes. A utilização do equipamento iCinac (AMS Systea, Frépillon, França) permitiu maior controle experimental, com farta captação de dados simples, mas diretamente correlacionáveis à efetiva atividade fermentativa, e sua eventual susceptibilidade aos antimicrobianos testados.

## **8 PERSPECTIVAS FUTURAS**

Em trabalhos futuros, a avaliação e comparação da presença de eventuais plasmídeos e genes de resistência nas culturas comerciais, frente a culturas naturalmente obtidas e utilizadas na fabricação de queijos e iogurtes, podem trazer resultados que elucidem mecanisticamente as informações aqui apresentadas, caracterizadas e discutidas. Todavia, cabe aos órgãos reguladores o desenvolvimento de novos estudos para aprimorar e restabelecer limites máximos de resíduos que não ofereçam riscos à saúde pública, mas que contemplem de maneira eficaz o desenvolvimento tecnológico de produtos fermentados. A percepção de que resíduos de antimicrobianos, mesmo abaixo do LMR, são capazes de alterar o processo fermentativo e gerar prejuízos à produção tende a auxiliar na educação da cadeia para o uso cada vez mais prudente de medicamentos veterinários, aspecto de importância mundialmente crescente no contexto da qualidade primária do leite.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANVISA. **Grupo de Trabalho sobre Resíduos de Medicamentos Veterinários em Alimentos**. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/alimentos/comissoes/residuos.htm>. Acesso em: 08/07/2017.

ANVISA. **Informe Técnico nº. 40, de 2 de junho de 2009**: Esclarecimentos sobre o uso do edulcorante ciclamato em alimentos. Disponível em: [http://www.anvisa.gov.br/alimentos/informes/40\\_020609.htm](http://www.anvisa.gov.br/alimentos/informes/40_020609.htm). Acesso em: 08/07/2017. 2017a.

ANVISA. Alimentos Com Alegações de Propriedades Funcionais e ou de Saúde. 2016. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/alimentos/alegacoes>. Acesso em: 31/05/2017.

ARIOLI, S.; GUGLIELMETTI, S.; AMALFITANO, S.; VITI, C.; MARCHI, E.; DECOROSI, F.; GIOVANNETTI, L.; MORA D. Characterization of tetA-like gene encoding for a major facilitator superfamily efflux pump in *Streptococcus thermophilus*. **FEMS Microbiol Lett.** 355(1):61-70. 2014. May 12.

AZIZ, K. E.; ABDULRAMAN, Z. F. A.; ESSA, R. H. Antibiotic Resistance pattern and Effect of Some Growth Condition on *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* Isolated from Cow Milk. **Int.J.Curr.Microbiol.App.Sci.** 4(6): 388-405 388. 2015.

BELLETTI, N.; GATTI, M.; BOTTARI, B.; NEVIANI, E.; TABANELLI, G.; GARDINI, F. Antibiotic Resistance of Lactobacilli Isolated from Two Italian Hard Cheeses. **Journal of Food Protection**, v. 72, No. 10, 2009, p. 2162–2169.

BNDES. Produção Leiteira no Brasil. **Banco Nacional de Desenvolvimento Econômico e Social**. BNDES Setorial, n. 37, mar. 2013, p. 371-398.

BONNET, M.; RAFI, M. M.; CHIKINDAS, M. L.; MONTVILLE, T.J. Bioenergetic Mechanism for Nisin Resistance, Induced by the Acid Tolerance Response of *Listeria monocytogenes*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 72. p. 2556–2563. 2006.

BRASIL. Alimentos com alegações de propriedades funcionais e ou de saúde, novos alimentos/ingredientes, substâncias bioativas e probióticos. **Agência Nacional de Vigilância Sanitária**. Brasília, 2008. Disponível em: [http://www.anvisa.gov.br/alimentos/comissoes/tecno\\_lista\\_alega.htm](http://www.anvisa.gov.br/alimentos/comissoes/tecno_lista_alega.htm). Acesso em: 04 de junho de 2017.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Portaria nº 146, de 07 de março de 1996. Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Queijos. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 11 mar. 1996.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa SDA/MAA 42/1999. Alterar o Plano Nacional do Controle de Resíduos em Produtos de Origem Animal PNCR e os Programas de Controle de Resíduos em Carne - PCRC, Mel - PCRM, Leite - PCRL e Pescado - PCRP. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF. 22/12/1999.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa Nº 26, de 9 de julho de 2009. Regulamento Técnico para a Fabricação, o Controle de Qualidade, a Comercialização e o Emprego de Produtos Antimicrobianos de Uso Veterinário. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF. 10/07/2009. Seção 1.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução da Diretoria Colegiada-RDC Nº 20, de 5 de maio de 2011. Dispõe sobre o controle de medicamentos à base de substâncias classificadas como antimicrobianos, de uso sob prescrição, isoladas ou em associação. **Diário Oficial da União** Nº 87, Brasília, DF. 9 de maio de 2011. Seção 1, páginas 39 a 41.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Instrução Normativa Nº 1, de 14 de janeiro de 2013. Altera a Instrução Normativa nº 07 de 16 de dezembro de 2011 que dispõe sobre o cronograma e procedimentos para credenciamento de farmácias e drogarias privadas referentes à escrituração dos medicamentos e substâncias contendo antimicrobianos no Sistema Nacional de Gerenciamento de Produtos Controlados (SNGPC). **Diário Oficial da União**, Brasília, DF. 16 de jan. de 2013.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução da Diretoria Colegiada-RDC Nº 68, de 28 de novembro de 2014. Dispõe sobre a atualização do Anexo I, Lista de Antimicrobianos Registrados na Anvisa, da Resolução – RDC nº 20, de 5 de maio de 2011 e dá outras providências. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF. 02 de junho de 2014.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa Nº 09, de 21 de fevereiro de 2017. Publica o plano de amostragem e limites de referência para o Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes em Produtos de Origem Animal - PNCRC de 2017 para as cadeias de carnes bovina, suína, caprina, ovina, equina, coelho, aves, avestruz, de leite, pescado, mel e ovos. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF. 08/03/2017.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa Nº 9, de 27 de junho de 2003. Proíbe a fabricação, a manipulação, o fracionamento, a comercialização, a importação e o uso dos princípios ativos cloranfenicol, nitrofuranos e os produtos que contenham estes princípios ativos, para uso veterinário e suscetível de emprego na alimentação de todos os animais e insetos. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF. 30/06/2003.

BROOME, M. C.; LIMSOWTIN, G. K. Y. *Starter Cultures: General Aspects*. In: FUQUAY, J. W.; FOX, P. F.; McSWEENEY, P. L. H. **Encyclopedia of Dairy Sciences** 2 ed. Londres: Elsevier, 2011. p. 552 a 558. 2 v.

*Codex Alimentarius*. Maximum Residue Limits (MRLs) and Risk Management Recommendations (RMRs) for Residues of Veterinary Drugs in Foods. CAC/MRL 2-2015. **Food and Agriculture Organization of the United Nations and World Health Organization**. 2015.

CDC. Antibiotic Resistance Threats in the United States, 2013. **Centers for Disease Control and Prevention**. U.S. Department of Health and Human Services, 2013.

CDDEP. Antibiotic Use and Resistance in Food Animals: Current Policy and Recommendations. **Center for Disease Dynamics, Economics & Policy**. USA. 2016.

CHAIT, R., CRANEY, A.; KISHONY, R. Antibiotic interactions that select against resistance. **Nature** 446, 668–671. 2007.

CONAB. Conjuntura Mensal: Leite e Serivados. **Companhia Nacional de Abastecimento**. 2016.

CORNELL UNIVERSITY. **Dairy Starter Cultures**: General Characteristics. Dairy Foods Science Notes. Milk Quality Improvement Program Department of Food Science Stocking Hall: Nova Iorque. 2008. Disponível em: <https://foodsafety.foodscience.cornell.edu/sites/foodsafety.foodscience.cornell.edu/files/shared/documents/CU-DFScience-Notes-Dairy-Cultures-04-08.pdf>. Acesso em: 21 de março de 2017.

DEL FIOL, F. S.; BARBERATO FILHO, S. Antibacterianos. In: Ministério da Saúde. **FORMULÁRIO TERAPÊUTICO NACIONAL 2010**: Rename 2010. 2 ed. Série B – Textos Básicos de Saúde. Brasília, 2010. p. 115.

ECDC. Last-line antibiotics are failing: options to address this urgent threat to patients and healthcare systems. **European Centre for Disease Prevention and Control**. Stockholm, 2016.

ELKINS, C.A.; MULLINS, L.B. Bile-mediated aminoglycoside sensibility in *Lactobacillus* species likely results from increased membrane permeability attributable to cholic acid. **Appl Environ Microbiol**. 2004. 70:7200–7209.

EMA. Ceftiofur: Summary Report. **European Agency for the Evaluation of Medicinal Products**. Committee for Veterinary Medicinal Products. EMA/MRL/498/98-Final. 1999.

EMA. Note for guidance for the assessment of the effect of antimicrobial substances on dairy *starter* cultures. **European Agency for the Evaluation of Medicinal Products**. Committee for Veterinary Medicinal Products. EMA/CVMP/ 276. 2000.

EFFCA - EUROPEAN FOOD AND FEED CULTURES ASSOCIATION. **Definition of Food Cultures**. EFFCA/15/09. Bruxelas, 2015.

FAO. Drivers, Dynamics and Epidemiology of Antimicrobial Resistance in Animal Production. **Food and Agriculture Organization of the United Nations**. Rome, 2016b.

FAO. Status and Trends of the conservation and sustainable use of microorganisms in food processes. Comission on Genetic Resources for **Food and Agriculture Organization**. FAO Background Study Paper N° 65. 2013.

FAO. The FAO Action Plan on Antimicrobial Resistance 2016-2020: Supporting the food and agriculture sectors in implementing the Global Action Plan on Antimicrobial Resistance to minimize the impact of antimicrobial resistance. **Food and Agriculture Organization of the United Nations**. Rome, 2016a.

FAO. Small-Scale Dairy Farming Manual. v. 1. Technology Unit 10.1 - Starter Cultures. **Food and Agriculture Organization of the United Nations**. Disponível em:

[http://www.fao.org/ag/againfo/themes/documents/dairyman/Dairy/V1U10\\_1.htm](http://www.fao.org/ag/againfo/themes/documents/dairyman/Dairy/V1U10_1.htm). Acesso em 09/05/2017.

FAO/WHO. Principles and methods for the risk assesment of chemicals in food: Environmental Health Criteria 240. © World Health Organization. **Food and Agriculture Organization of the United Nations and World Health Organization**. 2009.

FAO/IDF. Guide to good dairy farming practice. Animal Production and Health Guidelines. No. 8. **Food and Agriculture Organization of the United Nations and International Dairy Federation**. Rome. 2011.

FAO/WHO. Health and Nutritional Properties of Probiotics in Food including Powder Milk with Live Lactic Acid Bacteria. Joint FAO/WHO Expert Committee On Food Additives (JECFA). **Food and Agriculture Organization of the United Nations and World Health Organizaton**. Argentina, 2001.

FAO/WHO. Procedures for Recommending Maximum Residue Limits residues of Veterinary Drugs in Food (1987-1999). Joint FAO/WHO Expert Committee On Food Additives (JECFA). **Food and Agriculture Organization of the United Nations and World Health Organizaton**. Rome, 2000.

FAO/WHO. Roster of experts for JECFA for exposure assessment of chemicals in food (2012 - 2016). Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA). **Food and Agriculture Organization of the United Nations and World Health Organization**. 2012.

FERREIRA, C. L. L. F. Grupo de Bactérias Lácticas e Aplicação de Bactérias Probióticas. In: \_\_\_\_\_. **Prebióticos e Probióticos: Atualização e Prospecção**. 1 ed. Rio de Janeiro: Editora Rubio, 2012. v.1, p. 25-29.

FERREIRA, D. F. SISVAR - Sistema de Análise de Variância para Dados Balanceados. Versão 5.3. Build 77. **Universidade Federal de Lavras**. 1999 a 2010.

FDA. Generally Recognized as Safe (GRAS). **Food and Drug Administration**. Disponível em: <https://www.fda.gov/food/ingredientpackaginglabeling/gras/>. Atualizado em: 14 de fevereiro de 2017. Acesso em: 04 de junho de 2017.

FDA. Milk Drug Residue Sampling Survey. **Food and Drug Administration**. Department of Health and Human Services. March 2015.

