

**Capítulo 3 - DOI:10.55232/10830014.3**

**ANÁLISE DE PENICILINAS EM AMOSTRAS DE LEITE  
POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA**

**Thaynara Ramalho Santos, Bruno de Araújo Gomes**

**RESUMO:** Uma abordagem sobre análise de penicilinas em amostras de leite por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), realizado a partir de um levantamento bibliográfico para analisar antibióticos penicilinas encontrados em leite in natura. Para tanto, aponta – se os riscos à saúde humana devido a exposição frente aos antimicrobianos, bem como danos aos produtores além de evidenciar a eficiência do método analítico CLAE. Realiza-se, uma organização por procedência, divididas em quinze artigos, cinco monografias, seis dissertações e seis teses de doutorado. Quanto ao tipo de publicação, optou-se por materiais disponíveis no período de 2004 a 2021. As plataformas de acesso aos materiais foram o google acadêmico, Literatura Latino-Americana e do Caribe em Ciências da Saúde (LILACS), Scientific Electronic Library Online (SciELO). Verificando a presença de antimicrobianos, portanto, assumindo um limite maior do que está descrito no limite máximo de resíduo (LMR) na maioria das pesquisas analisadas.

**Palavras-chave:** mastite bovina, antimicrobianos,  $\beta$ -lactâmicos, CLAE.

## **1. INTRODUÇÃO**

Sendo um dos produtos mais valorizado, o leite está entre as cinco mercadorias mais comercializadas no mundo e por isso tem um impacto econômico significativo para aqueles que dependem da produção leiteira. Além de ser fonte de renda, o leite tem em sua essência, micronutrientes, proteínas, carboidratos, lipídios, bem como minerais e variadas vitaminas, por isso se torna indispensável para o consumo e desenvolvimento humano (SIQUEIRA, 2019).

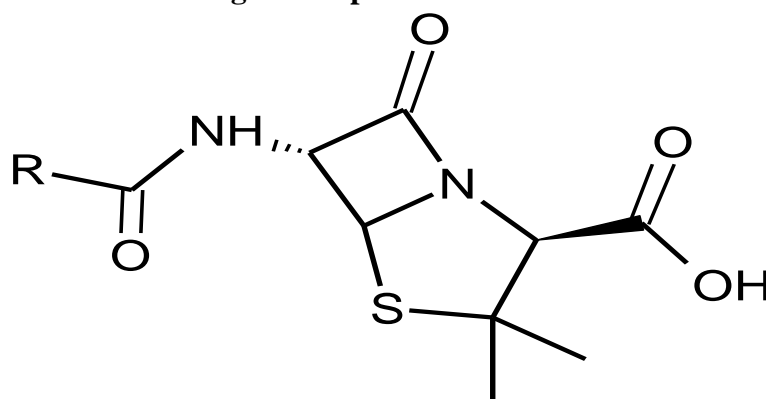
Por outro lado, a falta do controle de qualidade na produção do leite gera preocupação pois é muito comum a presença de grupos antimicrobianos oriundo do tratamento de um processo inflamatório no gado leiteiro, nomeado mastite responsável por prejuízos econômicos interferência na produção de derivados lácteos além de representar risco em potencial à saúde do consumidor, podendo predispor entre outras, reações alérgicas (CARVALHO *et al.*,2020).

A mastite trata-se de uma entidade patológica caracterizada pela resposta inflamatória localizada nas glândulas exócrina do tecido mamário comprometendo o estado de saúde do animal de forma severa (MASSOTE, 2019). E embora ela atinja o rebanho em vários graus de intensidade, quase sempre ela traz prejuízos para a pecuária, seja por gastos com o tratamento ou por redução na produtividade. Segundo Nascimento (2001) A maioria das infecções tem origem bacteriana, predominando o *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus agalactiae*. Em função dessas infecções os  $\beta$ -lactâmicos, sulfonamidas, tetraciclina, aminoglicosídeos, macrolídeos, quinolonas e anfenicóis estão em relevância no tratamento e prevenção as doenças causados por microrganismos, assim favorecendo benefícios para o índice de crescimento em especial na aquicultura e bovinocultura (SANTOS, 2011).

