

## ANÁLISE DE RESÍDUO DE PENICILINA G, ESTREPTOMICINA E DIHIDROESTREPTOMICINA EM LEITE

Rosângela Silveira Barbosa<sup>1</sup>, Maira Balbinotti Zanela<sup>1</sup>, Giovana Paula Zandoná<sup>2</sup>, Rosane Lopes Crizel<sup>2</sup>, Isabelle D. Veber Angelo<sup>2</sup>; Melissa García Méndez<sup>2</sup>; Marcelo Bonnet Alvarenga<sup>1</sup>; Fabiano Barreto<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Embrapa Clima Temperado, Pelotas, Brasil. <sup>2</sup>Bolsista de Desenvolvimento Tecnológico Industrial do CNPq, Programa Leite Seguro, Laboratório de Qualidade do Leite, Embrapa Clima Temperado, Pelotas, Brasil. <sup>3</sup>Laboratório Federal de Defesa Agropecuária (LFDA/RS/MAPA), Porto Alegre, Brasil

### INTRODUÇÃO

A produção de leite no Brasil cresceu substancialmente nas últimas décadas, fazendo com que o país se tornasse o terceiro maior produtor mundial de leite (FAO, 2022). O órgão responsável pela fiscalização do leite é o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) por meio da IN 76 e 77 (BRASIL, 2018) e, pelo Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes (PNCRC), com o objetivo de promover segurança química dos alimentos de origem animal produzidos no Brasil, bem como melhorar a qualidade do leite (BRASIL, 2017).

A Organização Mundial da Saúde (OMS) destaca que a maior ameaça global de saúde pública é a resistência aos antimicrobianos (Rocha, 2019), podendo ser desencadeada pela presença de medicamentos veterinários acima do limite máximo de resíduo (LMR) em alimentos lácteos.

No Brasil são utilizados medicamentos com associação de princípios ativos de antibióticos para o tratamento de vacas leiteiras com doenças infecciosas, ocasionadas por *Streptococcus* spp, *Bacillus* spp, *Escherichia* spp, *Staphylococcus* spp, *Pasteurella* spp e *Corynebacterium* spp. Como exemplo, há a associação de Benzilpenicilina benzatina, Benzilpenicilina procaína, Benzilpenicilina potássica (família dos  $\beta$ lactâmicos), Dihidroestreptomicina e Estreptomicina (família dos aminoglicosídeos), injetável e tempo de carência de 4-5 dias. Este, carece de mais estudos comparando a curva de eliminação no leite, o LMR permitido pela legislação e o tempo de carência recomendado pelo fabricante.

O objetivo do trabalho consistiu em avaliar o LMR, o tempo de detecção no leite em comparação ao recomendado pelo fabricante, a partir da associação de princípios ativos de penicilina, estreptomicina e dihidroestreptomicina.

### MATERIAL E MÉTODOS

Este estudo piloto foi realizado pelo Programa Leite Seguro, em 2020, no rebanho experimental do Sistema de Pesquisa e Desenvolvimento em Pecuária Leiteira (SISPEL). Em etapa prévia, foi selecionada uma vaca da raça Jersey em fase final de lactação, a fim de subsidiar a realização futura de estudo mais robustos. Este animal apresentou produção de leite de 9 L/dia, 306 dias de lactação e 3 partos.

Foi aplicado um antibiótico injetável, com a associação dos princípios ativos penicilina, estreptomicina e dihidroestreptomicina, em aplicação única, com período de carência recomendado em bula de 4-5 dias. Foram coletados 50 mL de leite antes do tratamento (tempo zero), e após o tratamento, nas ordenhas da manhã durante 15 dias. As amostras foram coletadas com um coletor acoplado a ordenhadeira. Após a coleta, as amostras foram armazenadas em frascos sem conservante e refrigeradas até realização da análise por kits comerciais. Os tempos 0, 1, 2 e 3 foram analisados pelo teste comercial rápido Kit Charm EZ® (QUAD1 –  $\beta$ lactâmicos - penicilina G, QUAD3 – aminoglicosídeos - estreptomicina) e a partir do tempo 4, pelo Devoltest® T (teste microbiológico) e Charm® Blue Yellow II Test (teste imunológico), ambos teste lentos. Posteriormente, foram realizadas as análises cromatográficas para detecção e

quantificação de Penicilina G, Estreptomina e Dihidroestreptomina, de acordo com o método descrito por Jank et al., (2015), usando cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa (LC-MS). O método foi validado de acordo com a diretiva 657/CE/2002 para análise quantitativa.

### RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos (Tabela 1), a partir dos testes realizados para identificação de presença de resíduos de antibióticos, observa-se que o tempo 0 foi negativo, como esperado; os três primeiros dias após a aplicação do antibiótico foram positivos para o QUAD1 e apenas positivo para QUAD3 no primeiro dia após aplicação do medicamento. As amostras apresentaram resultado positivo para Blue-Yellow e Devoltest, mesmo após o período de carência do medicamento.