FIL/IDF. Safety Demonstration of Microbial Food Cultures (MFC) in Fermented Food Products. Buletin of the International Dairy Federation. 455/2012. **International Dairy Federation**. Bruxelas, 2012.

FORSYTHE, S. J. **Microbiologia da Segurança dos Alimentos**. 2 ed. Porto Alegre: Artmed Editora LTDA. 2013. p. 174 a 187.

FRIEDEN, T. F. In: CDC. ANTIBIOTIC RESISTANCE THREATS in the United States, 2013. **Centers for Disease Control and Prevention**. U.S. Department of Health and Human Services, 2013.

GARAU, G.; DI GUILMI, A. M.; HALL, B. G. Structure-based phylogeny of the metallo-beta-lactamases. **Antimicrob. Agents Chemother.** 49, 2778–2784. 2005.

GUARDABASSI, L.; JENSEN, L. B.; KRUSE, H. **Guia de Antimicrobianos em Veterinária**. Porto Alegre: Artmed, 2010. 268 p.

GUEIMONDE, M.; SANCHÉS, B.; REYES-GAVILÁN, C.G.; MARGOLLES, A. Antibiotic Resistance in Probiotic Bacteria. **Frontiers in Microbiology**. v 4. Article 202. July 2013.

HALL, B. G.; BARLOW, M. Evolution of the serine beta-lactamases: past, present and future. **Drug Resist. Updat.** 7, 111–123. 2004.

HAMMER, B. W.; BABEL, F. J. *Dairy Bacteriology*. 4 ed. New York: John Wiley & Sons, Inc. 1957. 614 p.

HANDWERGER, S.; TOMASZ, A. Antibiotic tolerance among clinical isolates of bacteria. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 25, 349–380 (1985).

HATOSY, S. M.; MARTINY, A. C. The Ocean as a Global Reservoir of Antibiotic Resistance Genes. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 81. 2015. n. 21.

Hill, A. *Cheese Technology*. Dairy Science and Technology Education Series, University of Guelph, Canada. Disponível em: <https://www.uoguelph.ca/foodscience/book-page/cheese-making-technology-ebook>. Acesso em: 25/05/2017.

JECFA. Evaluations of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA). **World Health Organization**. 2014. Disponível em: <http://apps.who.int/food-additives-contaminants-jecfa-database/search.aspx>. Acesso em: 08/07/2017.

JOHNSON, M. E. Preparation of Cheese Milk. In: FUQUAY, J. W.; FOX, P. F.; McSWEENEY, P. L. H. **Encyclopedia of Dairy Sciences** 2 ed. Londres: Elsevier. v. 1. 2011. p. 470 a 477.

KESTER, J. C.; FORTUNE, S. M. Persists and beyond: mechanisms of phenotypic drug resistance and drug tolerance in bacteria. **Rev. Biochem. Mol. Biol.** 49, 91–101 (2014).

LAU, C. H.; ENGELEN, K. V.; GORDON, S.; RENAUD, J.; TOPPA, E. Novel Antibiotic Resistance Determinants from Agricultural Soil Exposed to Antibiotics Widely Used in Human Medicine and Animal Farming. **Applied and Environmental Microbiology**. AEM.00989-17. 2017. Disponível em: <http://aem.asm.org/>. Acesso em: 12/07/2017.

LEVINSON, W. **Microbiologia Médica e Imunologia**. ed. 13. Porto Alegre: AMGH Editora LTDA. 2016.

MICHIELS, J. E.; BERGH, B. V. D.; VERSTRAETEN, N.; MICHIELS, J. Molecular mechanisms and clinical implications of bacterial persistence. Elsevier. **Drug Resistance Updates** 29. 76–89. 2016.

MOULLAN, N.; MOUCHIROUD, L.; WANG, X.; RYU, D.; WILLIAMS, E. G.; MOTTIS, A.; JOVAISAITE, V.; FROUCHAUX, M. V.; QUIROS, P. M.; DEPLANCKE, B.;

HOUTKOOPER, R. H.; AUWERX, J. **Tetracyclines Disturb Mitochondrial Function across Eukaryotic Models: A Call for Caution in Biomedical Research.** Cell Reports 10, 1681–1691, March 17, 2015.

MULLAN, W.M.A. **Functions of starters in dairy fermentations.** Disponível em: <https://www.dairyscience.info/index.php/cheesestarters/225roleofstarters.html>. 2005. Acesso em: 21 de março de 2017.

MULLAN, W.M.A. **Inhibitors in milk.** Disponível em: <https://www.dairyscience.info/index.php/inhibitorsinmilk/51inhibitorsinmilk.html>. 2003. Acesso em: 21 de março de 2017.

NAMPOOTHIRI, V. M.; DOMINIQUE, G. **Drug residues in milk.** Dairy Cattle Nutrition division, National Dairy Research Institute, ICAR, Karnal, Haryana-132001. Research News For U (RNFU) ISSN: 2250 –3668, Vol. 14 ,2014. Disponível em: <http://www.doublehelixresearch.com/RNFU> ©Double Helix Research.

OCDE/FAO, 2015. **Perspectivas Agrícolas no Brasil: desafios da agricultura brasileira 2015-2024. Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico e Food and Agriculture Organization of the United Nations.** 2015.

OECD. **Antimicrobial Resistance in G7 Countries and Beyond: Economic Issues, Policies and Options for Action.** Organisation for Economic Co-operation and Development. 2015.

OMS. **A crescente ameaça da resistência antimicrobiana: Opções de ação – Sumário Executivo.** OMS/IER/PSP/2012.2. **Organização Mundial de Saúde.** Genebra, 2012.

PAULA, J.C.J; CARVALHO, A. F.; FURTADO, M.M. **Princípios Básicos de Fabricação de Queijo: Do Histórico à Salga.** **Rev. Inst. Latic. Cândido Tostes**, Mar/Jun, nº 367/368, 64 v., 2009. p. 19 a 25.

PEREIRA NETO, O. A. **Cuidados no Tratamento Antibiótico de Vacas em Lactação.** IN: TORRES, R. A.; MACHADO, J.R.C.; MUNDIM, P. M. **Estratégias de manejo e alimentação visando a melhoria da pecuária leiteira familiar das Regiões Sul e Centro-Sul Fluminense.** EMBRAPA Gado de Leite. Juiz de Fora, 2007.

PERRETEN, V.; SCHWARZ, F. V.; TEUBER, M.; LEVY, S.B. **Mdt(A), a New Efflux Protein Conferring Multiple Antibiotic Resistance in *Lactococcus lactis* and *Escherichia coli*.** **Antimicrobials Agents and Chemotherapy.** 2001. p. 1109-1114.

POELARENDS, G. J.; MAZURKIEWICZ, P.; KONINGS, W. N. **Multidrug transporters and antibiotic resistance in *Lactococcus lactis*.** **Biochimica et Biophysica Acta** 1555. 2002. p. 1–7.

QUINN, P.J.; MARKEY, B. K.; CARTER, M. E.; DONNELLY, W. J.; LEONARD, F. C. **Microbiologia Veterinária e Doenças Infecciosas.** Porto Alegre: Artmed® Editora S.A., 2005. p. 42 a 49.

RIZZOTTI, L.; LA GIOIA, F.; DELLAGLIO, F.; TORRIANI, S. **Characterization of Tetracycline-Resistant *Streptococcus thermophilus* Isolates from Italian Soft Cheeses.**

- Applied and Environmental Microbiology**, v. 75, No. 12. 2009. p. 4224–4229.
- ROBINSON, R. K. **Dairy Microbiology Handbook**. 3 ed. New York: John Wiley and Sons, 2002.
- ROCA, M.; et al. Effect of heat treatments on stability of  $\beta$ -lactams in milk. **Journal of Dairy Science**, v.94, n.3, p.1155-1164, 2011.
- SAMPAIO, I. B. M. *Estatística Aplicada à Experimentação Animal*. 3 ed. Belo Horizonte: FEPMVZ-Editora. 2010. 264 p.
- SPINOSA, H. S.; GÓRNIK, S. L.; BERNARDI, M. M. **Farmacologia Aplicada à Medicina Veterinária**. 4 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 2006.
- SURONO, I. S.; HOSONO, A. Fermented milks. In: FUQUAY, J. W.; FOX, P. F.; McSWEENEY, P. L. H. **Encyclopedia of Dairy Sciences** 2 ed. Londres: Elsevier, 2011. p. 470 a 477 1 v.
- TAMIME, A. Y. Microbiology of *Starter Cultures*. In: ROBINSON, R. K. **Dairy Microbiology Handbook**. 3 ed. Nova York: John Wiley and Sons, 2002. p. 261 a 347.
- TENÓRIO, C.G.M.S.C.; CERQUEIRA, M.M.O.P.; VIEGAS, R.P.; RESENDE, M.F.S.; CLINQUART, D.L.; SANTOS, A.K.R.; SOUZA, M.R.; PENNA, C.F.A.M. Eficiência dos testes COPAN (Microplate e Single) na detecção de resíduos de antimicrobianos no leite. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v.61, n.2, p.504-510, 2009.
- TETRA PAK. **Tetra Pak Dairy Processing Handbook**. 2015. Disponível em: <http://dairyprocessinghandbook.com>. Acesso em: 07 de março de 2017.
- TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C.L. **Microbiologia**. 10 ed. Artmed® Editora S.A.: Porto Alegre, 2012.
- USP. Apêndice XV: Microbial Food Cultures Including Probiotics. First suplemente. FCC 8. General Tests and Assays. **United States Pharmacopeial Convention**. 2012. p. 1709 a 1715.
- WALSTRA, P.; WOUTERS, J. T. M.; GEURTS, T. J. **Dairy Science and Technology**. Second Edition. Boca Raton: CRC Press Taylor & Francis Group. 2006.
- WIEGAND, I.; HILPERT, K.; HANCOCK, R. E. Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances. **Nature Protoc.** 3, 163–175.2008.
- WHO. Global Action Plan on Antimicrobial Resistance. **World Health Organization**. 2015. ISBN 978 92 4 150976.
- WHO. Media centre. Antibiotic resistance. Fact sheet. **World Health Organization**. 2016. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/antibiotic-resistance/en/>. Acesso em: 03/07/2017.