Uma inúmera classe de antibióticos tem sido usada na medicina veterinária para o trato de infecções de influência econômica, beneficiando altas possibilidades à produção animal. Antibióticos são fármacos que destroem ou impedem o desenvolvimento de microrganismos. São considerados eficazes e mais importante para o tratamento de infecções, segundo Guimarães (2010) “Podem ser classificados como bactericidas, quando causam a morte da bactéria, ou bacteriostáticos, quando promovem a inibição do crescimento microbiano”.

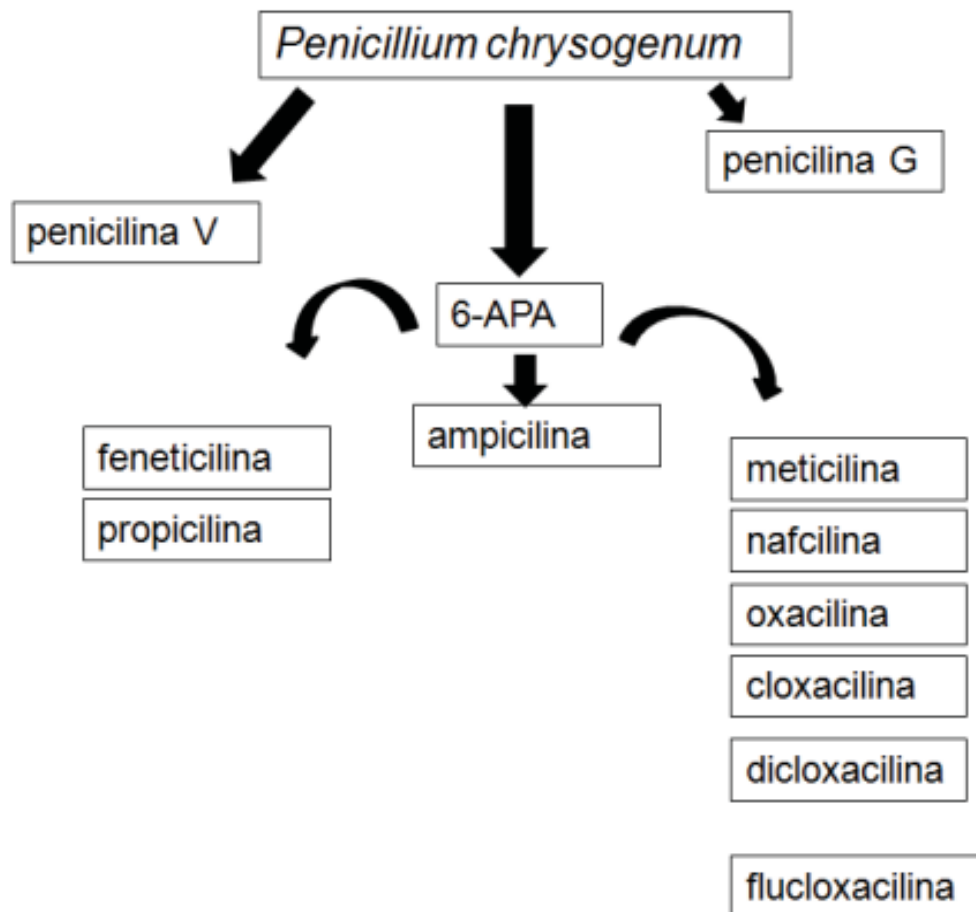
Dentre os antimicrobianos, a penicilina, demonstrada na figura 1, pertence ao grupo dos  $\beta$ -lactâmicos e são um importante grupo que tem sido usado efetivamente no combate às infecções de bactérias Gram Positivo e Gram Negativo. As penicilinas se dividem em dois macros grupos: as penicilinas naturais e as penicilinas semi sintéticas. A ação das penicilinas naturais acontece por inibição da  $\beta$ -lactamase. A este grupo faz parte penicilina G (penicilina cristalina, procaína e benzatina) e a penicilina V. enquanto o grupo das semi sintéticas pertencem às amoxilina, ampicilinas, nafcilina, cloxacilina, flucloxacilina, propicilina, oxacilina por possuírem um amplo espectro de ação e estruturalmente apresentam um composto na cadeia lateral conhecido como núcleo penicilânico (ANDRADE, 2018).

