



PLANEJAMENTO, OTIMIZAÇÃO E VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA QUECHERS PARA DETERMINAÇÃO MULTI-RESÍDUOS DE ANTIMICROBIANOS EM LEITE.

Thielly Nunes Silva¹, Izabelle Christinne Pereira de Brito², Sérgio Augusto de Albuquerque Fernandes³

Resumo: A presença de resíduos de antibióticos em leite é considerada uma das principais causas de contaminação química deste produto, podendo trazer diversos problemas tanto para a indústria de laticínios quanto para saúde do consumidor. Neste sentido, é necessário o diagnóstico contínuo, por meio da quantificação de resíduos destes medicamentos no leite. Para este fim, são usados métodos analíticos para determinar e quantificar a presença de resíduos de antibióticos em leite. Assim, o objetivo do desenvolvimento deste estudo foi aplicar o método de extração QuEChERS com modificações, para determinação de antibióticos em leite cru obtido em fazenda leiteira comercial, com o uso da cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). O método proposto para análise mostrou-se preciso e reprodutível para cada medicamento veterinário, com detecção de resíduos inferiores ao limite máximo de resíduo (LMR) estabelecido pelo Codex Alimentarius. As amostras analisadas se encontram em conformidade com a legislação e próprias para comercialização, uma vez que as concentrações encontradas de Tilosina, foram inferiores ao limite máximo de resíduo permitido. Sendo assim, a metodologia pode ser utilizada como um protocolo para investigar a presença de resíduos de antibióticos em amostras de leite.

Palavras Chaves: Antibioticos; Cromatografia; Tilosina.¹

PLANNING, OPTIMIZATION AND VALIDATION OF QUECHERS METHODOLOGY FOR MULTI-RESIDUE DETERMINATION OF ANTIMICROBIALS IN MILK.

Abstract: The presence of antibiotic residues in milk is considered one of the main causes of chemical contamination of this product, which can bring several problems to both the dairy industry and the consumer's health. In this sense, continuous diagnosis is necessary, through the quantification of residues of these drugs in milk. For this purpose, analytical methods are used to determine and quantify the presence of antibiotic residues in milk. Thus, the objective of the development of this study was to apply the QuEChERS extraction method with modifications, for the determination of antibiotics in raw milk obtained from a commercial dairy farm, with the use of high efficiency liquid chromatography (HPLC). The proposed method for analysis proved to be accurate and reproducible for each veterinary drug, with detection of residues below the maximum residue limit (MRL) established by the

¹ Graduanda em Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Núcleo de estudos em antibióticos em leite ;

² Doutoranda em Engenharia e Ciência de Alimentos, Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Núcleo de estudos em antibióticos em leite ;

³ Docente/pesquisador, Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Departamento Rural e Animal ;

Codex Alimentarius. The samples analyzed were in compliance with the legislation and suitable for commercialization, since the concentrations of tylosin found were lower than the maximum residue limit allowed. Therefore, the methodology can be used as a protocol to investigate the presence of antibiotic residues in milk samples.

Keywords: Antibiotics; Chromatography; Tylosine.

INTRODUÇÃO: O leite é um produto de alto valor nutricional, consumido mundialmente, por ser fonte de nutrientes essenciais para a alimentação humana. Apesar de suas características nutricionais, o leite é susceptível a diversas contaminações, sendo elas: químicas, físicas ou biológicas. A presença de medicamentos veterinários em produtos lácteos, é a principal causa de contaminação química em alimentos de origem animal, principalmente em leite (Foroutan et al., 2019). A presença de resíduos de antimicrobianos em leite está relacionada a aplicação inadequada do antibiótico e o não cumprimento do período de carência após o uso do medicamento nas vacas leiteiras. Um grande problema associado ao resíduo de antibióticos é a estimulação da resistência antimicrobiana, tornando esta questão, um problema mundial de saúde pública (Panigrahi et al., 2017). A fim de evitar riscos de contaminação por antimicrobianos, a produção leiteira é controlada internacionalmente, por organismos como a FAO e a OMS, que estabelecem limites máximos de resíduos de medicamentos veterinários em leite (Martin, 2015). Diante o exposto faz-se necessária a investigação de resíduos de antimicrobianos em leite e para isto, são usadas metodologias analíticas confiáveis e validadas, que buscam diminuir o uso de reagentes químicos e que sejam eficazes e rápidas. Neste sentido, Anastassiades *et al.*, (2003) introduziram um método rápido, fácil, de baixo custo, efetivo, robusto e seguro, denominado QuEChERS, para preparo de amostras, inicialmente usada para a análise de resíduos de pesticidas em frutas e vegetais. Com a necessidade de ampliar as matrizes analisadas, o método passou por modificações a fim de ser aplicado também em matrizes alimentícias ricas em lipídeos.

