



ANÁLISE DE RESÍDUOS DE TULATROMICINA EM AMOSTRAS DE LEITE

*Emylaine Pereira dos Santos¹, José Eduardo Gonçalves², Márcia Aparecida Andreazzi³,
Andréa Diniz⁴, Fábio Luiz Bim Cavalieri⁵*

¹Acadêmica do Curso de Biomedicina, Campus Maringá-PR, Universidade Cesumar – UNICESUMAR. Bolsista do Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica (PIBIC/Fundação Araucária-ICETI). emylainepereira4@gmail.com

²Coorientador, Doutor, Docente no Programa de Pós-Graduação em Tecnologias Limpas, Universidade Cesumar - UNICESUMAR, Campus Maringá-PR. Pesquisador do Instituto Cesumar de Ciência, Tecnologia e Inovação – ICETI, Maringá/PR. jose.goncalves@unicesumar.edu.br

³Coorientadora, Doutora, Docente no Programa de Pós-Graduação em Tecnologias Limpas, Universidade Cesumar - UNICESUMAR, Campus Maringá-PR. Pesquisadora do Instituto Cesumar de Ciência, Tecnologia e Inovação – ICETI, Maringá/PR. marcia.andreazzi@unicesumar.edu.br

⁴Pesquisadora do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual de Maringá – UEM. adiniz@uem.br

⁵Orientador, Programa de Pós-Graduação em Tecnologias Limpas – PPGTL, Campus Maringá-PR, Universidade Cesumar – UNICESUMAR. fabio.cavalieri@unicesumar.edu.br

RESUMO

A bovinocultura leiteira é uma das principais atividades do agronegócio brasileiro, destacando-se nas regiões Sul e Sudeste. O leite possui relevante valor nutricional e econômico, sendo amplamente consumido in natura ou processado. Contudo, a utilização de antibióticos na produção leiteira, como a Tulatromicina, exige atenção quanto à segurança alimentar, devido à possibilidade de resíduos no produto final e ao risco de desenvolvimento de resistência antimicrobiana. Este estudo teve como objetivo verificar a estabilidade da Tulatromicina em leite bovino ao longo do tempo e investigar a presença de seus resíduos em amostras comerciais de leite UHT e pasteurizado. A metodologia envolveu indução da Tulatromicina em leite in natura, seguida de liofilização, extração com solventes e análise por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (LC-MS/MS). Os resultados demonstraram alta estabilidade da molécula por até 58 dias, com recuperação entre 99,25% e 88,25%. Na análise de amostras comerciais, cinco das dez apresentaram resíduos detectáveis, com concentrações variando entre 0,35 ng/mL e 14,66 ng/mL. Esses achados evidenciam a persistência do fármaco e a necessidade de monitoramento contínuo, reforçando a importância de métodos analíticos sensíveis para garantir a segurança na cadeia produtiva do leite.

PALAVRAS-CHAVE: Antimicrobiano; Macrolídeos; Pecuária leiteira; Segurança alimentar.

1 INTRODUÇÃO

A bovinocultura leiteira no Brasil configura-se como uma das principais cadeias produtivas do agronegócio, especialmente nas regiões Sul e Sudeste do país, sendo o estado do Paraná o segundo maior produtor nacional (CARVALHO; ROCHA; GOMES, 2018). A atividade leiteira contribui significativamente para a economia brasileira e acompanha uma tendência global voltada ao desenvolvimento sustentável da produção de lácteos, buscando não apenas o aumento da produtividade, mas também a melhoria da qualidade do leite destinado tanto aos consumidores quanto à indústria láctea (ANUÁRIO LEITE, 2023).

O leite é reconhecido como uma fonte alimentar rica em cálcio, proteínas, vitaminas e minerais, sendo, portanto, um componente essencial da dieta humana (CARVALHO; NOVAES; MARTINS, 2002). Além de sua importância nutricional, o leite apresenta elevada versatilidade como produto agroindustrial, sendo amplamente utilizado tanto em sua forma natural quanto na fabricação de diversos derivados.

Apesar dos avanços na atividade leiteira no Brasil, a utilização de fármacos na produção animal, especialmente antibióticos, continua sendo uma prática comum e necessária para assegurar a produtividade e competitividade do setor (REGITANO; LEAL, 2010). No entanto, determinados antibióticos, possuem uso restrito na bovinocultura de leite, como é o caso da tulatromicina.