**Figura 1: Fórmula estrutural geral da penicilina.**



Fonte: Autor

**Figura 2:** Esquema do grupo das penicilinas naturais e semi sintéticas.



Fonte: FIORENTINO, 2012

A presença do antimicrobiano no leite assume uma preocupação devido à alta taxa de consumo, destacada pelo grupo de risco da sociedade, crianças e idosos, pois propiciam a estes o crescimento de microrganismos resistentes no organismo humano (JUNIOR,2018). Por serem os mais utilizados no tratamento com gado leiteiro a penicilina é o fármaco encontrado com mais frequência na identificação de resíduos. Esse medicamento resiste a pasteurização e não se torna inativo quando expostos a altas temperaturas. Um dos problemas à indústria se encontra na inibição de culturas lácteas, indispensável para a produção de alimentos, derivados do leite, que passam pelo processo de fermentação decorrendo a má qualidade do produto (SILVIA; RIBEIRO 2012; LOBATO, 2019).



Quanto aos problemas da a saúde pública Souza cita que 5% a 10% da sociedade brasileira apresenta uma sensibilidade alérgica a 1 parte por milhão da penicilina, e que podem evoluir para asma brônquica, urticárias, dermatites ou rinites além do desenvolvimento de cepas resistentes que acontece a longo prazo, com o oferecimento de subdoses de antimicrobianos a microbiota intestinal. A penicilina pode ter um efeito toxico nas situações eventuais, em mulheres grávidas as alterações teratogênicas podem vir a acontecer (LOBATO,2019; SOUZA, 2013; JUNIOR, 2018).

As organizações internacionais responsáveis pela saúde pública determinam as diretrizes para o Limite Máximo de Resíduo (LMR) dos antibióticos, por isso é considerada o principal parâmetro para validação dos testes de detecção de resíduos de drogas em alimentos. No Brasil o monitoramento de resíduos de medicamentos veterinários em produtos de origem animal é regulamentado pelo programa Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes (PNCRC), coordenado pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) e pelo Programa de Análise de Resíduos de Medicamentos Veterinários em Alimentos (PAMVet), da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) que fazem o controle no estabelecimento dos limites máximos resíduos oriundos de medicamentos veterinários ou agrotóxicos, contaminantes ou aditivos (PACHECO et al, 2014).

O LMR, por definição legal é a quantidade máxima de miligramas presente em 1kg de alimento, representado por parte por milhão (ppm) ou parte por bilhão (ppb), é um limite que se utiliza para garantir a segurança dos consumidores (JUNIOR, 2018). Além disso, os valores estão relacionados com a taxa de Ingestão Diária Aceitável (IDA) bem como, mostram o reflexo das práticas veterinárias adotadas (JUNIOR, 2018).

**Tabela 1: Limite máximo de resíduos para os antimicrobianos  $\beta$ -lactâmicos pertencentes ao grupo penicilinas na matriz leite – PNCR 2017.**

<b>Grupo de antimicrobianos</b>	<b>Substância farmacologicamente ativa</b>	<b>LMR (<math>\mu\text{g/L}</math>)</b>
<b>B-lactâmicos</b> <b>Penicilinas</b>	Benzilpenicilina/penicilina G	4
	Ampicilina	4
	Amoxiciclina	4
	Cloxacilina	30
	Oxacilina	30
	Dicloxacilina	30

Fonte: Autor

A cromatografia líquida é um método de separação de misturas que acontece pela consequência da distribuição dos componentes da amostra entre uma fase móvel (FM) líquida e uma fase estacionária (FE) líquida ou sólida dentro de uma coluna. A cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) se destaca pela versatilidade, análise em menor tempo e com alta resolução além de apresentar sensibilidade, porém apresenta alto custo na instrumentação bem como nos solventes utilizados (FIORENTINO, 2012).