Preconiza-se que a determinação da capacidade de detecção ( $CC\beta$ ) de um ensaio seja mediante a fixação inicial da concentração equivalente a 50% do LMR ou seja tão baixo quanto razoavelmente possível, garantindo detecção do verdadeiramente positivo (EC, 2021).

Tabela 1 – Análise de detecção e quantificação de resíduo de medicamento com associação de penicilina, estreptomina e diidroestreptomina em leite.

Dias de coleta	QUAD 1	QUAD 3	Blue-Yellow	Devoltest	Penicilina Estr G ( $\mu\text{g.L}^{-1}$ )	estreptomina ( $\mu\text{g.L}^{-1}$ )	Dihidro estreptomina ( $\mu\text{g.L}^{-1}$ )
0	Negativa	Negativa			<LQ	<LQ	<LQ
1	+ (BL)	+ (STP)			37	242,12	188,28
2	+ (BL)				2,92	<LQ	<LQ
3	+ (BL)						
4			Positiva	Positiva	3,09	<LQ	<LQ
5			Positiva	Positiva			
6			Positiva	Positiva			
7			Positiva	Positiva	2,34	<LQ	<LQ
8			Positiva	Positiva			
9			Positiva	Positiva			
10			Positiva	Positiva	1,57	<LQ	<LQ
11			Negativa	Positiva			
12			Negativa	Positiva			
13			Negativa	Positiva	<LQ	<LQ	<LQ
14			Negativa	Negativa	<LQ	<LQ	<LQ
15			Negativa	Negativa			

Nota: Positiva: presença de antibiótico; negativo: ausência de antibiótico; <LQ: abaixo do limite de quantificação.

A quantificação dos compostos estudados na análise por cromatografia, observa-se que no primeiro dia de aplicação, para os três compostos analisados a concentração estava acima do (LMR) de 4, 200 e 200  $\mu\text{g.L}^{-1}$ , respectivamente, com base na IN nº 51, de 19 de dezembro de 2019, da ANVISA (BRASIL, 2019). Isso era esperado, uma vez que a bula informa que o período de eliminação é de 4 a 5 dias. O método possui limite de quantificação de 1  $\mu\text{g.L}^{-1}$  para a penicilina G e 50  $\mu\text{g.L}^{-1}$  para estreptomina e diidroestreptomina, permitindo quantificar a penicilina até o décimo

dia. Observa-se que a partir do segundo dia de aplicação, os três compostos estavam abaixo do LMR (BRASIL, 2019).

### CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS

Neste estudo piloto, a utilização do medicamento injetável com associação de princípios ativos de penicilina, estreptomicina e dihidroestreptomicina, apresentou resultado positivo além do período de carência máxima de cinco dias para os testes lentos Blue-Yellow e Devotest, enquanto que, no teste confirmatório foi quantificado acima do Limite Máximo de Resíduo permitido apenas no primeiro dia após o tratamento, para todos os princípios ativos. Não se pode fazer inferências sem outros estudos que confirmem os dados apresentados.

### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). **Instrução Normativa nº 76 de novembro de 2018**. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Brasília, DF, nov. 2018.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Instrução Normativa n. 77, de 26 de novembro de 2018**. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 30 nov. 2018.
- BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **INSTRUÇÃO NORMATIVA Nº 51, 19/12/2019**. Publicada no DOU nº 249, 26/12/2019.
- BRASIL, 2017. **Plano de Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes PNCR**. 2017. Disponível: <https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/inspecao/produtosanimal/plano-de-nacional-de-controle-de-residuos-e-contaminantes>.
- BRITO; LANGE. Resíduos de antibióticos em leite. Comunicado Técnico 44. **Embrapa Gado de Leite**, 2005.
- EC (European Commission). Commission Implementing Regulation 2021/888/EC of 22 March 2021. on the performance of analytical methods for residues of pharmacologically active substances used in food-producing animals and on the interpretation of results as well as on the methods to be used for sampling and repealing Decisions 2002/657/EC and 98/179/EC. **Official Journal of the European Communities**, 2021, L 180/84.
- FAO-Food and Agriculture Organization of the United Nations. **FAO STAT**. Italy, 2019. Disponível em: <https://www.fao.org/faostat/en/>.
- MENDES, C. et al. Pesquisa de resíduos de beta-lactâmicos no leite cru comercializado clandestinamente no município de Mossoró, RN, utilizando o Delvotest. **Arq.Inst.Biol.**, nº 75, 2008.
- ROCHA. Antibióticos: resistência de microrganismos é grave ameaça à saúde global. 2019. Disponível: <https://portal.fiocruz.brs>.