

Cristiana Gomes dos Santos

**Resíduos de antibióticos em produtos lácteos - análise e segurança alimentar**

Faculdade Ciências da Saúde

Universidade Fernando Pessoa

Porto, 2023



Cristiana Gomes dos Santos

**Resíduos de antibióticos em produtos lácteos - análise e segurança alimentar**

Faculdade Ciências da Saúde

Universidade Fernando Pessoa

Porto, 2023

Cristiana Gomes dos Santos

**Resíduos de antibióticos em produtos lácteos - análise e segurança alimentar**

Atesto a originalidade do trabalho,

Cristiana Gomes dos Santos

(Cristiana Gomes dos Santos)

Trabalho apresentado à Universidade Fernando Pessoa como parte dos requisitos para obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Professora Doutora Renata Souto

Coorientador: Professora Doutora Adriana Pimenta.

Porto, 2023

## **Resumo**

Os produtos lácteos desempenham um papel importante no fornecimento de nutrientes (proteínas, lípidos, hidratos de carbono, vitaminas e micronutrientes), prebióticos e probióticos, especialmente entre crianças e idosos, sendo o seu consumo generalizado. Têm um impacto positivo na massa óssea, saúde cardiovascular e na microbiota intestinal das populações, mas, em alguns casos, a presença de contaminantes, designadamente resíduos de antibióticos, pode representar sérios riscos para a saúde. Os antibióticos são amplamente utilizados na medicina veterinária na terapia, na profilaxia e metafilaxia e o seu inadequado uso pode levar à presença de resíduos antimicrobianos no leite.

Os resíduos de antibióticos no leite podem afetar seriamente a saúde dos consumidores causando reações alérgicas e o desenvolvimento de estirpes resistentes. Além disso, a contaminação antibiótica do leite causa perdas económicas significativas para os produtores e fabricantes de leite e derivados. O uso prudente de antibióticos na indústria leiteira é, pois, o método apropriado para minimizar a seleção de organismos resistentes mantendo, ao mesmo tempo, a saúde e o bem-estar animal e prevenindo a entrada de organismos patogénicos e de resíduos de antibióticos na cadeia alimentar.

Portanto, a adoção de uma política de controlo e prevenção de resíduos de antibióticos no leite, para a obtenção de uma matéria-prima de qualidade, implica o desenvolvimento de adequadas ferramentas de deteção, evitando resultados negativos falsos, e métodos de confirmação apropriados para comprovar e quantificar os resíduos de antibióticos.

Cientes da importância e globalidade do problema, com repercussões para a saúde humana, a saúde e o bem-estar animal e o ambiente, várias organizações internacionais estabeleceram sistemas de monitorização e limites máximos de resíduos no leite para garantir a segurança e a qualidade dos produtos lácteos. Esta política de controlo exige uma abordagem adequada de deteção e quantificação dos resíduos no leite.

Com este trabalho de revisão bibliográfica pretende-se fornecer uma visão geral e atualizada do uso de antibióticos pelos produtores de laticínios e resumir os mais importantes métodos atualmente disponíveis para identificar e quantificar resíduos de antibióticos no leite de acordo com a recente legislação europeia.

**Palavras-chave:** resíduos de antibióticos, leite, segurança alimentar, limite máximo de resíduos, análise, LC-MS/MS.

## **Abstract**

Dairy products play an important role in providing nutrients (proteins, lipids, carbohydrates, vitamins and micronutrients), prebiotics and probiotics, especially among children and the elderly, and their consumption is widespread. They have a positive impact on bone mass, cardiovascular health and the gut microbiota of populations, but in some cases, the presence of contaminants, namely antibiotic residues, can pose serious health risks. Antibiotics are widely used in veterinary medicine in therapy, prophylaxis and metaphylaxis and their inappropriate use can lead to the presence of antimicrobial residues in milk.

Antibiotic residues in milk can seriously affect the health of consumers by causing allergic reactions and the development of resistant strains. Furthermore, antibiotic contamination of milk causes significant economic losses for producers and manufacturers of milk and dairy products. The prudent use of antibiotics in the dairy industry is therefore the appropriate method to minimize the selection of resistant organisms while maintaining animal health and welfare and preventing the entry of pathogenic organisms and antibiotic residues into the food chain.

Therefore, the adoption of a control and prevention policy for antibiotic residues in milk, in order to obtain a quality raw material, implies the development of adequate detection tools, avoiding false negative results, and appropriate confirmation methods to prove and quantify antibiotic residues.

Aware of the importance and global nature of the problem, with repercussions for human health, animal health and welfare and the environment, several international organizations have established monitoring systems and maximum residue limits in milk to guarantee the safety and quality of dairy products. This control policy requires an appropriate approach to the detection and quantification of residues in milk.

With this work of bibliographic review, it is intended to provide an updated overview of the use of antibiotics by dairy producers and to summarize the most important methods currently available to identify and quantify antibiotic residues in milk according to the recent European legislation.

**Keywords:** milk; antibiotic residues; maximum waste limit; food safety; analysis; LC-MS/MS

## **Agradecimentos**

Esta dissertação não era possível sem o apoio da minha família que me acompanhou nesta minha jornada. Um especial obrigado à minha mãe e à minha irmã que estiveram sempre do meu lado.

Ao meu namorado que esteve sempre presente em tudo, mesmo nos momentos mais difíceis, foi sem dúvida um dos meus maiores apoios nestes longos anos. Obrigada por me ouvires e me aconselhares em muitas situações.

Agradeço o apoio da minha orientadora, Professora Doutora Renata Souto que desde o início me ajudou e direcionou-me nesta etapa. A sua disponibilidade desde o início e todo o trabalho que teve comigo, um grande obrigada. Agradeço também à minha coorientadora Professora Doutora Adriana Pimenta.

Por fim agradeço à instituição Fernando Pessoa, por me ter acolhido nestes 5 anos consecutivos.

## Índice Geral

Resumo .....	v
Abstract.....	vii
Agradecimentos .....	ix
Índice Geral .....	x
Índice de Figuras .....	xi
Índice de Tabelas.....	xi
Lista de Abreviatura .....	xii
I. Introdução.....	1
1.1.Motivação .....	4
1.2. Objetivos.....	4
1.3. Metodologia.....	4
II. Desenvolvimento .....	6
2.1. Principais classes de antibióticos usados no gado bovino .....	9
2.2. Resíduos de antibióticos nos produtos lácteos .....	18
2.2.1. Causas mais relevantes para a presença de resíduos de antibióticos no leite ...	20
2.2.2 Potenciais riscos para a saúde pública .....	23
2.2.3 Impactos para a indústria de laticínios .....	25
2.3. Metodologias para a análise de antibióticos no leite .....	26
2.3.1. Métodos de triagem.....	27
2.3.2. Análise quantitativa .....	34
2.3.3. Outros métodos .....	44
2.4. Uso de alternativas aos antibióticos.....	45
III. Conclusão .....	47
IV. Referências Bibliográficas .....	49

## Índice de Figuras

<b>Figura 1.</b> Potenciais fatores associados à resistência aos antibióticos (adaptado de Aslam <i>et al.</i> , 2021). .....	8
<b>Figura 2.</b> Tendências de vendas por classe de antibióticos (mg/PCU) em Portugal de 2010 a 2021 (adaptado de DGAV, 2022b) .....	17
<b>Figura 3.</b> Análise cronológica da variação do número de publicações sobre a detecção de resíduos de antibióticos no leite (adaptado de Sachi <i>et al.</i> , 2019).....	19
<b>Figura 4.</b> Procedimento do teste Twinsensor BT (adaptado de Alves <i>et al.</i> , 2016).....	33
<b>Figura 5.</b> Frequência com que são usadas as diversas técnicas de detecção de resíduos de antibióticos no leite (adaptado de Sachi <i>et al.</i> , 2019).....	35
<b>Figura 6.</b> Representação esquemática do equipamento envolvido na técnica de cromatografia líquida (adaptado de Parmar <i>et al.</i> , 2021). .....	36

## Índice de Tabelas

<b>Tabela 1.</b> Principais antibióticos utilizados no tratamento de mastite (adaptado de Pereira <i>et al.</i> , 2017).....	11
<b>Tabela 2.</b> Classificação atualizada dos antibióticos na medicina veterinária (adaptado de EMA, 2020).....	14
<b>Tabela 3.</b> Categorização das classes de antibióticos para uso veterinário (adaptado de EMA, 2020).....	15
<b>Tabela 4.</b> Tempo mínimo necessário para a eliminação de antimicrobianos administrados por via intramuscular do leite (MedVet, 2017c; MedVet, 2017b; MedVet, 2017a; MedVet, 2018).....	21
<b>Tabela 5.</b> Limites máximos de resíduos para antibióticos no leite de vaca estabelecidos por diferentes agências reguladoras em vários países (adaptado de Faria <i>et al.</i> , 2021; Lu <i>et al.</i> , 2021).....	23
<b>Tabela 6.</b> Exemplos de testes de triagem para pesquisa de resíduos de antibióticos (adaptado de Pereira <i>et al.</i> , 2017).....	28
<b>Tabela 7.</b> Sensibilidade do teste Eclipse50 relativamente aos antibióticos e os seus LMR (adaptado de Alves <i>et al.</i> , 2016). ....	30
<b>Tabela 8.</b> Capacidade de detecção dos testes Betastar Combo, SNAP e Twinsensor BT para antibióticos $\beta$ -lactâmicos e tetraciclina no leite (adaptado de Beltrán <i>et al.</i> , 2014). ....	34
<b>Tabela 9.</b> Exemplos de técnicas de cromatografia líquida para pesquisa de resíduos de ABs no leite (adaptado de Pereira <i>et al.</i> , 2017).....	37
<b>Tabela 10.</b> Vantagens e desvantagens gerais dos métodos para a detecção de antibióticos no leite (adaptado de Vercelli <i>et al.</i> , 2023).....	39
<b>Tabela 11.</b> Alguns dos microrganismos probióticos usados no gado (Popova, 2017; Suryadi <i>et al.</i> , 2019). ....	47

## **Lista de Abreviatura**

ABs – antibióticos

DGAV – Direção Geral de Alimentação e Veterinária

EFSA - Autoridade Europeia para a Segurança dos Alimentos, do inglês *European Food Safety Authority*

EMA – Agência Europeia de Medicamentos, do inglês *European Medicines Agency*

FAO - Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura, do inglês *Food and Agriculture Organization of the United Nations*

FDA - Administração Federal de Alimentos e Medicamentos, do inglês *Food and Drug Administration*

HPLC- cromatografia líquida de alta eficiência, do inglês, *High Performance Liquid Chromatography*

LC - cromatografia líquida, do inglês *Liquid Chromatography*

LC-MS/MS – cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massa sequencial, do inglês, *Liquid Chromatography tandem mass spectrometry*

LMR – limite máximo de resíduos

OECD - Organização para Cooperação e Desenvolvimento Económico, do inglês *Organisation for Economic Cooperation and Development*

OMS - Organização Mundial de Saúde

PCU - Substância ativa vendida por unidade corrigida de população, do inglês *Population Correction Unit*

MS – espectrometria de massa, do inglês *Mass Spectrometry*

UE – União Europeia

UPLC - cromatografia líquida de ultra eficiência, do inglês *ultra-performance liquid chromatography*

RAAs - Resíduos de Antibióticos

## I. Introdução

De acordo com a Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura (FAO) mais de 6 mil milhões de pessoas em todo o mundo consomem leite e os seus derivados (FAO, 2019).

O leite de vaca (que representa globalmente 81% da quantidade total de leite) é um dos alimentos mais consumidos no mundo e é importante pelo seu elevado valor nutricional e pelo papel fundamental que tem na economia mundial. A sua composição inclui proteínas (3,0-3,9%), lactose (4,4-5,6%), gordura (3,3-5,4%) e minerais (0,7-0,8%). É uma fonte alimentar bastante importante visto que possui uma variedade de micronutrientes, incluindo cálcio, fósforo, magnésio, zinco, iodo, potássio, vitamina A, vitamina D, vitamina B<sub>12</sub> e vitamina B<sub>2</sub>. Esta variedade de componentes é responsável pelas suas características bioquímicas e nutricionais, que podem contribuir de forma muito positiva para a saúde (Garcia *et al.*, 2019; Vercelli *et al.*, 2023). De facto, a diversidade de macro e micronutrientes é notável, destacando-se a vitamina A e minerais como o cálcio, potássio e fósforo. Adicionalmente o perfil de ácidos gordos e de compostos bioativos presentes no leite tem sido foco de particular interesse, não só devido a aspetos nutricionais, mas também no fortalecimento do sistema imunológico e no crescimento e reparação dos tecidos (Garcia *et al.*, 2019).