Este método se define pelo mecanismo de separação entre o soluto e a fase estacionária e por isso pode acontecer por partição ou cromatografia líquido – líquido e se caracteriza pela FM ser uma mistura de solventes orgânicos e a FE ser partículas de sílica. Adsorção ou cromatografia sólido – líquido, neste método a fase móvel e fase estacionária não apresentam distinção quanto a polaridade. Troca iônica ou cromatografia de íons, cromatografia por exclusão quando a separação acontece de acordo com o tamanho de partículas no soluto ou cromatografia afinidade, interação eletrostática ou iônica dos analitos, usada para substratos, enzimas, amostras biológicas, entre outros. (SILVA, 2019).

A metodologia analítica consiste em etapas como a extração, limpeza, identificação, quantificação e confirmação. O leite apresenta em sua matriz um elevado teor de proteína e lipídio, por isso é necessária uma preparação da amostra com a adição de acetonitrila seguindo de centrifugação e um processo no qual resfria a amostra a baixa temperatura e descongela logo em seguida. Técnica mais empregada para a limpeza do leite se dá pela extração líquido – líquido (ELL) e extração e fase sólida (EFS). Para identificar e quantificar se usa um método cromatográfico com sistema de detecção por absorção ultravioleta (UV), a confirmação dos antimicrobianos da análise acontece com o uso do espectrômetro de massas acoplada ao HPLC uma técnica altamente seletiva, precisa e específica (SILVEIRA, 2016).

O uso das técnicas cromatográficas, facilitou as análises para detecção de contaminantes em baixas concentrações pois a sensibilidade dos equipamentos permite a injeção de quantidades mínimas da amostra, além de poder fazer a análise de compostos orgânicos e inorgânicos no estado líquido ou gasoso. Na maioria da literatura disponível sobre os  $\beta$ -lactâmicos, se encontra uma comparação do tempo de detenção do composto com o tempo fornecido pelo seu padrão, para análises quantitativas residuais de antimicrobianos utilizando métodos cromatográficos, se encontra também colunas no modo reverso de eluição, utilização de solução tampão com diferentes valores de pH. O

autor ainda cita a cromatografia líquida de alta eficiência acoplada ao espectrômetro de massas como um mais método analítico sofisticado (CUNHA, 2009; JUNIOR, 2018; MOURA, 2011).

Em função do seu uso extensivo, estes compostos têm se distribuídos no meio ambiente, oriundos dos efluente domésticos e resíduos da produção bovina. Por esta razão, considerando a importância em saúde pública e para a indústria, o objetivo do trabalho foi realizar um levantamento bibliográfico de verificação de resíduos de antibióticos especificamente de penicilinas no leite in natura bem como os malefícios deixados à saúde humana e as fazendas leiteiras pela presença desses antimicrobianos.

## **2. METODOLOGIA**

Foi realizado a construção de uma contextualização para o problema e análise das possibilidades presentes na literatura consultada para a concepção do referencial teórico da pesquisa acerca da identificação quantitativa de resíduos de penicilinas em leite. Sendo assim o material coletado para o levantamento bibliográfico, foi organizado por procedência, ou seja, fontes científicas divididas em quinze artigos, cinco monografias, seis dissertações e seis teses de doutorado e, a partir de suas análises permitiu a elaboração de ideias que favoreceram a contextualização, permitindo estabelecer uma relação com as produções anteriores e por isso é classificado como um estudo de revisão bibliográfica do tipo integrativa.