A tulatromicina é amplamente empregada no tratamento da Doença Respiratória Bovina (DRB), porém seu uso em vacas lactantes ou em fase próxima ao parto é limitado devido ao risco de resíduos no leite, o que compromete a segurança alimentar dos consumidores (BEHURA et al., 2017; OURO FINO, 2022; ZOETIS, 2022). Além disso, o uso inadequado desse antibiótico pode contribuir para o desenvolvimento da resistência antimicrobiana.

Diante da incidência da Doença Respiratória Bovina (DRB) em rebanhos leiteiros e da comprovada eficácia da tulatromicina no tratamento, a ausência de testes específicos e rotineiros em laticínios para a detecção de resíduos desse antibiótico pode representar um risco adicional, especialmente no que se refere à segurança alimentar (LEKAGUL et al., 2020; SLIZOVSKIY et al., 2020). Nesse contexto, o presente estudo tem como objetivo aplicar um protocolo analítico para a identificação e quantificação da tulatromicina em amostras de leite comercializada em supermercados da cidade de Maringá.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

O experimento inicial foi conduzido com amostras de leite obtidas da Fazenda Escola da Universidade Cesumar - UNICESUMAR, (23° 25'S, 51°57'W e altitude de 550 metros), no mês de abril de 2024. Foram coletados 2 litros de leite, transportado ao Laboratório Interdisciplinar de Análises Biológicas e Químicas da UNICESUMAR, separados em 33 frascos contendo 25 mL cada, identificados e armazenados a -20 °C. No laboratório foram adicionados 100 µL de solução padrão de Tulatromicina 1000 µg/mL em cada recipiente, liofilizadas à -86°C (Liofilizador LJJ, JJ Científica). O protocolo foi aprovado pelo CEP/Unicesumar no 03.2/2023.

Em um frasco cônico contendo 10 mL de acetonitrila foram adicionados 1 g de amostra de leite liofilizado, agitado por 5 minutos em vórtex (Vortex Basic Kasvi) seguido por centrifugação a 4.000 rpm por 15 minutos. O sobrenadante foi transferido cuidadosamente para outro tubo cônico de 50 mL contendo 10 mL de hexano, 250 mg de DSC – 18 (Sigma – Aldrich) e 100 mg de PSA (Supelco), agitados por 5 minutos em vórtex e centrifugação por 15 minutos a 4.000 rpm.

O hexano, presente na camada superior do sobrenadante, foi descartada, e a inferior, composta pelo solvente acetonitrila, foi transferida para um tubo de vidro para evaporação do solvente. Após o período de evaporação, o material foi reconstituído com 2 mL de metanol e transferido para um vial de 2 mL e analisadas no Núcleo de Pesquisa Clínica e Bioequivalência (NPCBio) – HU/UEM, utilizando um módulo cromatográfico (Waters), equipado com forno e amostrador automático (autosampler) refrigerado, contendo uma coluna ACE 3 C18 DV17-1217 (50 x 4,6 mm) e acoplado ao sistema de espectrometria de massas Micromass Quattro Premier XE (Waters).

Na análise por LC-MS/MS, 20 µL de amostra foram injetados no sistema, fixando a temperatura da coluna em 40°C. A fase móvel consistiu em uma mistura 85:15 (A:B), sendo: A – 0,1% ácido fórmico em água; B – metanol. O fluxo utilizado de fase móvel foi de 0,4 mL/min e o tempo de corrida cromatográfica foi de 5 minutos.

O espectrômetro de massas foi definido otimizando melhores condições para o método de monitoramento de reações múltiplas (MRM), sendo elas: modo de ionização por eletrospray (ES) operando no modo positivo (+), voltagem no capilar de 3.6 kV, voltagem no cone de 30 V, voltagem no extrator de 3V, temperatura da fonte de 120°C, temperatura de dessolvatação de 500°C, fluxo do gás de dessolvatação de 600 L/h; fluxo de gás no cone de 150 L/h, resoluções LM1 e HM1 de 15, resoluções LM2 e HM2 de 15 e 13, multiplicador 550 vezes; energia do íon 1 e 2 de 1.0 e 2.0 respectivamente e fluxo de argônio na câmara de colisão de 0,17 mL/min. Para a quantificação da tulatromicina foi realizada



curva de calibração utilizando padrão externo de tulatromicina nas concentrações de 0 a 10 ng/mL.

Em supermercados da cidade de Maringá-PR, foram adquiridas 10 amostras de leite, sendo 5 amostras de leite UHT e 5 amostras de leite pasteurizado. As extrações e análises seguiram os mesmos protocolos descritos. Para a quantificação da tulatromicina foi realizada curva de calibração utilizando padrão externo de tulatromicina nas concentrações de 0 a 10 ng/mL.