No caso dos bebés e crianças, a ingestão de leite é especialmente importante, dado que esta faixa etária necessita de alimentos ricos em nutrientes e energia para o crescimento e desenvolvimento cognitivo (Chen *et al.*, 2019; de Faria *et al.*, 2021). O consumo destes alimentos tem ainda demonstrado benefícios na massa óssea, na saúde cardiovascular e na microbiota gastrointestinal em populações de todas as idades (Garcia *et al.*, 2019; Kurjogi *et al.*, 2019).

Em Portugal, dados do Instituto Nacional de Estatística (INE) indicam que em 2021 o consumo de leite e produtos lácteos per capita foi de 112,9 kg/ hab (66,1 kg/ hab dos quais relativos a leite), confirmando uma ligeira tendência decrescente que se verifica desde 2017 (ano em que o consumo per capita foi 117,7 kg/ hab, dos quais 72,2 kg/ hab eram de leite) (INE, 2021). No entanto, a nível mundial, a Organização para Cooperação e Desenvolvimento Económico (OECD) e a FAO, prevêm um aumento no consumo de produtos lácteos de cerca de 7% nos países desenvolvidos e 18% nos países em

desenvolvimento de 2018-20 para 2030 e na produção mundial de leite (1,7% por ano) devido ao forte crescimento da procura na Índia, Paquistão e África, impulsionado pelo aumento do rendimento, da população, a urbanização e as mudanças nas dietas (FAO, 2019).

A produção de leite de vaca é um mercado bilionário, de extrema importância na economia mundial. Atualmente, a União Europeia (UE) é o maior produtor mundial com 155,7 milhões de toneladas métricas (cerca de  $1,6 \times 10^{11}$  litros) de leite produzidas em 2021, seguida dos EUA ( $1,0 \times 10^{11}$  litros), Índia ( $9,3 \times 10^{10}$  litros) e China ( $3,4 \times 10^9$  litros) (Ribeiro *et al.*, 2022). Esta produção em massa só é possível devido ao uso de várias classes terapêuticas no gado para controlar doenças e melhorar a saúde e bem-estar animal. Neste enquadramento os antibióticos (ABs) assumem um papel de destaque. A maioria dos animais envolvidos na produção de leite é ou, em alguma fase da sua vida produtiva, foi tratada com estes fármacos (de Faria *et al.*, 2021).

Na realidade, estima-se que o seu uso global em animais ultrapassa em muito o humano e que haverá um aumento global correspondente a 52% quando se comparam os valores de 2013 com os previstos para 2030 (mais de 131000 toneladas para superior a 200000 toneladas, respetivamente) (Treiber e Beranek- Knauer, 2021; Ribeiro *et al.*, 2022). Ainda sobre o uso de ABs em animais, de acordo com a Administração Federal de Alimentos e Medicamentos (FDA) cerca de 80% destes compostos destinam-se a animais produtores de alimentos (Rahman *et al.*, 2021).

Assim, se por um lado é necessário garantir o bem-estar animal e um nível de produção de laticínios adequado, é também essencial certificar a sua segurança global estabelecendo uma utilização prudente de compostos farmacológicos na sua produção para que não representem um perigo para a saúde pública (Garcia *et al.*, 2019).

Aminoglicosídeos, anfencóis, beta-lactâmicos, fluoroquinolonas, sulfonamidas, e tetraciclina são as classes de ABs mais utilizadas no tratamento e profilaxia do gado leiteiro. Quando usados incorretamente, sem respeitar os registos médicos e os períodos de carência (espaço de tempo necessário para que o organismo metabolize e elimine o resíduo de preocupação toxicológica até concentrações seguras), podem deixar vestígios dessas substâncias no leite, sendo denominados de resíduos, e que constituem um

problema para a indústria e um risco para a saúde pública (Garcia *et al.*, 2019; Sachi *et al.*, 2019; de Faria *et al.*, 2021).

Os resíduos de antibióticos (RAs) nos alimentos de origem animal podem prejudicar seriamente a saúde dos consumidores aumentando o risco de reações alérgicas (por ex. à penicilina), mutações nas células, alterações intestinais (por desenvolvimento de desequilíbrios da flora microbiota normal do intestino humano) e o desenvolvimento de estirpes resistentes (a um ou mais ABs), fenómeno que se tornou numa ameaça à saúde global (de Faria *et al.*, 2021; Treiber e Beranek- Knauer, 2021). As bactérias adaptam-se a concentrações subterapêuticas de ABs, o que leva ao desenvolvimento e à propagação da resistência antimicrobiana. As consequências diretas são, pois, o insucesso dos tratamentos e/ou a possibilidade de desenvolvimento de microrganismos patogénicos resistentes nos animais e nos seres humanos (Vercelli *et al.*, 2023).

Além disso, a contaminação antibiótica do leite causa perdas económicas significativas para os produtores e fabricantes de leite. A sua repercussão estende-se ainda aos processos de fabrico de alguns produtos lácteos, tais como a manteiga, o iogurte e o queijo, dado que os RAs podem inibir a microflora normal do leite, e ter um efeito adverso nos processos fermentativos inerentes à produção (de Faria *et al.*, 2021).

O rastreio de RAs no leite é, portanto, essencial para a segurança alimentar, mas a escolha adequada do método desempenha um papel importante na eficácia e exatidão dessa deteção (Kurjogi *et al.*, 2019; Sachi *et al.*, 2019).

Estão disponíveis várias técnicas como ensaios químicos, microbiológicos e imunológicos para a deteção de ABs e classes de ABs no leite, mas a maioria destes métodos carece de especificidade e/ou fornece apenas medições qualitativas ou semiquantitativas.

Relativamente às análises quantitativas são efetuadas maioritariamente recorrendo à cromatografia líquida acoplada à espetrometria de massa (LC-MS). Estas metodologias são fiáveis e possuem elevada seletividade e sensibilidade. Contudo, requerem várias etapas, instrumentação dispendiosa, e profissionais treinados (Sachi *et al.*, 2019; de Faria *et al.*, 2021). Por outro lado, os métodos eletroanalíticos (sensores e biossensores) têm vindo a ganhar importância na monitorização de RAs em amostras de leite devido à sua simplicidade, baixo custo e elevada frequência analítica (de Faria *et al.*, 2021).

Com este trabalho de revisão bibliográfica pretende-se fornecer uma visão geral e atualizada do uso de ABs pelos produtores de laticínios e resumir os mais importantes métodos atualmente disponíveis para identificar RAs no leite de acordo com a legislação em vigor.

### **1.1. Motivação**

Os antibióticos são um dos grupos terapêuticos dispensados em farmácia comunitária, tanto para utilização no ser humano, como para utilização em animais. Em qualquer das situações, é necessário informar e consciencializar a população e os produtores para o uso responsável destes medicamentos dado que existem vários riscos associados à sua toma de forma inadequada. No caso do gado leiteiro é essencial implementar práticas responsáveis (respeitando as doses convenientes e os períodos de carência) que permitam tratar os animais, garantindo a sua saúde, mas que, em simultâneo, assegurem uma produção de leite com a adequada qualidade. Este estudo pretende avançar na compreensão deste desafio analisando perspetivas (regulamentações e políticas governamentais), metodologias e resultados atuais que possam aprofundar o conhecimento nesta área específica.

### **1.2. Objetivos**

O tema em questão foi escolhido pelo impacto que a existência de RAs nos produtos lácteos têm na saúde pública, no ambiente e na economia. Este trabalho de revisão narrativa da literatura científica tem como objetivo principal efetuar um levantamento dos principais antibióticos usados no tratamento de infeções do gado bem como os riscos mais relevantes para a saúde pública e para o setor industrial devido à sua utilização.

As novas formas de identificação destes antibióticos nos produtos lácteos foram alvo de análise para reconhecer vantagens e desvantagens que distinguem as diferentes metodologias de análise.

### **1.3. Metodologia**

Tendo por base os objetivos estabelecidos, e tratando-se esta dissertação de uma revisão narrativa, procedeu-se à recolha de artigos científicos e outras publicações relevantes num período temporal compreendido entre outubro de 2022 e julho de 2023, recorrendo à pesquisa em motores de busca como a *PubMed*, *ScienceDirect* e o Google Scholar

utilizando as palavras-chave “resíduos de antibióticos”, “leite”, “segurança alimentar”, “limite máximo de resíduos” e “análise” e recorrendo a operadores booleanos como “AND” e “OR”. Foi também utilizado o sinal “\*” para evitar o risco de perder artigos devido ao uso de palavras no plural ou múltiplas palavras.

A pesquisa foi limitada a artigos científicos publicados nos últimos 10 anos e escritos em inglês ou português, tendo-se obtido um total de 300 artigos. Efetuou-se posteriormente uma análise preliminar dos resumos/*abstracts* tendo-se excluído 232 artigos. A informação constante nos restantes 68 artigos foi considerada relevante para o trabalho pelo que foi alvo de posterior análise detalhada.

## II. Desenvolvimento

Estima-se que em 1938, 25% de todas as doenças de origem alimentar e de surtos de água contaminada tivessem origem no leite (atualmente esse valor é  $< 1\%$ ) (Garcia *et al.*, 2019).

A contaminação do leite e produtos lácteos com organismos patogênicos tem em geral origem direta nos animais, ou no ambiente agrícola, sendo os microrganismos *Salmonella*, *E. coli*, *Listeria* e *Campylobacter* os que mais contribuem para as doenças de origem alimentar. Todos estes microrganismos podem existir no leite e nos equipamentos utilizados para produção dos produtos lácteos, podendo, por isso, entrar na cadeia alimentar (Chen *et al.*, 2019; Garcia *et al.*, 2019).

Em consequência, e em paralelo com a sua ampla utilização em seres humanos, o uso de ABs tornou-se prática comum em medicina veterinária, para tratamento ou prevenção de doenças, e também como promotor de crescimento (prática, entretanto banida).

Desde a sua introdução no início do século XX, os ABs revolucionaram o tratamento das doenças e tiveram uma profunda influência na redução da morbidade e mortalidade, tanto dos seres humanos, como dos animais, sendo considerados uma das mais importantes realizações da medicina moderna (Garcia *et al.*, 2019; Treiber e Beranek-Knauer, 2021).

O tratamento dos animais é obrigatório para respeitar o seu bem-estar, mas deve ser efetuado de forma racional. No que se refere aos ABs, deve ser preferida uma terapia orientada que utilize moléculas de espectro reduzido, durante um curto período para obter um resultado terapêutico favorável.

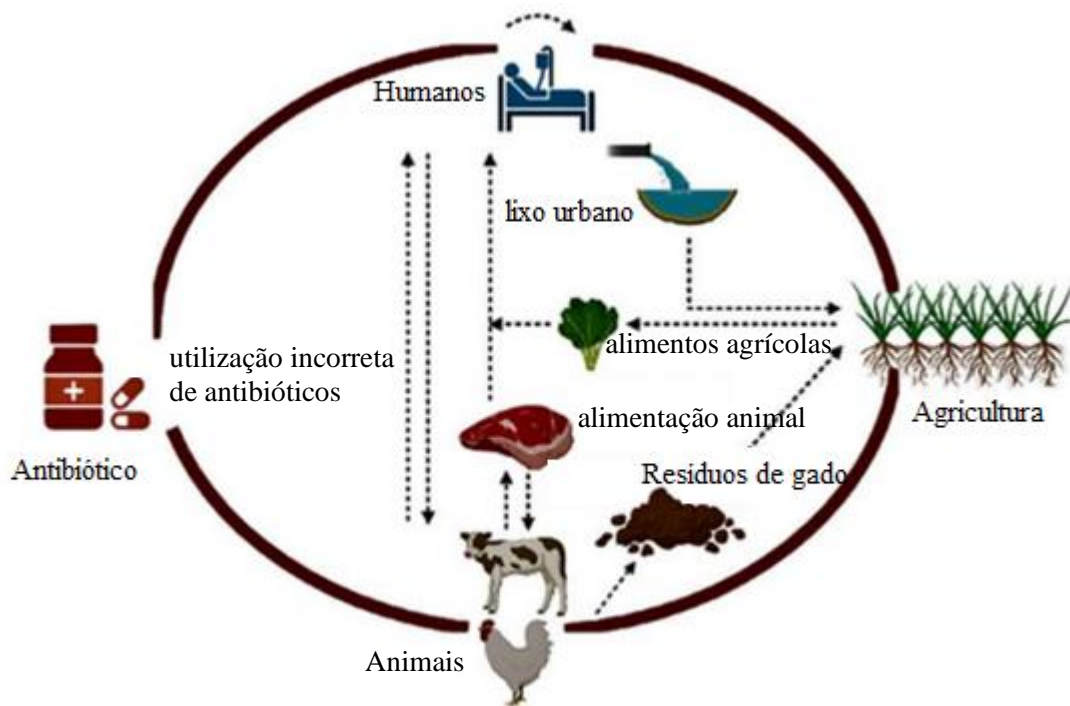
Nas vacas, a administração de ABs destina-se ao tratamento de infeções respiratórias (laringite, broncopneumonia, pneumonia e inespecíficas), infeções urogenitais (pielite, cistite e mastite puerperal) e infeções gerais e locais (septicemia, mastite, feridas e articulações). No entanto, apesar da existência de várias patologias associadas a diferentes bactérias patogênicas, a mastite é a principal doença dos bovinos que justifica a enorme utilização de ABs em todo o mundo (Ribeiro *et al.*, 2022).