MATERIAL E MÉTODOS:

Amostragem: Foram coletadas 500 mL de leite cru de 18 vacas de grau de sangue Holandês-Zebu, pertencentes a propriedade rural comercial, no município de Itapetinga – Bahia, testadas por meio de teste de triagem, por laticínio comercial.

Testes de triagem: Foi utilizado o teste de triagem TwinSensorBT (Unisensor, Bélgica).

Extração por QuEChERS modificado: O desenvolvimento do método QuEChERS foi baseado nas metodologias descritas por Anastassiades *et al.* (2003) e Aguilera-Luiz *et al.* (2008) com algumas modificações, consistiu em três etapas: extração, partição e clean-up. As análises foram realizadas em triplicata. Em um tubo de falcon de 50 mL adicionou-se 0,50 mL de leite em 1% de ácido acético, adicionou-se também 0,50 mL de acetonitrila e 0,50 mL de uma solução de Na₂EDTA, este quelante foi utilizado para reduzir a quantidade de gordura do leite. A mistura permaneceu em repouso por 1 hora e posteriormente foi agitada em vórtex durante 1 minuto, concluindo-se assim a etapa de extração. O processo de partição ocorreu com a adição de 0,20 g de MgSO₄ anidro e 0,05 g de NaCl, sendo agitados em vórtex por 1 minuto e levados à centrifugação durante 10 minutos a 4000 rotações por minuto (rpm). Após este período, realizou-se a etapa de clean-up, onde todo o sobrenadante cerca de 2,00 mL da camada de acetonitrila foi coletado e filtrado em filtro de nylon (Chromafil® Xtr, 0,45 µm), nesta etapa foi excluída a parte de adição de 150 mg MgSO₄, 50 mg de PSA e 50 mg de C18. Em seguida as amostras foram submetidas a análises cromatográficas em condições determinadas.

Condições cromatográficas: As concentrações dos analitos foram determinadas

utilizando-se cromatógrafo líquido de alta eficiência HPLC, marca Shimadzu (Kyoto, Japan), modelo SPD-20A, com coluna C18 Luna (100 x 4,6 mm, 5µm). O modo de injeção utilizado foi o gradiente (20 min) com vazão de 0,75 mL⁻¹ min⁻¹. A programação de temperatura do forno foi constante de 40 °C. O volume de 20 µL foi injetado no HPLC, utilizando micro agulha injetora de vidro para cromatografia líquida. Foi utilizada uma faixa de comprimento de onda para cada medicamento veterinário, Sulfadoxina (272 nm); Tilosina (450 nm) e Oxitetraciclina (363 nm) para obtenção dos espectros.

Resultados: De acordo com os resultados, das 18 amostras de leite estudadas não foi detectada a presença de dois dos três antibióticos estudados (Oxitetraciclina e Sulfadoxina). Por sua vez a Tilosina foi detectada em 4 amostras (Figura 1); no entanto, as concentrações de Tilosina, não ultrapassaram o LMR, que para este antibiótico é de 100 µg/kg (Tabela 1).

FIGURA 1- Detecção e quantificação de resíduos de antibióticos em amostras de leite cru.

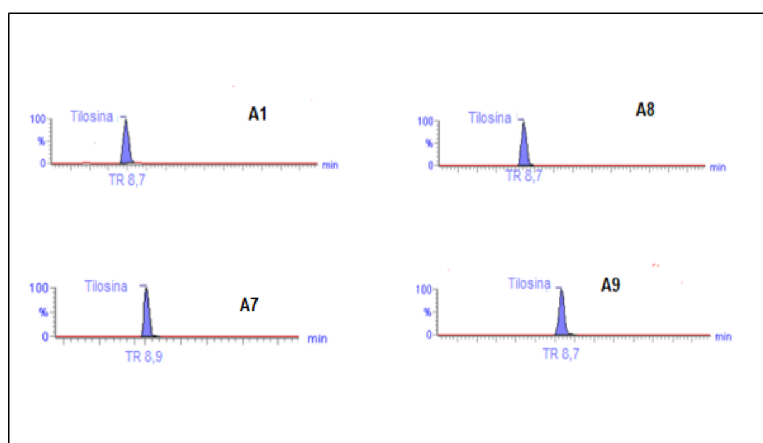


TABELA 1: Concentração de Tilosina em amostras reais.