3 RESULTADOS ESPERADOS E DISCUSSÕES

A análise de estabilidade da tulatromicina foi conduzida com o propósito de verificar seu comportamento em meio lácteo ao longo do tempo e avaliar possíveis perdas por degradação. Para isso, amostras de leite bovino foram coletadas em abril de 2024, na Fazenda Escola da UNICESUMAR, e fortificadas com tulatromicina para obtenção de uma concentração final teórica de 4,00 µg/mL. As amostras foram submetidas à liofilização em diferentes intervalos ao longo de 58 dias, sendo todas as análises realizadas em triplicata para garantir maior confiabilidade e reprodutibilidade dos resultados.

Os dados obtidos, apresentados na Tabela 1, indicaram que a tulatromicina apresentou elevada estabilidade durante todo o período avaliado. A concentração quantificada variou de $3,97 \pm 0,06$ µg/mL no tempo zero (recuperação de 99,25%) para $3,53 \pm 0,23$ µg/mL no 58º dia (recuperação de 88,25%). Esses valores correspondem a uma estabilidade percentual entre 99,25% e 88,25%, demonstrando que a degradação do fármaco foi mínima sob as condições experimentais estabelecidas.

Tabela 1: Análise da indução de Tulatromicina em leite de vaca in natura e teste de estabilidade

Indução de tulatromicina no leite / dia	Concentração inicial de Tulatromicina (ug mL ⁻¹)	Quantificação de Tulatromicina após processo de extração (ug mL ⁻¹)	Recuperação (%)	Estabilidade (%)
0	4	$3,97 \pm 0,06$	99,25	99,25
5	4	$3,84 \pm 0,15$	96	96
10	4	$3,79 \pm 0,23$	94,75	94,75
15	4	$3,75 \pm 0,22$	93,75	93,75
20	4	$3,80 \pm 0,21$	95	95
25	4	$3,60 \pm 0,37$	90	90
30	4	$3,91 \pm 0,11$	97,75	97,75
37	4	$3,82 \pm 0,19$	95,5	95,5
44	4	$3,77 \pm 0,20$	94,25	94,25
51	4	$3,69 \pm 0,18$	92,25	92,25
58	4	$3,53 \pm 0,23$	88,25	88,25
0	4	$3,97 \pm 0,06$	99,25	99,25

Fonte: Autor,2025

Tais resultados confirmam que a tulatromicina mantém-se quimicamente estável em leite bovino por, pelo menos, 58 dias quando armazenada nas condições de temperatura e processamento aplicadas no estudo. Essa persistência é relevante tanto para fins analíticos, uma vez que garante confiabilidade na detecção de resíduos, quanto para fins regulatórios, pois indica a possibilidade de permanência do antibiótico em produtos lácteos por períodos prolongados após a sua administração em animais.

Com base na confirmação da estabilidade da molécula, foi conduzida a segunda etapa do estudo, destinada à investigação da ocorrência de resíduos de tulatromicina em amostras de leite disponíveis comercialmente. Para isso, foram adquiridas, em 03 de



dezembro de 2024, dez amostras de diferentes marcas, sendo cinco de leite UHT e cinco de leite pasteurizado, em supermercados da cidade de Maringá-PR.

Todas as amostras foram processadas no mesmo dia da coleta, seguindo rigorosamente o protocolo de extração e análise previamente validado na etapa de estabilidade. A quantificação foi realizada por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (LC-MS/MS), utilizando curva de calibração com padrão externo de tulatromicina, na faixa de 0 a 10 ng/mL e os resultados apresentados na Tabela 2.

Tabela 2: Resultado da análise de Tulatromicina em amostras de leite UHT (longa vida) e leite pasteurizado (embalado em saco plástico flexível).

Amostra	Tipo de Leite	Tulatromicina (ng mL ⁻¹)
1	UHT	n.d.
2	UHT	14,66 ± 1,13
3	UHT	n.d.
4	UHT	n.d.
5	UHT	0,35 ± 0,09
6	Pasteurizado	2,88 ± 0,97
7	Pasteurizado	n.d.
8	Pasteurizado	0,73 ± 0,12
9	Pasteurizado	0,52 ± 0,10
10	Pasteurizado	n.d.

Fonte: Autor, 2025.

Os resultados, indicaram que 50% das amostras analisadas apresentaram resíduos detectáveis de tulatromicina. As maiores concentrações foram observadas em uma amostra de leite UHT (14,66 ± 1,13 ng/mL) e em uma amostra de leite pasteurizado (2,88 ± 0,97 ng/mL). Outras três amostras, sendo duas de leite pasteurizado e uma de leite UHT, apresentaram resíduos em níveis mais baixos, variando de 0,35 ± 0,09 ng/mL a 0,73 ± 0,12 ng/mL.