A utilização excessiva ou incorreta de ABs levou a que, a nível mundial, se enfrentem agora um conjunto de problemas associados ao desenvolvimento de estirpes bacterianas

multirresistentes que circulam na população humana e animal através do contacto interindividual, dos alimentos, da água e do ambiente, sendo a sua transmissão favorecida e influenciada pelas viagens, migrações e grandes concentrações no mesmo espaço de pessoas e animais que caracterizam o estilo de vida de várias populações em diversas regiões do globo (DGAV, 2021). Tal, proporciona-lhes oportunidades de partilhar o seu material genético, criando estirpes resistentes a um ritmo sem precedentes. Nenhum país pode, portanto, enfrentar com êxito este problema agindo isoladamente. A resistência aos antibióticos tornou-se uma ameaça global à saúde humana e animal, responsável pela morte de cerca de 0,7 milhões de pessoas por ano, que reduz as opções de tratamento das doenças, levando ao aumento de mortes e de custos com cuidados de saúde. Alguns especialistas estimam que a resistência aos antimicrobianos será responsável pela morte de 10 milhões de pessoas por ano em todo o mundo em 2050 (DGAV, 2021; Rahman *et al.*, 2021).

A este problema acrescem ainda outras questões de saúde, nomeadamente reações alérgicas causadas pelos RAs, bem como a contaminação do solo e da água com RAs excretados nas fezes e urina dos animais, passando por significativas perdas económicas para os produtores e fabricantes no setor alimentar (Chen *et al.*, 2019; Sachi *et al.*, 2019; Lu *et al.*, 2021).

A utilização responsável de medicamentos antimicrobianos nos animais surge, assim, integrada no conceito de “One Health”, em português “Uma Saúde” ou “Uma só Saúde”, que consiste numa estratégia mundial de adoção de políticas públicas ligadas à saúde humana e animal e do meio ambiente que se traduzem na prevenção e controlo efetivos de perturbações que afetam a saúde humana, a saúde animal e o ambiente (Figura 1). Esta abordagem integra uma equipa multidisciplinar entre médicos, veterinários, cientistas ambientais, profissionais de saúde entre outros. Este conceito não é novo, mas tornou-se bastante importante desde 2006 tendo por base as doenças emergentes e reemergentes, em que se reconhece que a saúde dos seres humanos, dos animais domésticos e selvagens, das plantas e do meio ambiente em geral estão ligados intimamente e interdependentes (Garcia *et al.*, 2019; Overgaauw *et al.*, 2020).



**Figura 1.** Potenciais fatores associados à resistência aos antibióticos (adaptado de Aslam *et al.*, 2021).

Na Figura 1 são salientados vários fatores que potenciam o desenvolvimento de resistência a antibióticos. A inadequada administração de ABs ao gado bovino (bem como a outros animais), sem respeitar as doses recomendadas e o tempo mínimo necessário para a eliminação de antimicrobianos, pode levar a que os produtos alimentares contenham resíduos de antibióticos, que são transmitidos a quem os consome e também podem contaminar vários reservatórios ambientais, tais como a água e os solos, afetando assim a indústria agrícola. O mesmo acontece com a incorreta eliminação de ABs e outros medicamentos no lixo indiferenciado, já que posteriormente podem contaminar a água e os solos, prejudicando assim a saúde de todas as espécies que consomem estes produtos contaminados. Este processo conduz a um ciclo contínuo que potencia e aumenta as resistências aos antibióticos.

Em 2014 foi reconhecido pela Organização Mundial de Saúde (OMS) em colaboração com a FAO e a Organização Mundial de Saúde Animal (WOAH) que a adoção do conceito “One Health” era efetivamente importante para encarar a resistência aos antibióticos. Tornou-se claro que esta problemática deveria ser resolvida através desta abordagem global como forma de resolução do uso impróprio de antibióticos a nível da

saúde humana, da saúde animal, agricultura e pecuária, alimentação e aquicultura (O'Neill, 2016; Aslam *et al.*, 2021).

O interesse da comunidade científica por estas questões levou vários países a alterarem a legislação para restringir a utilização de ABs e preservar a saúde dos consumidores. A legislação europeia (UE, 2019a) confirmou a proibição destas substâncias como agentes promotores de crescimento (restrição imposta pela UE em 2006, antecipando-se aos EUA e à China que proibiram a utilização como agentes promotores de crescimento apenas em 2017 e 2020, respetivamente) e restringiu severamente as utilizações profiláticas (a administração para prevenir a ocorrência de possíveis doenças ou infeções, antes do aparecimento de sinais clínicos de uma doença, como por exemplo em cirurgias ou ainda em vacas no período de secagem do leite) e metafiláticas (no tratamento de um grupo animais, ou seja, quando há alguns animais doentes, utiliza-se a antibioterapia na totalidade do grupo para controlar a propagação da doença) (UE, 2019a; Vercelli *et al.*, 2023).

## **2.1. Principais classes de antibióticos usados no gado bovino**

Como referido anteriormente, a descoberta dos ABs e a sua utilização em seres humanos e animais foi indiscutivelmente uma das maiores realizações do século XX, mas, como supramencionado, o seu uso inadequado tornou-se um problema global de saúde pública.

Sendo claro que o uso de ABs em animais foi um dos principais fatores subjacente ao aumento da incidência e da propagação da resistência aos antibióticos, há claramente circunstâncias em que a sua utilização é necessária para manter o bem-estar dos animais e a segurança alimentar (Aslam *et al.*, 2021; Treiber e Beranek- Knauer, 2021).

De acordo com Jindal e colaboradores (2021), cerca de 70% do aumento global da utilização de ABs deve-se ao número crescente de animais criados para satisfazer as necessidades nutricionais humanas (Jindal *et al.*, 2021).

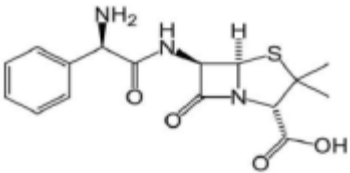
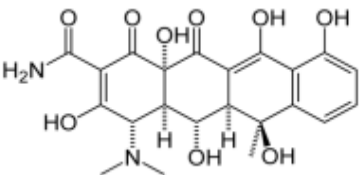
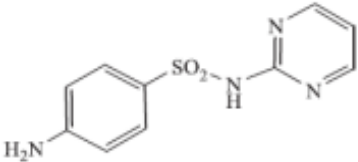
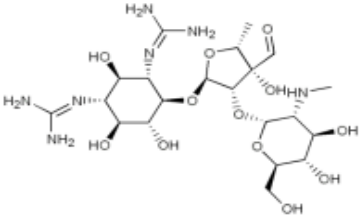
A existência de RAs no leite é, de facto, um motivo de preocupação e a sua presença nesta matriz tem como principal causa o uso de ABs para o tratamento e prevenção de mastites no gado leiteiro (Garcia *et al.*, 2019). A mastite (uma infeção da glândula mamária que ocorre devido a traumatismos, ação química, agentes patogénicos, ambiente e fatores imunológicos e metabólicos) é uma fonte de agentes patogénicos de origem alimentar e

é atualmente uma das doenças mais disseminadas no gado bovino e a principal causa de perda económica dos produtores de leite (Jamali *et al.*, 2018). De acordo com Mushtaq e colaboradores (2018), os microrganismos patogénicos que estão na sua origem, invadem as glândulas mamárias, multiplicam-se nos tecidos produtores do leite e podem entrar na cadeia alimentar diretamente ou através da contaminação do equipamento, sabendo-se que cerca de 62% destas bactérias são resistentes a pelo menos um antimicrobiano (Mushtaq *et al.*, 2018; Holko *et al.*, 2019). O elevado teor nutricional do leite faz com que seja fácil a proliferação de bactérias o que afeta não só o animal como o produto e os equipamentos nas instalações, passando a ser uma fonte significativa de doença de origem alimentar, designadamente de organismos como a *Listeria*, bacilos Gram-positivos, que têm a capacidade de proliferar mesmo a baixas temperaturas (Garcia *et al.*, 2019).

O tratamento mais usado neste caso é feito pela aplicação local de ABs pela via intramamária (Mushtaq *et al.*, 2018). Mesmo que a aplicação seja realizada apenas num dos quartos do úbere, todos apresentarão resíduos, pois há passagem para a corrente sanguínea, contaminando todo o leite. A utilização sistémica também é possível e pode, igualmente, levar à contaminação do leite com RAs, pois a região da glândula é extremamente vascularizada. Como mencionado, além do uso para o tratamento da mastite, os ABs são também empregues na profilaxia e existe ainda o uso metafilático (Pereira *et al.*, 2017). De notar que nestes casos o uso de ABs se restringe a circunstâncias excecionais (quando o risco de infeção, ou de disseminação de uma infeção, é elevado, as consequências são provavelmente graves e não existem alternativas disponíveis adequadas) e só podem ser prescritos por um período limitado, para abranger o período de risco (artigos 105º a 107º do Regulamento EU 2019/6) (UE, 2019a).

As classes de ABs mais utilizadas para combater estas questões são: os aminoglicosídeos,  $\beta$ -lactâmicos, sulfonamidas e tetraciclina (Tabela 1) (Guedes *et al.*, 2022). Se usados de modo incorreto, ou seja, sem respeitar as doses, os períodos de carência (tempo necessário em que o organismo do animal elimine totalmente os resíduos químicos provenientes do tratamento) e os limites de segurança, estes fármacos podem, de facto, deixar RAs no leite (Lobato *et al.*, 2019; Madougou *et al.*, 2019; de Faria *et al.*, 2021).

**Tabela 1.** Principais antibióticos utilizados no tratamento de mastite (adaptado de Pereira *et al.*, 2017).

Grupo Antimicrobiano	Estrutura química	Espetro antibacteriano	Mecanismo de ação
β-lactâmicos: Ampicilina		Gram positivo e Gram negativo significativamente	Bactericidas que inibem a síntese da parede celular das bactérias
Tetraciclinas: Oxitretaciclina		Gram positivo e Gram negativo	Inibem a síntese proteica na subunidade 30s dos ribossomas, mais propriamente, bloqueando a ligação do aminoacil-tRNA ao recetor no complexo mRNA
Sulfonamidas: Sulfadiazina		Gram positivo e Gram negativo	Inibem a ação do ácido para-aminobenzoico na síntese do ácido fólico utilizado pelas bactérias
Aminoglicosídeos: Estreptomicina		Gram negativo	Bactericidas com vasto espectro antibacteriano, que vão inibir a síntese proteica

Os β-lactâmicos são ABs bactericidas que impedem a síntese da parede celular das bactérias, através da inibição da enzima transpeptidase, impossibilitando a ligação cruzada dos peptidoglicanos, substâncias que conferem proteção ao microrganismo. Pertencem a este grupo as penicilinas e as cefalosporinas de uso comum na medicina

veterinária (Lobato *et al.*, 2019). A classificação destes ABs depende das substituições químicas ligadas ao anel beta-lactâmico, que determinam as propriedades farmacológicas, o espectro antibacteriano e a atividade. Possuem um largo espectro e baixa toxicidade, sendo, portanto, considerados importantes para o tratamento de mastites e de outras doenças (Reis *et al.*, 2020). Neste grupo, destaca-se a amoxicilina, utilizada em medicina humana e veterinária, com uma vasta gama de indicações contra as infecções do ouvido, do nariz, da garganta, da pele e do trato respiratório. Pode ser administrada por injeção, por via oral, por via tópica e por infusões intramamárias ou intrauterinas (de Faria *et al.*, 2021).