Quanto ao tipo de publicação, optou-se por materiais disponíveis no período de 2004 a 2021. A análise do acervo ocorreu em dois movimentos analíticos. Inicialmente realizou-se uma descrição do conjunto dos artigos, caracterizando-os quanto ano de publicação, país, tipo de estudo, antimicrobiano em foco, matriz e método analítico.

Em seguida, empreendeu-se uma análise de conteúdo temática percorrendo as seguintes etapas: leitura exaustiva do conjunto dos artigos, identificação de núcleos de sentidos nos diferentes textos e agrupamento de núcleos em temáticas que sintetizasse a produção.

A pesquisa foi realizada em janeiro de 2021 e como critério e inclusão foram utilizadas publicações envolvendo a identificação de resíduos  $\beta$ -lactâmicos em alimentos de origem animal, cuja os descritores utilizados foram leite, penicilinas e cromatografia líquida de alta eficiência. As plataformas de acesso aos materiais foram o google

acadêmico, Literatura Latino-Americana e do Caribe em Ciências da Saúde (LILACS), Scientific Electronic Library Online (SciELO). A normatização técnica, se deu com a formatação obedecendo os padrões técnicos estabelecidos pela Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT).

### **3. RESULTADOS**

No Brasil ainda é carente a disponibilidade de trabalho que dispõe da identificação das penicilinas em leite bovino utilizando técnicas cromatográficas, como o método analítico, CLAE. Porém este trabalho trouxe um levantamento de dados disponíveis nos anos entre 2004 – 2021 que contribuem para o fornecimento de uma visão geral da atual situação quanto aos resíduos de antimicrobianos em leite bem como a eficácia do controle de qualidade das indústrias.

Cabral (2015), realizou pesquisa de resíduos de penicilina G e penicilina V pelo método CLAE-MS com coluna reversa 250mm x 4,6mm x 3,5mm em oito amostras de leite bovino. As amostras que foram utilizadas no desenvolvimento do trabalho, foram analisadas na Universidade Federal do Rio Grande do Norte, no Instituto de Química em Laboratórios da Central Analítica. Como resultado obteve em 12% a não conformidade com o limite de tolerância da penicilina G, uma quantidade muito acima do que é permitido no leite pelas legislações. Nessa pesquisa o autor declarou que obteve resultados apropriados além de evidenciar que o método de análise está apto para a identificação de resíduos destes antimicrobianos.

Em estudo realizado por Brito & Junqueira (2004), analisaram o leite in natura oriundo da fazenda modelo do ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Nos resultados descritos por eles, o método CLAE foi otimizado e mostrou resultados satisfatórios na seleção para a ampicilina, penicilina G e penicilina V resultante da separação dos analitos. O limite de detecção encontrado na análise foi de 3µg/L para penicilina e 4µg/L para a ampicilina no leite e, portanto, está de acordo com a LMRs permitido pela legislação.

Cunha (2009), usou um leite oriundos de vários estados, fornecido pela fazenda do laboratório de referência animal do Ministério de Agricultura, Pecuária e Abastecimento de Pedro Leopoldo-MG, que foram identificados e armazenados a -18°C em um freezer. O método escolhido pelo autor se desenvolveu por precipitação total das proteínas, purificação com o solvente acetonitrila e a extração líquido- líquido antes de

ser injetado no cromatógrafo de alta eficiência com detector de massas. Como resultado, Cunha, obteve como LDM, 1,5µg/L para oxalina, cloxacilina, penicilina V, cefapirina, 400µg/L para penicilina G e 10µg/L para amoxicilina e ampicilina. Durante a análise foi possível identificar o estado de origem da amostra, sendo possível concluir sobre a efetividade nos processos quanto as boas condutas veterinárias. O autor finaliza o seu trabalho concluindo que o método analítico desenvolvido é satisfatório para confirmação e quantificação de analitos como os β-lactâmicos.