APÊNDICE A – APRESENTAÇÃO DOS RESULTADOS PARA O FERMENTO DELVO®  
CHEESE CP-101

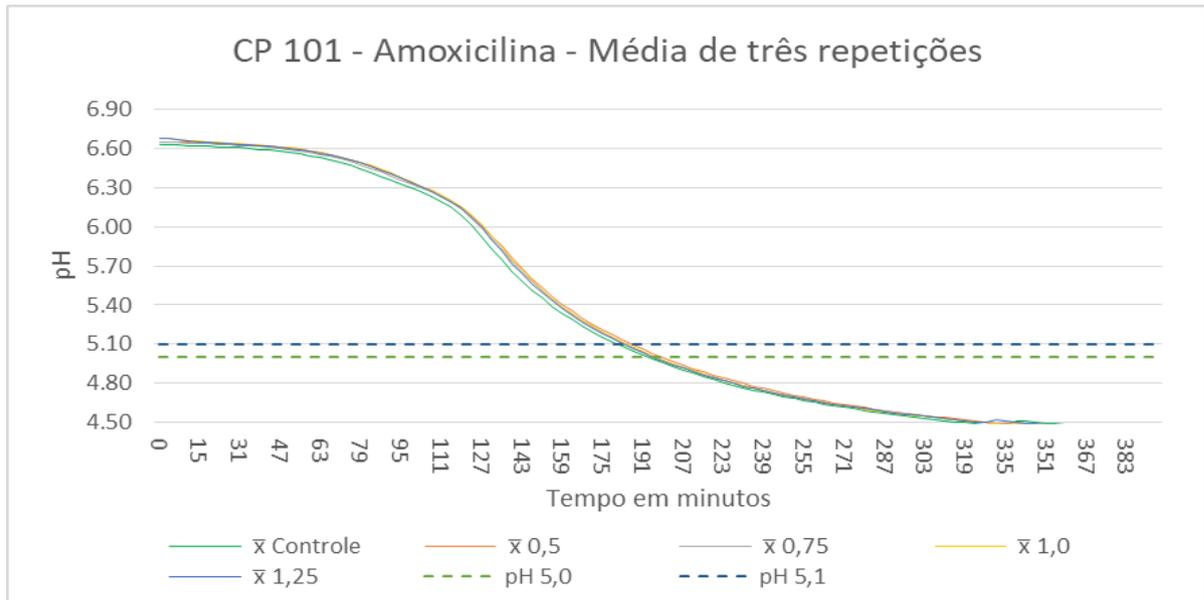
FERMENTO	pH	ANIMAL	ANTIBIÓTICO	CONCENTRAÇÃO (LMR)	TEMPO (minutos)
CP 101	5	1	AMOXICILINA	0	187
CP 101	5	1	AMOXICILINA	0.5	191
CP 101	5	1	AMOXICILINA	0.75	191
CP 101	5	1	AMOXICILINA	1	191
CP 101	5	1	AMOXICILINA	1.25	191
CP 101	5	2	AMOXICILINA	0	195
CP 101	5	2	AMOXICILINA	0.5	199
CP 101	5	2	AMOXICILINA	0.75	191
CP 101	5	2	AMOXICILINA	1	195
CP 101	5	2	AMOXICILINA	1.25	195
CP 101	5	3	AMOXICILINA	0	183
CP 101	5	3	AMOXICILINA	0.5	195
CP 101	5	3	AMOXICILINA	0.75	195
CP 101	5	3	AMOXICILINA	1	191
CP 101	5	3	AMOXICILINA	1.25	191
CP 101	5	1	SULFAMETAZINA	0	187
CP 101	5	1	SULFAMETAZINA	0.5	191
CP 101	5	1	SULFAMETAZINA	0.75	187
CP 101	5	1	SULFAMETAZINA	1	187
CP 101	5	1	SULFAMETAZINA	1.25	187
CP 101	5	2	SULFAMETAZINA	0	195
CP 101	5	2	SULFAMETAZINA	0.5	199
CP 101	5	2	SULFAMETAZINA	0.75	199
CP 101	5	2	SULFAMETAZINA	1	211
CP 101	5	2	SULFAMETAZINA	1.25	203
CP 101	5	3	SULFAMETAZINA	0	195
CP 101	5	3	SULFAMETAZINA	0.5	191
CP 101	5	3	SULFAMETAZINA	0.75	187
CP 101	5	3	SULFAMETAZINA	1	195
CP 101	5	3	SULFAMETAZINA	1.25	191
CP 101	5	1	TETRACICLINA	0	187
CP 101	5	1	TETRACICLINA	0.5	207
CP 101	5	1	TETRACICLINA	0.75	227
CP 101	5	1	TETRACICLINA	1	235
CP 101	5	1	TETRACICLINA	1.25	247
CP 101	5	2	TETRACICLINA	0	195
CP 101	5	2	TETRACICLINA	0.5	211
CP 101	5	2	TETRACICLINA	0.75	219
CP 101	5	2	TETRACICLINA	1	227
CP 101	5	2	TETRACICLINA	1.25	239
CP 101	5	3	TETRACICLINA	0	195
CP 101	5	3	TETRACICLINA	0.5	207
CP 101	5	3	TETRACICLINA	0.75	211
CP 101	5	3	TETRACICLINA	1	215
CP 101	5	3	TETRACICLINA	1.25	223
CP 101	5	1	CEFTIOFUR	0	183
CP 101	5	1	CEFTIOFUR	0.5	843
CP 101	5	1	CEFTIOFUR	0.75	791
CP 101	5	1	CEFTIOFUR	1	751
CP 101	5	1	CEFTIOFUR	1.25	839
CP 101	5	2	CEFTIOFUR	0	195
CP 101	5	2	CEFTIOFUR	0.5	611
CP 101	5	2	CEFTIOFUR	0.75	679
CP 101	5	2	CEFTIOFUR	1	787
CP 101	5	2	CEFTIOFUR	1.25	935
CP 101	5	3	CEFTIOFUR	0	183
CP 101	5	3	CEFTIOFUR	0.5	559
CP 101	5	3	CEFTIOFUR	0.75	607
CP 101	5	3	CEFTIOFUR	1	903
CP 101	5	3	CEFTIOFUR	1.25	819
CP 101	5	1	GENTAMICINA	0	183
CP 101	5	1	GENTAMICINA	0.5	191
CP 101	5	1	GENTAMICINA	0.75	183
CP 101	5	1	GENTAMICINA	1	187
CP 101	5	1	GENTAMICINA	1.25	187
CP 101	5	2	GENTAMICINA	0	195
CP 101	5	2	GENTAMICINA	0.5	199
CP 101	5	2	GENTAMICINA	0.75	199
CP 101	5	2	GENTAMICINA	1	195
CP 101	5	2	GENTAMICINA	1.25	207
CP 101	5	3	GENTAMICINA	0	183
CP 101	5	3	GENTAMICINA	0.5	191
CP 101	5	3	GENTAMICINA	0.75	191
CP 101	5	3	GENTAMICINA	1	195
CP 101	5	3	GENTAMICINA	1.25	203

FERMENTO	pH	ANIMAL	ANTIBIÓTICO	CONCENTRAÇÃO (LMR)	TEMPO (minutos)
CP 101	5.1	1	AMOXICILINA	0	175
CP 101	5.1	1	AMOXICILINA	0.5	179
CP 101	5.1	1	AMOXICILINA	0.75	183
CP 101	5.1	1	AMOXICILINA	1	179
CP 101	5.1	1	AMOXICILINA	1.25	179
CP 101	5.1	2	AMOXICILINA	0	183
CP 101	5.1	2	AMOXICILINA	0.5	187
CP 101	5.1	2	AMOXICILINA	0.75	179
CP 101	5.1	2	AMOXICILINA	1	183
CP 101	5.1	2	AMOXICILINA	1.25	183
CP 101	5.1	3	AMOXICILINA	0	175
CP 101	5.1	3	AMOXICILINA	0.5	183
CP 101	5.1	3	AMOXICILINA	0.75	183
CP 101	5.1	3	AMOXICILINA	1	183
CP 101	5.1	3	AMOXICILINA	1.25	179
CP 101	5.1	1	SULFAMETAZINA	0	175
CP 101	5.1	1	SULFAMETAZINA	0.5	179
CP 101	5.1	1	SULFAMETAZINA	0.75	175
CP 101	5.1	1	SULFAMETAZINA	1	179
CP 101	5.1	1	SULFAMETAZINA	1.25	175
CP 101	5.1	2	SULFAMETAZINA	0	183
CP 101	5.1	2	SULFAMETAZINA	0.5	187
CP 101	5.1	2	SULFAMETAZINA	0.75	187
CP 101	5.1	2	SULFAMETAZINA	1	199
CP 101	5.1	2	SULFAMETAZINA	1.25	191
CP 101	5.1	3	SULFAMETAZINA	0	183
CP 101	5.1	3	SULFAMETAZINA	0.5	179
CP 101	5.1	3	SULFAMETAZINA	0.75	179
CP 101	5.1	3	SULFAMETAZINA	1	183
CP 101	5.1	3	SULFAMETAZINA	1.25	179
CP 101	5.1	1	TETRACICLINA	0	175
CP 101	5.1	1	TETRACICLINA	0.5	191
CP 101	5.1	1	TETRACICLINA	0.75	211
CP 101	5.1	1	TETRACICLINA	1	219
CP 101	5.1	1	TETRACICLINA	1.25	231
CP 101	5.1	2	TETRACICLINA	0	183
CP 101	5.1	2	TETRACICLINA	0.5	195
CP 101	5.1	2	TETRACICLINA	0.75	203
CP 101	5.1	2	TETRACICLINA	1	211
CP 101	5.1	2	TETRACICLINA	1.25	219
CP 101	5.1	3	TETRACICLINA	0	183
CP 101	5.1	3	TETRACICLINA	0.5	195
CP 101	5.1	3	TETRACICLINA	0.75	199
CP 101	5.1	3	TETRACICLINA	1	203
CP 101	5.1	3	TETRACICLINA	1.25	207
CP 101	5.1	1	CEFTIOFUR	0	171
CP 101	5.1	1	CEFTIOFUR	0.5	835
CP 101	5.1	1	CEFTIOFUR	0.75	779
CP 101	5.1	1	CEFTIOFUR	1	747
CP 101	5.1	1	CEFTIOFUR	1.25	827
CP 101	5.1	2	CEFTIOFUR	0	183
CP 101	5.1	2	CEFTIOFUR	0.5	599
CP 101	5.1	2	CEFTIOFUR	0.75	659
CP 101	5.1	2	CEFTIOFUR	1	775
CP 101	5.1	2	CEFTIOFUR	1.25	923
CP 101	5.1	3	CEFTIOFUR	0	175
CP 101	5.1	3	CEFTIOFUR	0.5	547
CP 101	5.1	3	CEFTIOFUR	0.75	595
CP 101	5.1	3	CEFTIOFUR	1	887
CP 101	5.1	3	CEFTIOFUR	1.25	799
CP 101	5.1	1	GENTAMICINA	0	171
CP 101	5.1	1	GENTAMICINA	0.5	179
CP 101	5.1	1	GENTAMICINA	0.75	171
CP 101	5.1	1	GENTAMICINA	1	179
CP 101	5.1	1	GENTAMICINA	1.25	175
CP 101	5.1	2	GENTAMICINA	0	183
CP 101	5.1	2	GENTAMICINA	0.5	187
CP 101	5.1	2	GENTAMICINA	0.75	187
CP 101	5.1	2	GENTAMICINA	1	183
CP 101	5.1	2	GENTAMICINA	1.25	191
CP 101	5.1	3	GENTAMICINA	0	175
CP 101	5.1	3	GENTAMICINA	0.5	183
CP 101	5.1	3	GENTAMICINA	0.75	183
CP 101	5.1	3	GENTAMICINA	1	183
CP 101	5.1	3	GENTAMICINA	1.25	191

Legenda: Tempo de atingimento do pH de interesse, organizado de acordo com o fermento, pH de interesse, animal, antimicrobiano e dosagem de antimicrobiano.

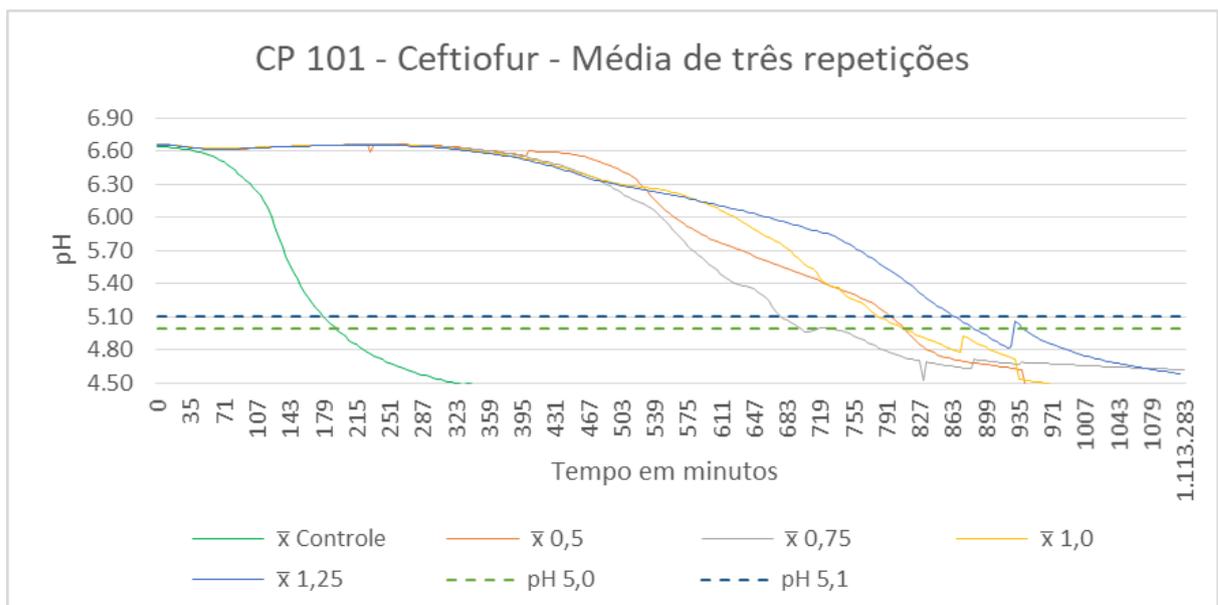
APÊNDICE B – APRESENTAÇÃO DOS RESULTADOS PARA O FERMENTO DELVO®  
CHEESE CP-101 - GRÁFICOS

GRÁFICO 1 – Evolução fermentativa do fermento comercial DELVO® CHEESE CP-101 em adição de amoxicilina em concentrações em torno de seu respectivo LMR.