Os aminoglicosídeos são também ABs bactericidas com vasto espectro antibacteriano, que vão inibir a síntese proteica, sendo usados sobretudo no tratamento de infecções por bacilos Gram negativos (Fu *et al.*, 2021). Podem ser classificados em antibióticos naturais (neomicina, gentamicina, canamicina, estreptomicina, entre outros) e antibióticos semissintéticos (netilmicina, arbecacina, amicacina). São utilizados na terapia humana e no tratamento veterinário e o espectro de tratamentos inclui infecções do sistema urinário, do trato respiratório, dos ossos, das articulações e da pele (de Faria *et al.*, 2021). A canamicina e a estreptomicina são os ABs naturais mais utilizados, uma vez que apresentam uma boa atividade biológica associada a um baixo custo. A absorção e a difusão destas substâncias nos órgãos e tecidos são limitadas devido à sua polaridade e grupos funcionais (principalmente amino e hidroxilo). Além disso, têm uma elevada afinidade para a ligação a proteínas e interagem com os íons metálicos complexos presentes nas matrizes biológicas (Vercelli *et al.*, 2023). Esta circunstância implica que seja necessário utilizar um solvente para induzir a desproteínização da matriz e extrair os ABs aminoglicosídeos antes de efetuar a sua análise por métodos analíticos (Kojok *et al.*, 2022; Vercelli *et al.*, 2023).

As tetraciclina são ABs bacteriostáticos com atividade contra uma ampla variedade de bactérias aeróbicas e anaeróbicas Gram-positivas e Gram-negativas. Inibem a síntese proteica na subunidade 30s dos ribossomas, mais propriamente, bloqueando a ligação do aminoacil-tRNA ao recetor no complexo mRNA (Yaghoubi *et al.*, 2022). Esta classe engloba vários compostos de acordo com a sua derivação natural (ou seja, clortetraciclina, oxitetraciclina e desmetiltetraciclina) ou semi-sintética (ou seja, minociclina e doxiciclina) (Vercelli *et al.*, 2023). A oxitetraciclina é recomendada na terapia da mastite aguda em bovinos sendo as doses recomendadas entre 20 e 25 mg por kg de peso para

administração parenteral. Além do tratamento de doenças infecciosas, as tetraciclina foram durante vários anos usadas como aditivos na alimentação do gado para promoção de crescimento (atividade banida em 2006 com a entrada em vigor do Regulamento 1831/2003/EC) o que levou a um aumento da resistência bacteriana limitando agora a sua utilização (UE, 2003; Araújo *et al.*, 2017).

Por fim, as sulfonamidas, são bacteriostáticos derivadas da sulfanilamina, que inibem a ação do ácido para- aminobenzóico, ou, também conhecido por 4-aminobenzóico, na síntese do ácido fólico utilizado pelas bactérias (Pereira *et al.*, 2017). Esta classe de ABs representa uma variedade de fármacos e compostos bioativos dotados de atividades antimicrobianas, antitumorais, anti-inflamatórias, hipoglicémicas, antipsicóticas, anticancerígenas, entre outras. Este grupo é bastante utilizado (atualmente, são utilizados cerca de 40 derivados de sulfonamidas em aplicações antibacterianas) tanto a nível veterinário, como a nível humano para fins terapêuticos e profiláticos pelo que a possível presença de resíduos em produtos de origem animal é considerada uma preocupação de saúde pública (de Faria *et al.*, 2021). As associações frequentemente disponíveis em medicina veterinária são o trimetoprim/sulfametoxazol (também definido como cotrimoxazol), o trimetoprim/sulfadiazina (também definido como cotrimazina), o trimetoprim/sulfadoxina (também definido como cotrimoxina) e o ormetoprim/sulfadimetoxina (Vercelli *et al.*, 2023).

De acordo com Sachi e colaboradores (2019) os ABs  $\beta$ -lactâmicos (em concreto a penicilina e cefalosporinas) são os grupos mais utilizados, seguido pelas tetraciclina, sulfonamidas e por último os aminoglicosídeos (Sachi *et al.*, 2019).

Em 2019, a Agência Europeia de Medicamentos (EMA) aprovou uma nova classificação de ABs de uso veterinário que os divide consoante o risco para a saúde pública causado pelo seu uso em animais, através do possível desenvolvimento de resistência antimicrobiana, bem como a necessidade da sua utilização em medicina veterinária. Esta classificação, que promove uma colaboração estreita e integrada entre a medicina humana e veterinária, considera 4 categorias para os ABs (de A a D), cada uma com uma palavra-chave de ação atribuída (Tabelas 2 e 3) (EMA, 2020).

**Tabela 2.** Classificação atualizada dos antibióticos na medicina veterinária (adaptado de EMA, 2020).

<b>Categoria A – Evitar</b>
Inclui classes de antibióticos não autorizados atualmente em medicina veterinária na EU; Estes medicamentos são proibidos em animais destinados à produção de alimentos e só podem ser administrados a animais de companhia em circunstâncias excepcionais.
<b>Categoria B – Restringir</b>
Estes medicamentos são extremamente importantes na medicina humana e o seu uso deve ser restringido para mitigar o risco para a saúde pública, nomeadamente quinolonas, cefalosporinas de 3ª e 4ª geração e polimixinas. Só podem ser usados em situações em que não há antibióticos alternativos nas categorias C ou D;
<b>Categoria C – Precaução</b>
Abrange os antibióticos para os quais existem alternativas na medicina humana, mas para as quais em certas indicações veterinária não existem alternativas pertencentes à categoria D; Estes antibióticos só devem ser considerados quando não existem substâncias antimicrobianas eficazes na categoria D.
<b>Categoria D – Prudência</b>
Categoria de risco mais baixo; Os antibióticos desta categoria podem ser usados em animais, de uma forma prudente, como tratamento de primeira linha, porém, o seu uso desnecessário, bem como os longos períodos de tratamento devem ser evitados; O tratamento em grupo deve ser restrito a situações em que o tratamento individual não é viável.

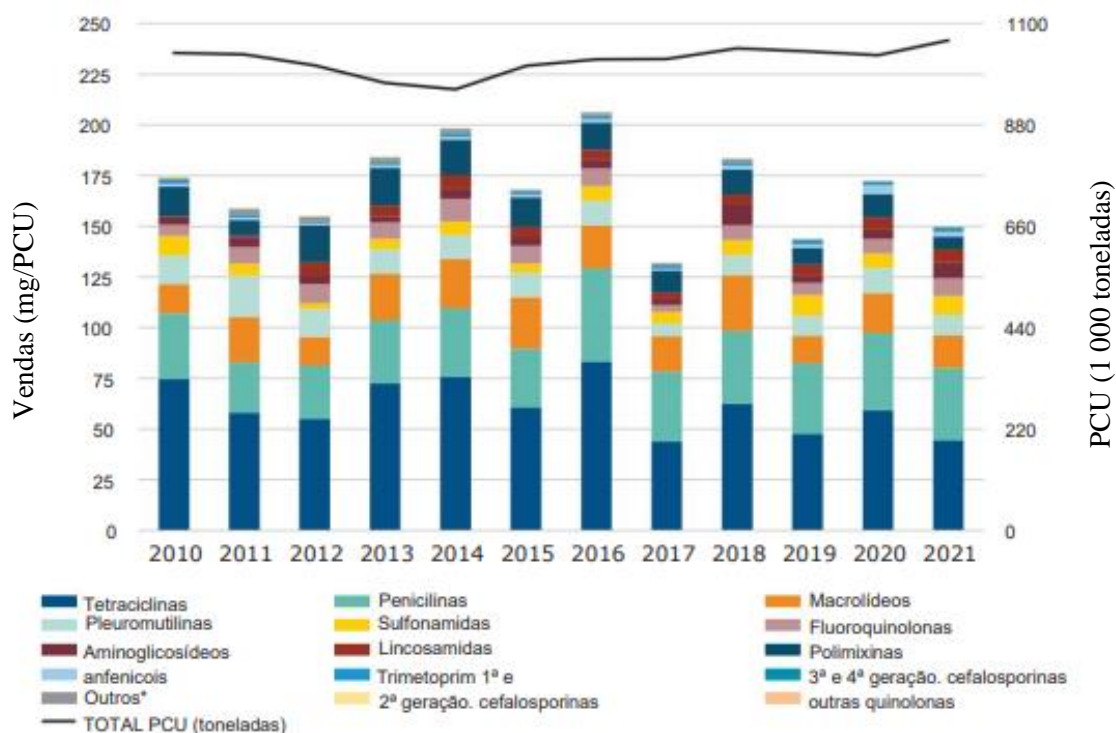
**Tabela 3.** Categorização das classes de antibióticos para uso veterinário (adaptado de EMA, 2020).

<b>A</b>	<b>Aminopenicilinas</b> mecilina pivmecilina	<b>Carbapenems</b> meropenem doripenem	<b>Medicamentos utilizados exclusivamente para o tratamento da tuberculose ou outras doenças micobacterianas</b> isoniazida etambutol pirazinamida etionamida	<b>Glicopeptídeos</b> vancomicina	<b>EVITAR</b>
	<b>Cetólidos</b> telitromicina	<b>Lipopeptídeos</b> daptomicina		<b>Glicilciclina</b> tigeciclina	
	<b>Monobactams</b> aztreonam	<b>Oxazolidinonas</b> linezolida		<b>Derivados do ácido fosfônico</b> fosfomicina	
	<b>Rifamicinas (exceto rifaximina)</b> rifampicina	<b>Riminoferazinas</b> clofazimina	<b>Outras cefalosporinas e penems (código ATC J01DI), incluindo associações de cefalosporinas de 3.ª geração com inibidores das lactamases beta</b> ceftobiprole ceftarolina ceftolozano-tazobactam faropenem	<b>Ácidos pseudomônicos</b> mupirocina	
	<b>Carboxipenicilina e ureidopenicilina, incluindo associações com inibidores das lactamases beta</b> piperacilina-tazobactam	<b>Sulfonas</b> dapsona		<b>Substâncias recentemente autorizadas na medicina humana na sequência da publicação da categorização do AMEG</b> a determinar	
<b>B</b>	<b>Cefalosporinas, 3.ª e 4.ª geração, à exceção de associações com inibidores das lactamases beta</b> cefoperazona cefovecina cefquinoma ceftiofur	<b>Polimixinas</b> colistina polimixina B	<b>Quinolonas: fluoroquinolonas e outras quinolonas</b> cinoxacina danofloxacina difloxacina enrofloxacina flumequina ibafloxacina	marbofloxacina norfloxacina orbifloxacina ácido oxolínico pradofloxacina	<b>RESTRINGIR</b>
<b>C</b>	<b>Aminoglicosídeos (exceto espectinomicina)</b> amicacina apramicina diidroestreptomicina frameticina gentamicina canamicina neomicina paromomicina estreptomicina tobramicina	<b>Aminopenicilinas, em associação com inibidores das lactamases beta</b> amoxicilina + ácido clavulânico ampicilina + sulbactam	<b>Anfenicóis</b> cloranfenicol florfenicol tianfenicol	<b>Macrólidos</b> eritromicina gamitromicina oleandomicina espiramicina tildipirosina tilmicosina tulatromicina tilosina tilvalosina	<b>PRECAUÇÃO</b>
		<b>Cefalosporinas, 1.ª e 2.ª geração, e cefamicinas</b> cefacetril cefadroxil cefalexina cefalônio cefalotina cefapirina cefazolina	<b>Lincosamidas</b> clindamicina lincomicina pirimicina	<b>Rifamicinas: apenas rifaximina</b> rifaximina	
			<b>Pleuromutilinas</b> tiamulina valnemulina		
<b>D</b>	<b>Aminopenicilinas, sem inibidores das lactamases beta</b> amoxicilina ampicilina metampicilina	<b>Aminoglicosídeos: apenas espectinomicina</b> espectinomicina	<b>Sulfonamidas, inibidores da diidrofolato redutase e associações</b> formosulfatiazol ftalilsulfatiazol sulfacetamida sulfaclopiridazina sulfaclazina sulfadiazina sulfadimetoxina sulfadimidina sulfadoxina sulfafurazol sulfaquanidina	sulfaleno sulfamerazina sulfametizol sulfametoxazol sulfametoxipiridazina sulfamonometoxina sulfanilamida sulfapiridina sulfaquinoxalina sulfatiazol trimetoprim	<b>PRUDÊNCIA</b>
	<b>Tetraciclina</b> clortetraciclina doxiciclina oxitetraciclina tetraciclina	<b>Penicilinas antiestafilocócicas (penicilinas resistentes às lactamases beta)</b> cloxacilina dicloxacilina nafcilina oxacilina			
	<b>Penicilinas naturais de espectro de ação estreito (penicilinas sensíveis às lactamases beta)</b> benzilpenicilina benzatínica fenoximetilpenicilina benzatínica benzilpenicilina hidroiodeto de penetamato	feneticilina fenoximetilpenicilina benzilpenicilina procaína	<b>Polipeptídeos cíclicos</b> bacitracina	<b>Nitroimidazóis</b> Metronidazol	
		<b>Antibacterianos esteroides</b> ácido fusídico	<b>Derivados do nitrofurano</b> furaltadona furazolidona		

Dados recentes divulgados pela Direção Geral de Alimentação e Veterinária (DGAV) apontam para uma diminuição média de cerca de 46,5% em miligramas de antibiótico por unidade corrigida de população (mg/PCU) das vendas anuais de ABs para uso veterinário,

entre os 25 países europeus que forneceram dados de vendas para todos os anos entre 2011 e 2021, sendo que em Portugal também se registou globalmente um ligeiro declínio de 5,8% (de 159,2 mg/PCU para 149,9 mg/PCU em 2021) apesar do aumento de cerca de 6% na venda de fluoroquinolonas e cefalosporinas (3<sup>a</sup> e 4<sup>a</sup> geração) (Figura 2) (DGAV, 2022b). A unidade PCU tem em conta a população total de animais criados para produção e ajusta-a para uma unidade normalizada sendo que este ajustamento é normalmente baseado no peso dos animais sendo, por isso, uma forma de quantificar e comparar a utilização de antibióticos em diferentes populações de animais, tendo em conta o seu peso ou tamanho.