Moura (2011), utilizou como técnica a microextração com gota suspensa (SDME), que se desenvolve com uma microgota de um solvente orgânico em água, suspensa na agulha do dispositivo, sendo imersa na solução contendo amostra. Após a extração do analito. O dispositivo é retraído e a fase orgânica submetida ao cromatógrafo. Em seu trabalho, o método analítico escolhido estava de acordo com o guia proposto pela ANVISA e pelo MAPA, revelando eficiência na quantificação da ampicilina com o limite de 1,8ng/ml.

#### **4. CONCLUSÃO**

O leite bovino é um alimento com alto teor nutritivo e amplamente consumido pela população brasileira, principalmente pelas crianças e idosos por ser uma importante fonte de cálcio. Portanto a identificação de antimicrobianos no leite desempenha um fator importante na exposição da população e do ambiente a esses medicamentos. Uma vez que a contaminação de alimentos como o leite gera risco a saúde humana nota-se que é indispensável o monitoramento e legislações que possam garantir o controle de qualidade do leite comercializado. Esta revisão confirma a falta de monitoramento e controle dos resíduos veterinários, evidenciando a necessidade de trabalhos que tenham como objetivo compreender a contaminação por fármacos veterinários do leite produzido. O método se mostrou adequado em todos os resultados obtidos na análise de resíduos de medicamentos veterinários em leite cru, pois foi possível quantificar a penicilina e relacionar com as concentrações ditadas pelo LMR.

Um fator que chama a atenção para a temática é a limitação de pesquisas quanto a validação de métodos analíticos por cromatografia líquida de alta eficiência, uma vez que a matriz é um produto exportado a nível mundial e consumido por todas as faixas

etárias. Alguns autores relatam a dificuldade no uso do CLAE no processo de extração, devido a presença de macromoléculas de proteínas e lipídios, afirmando que para 100g de leite, no mínimo 3g deverão ser lipídios e outros 2,9g no mínimo deverão ser proteínas, o que dificulta a validação de técnicas cromatográficas. Diante disso, métodos biológicos são utilizados com mais frequência, principalmente pela simplicidade na execução, rapidez no tempo de análise e ter de forma geral baixo custo. Porém, a eficiência na separação e identificação de analitos em matrizes complexas, além da sensibilidade e versatilidade ganha destaque com os métodos cromatográficos e se torna imprescindível para o monitoramento de resíduos em produtos de origem animal, como o leite.

## REFERÊNCIAS

ANDRADE, Felipe Mendonça. **Resistência antimicrobiana de *Staphylococcus spp.* em mastite bovina: revisão de literatura.** 2018. Trabalho de conclusão de curso (Medicina Veterinária) - Centro Universitário de Formiga - UNIFOR Centro Universitário de Formiga – UNIFOR Acesso: 01/02/2022

CABRAL, Alessandra Miranda. **Desenvolvimento de métodos para quantificação de Benzilpenicilina em medicamentos veterinários e seus resíduos em leite bovino e caprino por UFLC-DAD.** 2015. 237f. Tese (Doutorado em Química) - Centro de Ciências Exatas e da Terra, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2015. Disponível em: <https://repositorio.ufrn.br/handle/123456789/20855> acesso: 20/05/2022

CARVALHO, Rafael Nascimento Garcez et al. Detecção de resíduos de antibióticos em leite cru em fazendas de Aquidabã–Sergipe. **PUBVET**, v. 14, p. 138, 2020. Disponível em: <http://www.pubvet.com.br/artigo/6887/detecccedilatildeo-de-resiacuteduos-de-antibioacuteticos-em-leite-cru-em-fazendas-de-aquidabatilde-ndash-sergipe>. Acesso em: 11 fev. 2021

DA CUNHA, M.R.R. **Análise de multirresíduos de antibióticos anfenicóis e  $\beta$ -lactâmicos em leite por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada ao detector de massas.** 2009. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos), Campinas, SP. Disponível em: <http://repositorio.unicamp.br/handle/REPOSIP/254284> acesso: 30/05/2021