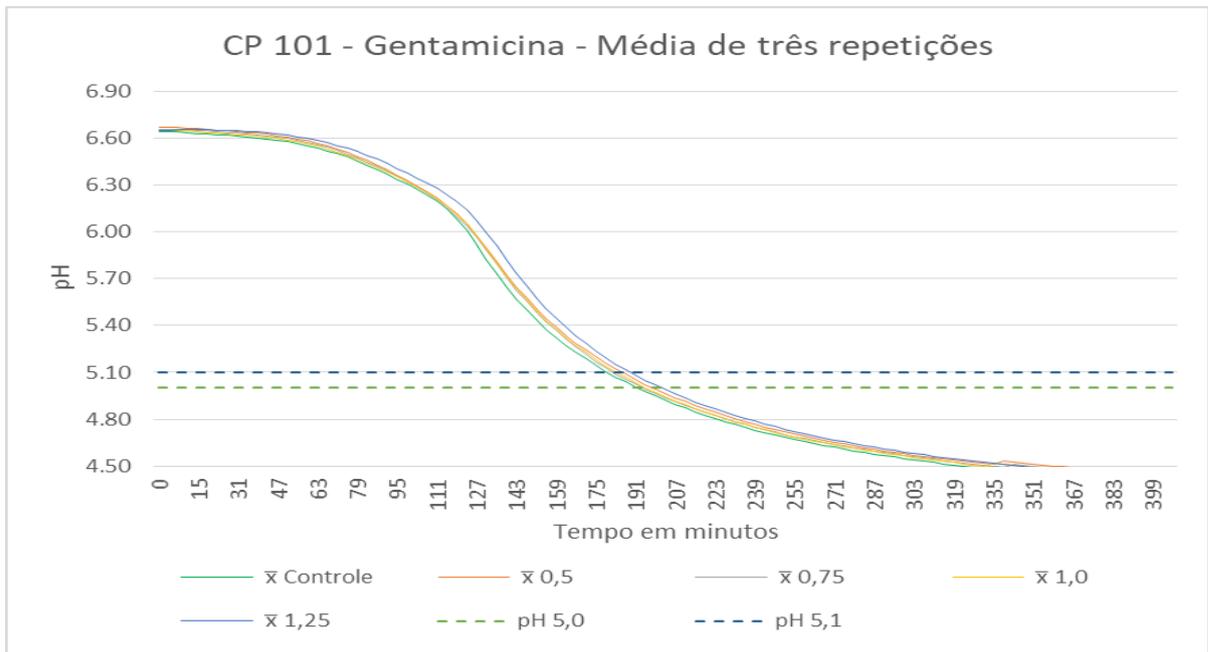
Legenda: Eixo das abscissas (x): tempo em minutos; eixo das ordenadas (y) escala de pH. Linhas horizontais: pHs de interesse.

GRÁFICO 2 – Evolução fermentativa do fermento comercial DELVO® CHEESE CP-101 em adição de ceftiofur em concentrações em torno de seu respectivo LMR.



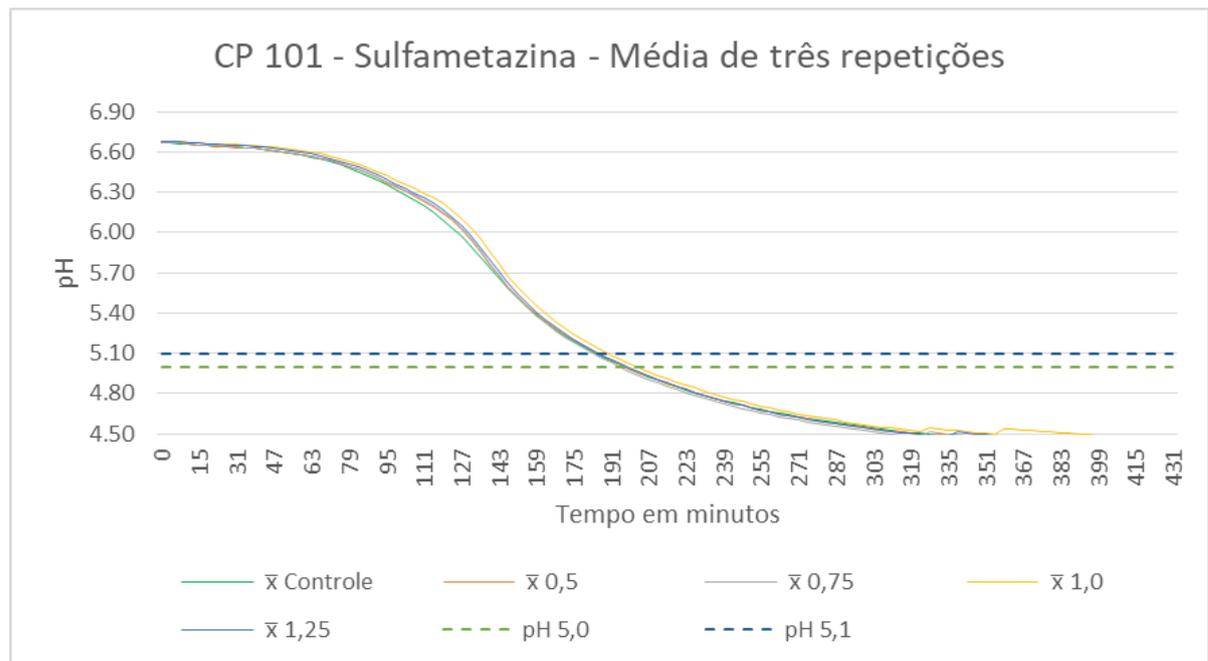
Legenda: Eixo das abscissas (x): tempo em minutos; eixo das ordenadas (y) escala de pH. Linhas horizontais: pHs de interesse.

GRÁFICO 3 – Evolução fermentativa do fermento comercial DELVO® CHEESE CP-101 em adição de gentamicina em concentrações em torno de seu respectivo LMR.



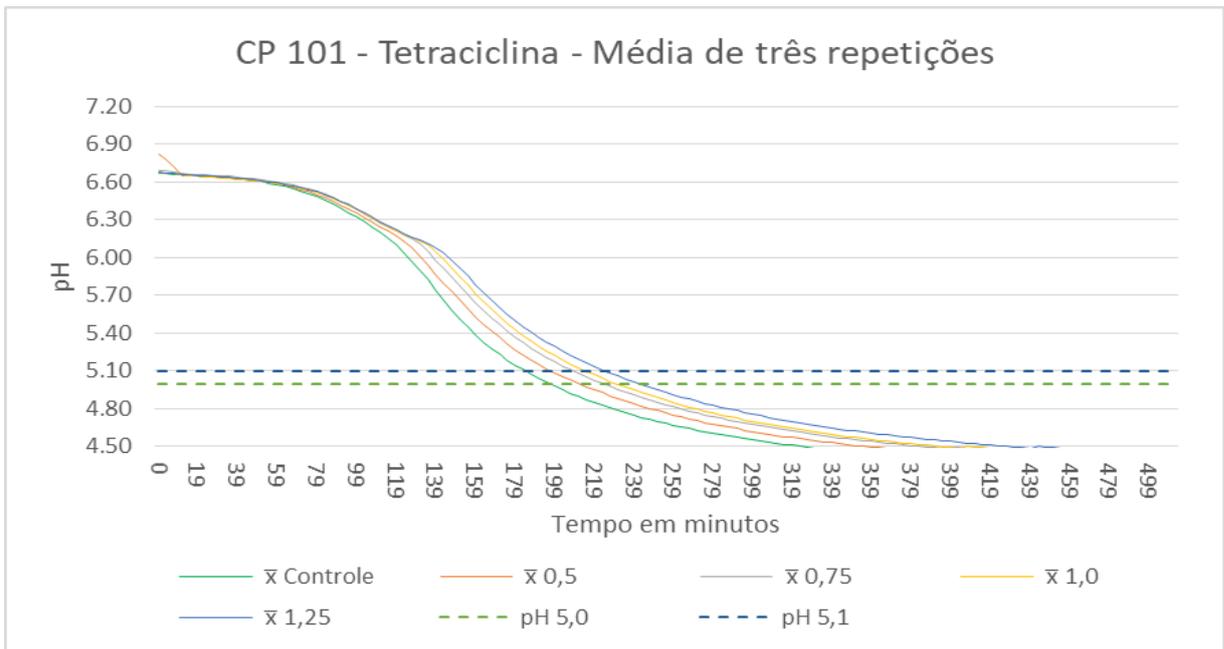
Legenda: Eixo das abcissas (x): tempo em minutos; eixo das ordenadas (y) escala de pH. Linhas horizontais: pHs de interesse.

GRÁFICO 4 – Evolução fermentativa do fermento comercial DELVO® CHEESE CP-101 em adição de sulfametazina em concentrações em torno de seu respectivo LMR.



Legenda: Eixo das abcissas (x): tempo em minutos; eixo das ordenadas (y) escala de pH. Linhas horizontais: pHs de interesse.

GRÁFICO 05 – Evolução fermentativa do fermento comercial DELVO® CHEESE CP-101 em adição de tetraciclina em concentrações em torno de seu respectivo LMR.



Legenda: Eixo das abscissas (x): tempo em minutos; eixo das ordenadas (y) escala de pH. Linhas horizontais: pHs de interesse.