Estes resultados constam do relatório anual (no caso o 12<sup>o</sup> relatório) que faz parte do projeto de Vigilância Europeia do Consumo de Antimicrobianos Veterinários (ESVAC) e confirmam a tendência de redução observada nos últimos anos, demonstrando que a orientação da UE e das campanhas nacionais que promovem o uso responsável e prudente de antibióticos nos animais para combater as resistências aos antimicrobianos estão a ter um efeito positivo (DGAV, 2022a).



\* “outros” inclui as vendas das seguintes subclasses: derivados imidazólicos (metronidazol), derivados nitrofuranos (furazolidona) e outros antibacterianos (furaltadona, bacitracina, rifaximina e espectinomicina).

**Figura 2.** Tendências de vendas por classe de antibióticos (mg/PCU) em Portugal de 2010 a 2021 (adaptado de DGAV, 2022b)

A análise da Figura 2 permite constatar que em Portugal, durante o período de participação no projeto ESVAC, as vendas globais de ABs registaram um mínimo em 2017 (132,1 mg/PCU) e um máximo em 2016 (206,4 mg/PCU). Em relação a 2019 a diminuição nas vendas é resultado de uma redução do consumo associada a uma subnotificação que justifica que o aumento relativo em 2020 na realidade não tenha sido tão significativo quanto os números indiciam (DGAV, 2022b).

As vendas de formulações farmacêuticas na forma de pós orais, soluções orais e pré-misturas representaram 93,7 % das vendas totais de ABs em 2021, sendo que a maioria (60,9%) pertencem à categoria D (Prudência). Em comparação com 2020, em 2021 houve uma diminuição global das vendas de 13,1% (de 172,5 mg/PCU para 149,9 mg/PCU) sendo as classes de ABs mais vendidas as tetraciclina, penicilinas e macrólidos que representaram 29,7%, 23,7% e 10,7% das vendas totais, respetivamente (DGAV, 2022b).

## 2.2. Resíduos de antibióticos nos produtos lácteos

A UE define resíduos de substâncias farmacologicamente ativas como “substâncias ativas, excipientes, ou produtos de degradação e os seus metabolitos, que permanecem nos alimentos” (EFSA, 2014).

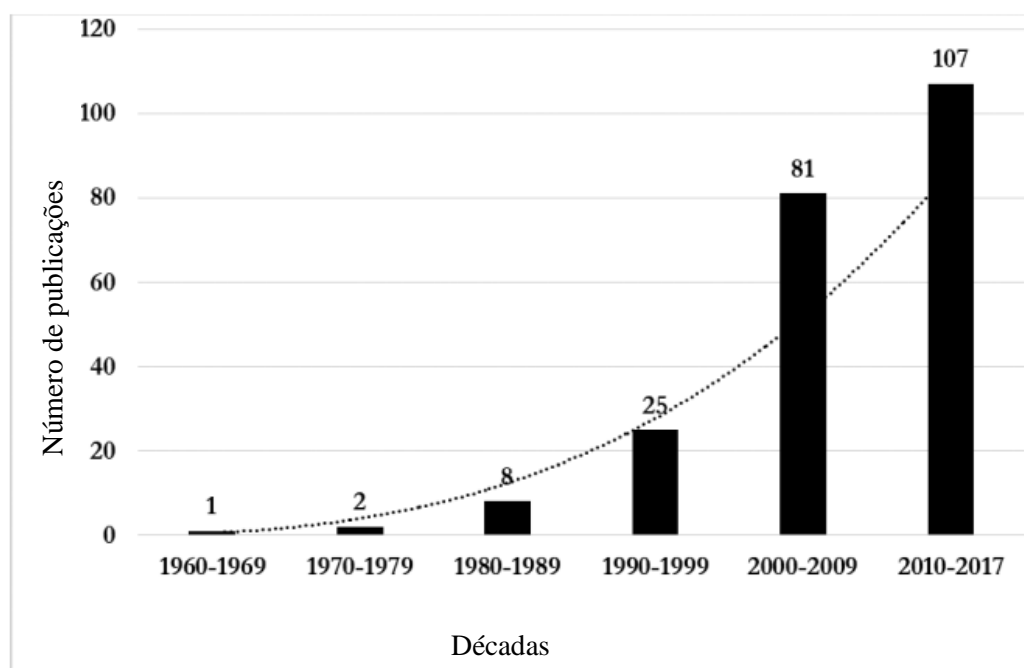
Tal como outros fármacos, após serem administrados os ABs podem ser parcialmente metabolizados. Uma parte dos ABs, ou dos seus metabolitos, acumula-se e deposita-se em várias células, tecidos e órgãos onde podem permanecer farmacologicamente ativos. Estima-se que cerca de 40-90% da dose administrada dos antibióticos é excretada na urina, ou, em menor extensão, nas fezes, na sua forma intacta ou na forma de metabolitos ativos, o que pode levar à contaminação ambiental (Jindal *et al.*, 2021; Rahman *et al.*, 2021). A este respeito, Rahman e colaboradores (2021) salientaram que alguns agentes antimicrobianos, como a eritromicina, o sulfametoxazol e as tetraciclina, podem mesmo persistir no solo e na água por um período superior a um ano (Rahman *et al.*, 2021).

Como referido, a má gestão e a utilização irracional de ABs nas explorações pecuárias, assim como as inadequadas condições de higiene e saneamento, conduzem a um aumento dos RAs. Estes resíduos podem estar presentes em diferentes produtos alimentares de origem animal como o leite, a carne, os ovos e a pele durante um período, que é específico para diferentes grupos de agentes antimicrobianos (Rahman *et al.*, 2021). Ou seja, em algumas circunstâncias, após a administração de fármacos, estes sofrem metabolização e excreção, mas uma parte do fármaco e/ou dos seus metabolitos pode persistir no leite (assim como na carne, ovos, órgãos ou outros produtos comestíveis) para além do nível de concentração permitido (Sachi *et al.*, 2019).

O uso prudente de ABs na indústria leiteira é pois o método apropriado para minimizar a seleção de organismos resistentes mantendo, ao mesmo tempo, a saúde e o bem-estar animal e prevenindo a entrada de organismos patogénicos e de RAs na cadeia alimentar (Garcia *et al.*, 2019).

Garantir que o leite não contém RAs é uma preocupação generalizada, mais evidente nos países em desenvolvimento onde a falta de regulamentação e supervisão na utilização de ABs em animais e a monitorização de RAs nos produtos alimentares são mais limitadas (Garcia *et al.*, 2019).

A detecção de RAs no leite aconteceu pela primeira vez nos anos 60 do século XX, tendo havido um elevado aumento na sua deteção após o ano 2000 (Sachi *et al.*, 2019). O aumento do número de publicações científicas dedicadas ao assunto é claramente ilustrativo da crescente preocupação sobre a sua existência no leite (Figura 3).



**Figura 3.** Análise cronológica da variação do número de publicações sobre a deteção de resíduos de antibióticos no leite (adaptado de Sachi *et al.*, 2019).

A maior parte dos estudos foram efetuados nos países desenvolvidos (maioritariamente na Europa) onde há um sistema de controlo de resíduos no leite e noutros produtos alimentares, com imposição de limites máximos como fator de salvaguarda para a saúde pública (Sachi *et al.*, 2019).

Um estudo recente, apontou o leite de vaca como uma fonte abundante de RAs quando comparado com outros produtos alimentares, nomeadamente, marisco e aves (Treiber e Beranek- Knauer, 2021). Neste trabalho procedeu-se à recolha de informação em 73 artigos científicos com o objetivo de relatar os antibióticos presentes em produtos de origem animal. De um total de 1308 amostras recolhidas entre os Estados Unidos, União Europeia e alguns países asiáticos, foram encontrados vários ABs dos quais se destacam a tetraciclina, a penicilina G, a amoxicilina, a oxitetraciclina, a gentamicina, o cloranfenicol, a ampicilina, a estreptomicina e a sulfadiazina por serem os mais prevalentes (Treiber e Beranek- Knauer, 2021).

As preocupações com os resíduos alimentares, e particularmente no leite, são económicas e de saúde pública. Por exemplo, a contaminação do leite com penicilina pode prejudicar a fermentação e os fermentos lácteos utilizados na indústria alimentar, o que pode resultar em perdas económicas. Do ponto de vista da segurança da saúde pública, é importante identificar corretamente os resíduos de medicamentos que podem ser responsáveis por efeitos secundários graves ou letais nos seres humanos. Por exemplo, o cloranfenicol, um antibiótico pertencente à classe do anfenicol, pode difundir-se no leite de animais que amamentam e mesmo uma quantidade muito pequena de resíduos em produtos de origem animal pode causar anemia aplástica no ser humano em indivíduos suscetíveis (Vercelli *et al.*, 2023).

### **2.2.1. Causas mais relevantes para a presença de resíduos de antibióticos no leite**

Como referido anteriormente, o principal uso de ABs é para o tratamento clínico da mastite sendo, por vezes, também usados na profilaxia e gestão de riscos pós-cirúrgicos.

Num estudo realizado, verificou-se que 92% dos casos de contaminação do leite por ABs deve-se a infusões intramamárias de ABs para o tratamento da mastite, 6% a injeções e 2% a outras causas (Chowdhury *et al.*, 2015).

Nestas situações, torna-se essencial ter em conta o período de carência, definido pela EMA como o tempo que deve decorrer entre a última administração de um medicamento veterinário e o abate ou a produção de alimentos a partir desse animal, para garantir que o alimento não contém níveis de RAs que excedam valores tidos como seguros (Vercelli *et al.*, 2023). A abordagem para determinar este intervalo de segurança na Europa é definida por procedimentos específicos estabelecidos conjuntamente pela Autoridade Europeia para a Segurança dos Alimentos (EFSA) e pela EMA. É estabelecida a toxicidade do composto em animais de laboratório para determinar o nível sem efeitos observáveis. É tido em conta o peso humano médio, combinado com ingestão diária aceitável para os resíduos do produto ao longo da vida humana e uma concentração segura é então calculada estabelecendo a concentração de resíduos que pode estar presente no leite (Vercelli *et al.*, 2023).

Especificamente no que respeita ao leite, o prazo para que isso aconteça pode variar muito, dependendo das propriedades químicas e físicas dos fármacos (ABs com natureza básica e/ou lipofílicos tendem a ter tempos de eliminação mais longos), da dosagem, do

estado fisiológico da glândula mamária e da via de administração (intramamária, intramuscular ou intravenosa), pode chegar até sete dias (Tabela 4). Durante este período é estritamente proibido o uso ou o consumo do leite (Madougou *et al.*, 2019). Além desta, outras causas podem levar ao aparecimento de resíduos no leite entre as quais se destacam a contaminação indireta (por exemplo, durante o processamento ou preservação do leite) e ainda o facto de o processo metabólico normal dos ABs estar alterado em animais doentes, o que pode fazer com que permaneçam armazenados durante um período mais longo e em quantidades mais elevadas nos tecidos, acabando por impor um risco mais elevado de RAs (Sachi *et al.*, 2019).

**Tabela 4.** Tempo mínimo necessário para a eliminação de antimicrobianos administrados por via intramuscular do leite (MedVet, 2017c; MedVet, 2017b; MedVet, 2017a; MedVet, 2018).

<b>Antibiótico</b>	<b>Intervalo de segurança (dias)</b>
Ampicilina	3
Oxitretaciclina	7
Sulfadiazina	2
Estreptomicina	3

O período de carência, acima mencionado, está estritamente relacionado com os limites máximos de resíduos (LMR) definidos como a concentração máxima de resíduo resultante do uso de medicamento veterinário, que é legalmente permitido, ou reconhecido, como aceitável no alimento, sendo estabelecido para cada princípio ativo aprovado para uso em animal produtor de alimento (UE, 2010; Hosain *et al.*, 2021). Os LMRs são determinados a partir de estudos toxicológicos, de curto e médio prazo, realizados em animais de laboratório, microrganismos e genomas celulares tendo em conta outras avaliações científicas, efetuadas por organizações internacionais ou por organismos científicos estabelecidos na comunidade (UE, 2010). Embora não seja tão abrangente como o regulamento da UE, surgem igualmente informações sobre os LMRs de várias substâncias no *Codex Alimentarius* que reúne um conjunto de normas, códigos e diretrizes internacionais, estabelecidas pela ação conjunta da OMS e da FAO, para promover a segurança dos alimentos e a sua qualidade, protegendo a saúde dos

consumidores e garantindo práticas justas no comércio de alimentos (CE, 2009; Halabi, 2015).