Animais tratados com antibióticos	Concentração de Tilosina (LMR 100 µg/kg)	Animais não tratados com antibióticos	Concentração de Tilosina (LMR 100 µg/kg)
A1	1,42216	A11	-
A2	-	A12	-
A3	-	A13	-
A4	-	A14	-
A5	-	A15	-
A6	-	A16	-
A7	1,4222	A17	-
A8	3,4989	A18	-
A9	2,6682		
A10	-		

Grabsk *et al.* (2021), também utilizando o método QuEChERS associado à CLAE, para determinação de 3 medicamentos veterinários em amostras reais de leite cru, obtiveram resultados satisfatórios em relação ao método, uma vez que o mesmo foi capaz de extrair pequenas concentrações de medicamentos veterinários, confirmando assim sua viabilidade. Ressaltando que a presença de resíduos de antibióticos mesmo abaixo do LMR permitido, podem estar favorecendo a disseminação da resistência antimicrobiana, no entanto, deve-se ter mais estudos

para confirmação. É importante salientar que a presença de resíduos de antibióticos em produtos de origem animal, pode ocasionar danos aos consumidores, problemas durante o processamento da matéria-prima, além de desencadear a resistência microbiana (Bassetti *et al.*, 2017).

Conclusão: Conclui-se com este estudo, que o método de extração QuEChERS mostrou-se uma ótima alternativa para avaliação de medicamentos veterinários em leite, uma vez que trouxe resultados satisfatórios, na extração de pequenas concentrações do analito. Conclui-se também que as amostras de leite analisadas, se encontravam em conformidade com a legislação, obedecendo os limites máximos de resíduos permitidos, mas é importante salientar que mesmo em pequenas concentrações a presença destes resíduos são preocupantes.

Referências Bibliográficas:

- [1] AGUILERA-LUIZ, M. M., VIDAL, J. L. M., ROMERO-GONZÁLEZ, R., FRENICH, A. G. **Multi-residue determination of veterinary drugs in milk by ultra-high-pressure liquid chromatography–tandem mass spectrometry.** *Journal of Chromatography A*, v. 1205, n. 1-2, p. 10-16, 2008.
- [2] ANASTASSIADES, M., LEHOTAY, S. J., STAJNBAHER, D., SCHENCK, F. J. **Fast and easy multiresidue method employing acetonitrile extraction/partitioning and “dispersive solid-phase extraction” for the determination of pesticide residues in produce.** *Journal of AOAC international*, v. 86, n. 2, p. 412-431, 2003.
- [3] BASSETTI, M., POULAKOU, G., RUPPE, E., BOUZA, E., VAN HAL, S. J., BRINK, A. **Antimicrobial resistance in the next 30 years , humankind , bugs and drugs : a visionary approach.** *Intensive Care Medicine*, v. 43, n. 10, p. 1464–1475, 2017.
- [4] FOROUTAN, A. et al. **Chemical Composition of Commercial Cow’s Milk.** *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 67, n. 17, p. 4897–4914, 2019.
- [5] GRABSK, A. H., SOUZA, J. R. B. D., MARCHI, F. E. D., PRADO, R. M. D., SANTOS, G. T. D., PORTO, C., PILAU, E. J. **Determination of antibiotics residues in milk using a QuEChERS method using full factorial design and liquid chromatography-tandem mass spectrometry.** *Journal of the Brazilian Chemical Society*, v. 30, n. 7, p. 1498–1505, 2019.
- [6] MARTIN, J. G. P. **Resíduos de antimicrobianos em leite – uma revisão.** *Segurança Alimentar e Nutricional*, v. 18, n. 2, p. 80, 2015.
- [7] PANIGRAHI, S.; SINGH SHEORAN, M.; GANGULY, S. **Antibiotic residues in milk-a serious public health hazard.** *Journal of Environment and Life Sciences J Environ Life Sci*, v. 2, n. 4, p. 99–102, 2017.