APÊNDICE C – APRESENTAÇÃO DOS RESULTADOS PARA O FERMENTO DELVO®  
FRESH FC-211

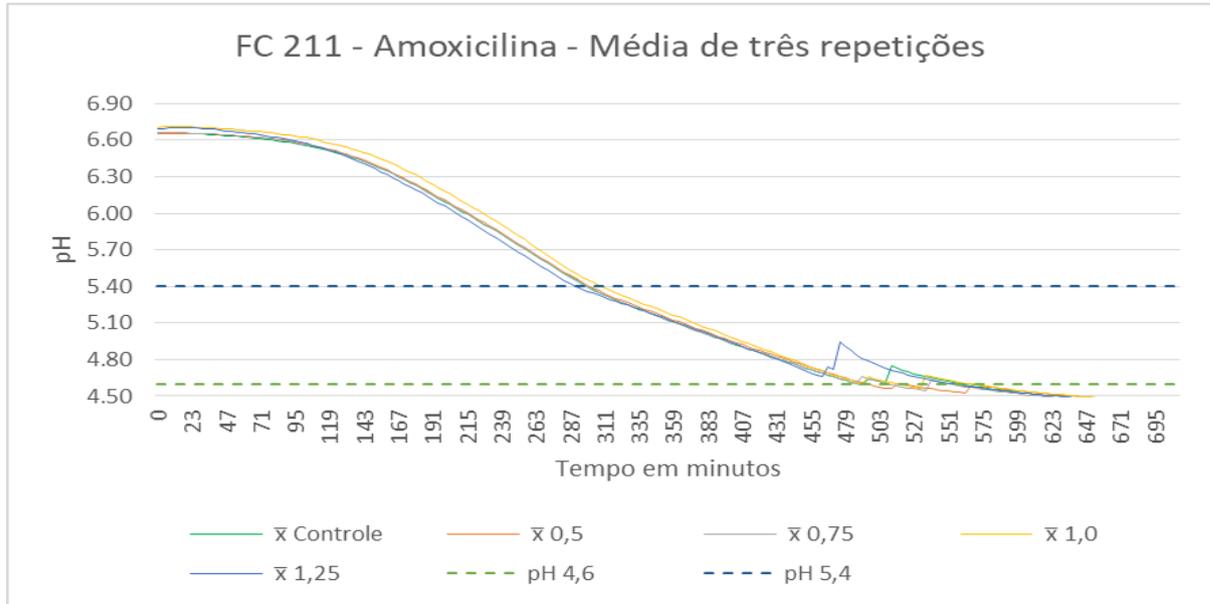
FERMENTO	pH	ANIMAL	ANTIBIÓTICO	CONCENTRAÇÃO (LMR)	TEMPO (minutos)
FC 211	4.6	1	AMOXICILINA	0	339
FC 211	4.6	1	AMOXICILINA	0.5	355
FC 211	4.6	1	AMOXICILINA	0.75	347
FC 211	4.6	1	AMOXICILINA	1	327
FC 211	4.6	1	AMOXICILINA	1.25	327
FC 211	4.6	2	AMOXICILINA	0	355
FC 211	4.6	2	AMOXICILINA	0.5	355
FC 211	4.6	2	AMOXICILINA	0.75	351
FC 211	4.6	2	AMOXICILINA	1	355
FC 211	4.6	2	AMOXICILINA	1.25	327
FC 211	4.6	3	AMOXICILINA	0	543
FC 211	4.6	3	AMOXICILINA	0.5	547
FC 211	4.6	3	AMOXICILINA	0.75	535
FC 211	4.6	3	AMOXICILINA	1	547
FC 211	4.6	3	AMOXICILINA	1.25	535
FC 211	4.6	1	SULFAMETAZINA	0	339
FC 211	4.6	1	SULFAMETAZINA	0.5	343
FC 211	4.6	1	SULFAMETAZINA	0.75	343
FC 211	4.6	1	SULFAMETAZINA	1	347
FC 211	4.6	1	SULFAMETAZINA	1.25	363
FC 211	4.6	2	SULFAMETAZINA	0	355
FC 211	4.6	2	SULFAMETAZINA	0.5	375
FC 211	4.6	2	SULFAMETAZINA	0.75	367
FC 211	4.6	2	SULFAMETAZINA	1	371
FC 211	4.6	2	SULFAMETAZINA	1.25	383
FC 211	4.6	3	SULFAMETAZINA	0	563
FC 211	4.6	3	SULFAMETAZINA	0.5	559
FC 211	4.6	3	SULFAMETAZINA	0.75	563
FC 211	4.6	3	SULFAMETAZINA	1	559
FC 211	4.6	3	SULFAMETAZINA	1.25	567
FC 211	4.6	1	TETRACICLINA	0	339
FC 211	4.6	1	TETRACICLINA	0.5	355
FC 211	4.6	1	TETRACICLINA	0.75	351
FC 211	4.6	1	TETRACICLINA	1	375
FC 211	4.6	1	TETRACICLINA	1.25	387
FC 211	4.6	2	TETRACICLINA	0	355
FC 211	4.6	2	TETRACICLINA	0.5	355
FC 211	4.6	2	TETRACICLINA	0.75	367
FC 211	4.6	2	TETRACICLINA	1	379
FC 211	4.6	2	TETRACICLINA	1.25	383
FC 211	4.6	3	TETRACICLINA	0	563
FC 211	4.6	3	TETRACICLINA	0.5	571
FC 211	4.6	3	TETRACICLINA	0.75	567
FC 211	4.6	3	TETRACICLINA	1	571
FC 211	4.6	3	TETRACICLINA	1.25	579
FC 211	4.6	1	CEFTIOFUR	0	307
FC 211	4.6	1	CEFTIOFUR	0.5	NA
FC 211	4.6	1	CEFTIOFUR	0.75	NA
FC 211	4.6	1	CEFTIOFUR	1	NA
FC 211	4.6	1	CEFTIOFUR	1.25	NA
FC 211	4.6	2	CEFTIOFUR	0	375
FC 211	4.6	2	CEFTIOFUR	0.5	NA
FC 211	4.6	2	CEFTIOFUR	0.75	NA
FC 211	4.6	2	CEFTIOFUR	1	NA
FC 211	4.6	2	CEFTIOFUR	1.25	NA
FC 211	4.6	3	CEFTIOFUR	0	543
FC 211	4.6	3	CEFTIOFUR	0.5	NA
FC 211	4.6	3	CEFTIOFUR	0.75	NA
FC 211	4.6	3	CEFTIOFUR	1	NA
FC 211	4.6	3	CEFTIOFUR	1.25	NA
FC 211	4.6	1	GENTAMICINA	0	307
FC 211	4.6	1	GENTAMICINA	0.5	351
FC 211	4.6	1	GENTAMICINA	0.75	391
FC 211	4.6	1	GENTAMICINA	1	391
FC 211	4.6	1	GENTAMICINA	1.25	395
FC 211	4.6	2	GENTAMICINA	0	375
FC 211	4.6	2	GENTAMICINA	0.5	399
FC 211	4.6	2	GENTAMICINA	0.75	415
FC 211	4.6	2	GENTAMICINA	1	535
FC 211	4.6	2	GENTAMICINA	1.25	503
FC 211	4.6	3	GENTAMICINA	0	543
FC 211	4.6	3	GENTAMICINA	0.5	591
FC 211	4.6	3	GENTAMICINA	0.75	647
FC 211	4.6	3	GENTAMICINA	1	695
FC 211	4.6	3	GENTAMICINA	1.25	779

FERMENTO	pH	ANIMAL	ANTIBIÓTICO	CONCENTRAÇÃO (LMR)	TEMPO (minutos)
FC 211	5.4	1	AMOXICILINA	0	227
FC 211	5.4	1	AMOXICILINA	0.5	235
FC 211	5.4	1	AMOXICILINA	0.75	231
FC 211	5.4	1	AMOXICILINA	1	235
FC 211	5.4	1	AMOXICILINA	1.25	231
FC 211	5.4	2	AMOXICILINA	0	243
FC 211	5.4	2	AMOXICILINA	0.5	243
FC 211	5.4	2	AMOXICILINA	0.75	239
FC 211	5.4	2	AMOXICILINA	1	259
FC 211	5.4	2	AMOXICILINA	1.25	219
FC 211	5.4	3	AMOXICILINA	0	431
FC 211	5.4	3	AMOXICILINA	0.5	431
FC 211	5.4	3	AMOXICILINA	0.75	431
FC 211	5.4	3	AMOXICILINA	1	439
FC 211	5.4	3	AMOXICILINA	1.25	435
FC 211	5.4	1	SULFAMETAZINA	0	227
FC 211	5.4	1	SULFAMETAZINA	0.5	231
FC 211	5.4	1	SULFAMETAZINA	0.75	231
FC 211	5.4	1	SULFAMETAZINA	1	231
FC 211	5.4	1	SULFAMETAZINA	1.25	235
FC 211	5.4	2	SULFAMETAZINA	0	243
FC 211	5.4	2	SULFAMETAZINA	0.5	251
FC 211	5.4	2	SULFAMETAZINA	0.75	247
FC 211	5.4	2	SULFAMETAZINA	1	247
FC 211	5.4	2	SULFAMETAZINA	1.25	259
FC 211	5.4	3	SULFAMETAZINA	0	451
FC 211	5.4	3	SULFAMETAZINA	0.5	447
FC 211	5.4	3	SULFAMETAZINA	0.75	451
FC 211	5.4	3	SULFAMETAZINA	1	451
FC 211	5.4	3	SULFAMETAZINA	1.25	447
FC 211	5.4	1	TETRACICLINA	0	227
FC 211	5.4	1	TETRACICLINA	0.5	239
FC 211	5.4	1	TETRACICLINA	0.75	239
FC 211	5.4	1	TETRACICLINA	1	251
FC 211	5.4	1	TETRACICLINA	1.25	263
FC 211	5.4	2	TETRACICLINA	0	243
FC 211	5.4	2	TETRACICLINA	0.5	243
FC 211	5.4	2	TETRACICLINA	0.75	247
FC 211	5.4	2	TETRACICLINA	1	255
FC 211	5.4	2	TETRACICLINA	1.25	259
FC 211	5.4	3	TETRACICLINA	0	451
FC 211	5.4	3	TETRACICLINA	0.5	459
FC 211	5.4	3	TETRACICLINA	0.75	455
FC 211	5.4	3	TETRACICLINA	1	459
FC 211	5.4	3	TETRACICLINA	1.25	459
FC 211	5.4	1	CEFTIOFUR	0	211
FC 211	5.4	1	CEFTIOFUR	0.5	251
FC 211	5.4	1	CEFTIOFUR	0.75	NA
FC 211	5.4	1	CEFTIOFUR	1	991
FC 211	5.4	1	CEFTIOFUR	1.25	NA
FC 211	5.4	2	CEFTIOFUR	0	259
FC 211	5.4	2	CEFTIOFUR	0.5	283
FC 211	5.4	2	CEFTIOFUR	0.75	NA
FC 211	5.4	2	CEFTIOFUR	1	NA
FC 211	5.4	2	CEFTIOFUR	1.25	NA
FC 211	5.4	3	CEFTIOFUR	0	431
FC 211	5.4	3	CEFTIOFUR	0.5	535
FC 211	5.4	3	CEFTIOFUR	0.75	NA
FC 211	5.4	3	CEFTIOFUR	1	NA
FC 211	5.4	3	CEFTIOFUR	1.25	NA
FC 211	5.4	1	GENTAMICINA	0	211
FC 211	5.4	1	GENTAMICINA	0.5	243
FC 211	5.4	1	GENTAMICINA	0.75	259
FC 211	5.4	1	GENTAMICINA	1	263
FC 211	5.4	1	GENTAMICINA	1.25	271
FC 211	5.4	2	GENTAMICINA	0	259
FC 211	5.4	2	GENTAMICINA	0.5	263
FC 211	5.4	2	GENTAMICINA	0.75	275
FC 211	5.4	2	GENTAMICINA	1	399
FC 211	5.4	2	GENTAMICINA	1.25	371
FC 211	5.4	3	GENTAMICINA	0	431
FC 211	5.4	3	GENTAMICINA	0.5	483
FC 211	5.4	3	GENTAMICINA	0.75	523
FC 211	5.4	3	GENTAMICINA	1	567
FC 211	5.4	3	GENTAMICINA	1.25	655

Legenda: Tempo de atingimento do pH de interesse, organizado de acordo com o fermento, pH de interesse, animal, antimicrobiano e dosagem de antimicrobiano. NA = O valor de pH não foi alcançado durante o ensaio.

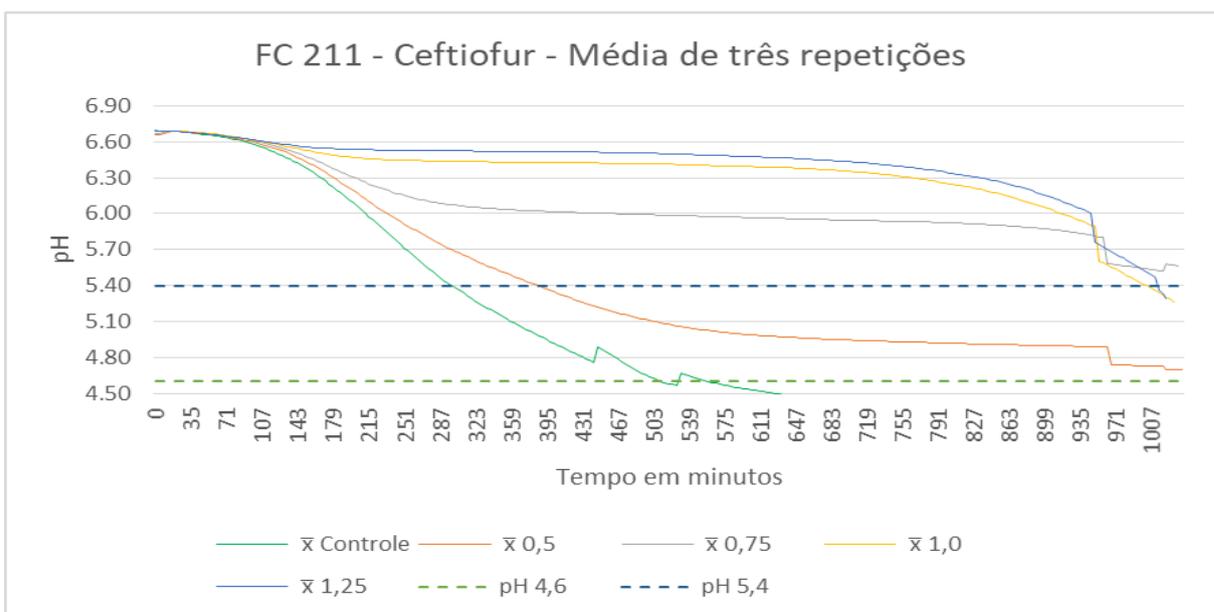
APÊNDICE D – APRESENTAÇÃO DOS RESULTADOS PARA O FERMENTO DELVO®  
FRESH FC-211 - GRÁFICOS

GRÁFICO 1 – Evolução fermentativa do fermento comercial DELVO® FRESH FC-211 em adição de amoxicilina em concentrações em torno de seu respectivo LMR.



Legenda: Eixo das abcissas (x): tempo em minutos; eixo das ordenadas (y) escala de pH. Linhas horizontais: pHs de interesse.

GRÁFICO 2 – Evolução fermentativa do fermento comercial DELVO® FRESH FC-211 em adição de ceftiofur em concentrações em torno de seu respectivo LMR.