O valor de LMR tem em consideração a ingestão diária aceitável (IDA), que corresponde à quantidade ingerida durante toda a vida do indivíduo e que não apresenta riscos relativamente à sua saúde, e é obtido a partir de ensaios com animais avaliando-se a toxicidade, teratogenicidade e carcinogenicidade desses aditivos não intencionais (Pereira *et al.*, 2017). Ou seja, leite com teores de resíduos que excedam os LMRs é considerado não seguro para consumo humano e para a indústria alimentar e deve ser eliminado para preservar da maneira mais cautelosa a saúde dos consumidores (UE, 2019b). O mesmo destino tem todo o leite dentro do período de carência que deve ser retirado do consumo (UE, 2009; Sachi *et al.*, 2019).

Os LMR podem variar de acordo com o fármaco, a dose administrada aos animais, o tempo de espera após a administração do medicamento e outros fatores relevantes. Com o intuito de garantir a segurança do consumidor, várias agências reguladoras estabeleceram LMRs no leite para diferentes classes de antibióticos (Tabela 5) (de Faria *et al.*, 2021; Lu *et al.*, 2021).

É importante notar que os LMR podem variar ao longo do tempo, à medida que novas informações e pesquisas são disponibilizadas, e entre diferentes países, dado que cada um tem as suas próprias regulamentações e padrões nacionais relacionados a resíduos de medicamentos veterinários em alimentos. Assim sendo, é necessário consultar as autoridades regulatórias de cada país para obter informações específicas sobre os LMR aplicáveis localmente.

**Tabela 5.** Limites máximos de resíduos para antibióticos no leite de vaca estabelecidos por diferentes agências reguladoras em vários países (adaptado de Faria *et al.*, 2021; Lu *et al.*, 2021).

Classe	Antibiótico	LMR( µg/kg) <sup>a</sup>						
		UE <sup>b</sup>	Brasil <sup>c</sup>	Japão <sup>d</sup>	China <sup>e</sup>	FAO/FDA <sup>f</sup>	Canada <sup>g</sup>	CAC <sup>h</sup>
Aminoglicosídeos	Canamicina	150	150	700	150	n.m.	n.m.	150
	Estreptomicina	200	200	200	200	200	125	n.m.
	Gentamicina	100			200		200	100
Anfenicóis	Cloranfenicol	n.p.	n.p.	n.p.	n.p.	n.p.		
	Tianfenicol	50	n.r.	n.r.	50	n.r.		
β-lactâmico	Amoxicilina	4	4	4	4	4	n.m.	4
	Ampicilina	4			4		n.m.	n.m.
	Cefazolina	50			n.m.		n.m.	n.m.
	Cloxacilina	30	30	20	30	10		
	Penicilina	4	4	4	4	4	5,8	n.m.
Fluoroquinolonas	Ciprofloxacina	100	100	n.m.	100	n.m.		
	Levofloxacina	n.r.	100	n.m.	n.m.	n.r.		
Sulfonamidas	Sulfacetamida	100	100	90	100	10	0,01	n.m.
	Sulfadiazina	100	100	70	100	10	n.m.	
	Sulfatiazol	100			100			n.m.
	Trimetoprim	50			50		n.m.	n.m.
Tetraciclina	Doxiciclina	n.p.	n.p.	n.p.	n.p.	n.p.		
	Oxitetraciclina	100	100	100	100	100		
	Tetraciclina	100	100	100	100	100		

<sup>a</sup> n.p. – não permitido; n.r. – não recomendado; n.m.- não mencionado;

<sup>b</sup> Comissão Europeia

<sup>c</sup> ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária)

<sup>d</sup> Fundação Japonesa de Pesquisa Química Alimentar

<sup>e</sup> Ministério da Agricultura da República Popular da China

<sup>f</sup> Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura e (FAO) e FDA – Administração Federal de Alimentos e Medicamentos, (FDA, do inglês *Food and Drug Administration*)

<sup>g</sup> Government of Canada - Health Canada

<sup>h</sup> Codex Alimentarius Commission

## 2.2.2 Potenciais riscos para a saúde pública

No que diz respeito à produção de leite, os RAs têm sido uma das maiores preocupações nos últimos anos (Sachi *et al.*, 2019). Conforme mencionado ao longo deste trabalho, a sua presença no leite e outros produtos lácteos, mesmo que em reduzida concentração, potencia o desenvolvimento de estirpes resistentes aos ABs nocivas para os animais, os seres humanos e o ambiente e possui potencial alergénico para os consumidores (sobretudo reações cutâneas que incluem urticárias e dermatites, reações respiratórias como rinites e asma brônquica e reações digestivas, mas também inclui a anafilaxia) que podem afetar negativamente sistemas de órgãos, levando à morbidade e mesmo à morte (Chen *et al.*, 2019; Lu *et al.*, 2021). Estas reações estão mais associadas ao uso de penicilinas, porém a tetraciclina, estreptomicina e sulfonamidas também podem estar na

sua origem (Pereira *et al.*, 2017). A estes efeitos acresce potenciais impactos carcinogénicos e mutagénicos, pela sua interação com elementos celulares tais como o ácido desoxirribonucleico (DNA) e o ácido ribonucleico (RNA) (Chen *et al.*, 2019; Sachi *et al.*, 2019).

O consumo de alimentos que contêm RAs por seres humanos durante muito tempo impede a síntese de proteínas nos linfócitos dos mamíferos, suprime o sistema imunitário e causa o risco de superinfecção, altera a flora bacteriana do intestino delgado e grosso e dá origem a efeitos teratogénicos, carcinogénicos e mutagénicos (Tasci *et al.*, 2021).

Num estudo recente, Rahman e colaboradores (2021) corroboram que os resíduos consumidos através do leite podem causar diferentes reações nocivas para a saúde humana, tais como carcinogénicas, mutagénicas, teratogénicas, nefropatia, distúrbios reprodutivos, hepatotoxicidade e reações alérgicas. Além disso, referem que os resíduos de penicilina são uma causa potencial de urticária, mesmo numa quantidade reduzida (Rahman *et al.*, 2021).

Estudos efetuados em modelos animais provaram que os resíduos de ABs alteravam a composição da microbiota e os fenótipos metabólicos dos consumidores (Rahman *et al.*, 2021).

A presença de RAs no leite tem um impacto acrescido na saúde das populações em regiões já confrontadas com elevadas taxas de doenças diarreicas e desnutrição. Numerosos estudos demonstraram uma ligação entre a microbiota intestinal e o estado de saúde (Garcia *et al.*, 2019). Os RAs podem afetar negativamente a microbiota gastrointestinal daqueles que consomem leite adulterado, resultando em disbiose, que consiste numa alteração na diversidade, quantidade e/ou proporção de microrganismos presentes na microbiota que pode durar anos, resultando em riscos de saúde a longo prazo, especialmente em bebés e crianças, tais como atrofia no crescimento, resposta imunitária comprometida e doença diarreica recorrente. As *Bifidobacterium* spp. são organismos não patogénicos que desempenham um importante papel na homeostase intestinal e na saúde infantil. Estas bactérias são altamente suscetível a ABs e a exposição a RAs pode afetar a diversidade microbiana intestinal, resultando em níveis reduzidos de *Bifidobacterium* e num aumento de *Proteobacteria*, espécies patogénicas associadas a condições

inflamatórias e doenças intestinais (Mushtaq *et al.*, 2018; Garcia *et al.*, 2019; Sachi *et al.*, 2019).

### **2.2.3 Impactos para a indústria de laticínios**

No caso dos produtores e da indústria de laticínios, a existência de RAs no leite é motivo de grande preocupação, provocando enormes prejuízos financeiros devido à redução da produção e da qualidade do leite e à interferência com o processo de produção de manteiga, queijo e iogurte. A presença destes compostos no leite traz dificuldades técnicas, interferindo nas características organolépticas e tecnológicas dos produtos derivados, devido à inibição parcial ou total das culturas lácteas sensíveis (Mushtaq *et al.*, 2018). O fermento láctico contém duas bactérias, *Streptococcus cremoris* e *Lactobacillus bulgaricus*, responsáveis pela acidificação e coagulação do leite que são sensíveis aos ABs pelo que a sua presença interfere com a elaboração dos produtos. No iogurte, ocorre um desequilíbrio do fermento lácteo proporcionando um sabor desagradável e aspeto não característico do produto. No queijo, os resíduos provocam fermentação indesejada e maturação incompleta, além de influenciarem nos processos organolépticos, modificando o sabor normal e textura, tornando o produto com características indesejáveis. Na manteiga, inibem a fermentação láctea parcial ou total, levando a uma menor produção de diacetilo, responsável pelo aroma característico do produto (Freitas *et al.*, 2017; Kojok *et al.*, 2022). Foi reportado que uma concentração de AB tão baixa como 1 ppb pode interferir nos processos iniciais para a fabricação destes derivados (Lobato *et al.*, 2019).

Os tratamentos térmicos (pasteurização, fervura e esterilização) do leite reduzem o risco de exposição ao ABs mas não garantem em absoluto a sua destruição ou a decomposição completa dos resíduos e, portanto, podem chegar à indústria alimentar e aos consumidores (Lobato *et al.*, 2019; Sachi *et al.*, 2019; Treiber e Beranek- Knauer, 2021).

Castillo-Aguirre e colaboradores (2021) alertam para o facto de em muitos casos, apenas a atividade microbiana ser afetada pela pasteurização, mantendo-se o teor em ABs (Castillo-Aguirre *et al.*, 2021). Outros estudos indicam igualmente que muitos dos RAs não são neutralizados pelo tratamento térmico convencional utilizado na indústria para o fabrico de leite pasteurizado (72 °C) (Rahman *et al.*, 2021). A título de exemplo, alguns autores referem que para eliminar a penicilina do leite é necessário atingir 100 °C, durante três horas, ocorrendo o mesmo com a tetraciclina (Freitas *et al.*, 2017).

De salientar que mesmo no que concerne a atividade microbiana, no caso de bactérias termodúricas, os tratamentos térmicos como a pasteurização podem revelar-se ineficientes, havendo desenvolvimento de microrganismos formadores de esporos, tais como *Clostridium sporogenes*, *Clostridium butyricum* e *Clostridium tyrobutyricum* (Quigley *et al.*, 2013).

É, portanto, necessário garantir uma utilização prudente de ABs auxiliada por uma política de controlo com uma abordagem adequada de deteção e quantificação dos RAs no leite que assegure produtos lácteos seguros e de elevada qualidade (Sachi *et al.*, 2019). Só assim é possível garantir o bem-estar animal, a segurança alimentar e a saúde humana, protegendo ao mesmo tempo a subsistência económica dos produtores e das indústrias e a reputação das marcas no mercado (Garcia *et al.*, 2019).

### **2.3. Metodologias para a análise de antibióticos no leite**

A política de controlo e prevenção de RAs no leite para a obtenção de uma matéria-prima de qualidade implica o desenvolvimento de adequadas ferramentas de deteção, evitando resultados negativos falsos, e métodos de confirmação apropriados para comprovar e quantificar os RAs. De notar que neste cenário, também os resultados falsos positivos são uma limitação dado que podem ocasionar perdas económicas para os produtores e para a indústria de laticínios, e em alguns países pode também resultar em consequências legais. Por estas razões, são necessárias técnicas analíticas sensíveis para identificar e quantificar os RAs no leite.

Os métodos de análise de RAs em alimentos podem ser divididos em três grandes grupos: qualitativos, semiquantitativos e quantitativos (Chen *et al.*, 2019).

Até ao início deste século, os métodos de deteção usados para testar RAs nos alimentos eram essencialmente qualitativos ou semiquantitativos baseando-se em ensaios de inibição de crescimento microbiano, ensaios enzimáticos colorimétricos e imunoenaios (Chen *et al.*, 2019).

Na análise qualitativa, é possível detetar a presença de uma substância, ou classe de substância, a partir de um valor pré-determinado de concentração (*cutoff value*), necessariamente menor ou igual ao LMR, sendo por isso o tipo de resultado obtido classificado com negativo ou positivo consoante o valor de concentração é inferior ou

superior ao limite de detecção do teste. Nas metodologias semiquantitativas os resultados são interpretados relativamente a uma faixa de concentrações do composto (por exemplo, negativo, fracamente positivo e fortemente positivo) (Chen *et al.*, 2019).