DA SILVA, Thaís Michelle Liziere et al. Desenvolvimento e validação de metodologia por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) para pesquisa de enrofloxacina e ciprofloxacina em dejetos de poedeiras. 2019. Disponível em: <https://repositorio.ufmg.br/handle/1843/31554> acesso: 25/05/2021

FIORENTINO, Flávia Angélica Másquio. **Análise químico-farmacêutica e estudo de estabilidade e de dissolução de cápsulas de flucloxacilina sódica.** 2012. 272 f. Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, 2012. Disponível em: <<http://hdl.handle.net/11449/106687>> acesso: 20/05/2021

GUIMARAES, Denise Oliveira; MOMESSO, Luciano da Silva; PUPO, Mônica Tallarico. Antibióticos: importância terapêutica e perspectivas para a descoberta e



desenvolvimento de novos agentes. **Quím. Nova**, São Paulo, v. 33, n. 3, p. 667-679, 2010. disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0100-40422010000300035&lng=en&nrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422010000300035&lng=en&nrm=iso)>. Acesso 25 Mar. 2021.

JÚNIOR, N.L. **Resíduos de antimicrobianos no leite e sua importância para a saúde pública**. Trabalho de Conclusão de Curso medicina veterinária). Universidade Federal Rural de Pernambuco. Brasil, 2018. Disponível em: [https://repository.ufrpe.br/bitstream/123456789/1679/1/tcc\\_nitalmoleitejunior.pdf](https://repository.ufrpe.br/bitstream/123456789/1679/1/tcc_nitalmoleitejunior.pdf) acesso: 09/05/2021

LOBATO, Cláudio Luiz Damé Sayão; DE LOS SANTOS, João Rodrigo Gil. RESÍDUOS DE ANTIBIÓTICOS NO LEITE: CAUSAS E IMPACTOS PARA A INDÚSTRIA E SAÚDE PÚBLICA. **Science And Animal Health**, v. 7, n. 3, p. 232-250, 2019. Disponível em: <https://periodicos.ufpel.edu.br/ojs2/index.php/veterinaria/article/view/17501/11906> acesso: 09/05/2021

MOURA, Franciane. **Quantificação de resíduos de amoxicilina e ampicilina por injeção direta de amostras de leite de bovino**. 2011. Dissertação (mestrado em química). Universidade Federal de São Carlos – SP. Disponível em: <https://repositorio.ufscar.br/handle/ufscar/6543> acesso: 20/05/2021

PACHECO, Érica silvia; SOUZA, Jurandir Rodrigues de; CALDAS, Eloisa Dutra. Resíduos de medicamentos veterinários em leite e ovos. **Química nova**, v. 37, p. 111-122, 2014. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/qn/a/C4KBF9kRWBFLpQtDvsFJGgc/?lang=pt> acesso em: 20/06/2022

SILVEIRA, Ana Virginia Marinho. Pesquisa de Multiresíduos de Antimicrobianos em Leite Produzidos no estado de Pernambuco, Brasil, 2016. Tese (Doutorado em Química). Disponível em: <https://pesquisa.bvsalud.org/portal/resource/pt/vtt-203315> acesso em: 16/06/2022

SIQUEIRA, Kennya Beatriz. O mercado consumidor de leite e derivados. **Circular Técnica Embrapa**, v. 120, 17 p. 2019. *E-book*. Disponível em: <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/199791/1/CT-120-MercadoConsumidorKennya.pdf> acesso: 12/02/2021

SOUZA, Elson Elias. **Resíduos de antimicrobianos no leite: revisão de literatura**. Trabalho de conclusão de curso (medicina veterinária). Centro universitário de formiga – MG. 2013. Disponível em: <https://bibliotecadigital.uniformg.edu.br:21015/xmlui/bitstream/handle/123456789/166/Elson-Elias-Vet.pdf?sequence=1&isAllowed=y> acesso: 02/05/2021