Legenda: Eixo das abcissas (x): tempo em minutos; eixo das ordenadas (y) escala de pH. Linhas horizontais: pHs de interesse.

GRÁFICO 3 – Evolução fermentativa do fermento comercial DELVO® FRESH FC-211 em adição de gentamicina em concentrações em torno de seu respectivo LMR.

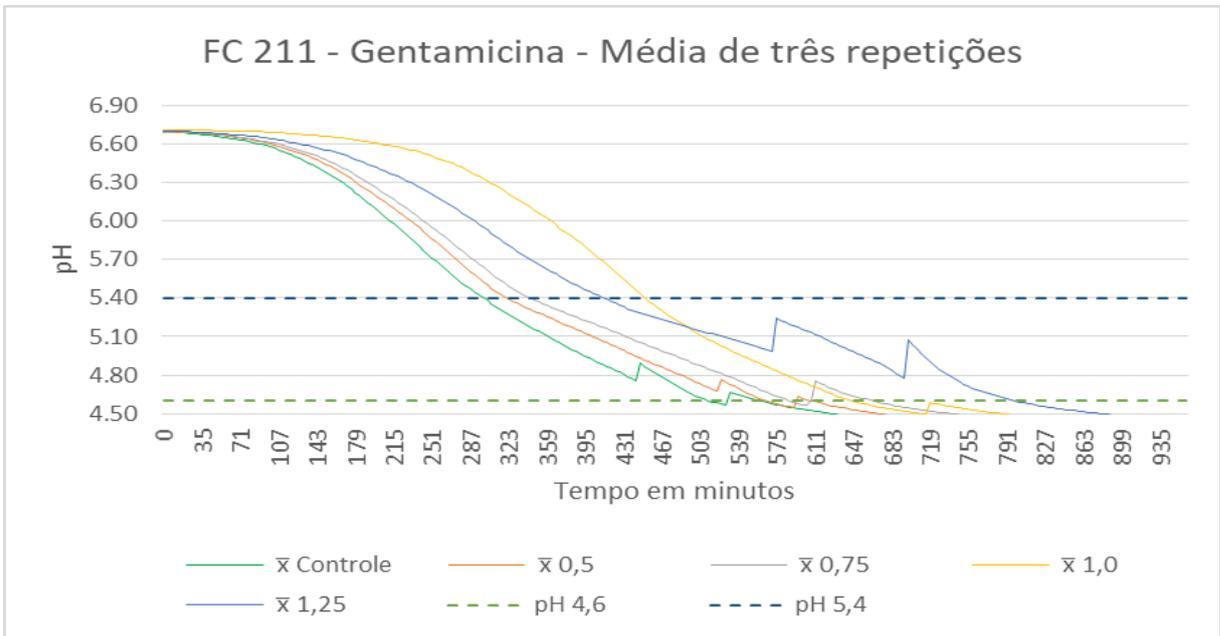


GRÁFICO 4 – Evolução fermentativa do fermento comercial DELVO® FRESH FC-211 em adição de sulfametazina em concentrações em torno de seu respectivo LMR.

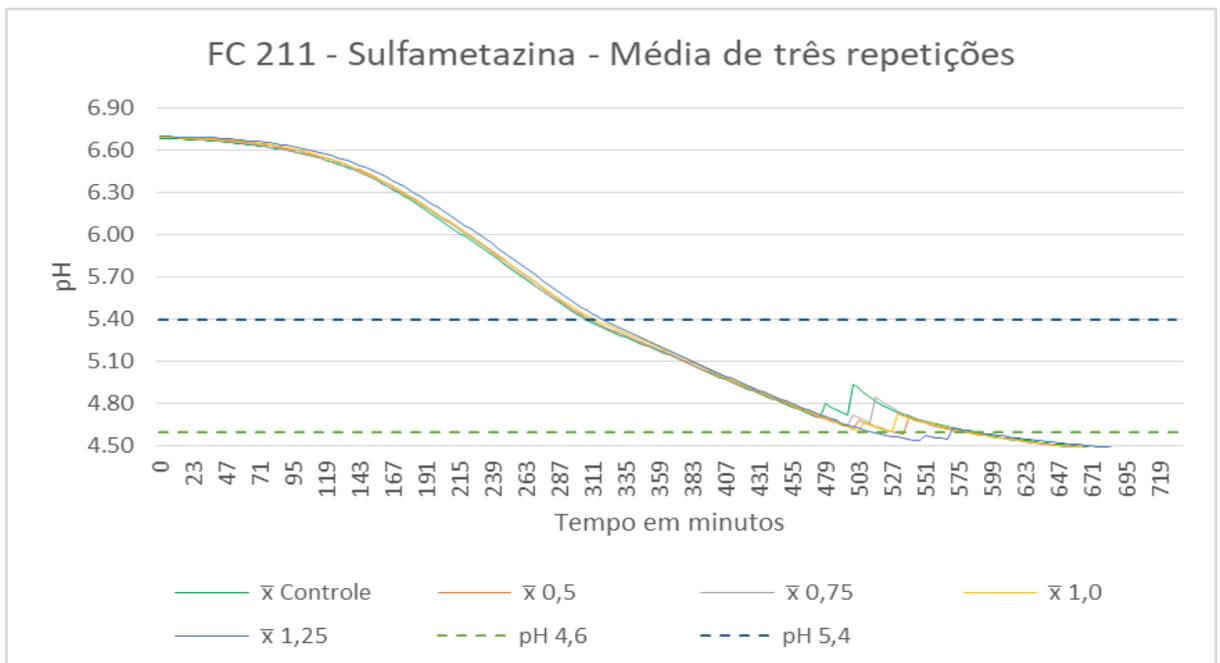
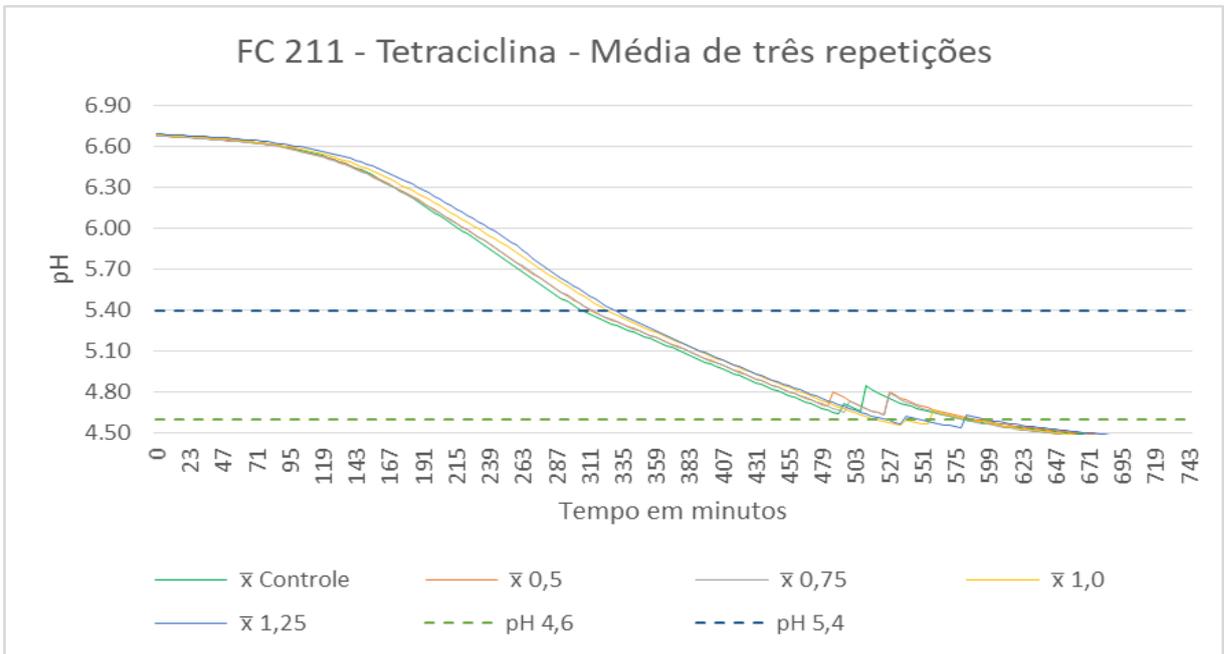


GRÁFICO 5 – Evolução fermentativa do fermento comercial DELVO® FRESH FC-211 em adição de Tetraciclina em concentrações em torno de seu respectivo LMR.



Legenda: Eixo das abcissas (x): tempo em minutos; eixo das ordenadas (y) escala de pH. Linhas horizontais: pHs de interesse.

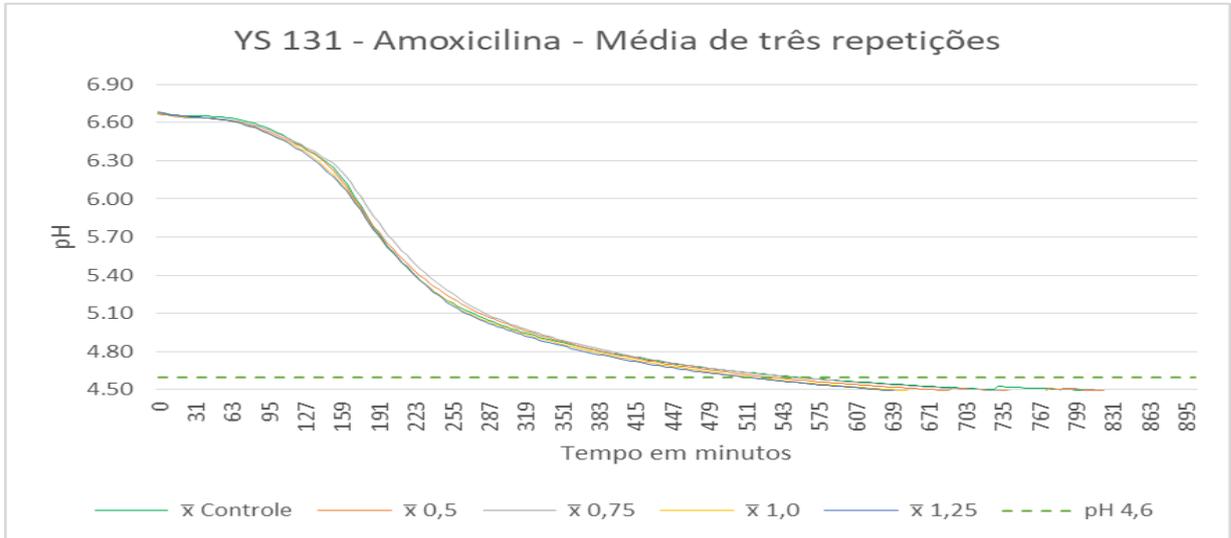
APÊNDICE E – APRESENTAÇÃO DOS RESULTADOS PARA O FERMENTO DELVO®  
FRESH YS-131