Estes métodos de triagem continuam a ser utilizados e de reconhecida importância na produção, beneficiamento e industrialização do leite, pois os resultados obtidos por meio de kits são suficientes para apontar possíveis riscos e direcionar medidas de prevenção, mas, atualmente, amostras com resultados suspeitos ou positivos devem passar por métodos confirmatórios que quantifiquem esse resíduo (UE, 2010; Moretti *et al.*, 2016; Chen *et al.*, 2019). A Decisão da Comissão Europeia nº 657, de 17 de agosto de 2002, institui que os métodos usados para confirmação devem comprovar a estrutura química da substância a analisar. Consequentemente estes métodos geralmente utilizam técnicas de cromatografia com recurso a um sistema de detecção baseado na espectrometria de massa, o que implica que ocorram em ambiente laboratorial (CE, 2002; Pereira *et al.*, 2017).

### **2.3.1. Métodos de triagem**

Idealmente, um teste de triagem deve detetar um grande número de substâncias no mesmo ensaio, ser rápido, ter um custo reduzido e ser fácil de executar. Atualmente, estão disponíveis comercialmente vários testes, e outros estão a ser desenvolvidos, para avaliar a sua possível utilização no local ou em condições laboratoriais (Vercelli *et al.*, 2023). O interesse da comunidade científica é desenvolver e validar novos kits que permitam a identificação qualitativa de resíduos de ABs em concentrações inferiores ao LMR. Nenhum deles possui todas as características esperadas de um teste dito de ideal e, assim, antes de utilizar um destes testes, devem avaliar-se cuidadosamente as vantagens e desvantagens para obter o resultado mais fiável de acordo com a situação em concreto (Vercelli *et al.*, 2023). De qualquer das formas para ser considerado um método fiável, a validação do teste é obrigatória de acordo com a Decisão 2002/657/CE da Comissão Europeia, relativa ao desempenho de métodos analíticos e à interpretação de resultados. Este regulamento estabelece os critérios de linearidade, sensibilidade, especificidade, repetibilidade, reprodutibilidade e exatidão (CE, 2002).

O leite é uma matriz complexa, composta por vários elementos que podem interferir na análise dos RAs. Quando as concentrações de células somáticas, lisozima, lactoferrina,

gordura e proteína aumentam no leite, verifica-se geralmente que a taxa de resultados falsos positivos nos testes de triagem de ABs aumenta (Durel *et al.*, 2019; Tasci *et al.*, 2021). Assim, é comum existirem operações de purificação, diluição e preparação das amostras antes da execução do teste (Tasci *et al.*, 2021).

A maioria dos testes comerciais disponíveis para aplicação no campo são qualitativos ou semiquantitativos (Chen *et al.*, 2019). Estes testes são de custo reduzido e de resposta rápida, não exigindo instrumentos laboratoriais complexos, mas em contrapartida não quantificam de forma exata a concentração do AB presente no leite e podem ocasionar falsos positivos (Moretti *et al.*, 2016).

Existem vários kits para a detecção de RAs no leite, utilizando diferentes princípios de ação e de detecção. Estes testes são geralmente baseados na inibição do crescimento microbiano, testes imunológicos e enzimáticos com recetores específicos, associados a técnicas cromatográficas em camada fina (Tabela 6) (Pereira *et al.*, 2017; Rahman *et al.*, 2021).

**Tabela 6.** Exemplos de testes de triagem para pesquisa de resíduos de antibióticos (adaptado de Pereira *et al.*, 2017).

Testes	Kits Comerciais	Classe de Antibióticos
Inibição do crescimento microbiano	Copan CH ATK <sup>®</sup>	$\beta$ -lactâmicos Tetraciclina Sulfonamidas
	Delvotest <sup>®</sup> -P	$\beta$ -lactâmicos Tetraciclina Sulfonamidas
	Delvotest <sup>®</sup> SP-NT	Aminoglicosídeos $\beta$ -lactâmicos
Imunológico e enzimático	Cite Probe Gentamicin Test <sup>®</sup>	Aminoglicosídeos
	Snap Beta-lactam Test <sup>®</sup>	$\beta$ -lactâmicos

Como os antibióticos  $\beta$ -lactâmicos e tetraciclina são os mais frequentemente utilizados para o tratamento de infeções bacterianas no gado, a maioria dos programas de controlo de qualidade centram-se na detecção destas substâncias no leite (Beltrán *et al.*, 2014).

### i. Ensaios microbiológicos

Os testes de inibição do crescimento microbiano foram os primeiros a serem utilizados e versões atualizadas com melhorias significativas continuam a ser aplicadas (Sachi *et al.*, 2019). Não é necessária a preparação da amostra de leite e o princípio tem como objetivo a inibição do crescimento de culturas bacterianas de referência sobre a quais se adiciona uma alíquota de leite. A presença de RAs acima de uma determinada concentração, ocasiona a inibição do crescimento das bactérias e a interpretação dos resultados prende-se com a medição dos diâmetros da zona de inibição. Como referido anteriormente este tipo de técnica tem uma baixa especificidade que pode levar a resultados incorretos. Por exemplo, quantidades de células somáticas elevadas ou variações de pH, comuns em caso de mastite, podem levar a resultados falsos. No entanto, este tipo de método continua a ser o foco de várias investigações para melhorar o seu desempenho devido ao reduzido tempo de análise (alguns kits comerciais reivindicam 3 horas de tempo de execução para obter resultados) e à versatilidade de aplicação a vários produtos de origem animal, como por exemplo, ovos, mel e leite (Vercelli *et al.*, 2023).

O avanço desta técnica permitiu a utilização de bactérias específicas como *Geobacillus stearothermophilus*, *Bacillus megaterium* e *Bacillus licheniformis* para detetar  $\beta$ -lactâmicos, macrólidos, tetraciclinas, quinolonas e sulfonamidas, respetivamente, em níveis próximos dos LMRs. As bactérias sensíveis aos ABs, os nutrientes para o crescimento bacteriano e um indicador de pH são misturados e incubados, à temperatura adequada para permitir o crescimento bacteriano, após a adição da amostra de leite. Sem RAs, o crescimento bacteriano mantém-se inalterado e é detetável visualmente através da mudança de opacidade do meio e da cor devido ao pH ácido (Vercelli *et al.*, 2023).

O teste Eclipse 50 (Tabela 7) é exemplo deste teste de triagem em que o meio de cultivo possui esporos de *Geobacillus stearothermophilus* e um indicador ácido-base. Ao incubar a 65°C, os esporos vão germinar e multiplicar-se, acidificando assim o meio, levando a uma alteração de cor do indicador, de azul para amarelo-esverdeado. Se a amostra do leite possuir uma concentração de AB superior ao limite de deteção, não haverá crescimento dos esporos. Desta forma, o meio não é acidificado e, portanto, não há alteração da cor do meio que permanece azul, originando um resultado positivo (Alves *et al.*, 2016).

**Tabela 7.** Sensibilidade do teste Eclipse50 relativamente aos antibióticos e os seus LMR (adaptado de Alves *et al.*, 2016).

Substância (MRL ppb)	Limites de detecção (ppb)	LMR (Codex 2012)
Penicilina G	3-4	4
Ampicilina	4-5	4
Amoxicilina	4	4
Oxacilina	25	30
Cloxacilina	35	30
Cefalomo	20	20
Cefalexina	75	100
Cefazolina	35	50
Cefquinona	150	20
Ceftiofur	100	100
Cefapirina	8	60
Doxiciclina	100	100
Oxitetraclina	50	100
Tetraciclina	100	100
Sulfatiazol	100	100
Sulfametazina	150	100
Sulfamediazina	100	100
Sulfametoxipiridazina	100	100
Sulfanilamida	600	100
Sulfametoxazol	100	100
Eritromicina	400-800	40
Tilosina	80-100	50
Espiranicina	≥400	200
Gentamicina	≥1000	100
Estreptomicina	1500	200
Espiranicina	≥400	200
Gentamicina	≥1000	100
Estreptomicina	1500	200
Kanamicina	2000	150
Neomicina	1500	1500
Lincomicina	150	150

Existem também outros kits baseados nesta técnica como o Delvotest®P, Copan® e teste Charm® QUAD1 que são utilizados oficialmente (Durel *et al.*, 2019; Sachi *et al.*, 2019).

O Delvotest® SP-NT pode detetar  $\beta$ -lactâmicos, aminoglicosídeos, macrólidos, sulfonamidas, tetraciclina e diaminopirimidinas, enquanto o teste Charm® QUAD1 identifica apenas  $\beta$ -lactâmicos, quinolonas, sulfonamidas e tetraciclina (Vercelli *et al.*, 2023). Ambos afirmam ter a possibilidade de identificar a presença de resíduos correspondentes, no mínimo, aos valores LMRs, e declaram 95% de sensibilidade (Vercelli *et al.*, 2023).

Estas técnicas têm baixo custo e são de execução simples mas apresentam algumas limitações como o período de incubação poder ser relativamente longo (alguns kits

requerem até 24 horas de incubação), a possibilidade de aquisição de resistência antimicrobiana das estirpes bacterianas usadas para a detecção, a interpretação subjetiva e a presença de interferentes que pode levar a resultados errados (Vercelli *et al.*, 2023).

## ii. Imunoensaios

Os imunoensaios, descritos pela primeira vez em 1971, tem múltiplas aplicações, que vão desde fins médicos a biotecnológicos. Os testes utilizam a interação entre anticorpos e antígenos (no caso, os antibióticos) para detecção dessas substâncias no leite. Geralmente uma versão inativa do AB que se deseja detectar é conjugada (ligada) com um agente/molécula de marcação (que pode ser um radioisótopo, uma enzima, uma molécula fluorescente ou um outro produto químico). Se houver ABs na amostra de leite, eles competirão com o antígeno marcado pelos locais de ligação dos anticorpos, ligando-se a estas estruturas. Após a adição de um substrato para a molécula marcadora, se os anticorpos estiverem ligados ao ABs presentes na amostra, a degradação do substrato produzirá um sinal detectável (como a formação do produto colorido, fluorescência ou uma leitura de absorvância) (Ahmed *et al.*, 2020). Atualmente, os testes de triagem baseados na utilização de recetores específicos são amplamente utilizados, devido à sua fácil execução e baixo custo, especialmente em explorações agrícolas e na indústria de laticínios, para detectar rapidamente algumas famílias de ABs no leite (Beltrán *et al.*, 2014; Ahmed *et al.*, 2020; Vercelli *et al.*, 2023).

Um exemplo da utilização deste tipo de método é a técnica ELISA (do inglês, *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*), um teste imunoenzimático versátil que utiliza várias enzimas de marcação (tais como a glicose oxidase, peroxidase de rábano, piruvato desidrogenase, fosfatase alcalina e  $\beta$ -galactosidase recombinante) para detectar a presença de substâncias específicas. Tipicamente cada poço da placa é revestido com o anticorpo específico que se liga ao AB. A amostra é adicionada a cada um dos poços e caso contenha o antígeno ele liga-se ao anticorpo. Após um período de incubação e subsequente lavagem é adicionado um anticorpo secundário que está conjugado com a enzima. Este anticorpo secundário reconhece e liga-se aos anticorpos primários ligados com o antígeno. Depois da segunda incubação e lavagem é adicionado um substrato específico para a enzima que, se presente, catalisa uma reação química que leva à formação de um produto corado (Ahmed *et al.*, 2020).

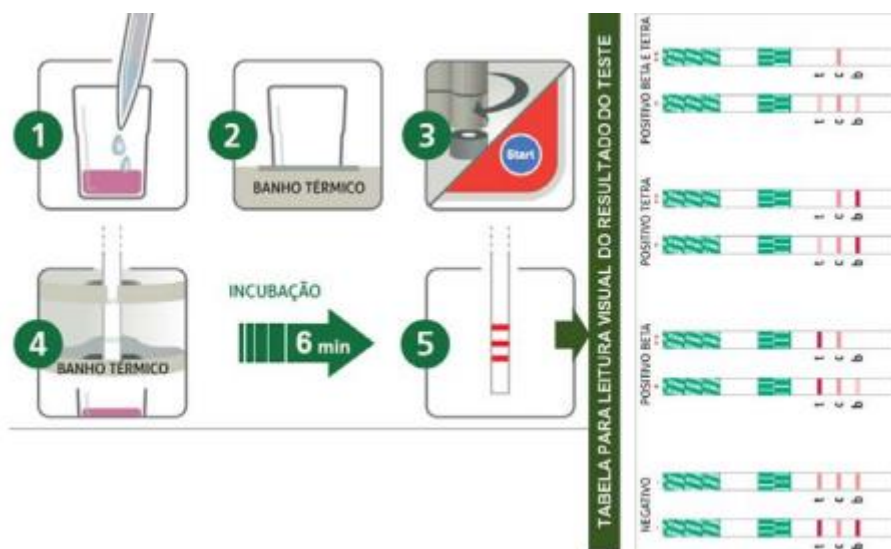
Esta técnica é um método imunológico enzimático mais utilizado devido ao tempo reduzido na detecção de resíduos de ABs tais como fluoroquinolonas,  $\beta$ -lactâmicos, tetraciclinas e aminoglicosídeos. Porém, possui algumas desvantagens como a baixa reprodutibilidade e presença de falsos positivos (Ahmed *et al.*, 2020).