A detecção de resíduos em produtos prontos para o consumo pode estar associada a diferentes fatores, como uso não autorizado do antibiótico em vacas lactantes, falhas no cumprimento do período de carência após tratamento, ou ainda contaminação cruzada durante as etapas de ordenha, transporte ou processamento industrial. Esses achados reforçam a necessidade de um monitoramento sistemático e de protocolos analíticos de alta sensibilidade, visando garantir a conformidade com padrões de segurança alimentar e minimizar riscos à saúde pública.

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados obtidos evidenciam que a tulatromicina apresenta elevada estabilidade em leite bovino, mantendo-se quimicamente íntegra por, pelo menos, 58 dias sob as condições de armazenamento e análise aplicadas, indicando que resíduos do fármaco podem persistir no produto por períodos prolongados, o que amplia a importância do seu monitoramento. A presença de resíduos detectáveis de tulatromicina em 50% das amostras comerciais avaliadas, incluindo concentrações expressivas em produtos UHT (14,66 ± 1,13 ng/mL) e pasteurizados (2,88 ± 0,97 ng/mL). Esses resultados sugerem possíveis falhas no cumprimento do período de carência após tratamento, uso indevido do antibiótico em vacas lactantes ou contaminação cruzada durante o processamento industrial. Assim, programas de vigilância contínua e do uso de metodologias analíticas



sensíveis, no controle de resíduos na cadeia produtiva do leite, são essenciais para reduzir o risco de exposição da população, a proteção da saúde pública e a segurança alimentar.

REFERÊNCIAS

ANUÁRIO LEITE. **Leite baixo carbono**. 118 p. 2023. Disponível em:

<https://www.embrapa.br/busca-de-publicacoes/-/publicacao/1154264/anuario-leite-2023-leite-baixo-carbono>, acessado em 07 de ago 2024.

BARTOLOMEU, L.C.R; CAVALIERI, F.L.B.; GONÇALVES, J.E.; ANDREAZZI, M.A.; DINIZ, A.; LIPPA, V.N.M.; SILVA, J.K.F.; FREIRE, S.A.; SANTOS, E.P. **Identificação de eliminação de droga veterinária macrolídia em vacas de leite**. Caderno Pedagógico, v. 5, p.e3614, 2024. DOI: 10.54033/cadpedv21n5-104.

BEHURA, S.K.; TIZIOTO, P.C.; KIM, J.W.; GRUPIONI, N.V.; SEABURY, C.M.; SCHNABEL, R.D.; GERSHWIN, L.J.; VAN EENENNAAM, A.L.; TOAF-ROSENSTEIN, R.; NEIBERGS H.L.; REGITANO, L.C. A.; TAYLOR, J.F. **Tissue tropism in host transcriptional response to members of the bovine respiratory disease complex**. Scientific Reports, v.7, n.17938, 2017.

CARVALHO, G.R.; ROCHA, D.T.; GOMES, I.R. **O Mercado de Leite em 2017**. Circular técnica 118, EMBRAPA, p.28, 2018.

CARVALHO, L. A.; NOVAES, L. P.; MARTINS, C. E. **Sistema de Produção de Leite: Embrapa**. 2002. Disponível em:

<http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Leite/LeiteCerrado/introducai.html>>

LEKAGUL, A.; TANGCHAROENSATHIEN, V.; MILLS, A.; RUSHTON, J.; YEUNG, S. **How antibiotics are used in pig farming: a mixed-methods study of pig farmers, feed mills and veterinarians in Thailand**. BMJ Global Health. v. 5, e001918, 2020.

OURO FINO –SAÚDE ANIMAL. **Tulaxx**. Disponível em <

<http://www.ourofinosaudeanimal.com/produtos/bovinos/terapeuticos/tulaxx/> > Acesso em: 16 ago. 2024.

REGITANO, J. B.; LEAL, R. M. P. **Comportamento e impacto ambiental de antibióticos usados na produção animal brasileira**. Revista Brasileira de Ciência do Solo, v.34, n.3, p.601-616, 2010.

SLIZOVSKIY, I. B; MUKHERJEE, K; DEAN, C. J; BOUCHER, C; NOYES, N. R. **mobilization of antibiotic resistance: are current approaches for colocalizing resistomes and mobilomes useful? Frontiers in microbiology**. v.11, n.1376, 2020.

ZOETIS. Draxxin. **Pneumonia em Bovinos e Outras doenças**. Disponível em <
<https://www2.zoetis.com.br/especies/bovinos/draxxin/> > Acesso em 16 ago. 2024.