FERMENTO	pH	ANIMAL	ANTIBIÓTICO	CONCENTRAÇÃO (LMR)	TEMPO (minutos)
YS 131	4.6	1	AMOXICILINA	0	547
YS 131	4.6	1	AMOXICILINA	0.5	535
YS 131	4.6	1	AMOXICILINA	0.75	539
YS 131	4.6	1	AMOXICILINA	1	467
YS 131	4.6	1	AMOXICILINA	1.25	463
YS 131	4.6	2	AMOXICILINA	0	463
YS 131	4.6	2	AMOXICILINA	0.5	471
YS 131	4.6	2	AMOXICILINA	0.75	491
YS 131	4.6	2	AMOXICILINA	1	475
YS 131	4.6	2	AMOXICILINA	1.25	479
YS 131	4.6	3	AMOXICILINA	0	519
YS 131	4.6	3	AMOXICILINA	0.5	475
YS 131	4.6	3	AMOXICILINA	0.75	487
YS 131	4.6	3	AMOXICILINA	1	487
YS 131	4.6	3	AMOXICILINA	1.25	471
YS 131	4.6	1	SULFAMETAZINA	0	547
YS 131	4.6	1	SULFAMETAZINA	0.5	447
YS 131	4.6	1	SULFAMETAZINA	0.75	439
YS 131	4.6	1	SULFAMETAZINA	1	455
YS 131	4.6	1	SULFAMETAZINA	1.25	411
YS 131	4.6	2	SULFAMETAZINA	0	543
YS 131	4.6	2	SULFAMETAZINA	0.5	507
YS 131	4.6	2	SULFAMETAZINA	0.75	491
YS 131	4.6	2	SULFAMETAZINA	1	551
YS 131	4.6	2	SULFAMETAZINA	1.25	523
YS 131	4.6	3	SULFAMETAZINA	0	519
YS 131	4.6	3	SULFAMETAZINA	0.5	487
YS 131	4.6	3	SULFAMETAZINA	0.75	463
YS 131	4.6	3	SULFAMETAZINA	1	515
YS 131	4.6	3	SULFAMETAZINA	1.25	515
YS 131	4.6	1	TETRACICLINA	0	547
YS 131	4.6	1	TETRACICLINA	0.5	523
YS 131	4.6	1	TETRACICLINA	0.75	579
YS 131	4.6	1	TETRACICLINA	1	619
YS 131	4.6	1	TETRACICLINA	1.25	647
YS 131	4.6	2	TETRACICLINA	0	543
YS 131	4.6	2	TETRACICLINA	0.5	591
YS 131	4.6	2	TETRACICLINA	0.75	599
YS 131	4.6	2	TETRACICLINA	1	591
YS 131	4.6	2	TETRACICLINA	1.25	635
YS 131	4.6	3	TETRACICLINA	0	519
YS 131	4.6	3	TETRACICLINA	0.5	543
YS 131	4.6	3	TETRACICLINA	0.75	559
YS 131	4.6	3	TETRACICLINA	1	599
YS 131	4.6	3	TETRACICLINA	1.25	655
YS 131	4.6	1	CEFTIOFUR	0	435
YS 131	4.6	1	CEFTIOFUR	0.5	NA
YS 131	4.6	1	CEFTIOFUR	0.75	NA
YS 131	4.6	1	CEFTIOFUR	1	NA
YS 131	4.6	1	CEFTIOFUR	1.25	NA
YS 131	4.6	2	CEFTIOFUR	0	463
YS 131	4.6	2	CEFTIOFUR	0.5	767
YS 131	4.6	2	CEFTIOFUR	0.75	NA
YS 131	4.6	2	CEFTIOFUR	1	NA
YS 131	4.6	2	CEFTIOFUR	1.25	NA
YS 131	4.6	3	CEFTIOFUR	0	519
YS 131	4.6	3	CEFTIOFUR	0.5	NA
YS 131	4.6	3	CEFTIOFUR	0.75	915
YS 131	4.6	3	CEFTIOFUR	1	503
YS 131	4.6	3	CEFTIOFUR	1.25	NA
YS 131	4.6	1	GENTAMICINA	0	547
YS 131	4.6	1	GENTAMICINA	0.5	443
YS 131	4.6	1	GENTAMICINA	0.75	547
YS 131	4.6	1	GENTAMICINA	1	483
YS 131	4.6	1	GENTAMICINA	1.25	511
YS 131	4.6	2	GENTAMICINA	0	435
YS 131	4.6	2	GENTAMICINA	0.5	491
YS 131	4.6	2	GENTAMICINA	0.75	511
YS 131	4.6	2	GENTAMICINA	1	547
YS 131	4.6	2	GENTAMICINA	1.25	575
YS 131	4.6	3	GENTAMICINA	0	519
YS 131	4.6	3	GENTAMICINA	0.5	515
YS 131	4.6	3	GENTAMICINA	0.75	511
YS 131	4.6	3	GENTAMICINA	1	495
YS 131	4.6	3	GENTAMICINA	1.25	599

Legenda: Tempo de atingimento do pH de interesse, organizado de acordo com o fermento, pH de interesse, animal, antimicrobiano e dosagem de antimicrobiano. NA = O valor de pH não foi alcançado durante o ensaio. NA = O valor de pH não foi alcançado durante o ensaio.

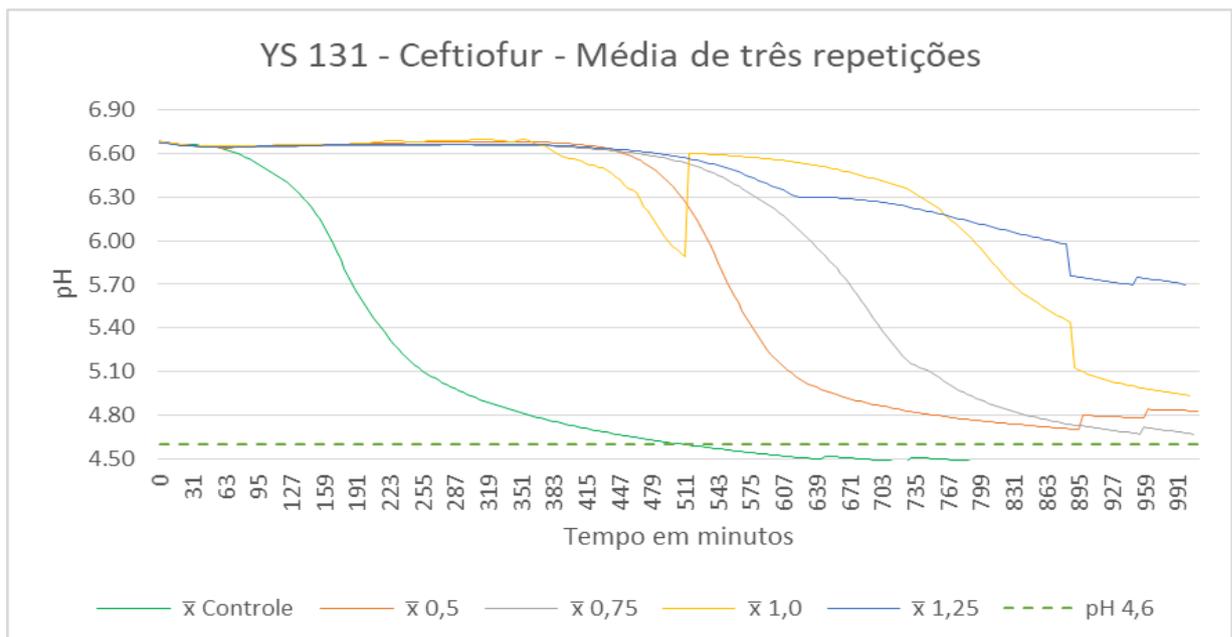
APÊNDICE F – APRESENTAÇÃO DOS RESULTADOS PARA O FERMENTO DELVO®  
FRESH YS-131 - GRÁFICOS

GRÁFICO 1 – Evolução fermentativa do fermento comercial DELVO® FRESH YS-131 em adição de amoxicilina em concentrações em torno de seu respectivo LMR.



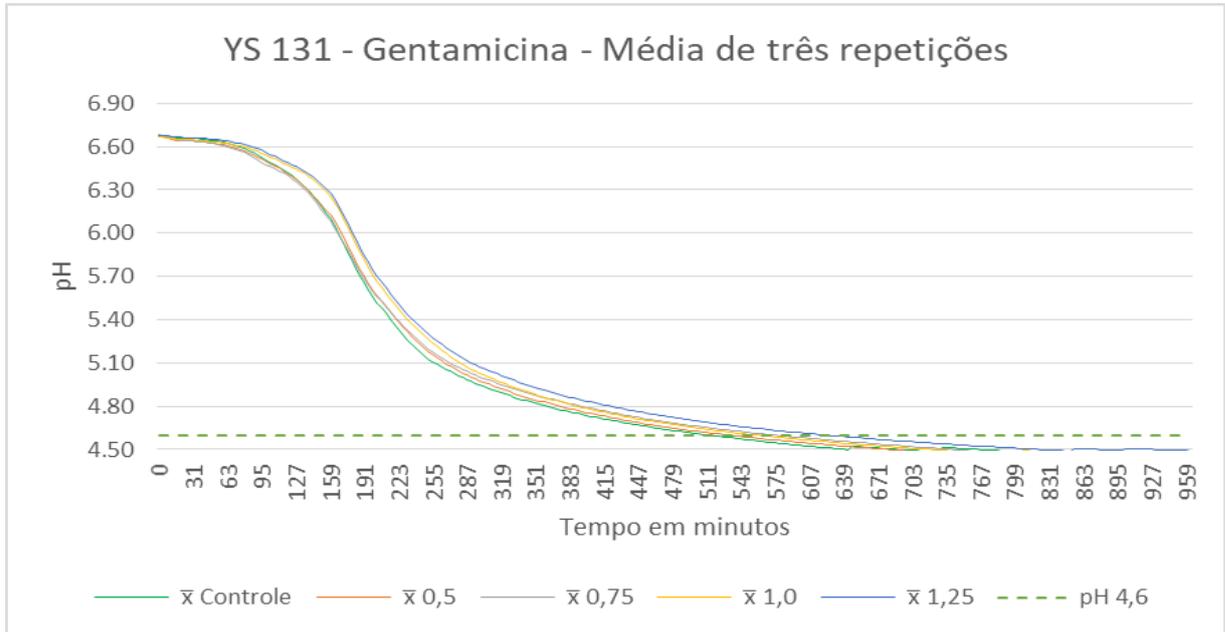
Legenda: Eixo das abcissas (x): tempo em minutos; eixo das ordenadas (y) escala de pH. Linhas horizontais: pHs de interesse.

GRÁFICO 2 – Evolução fermentativa do fermento comercial DELVO® FRESH YS-131 em adição de ceftiofur em concentrações em torno de seu respectivo LMR.



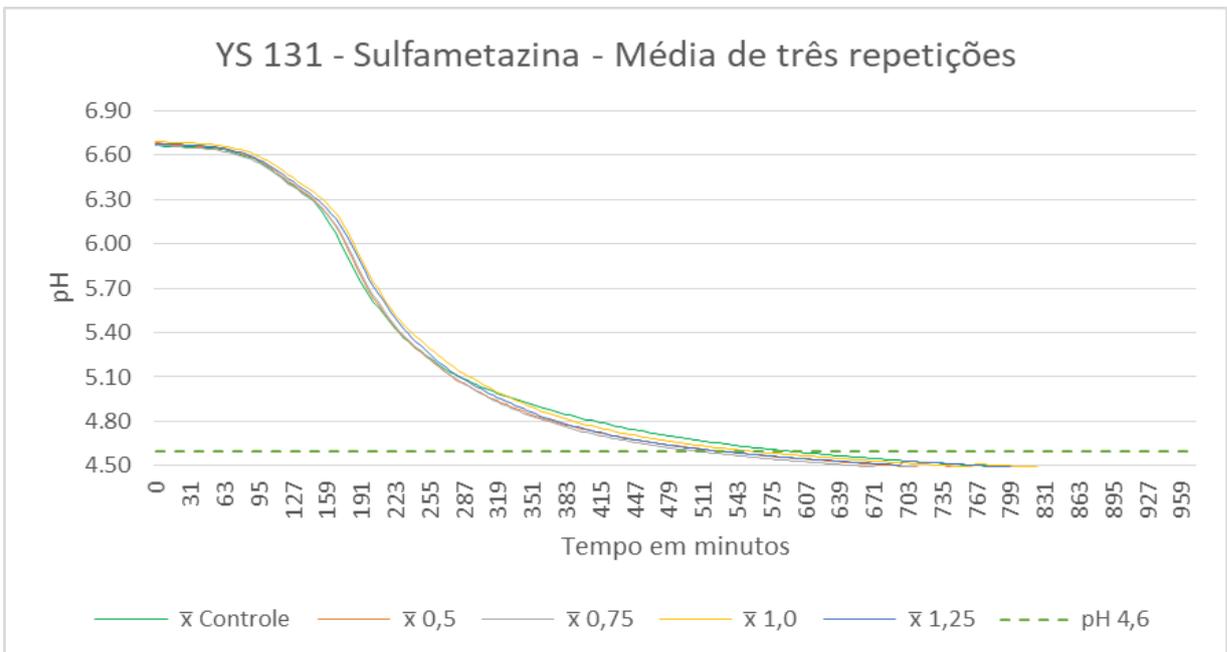
Legenda: Eixo das abcissas (x): tempo em minutos; eixo das ordenadas (y) escala de pH. Linhas horizontais: pHs de interesse.

GRÁFICO 3 – Evolução fermentativa do fermento comercial DELVO® FRESH YS-131 em adição de gentamicina em concentrações em torno de seu respectivo LMR.



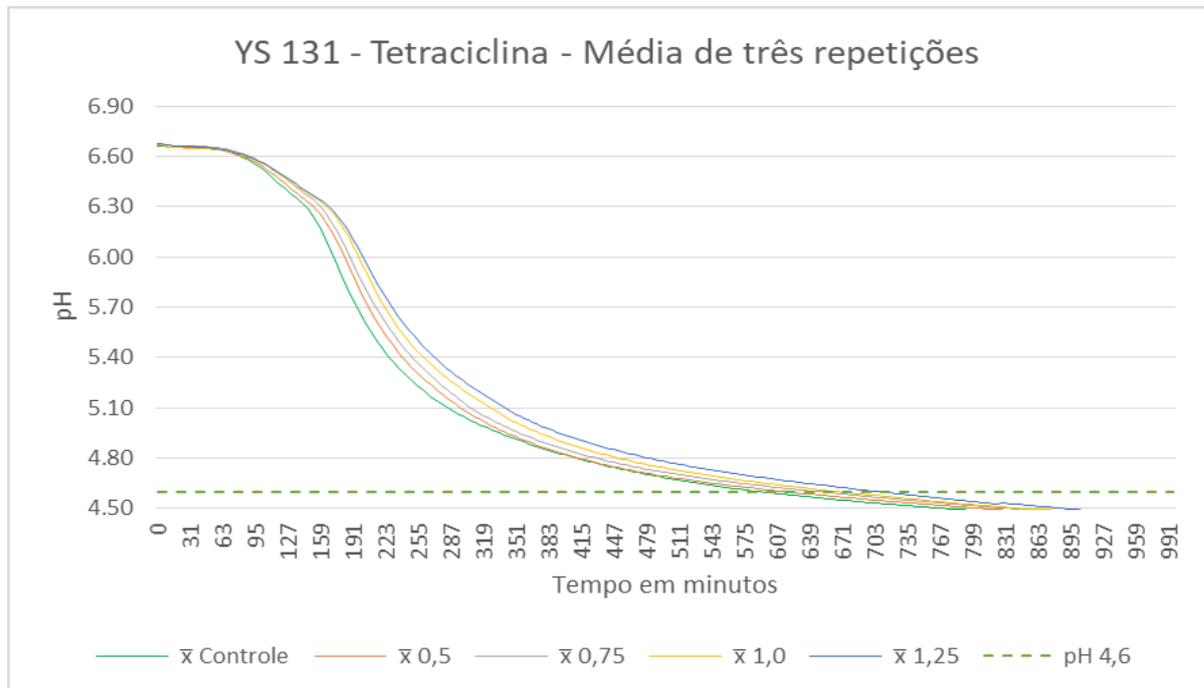
Legenda: Eixo das abscissas (x): tempo em minutos; eixo das ordenadas (y) escala de pH. Linhas horizontais: pHs de interesse.

GRÁFICO 4 – Evolução fermentativa do fermento comercial DELVO® FRESH YS-131 em adição de sulfametazina em concentrações em torno de seu respectivo LMR.



Legenda: Eixo das abscissas (x): tempo em minutos; eixo das ordenadas (y) escala de pH. Linhas horizontais: pHs de interesse.

GRÁFICO 5 – Evolução fermentativa do fermento comercial DELVO® FRESH YS-131 em adição de tetraciclina em concentrações em torno de seu respectivo LMR.



Legenda: Eixo das abscissas (x): tempo em minutos; eixo das ordenadas (y) escala de pH. Linhas horizontais: pHs de interesse.

## APÊNDICE G –ANÁLISES DE VARIÂNCIA (ANOVA)

**Tabela 1** – Análise de variância para o fermento comercial DELVO® CHEESE CP-101, referente ao tempo (minutos) para se atingir pH 5,0.

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
ANIMAL	2	2527.146667	1263.573333	0.733	0.4859
ANTIBI_TIC	4	2403970.133333	600992.533333	348.510	0.0000
CONCENTRA_	4	203374.933333	50843.733333	29.484	0.0000
ANTIBI_TIC*CONCENTRA	16	668100.266667	41756.266667	24.214	0.0000
erro	48	82774.186667	1724.462222		
-----					
Total corrigido	74	3360746.666667			
-----					
CV (%) =	14.42				
Média geral:	288.0666667		Número de observações:	75	

Legenda: Tabela de Análise de Variância (Software SISVAR). Demonstra que o bloco de animal não foi significativo ( $p > 0,05$ ), que o baixo coeficiente de variação indica que o experimento foi bem controlado e que o fator antimicrobiano foi o mais impactante do experimento.

**Tabela 2** – Análise de variância para o fermento comercial DELVO® CHEESE CP-101, referente à variação do pH entre amostras, no tempo (minutos) necessário pelo controle para atingir pH 5,0.

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
ANIMAL	2	0.003327	0.001664	0.438	0.6481
ANTIBI_TIC	4	18.500978	4.625244	1216.826	0.0000
CONCENTRA_	4	1.796482	0.449120	118.156	0.0000
ANTIBI_TIC*CONCENTRA	16	4.657044	0.291065	76.575	0.0000
erro	48	0.182451	0.003801		
-----					
Total corrigido	74	25.140281			
-----					
CV (%) =	1.15				
Média geral:	5.3438133		Número de observações:	75	

Legenda: Tabela de Análise de Variância (Software SISVAR). Demonstra que o bloco de animal não foi significativo ( $p > 0,05$ ), que o baixo coeficiente de variação indica que o experimento foi bem controlado e que o fator antimicrobiano foi o mais impactante do experimento.

**Tabela 3** – Análise de variância para o fermento comercial DELVO® CHEESE CP-101, referente ao tempo (minutos) para se atingir pH 5,1.

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
ANIMAL	2	2274.986667	1137.493333	0.655	0.5242
ANTIBI_TIC	4	2400871.680000	600217.920000	345.450	0.0000
CONCENTRA_	4	198832.213333	49708.053333	28.609	0.0000
ANTIBI_TIC*CONCENTRA	16	665583.786667	41598.986667	23.942	0.0000
erro	48	83399.680000	1737.493333		
Total corrigido	74	3350962.346667			
CV (%) =	15.11				
Média geral:	275.9066667	Número de observações:	75		

Legenda: Tabela de Análise de Variância (Software SISVAR). Demonstra que o bloco de animal não foi significativo ( $p > 0,05$ ), que o baixo coeficiente de variação indica que o experimento foi bem controlado e que o fator antimicrobiano foi o mais impactante do experimento.

**Tabela 4** – Análise de variância para o fermento comercial DELVO® CHEESE CP-101, referente à variação do pH entre amostras, no tempo (minutos) necessário pelo controle para atingir pH 5,1.

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
ANIMAL	2	0.003235	0.001617	0.426	0.6553
ANTIBI_TIC	4	16.020333	4.005083	1056.100	0.0000
CONCENTRA_	4	1.694893	0.423723	111.732	0.0000
ANTIBI_TIC*CONCENTRA	16	4.099973	0.256248	67.570	0.0000
erro	48	0.182032	0.003792		
Total corrigido	74	22.000467			
CV (%) =	1.13				
Média geral:	5.4313333	Número de observações:	75		

Legenda: Tabela de Análise de Variância (Software SISVAR). Demonstra que o bloco de animal não foi significativo ( $p > 0,05$ ), que o baixo coeficiente de variação indica que o experimento foi bem controlado e que o fator antimicrobiano foi o mais impactante do experimento.

**Tabela 5** – Análise de variância para o fermento comercial DELVO® FRESH FC-211, referente ao tempo (minutos) para se atingir pH 4,6.

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
ANIMAL	2	480456.426667	240228.213333	56.704	0.0000
ANTIBI_TIC	4	2399610.933333	599902.733333	141.602	0.0000
CONCENTRA_	4	253429.733333	63357.433333	14.955	0.0000
ANTIBI_TIC*CONCENTRA	16	637064.000000	39816.500000	9.398	0.0000
erro	48	203353.573333	4236.532778		
Total corrigido	74	3973914.666667			
CV (%) =	12.34				
Média geral:	527.4666667	Número de observações:	75		

**Tabela 6** – Análise de variância para o fermento comercial DELVO® FRESH FC-211, referente à variação do pH entre amostras, no tempo (minutos) necessário pelo controle para atingir pH 4,6.

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
ANIMAL	2	0.572531	0.286265	6.845	0.0024
ANTIBI_TIC	4	13.788139	3.447035	82.429	0.0000
CONCENTRA_	4	3.023219	0.755805	18.074	0.0000
ANTIBI_TIC*CONCENTRA	16	5.811661	0.363229	8.686	0.0000
erro	48	2.007269	0.041818		
Total corrigido	74	25.202819			
CV (%) =	4.14				
Média geral:	4.9341333	Número de observações:	75		

Legenda: Tabela de Análise de Variância (Software SISVAR). Demonstra que o bloco de animal foi significativo ( $p > 0,05$ ), no entanto, o baixo coeficiente de variação indica que o experimento foi bem controlado e que o fator antimicrobiano foi o mais impactante do experimento.

**Tabela 7** – Análise de variância para o fermento comercial DELVO® FRESH FC-211, referente ao tempo (minutos) para se atingir pH 5,4.

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
ANIMAL	2	572745.920000	286372.960000	81.676	0.0000
ANTIBI_TIC	4	2005714.346667	501428.586667	143.011	0.0000
CONCENTRA_	4	424829.946667	106207.486667	30.291	0.0000
ANTIBI_TIC*CONCENTRA	16	1218760.320000	76172.520000	21.725	0.0000
erro	48	168298.746667	3506.223889		
Total corrigido	74	4390349.280000			
CV (%) =	14.64				
Média geral:	404.3600000	Número de observações:	75		

Legenda: Tabela de Análise de Variância (Software SISVAR). Demonstra que o bloco de animal foi significativo ( $p > 0,05$ ), no entanto, o baixo coeficiente de variação indica que o experimento foi bem controlado e que o fator antimicrobiano foi o mais impactante do experimento.

**Tabela 08** – Análise de variância para o fermento comercial DELVO® FRESH FC-211, referente à variação do pH entre amostras, no tempo (minutos) necessário pelo controle para atingir pH 5,4.

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
ANIMAL	2	0.191875	0.095937	3.844	0.0283
ANTIBI_TIC	4	4.688888	1.172222	46.965	0.0000
CONCENTRA_	4	1.941555	0.485389	19.447	0.0000
ANTIBI_TIC*CONCENTRA	16	2.229099	0.139319	5.582	0.0000
erro	48	1.198059	0.024960		
Total corrigido	74	10.249475			
CV (%) =	2.79				
Média geral:	5.6682667	Número de observações:	75		

Legenda: Tabela de Análise de Variância (Software SISVAR). Demonstra que o bloco de animal foi significativo ( $p > 0,05$ ), no entanto, o baixo coeficiente de variação indica que o experimento foi bem controlado e que o fator antimicrobiano foi o mais impactante do experimento.

**Tabela 9** – Análise de variância para o fermento comercial DELVO® FRESH YS-131, referente ao tempo (minutos) para se atingir pH 4,6.

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
ANIMAL	2	2278.160000	1139.080000	0.241	0.7869
ANTIBI_TIC	4	1117003.520000	279250.880000	59.042	0.0000
CONCENTRA_	4	116128.986667	29032.246667	6.138	0.0004
ANTIBI_TIC*CONCENTRA	16	412142.613333	25758.913333	5.446	0.0000
erro	48	227025.840000	4729.705000		
Total corrigido	74	1874579.120000			
CV (%) =	11.89				
Média geral:	578.2800000	Número de observações:	75		

Legenda: Tabela de Análise de Variância (Software SISVAR). Demonstra que o bloco de animal não foi significativo ( $p > 0,05$ ), que o baixo coeficiente de variação indica que o experimento foi bem controlado e que o fator antimicrobiano foi o mais impactante do experimento.

**Tabela 10** – Análise de variância para o fermento comercial DELVO® FRESH YS-131, referente à variação do pH entre amostras, no tempo (minutos) necessário pelo controle para atingir pH 4,6.

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
ANIMAL	2	0.272232	0.136116	2.112	0.1321
ANTIBI_TIC	4	22.162200	5.540550	85.979	0.0000
CONCENTRA_	4	1.617427	0.404357	6.275	0.0004
ANTIBI_TIC*CONCENTRA	16	6.218973	0.388686	6.032	0.0000
erro	48	3.093168	0.064441		
Total corrigido	74	33.364000			
CV (%) =	5.16				
Média geral:	4.9160000	Número de observações:	75		

Legenda: Tabela de Análise de Variância (Software SISVAR). Demonstra que o bloco de animal não foi significativo ( $p > 0,05$ ), que o baixo coeficiente de variação indica que o experimento foi bem controlado e que o fator antimicrobiano foi o mais impactante do experimento.