Outro exemplo de ensaio imunológico é radioimunoensaio (RIA) que utiliza antígenos marcados com isótopos e não marcados para reagir competitivamente com anticorpos. É usado para a detecção de antibióticos e hormonas tanto a nível veterinário como a nível humano (Ahmed *et al.*, 2020). No entanto, a utilização deste método é, hoje em dia, limitada por os radioisótopos prejudicarem o ambiente e a saúde pública (Ahmed *et al.*, 2020).

O método de fluorescência consiste na ligação de um fluoróforo a um antígeno específico que permite uma detecção bem visualizada e robusta, contudo necessita de uma preparação prévia da amostra antes de ser utilizada. Este imunoensaio tem sido amplamente utilizado para detetar fluoroquinolonas,  $\beta$ -lactâmicos e tetraciclinas no leite (Ahmed *et al.*, 2020).

O teste SNAP (*Screening for  $\beta$ -lactamase Activity by SNAP*) é um teste imunológico desenvolvido para detetar a presença de resíduos de ABs  $\beta$ -lactâmicos, como penicilinas e cefalosporinas, em amostras de leite (Beltrán *et al.*, 2014). A amostra de leite é preparada de acordo com as instruções do teste e por norma envolve uma diluição prévia. Seguidamente é colocada numa área específica do teste que contém reagentes conjugados com anticorpos específicos para o antibiótico alvo. Se existirem RAs na amostra há a formação de uma linha colorida, que informa que o resultado é positivo. No caso de não se detetar RAs apenas se visualiza a linha de controlo (Beltrán *et al.*, 2014). O teste é capaz de detetar todos os ABs  $\beta$ -lactâmicos testados a níveis iguais ou inferiores aos respetivos LMR (Tabela 8). Relativamente às tetraciclinas, a capacidade de detecção do ensaio foi igual ao LMR para a clortetraciclina e inferior para a oxitetraciclina e a tetraciclina.

O teste Twinsensor BT é outro exemplo de um teste imunocromatográfico capaz de detetar de forma rápida e concomitante ABs  $\beta$ -lactâmicos e tetraciclinas em amostras de leite. Se a amostra do leite possuir uma concentração de AB superior ao limite de detecção do teste, haverá o aparecimento de várias linhas com cor (Figura 5) (Alves *et al.*, 2016).



**Figura 4.** Procedimento do teste Twinsensor BT (adaptado de Alves *et al.*, 2016).

De acordo com Beltrán e colaboradores (2014) a capacidade de detecção do teste TwinsensorBT foi inferior ao LMR para todos os ABs  $\beta$ -lactâmicos testados, exceto para a cefalexina e a nafcilina (Tabela 8). Relativamente às tetraciclina, o teste foi capaz de detectar a clortetraciclina, a oxitetraciclina e a tetraciclina a níveis iguais ou inferiores ao LMR (Beltrán *et al.*, 2014).

O Betastar Combo é um teste imunológico desenvolvido para detetar a presença de RAs  $\beta$ -lactâmicos, como penicilinas e cefalosporinas, e do grupo da tetraciclina em amostras de leite. Uma alíquota de leite (geralmente diluída) é adicionada a um recipiente contendo uma mistura de reagentes que contêm anticorpos específicos que reagem com os RAs  $\beta$ -lactâmicos e/ou tetraciclina presentes na amostra. Após inserção das tiras de teste e incubação o resultado é obtido através da leitura visual de 3 linhas. A linha inferior capta os reagentes que não interagiram com os ABs de tetraciclina durante a pré-incubação, a intermédia serve como controlo para comparação das outras 2 e a linha superior sinaliza os reagentes relacionados com os ABs  $\beta$ -lactâmicos. Se a amostra possuir níveis de ABs abaixo do nível detetável, as linhas superior e inferior do teste aparecerão a vermelho com uma intensidade maior à da linha de controlo, e o resultado do teste é considerado negativo. Se as linhas superior e inferior do teste não aparecerem, ou aparecerem com uma intensidade inferior ao controlo o resultado do teste é considerado positivo (Beltrán *et al.*, 2014).

**Tabela 8.** Capacidade de detecção dos testes Betastar Combo, SNAP e Twinsensor BT para antibióticos  $\beta$ -lactâmicos e tetraciclina no leite (adaptado de Beltrán *et al.*, 2014).

Antibiótico	LMR ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ ) <sup>a</sup>	Capacidade de detecção ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ ) <sup>b</sup>		
		Betastar Combo	SNAP <sup>c</sup>	Twinsensor BT
<i><math>\beta</math>-lactâmicos</i>				
Amoxicilina	4	4	4	4
Ampicilina	4	3	3	$\leq 2$
Benzilpenicilina	4	$\leq 2$	$\leq 2$	3
Cloxacilina	30	$\leq 15$	20	$\leq 15$
Dicloxacilina	30	$\leq 15$	$\leq 15$	$\leq 15$
Nafcilina	30	$\leq 15$	30	$> 30$
Oxacilina	30	$\leq 15$	30	$\leq 15$
Cefacetililo	125	$\leq 63$	$\leq 63$	$\leq 63$
Cefalônio	20	$< 10$	20	$< 10$
Cefapirina	60	$\leq 30$	$\leq 30$	$\leq 30$
Cefazolina	50	50	$\leq 25$	$\leq 25$
Desacetilcefapirina	*	$\leq 30$	$\leq 30$	$\leq 30$
Cefoperazona	50	50	$\leq 25$	$\leq 25$
Cefquinoma	20	$\leq 10$	$\leq 10$	$\leq 10$
Ceftiofur	100	$> 100$	$\leq 50$	$\leq 50$
Desfuroilceftiofur	*	$> 100$	$\leq 50$	$\leq 50$
Cefalexina	100	$> 100$	$\leq 50$	$> 100$
<i>Tetraciclina</i>				
Clortetraciclina	100	100	100	100
Oxitetraciclina	100	100	$\leq 50$	75
Tetraciclina	100	100	75	100

<sup>a</sup> LMR, limite máximo de resíduos estabelecido pelo Regulamento (CE) n.º 37/2010; \* indica um resíduo com LMR não estabelecido

<sup>b</sup> Concentração de antibiótico que produz pelo menos 95% de resultados positivos

<sup>c</sup> Teste SNAP de antibiótico  $\beta$ -lactâmicos e teste SNAP para tetraciclina

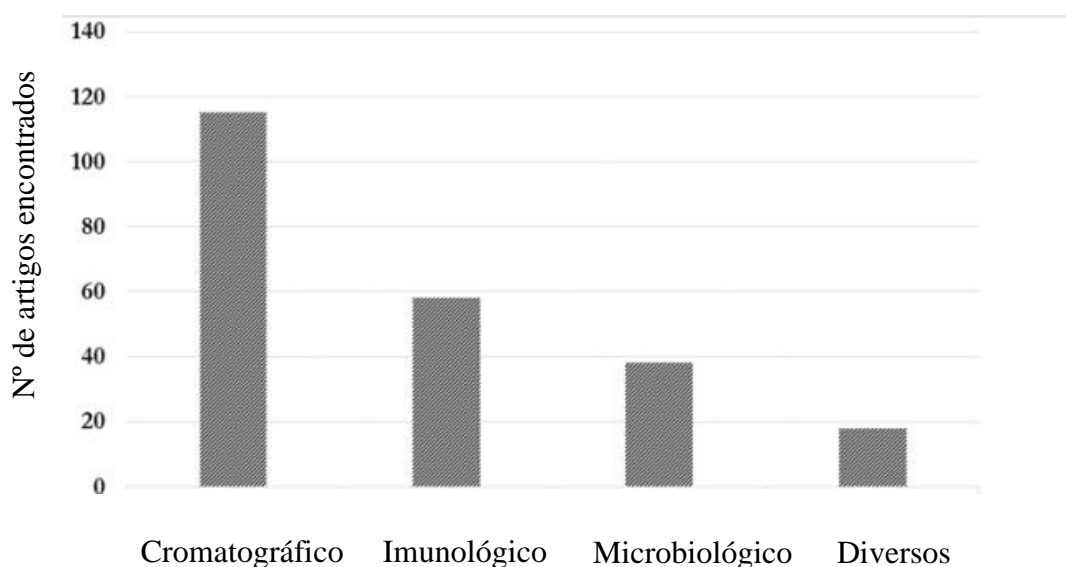
A detecção do teste Betastar Combo foi inferior ao LMR para todos os ABs  $\beta$ -lactâmicos testados, exceto para ceftiofur e cefalexina (Tabela 8). Já em relação às tetraciclina o teste detetou níveis iguais ao LMR (Beltrán *et al.*, 2014).

### 2.3.2. Análise quantitativa

Como referido os testes de triagem são utilizados como métodos de despistagem de primeira linha, mas necessitam de confirmação de resultados positivos, utilizando abordagens analíticas sensíveis e de elevada especificidade, que permitem cumprir com os requisitos impostos pela UE, como a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) ou a cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massa sequencial (LC-MS/MS)

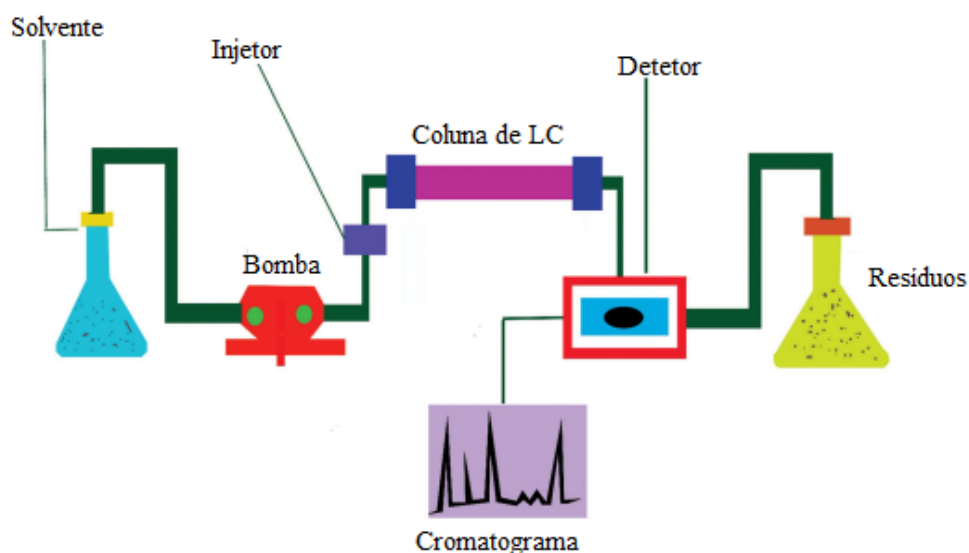
melhorando e garantindo assim a segurança e a qualidade dos produtos de origem animal (Parmar *et al.*, 2021).

De facto, de acordo, com um estudo de Sachi e colaboradores (2019), as técnicas cromatográficas são os procedimentos mais usados na deteção de ABs no leite (Figura 6) correspondendo a um total de 115 artigos, seguida da técnica imunológica que corresponde a 58 artigos mencionados, a técnica microbiológica citada em 38 artigos e por fim outras técnicas referidas em 18 artigos (Sachi *et al.*, 2019).



**Figura 5.** Frequência com que são usadas as diversas técnicas de deteção de resíduos de antibióticos no leite (adaptado de Sachi *et al.*, 2019).

A cromatografia líquida (LC) é a técnica mais versátil e mais amplamente empregue para a separação e determinação de espécies nos mais diversos tipos de amostras. Conforme a própria designação indica, em todos estes procedimentos a fase móvel é um líquido, decorrendo o processo de separação neste estado físico, o que possibilita a separação de constituintes pouco voláteis e/ou termolábeis. A amostra é inserida na coluna por meio de injetor apropriado e arrastada pela fase móvel, percorrendo toda a coluna por uma força intensa gerada por uma bomba de modo a superar a resistência da coluna ao escoamento da fase móvel. No processo de separação os componentes migram com velocidades diferentes de acordo com a sua distribuição nas duas fases imiscíveis (fase estacionária e fase móvel) e são identificados à saída da coluna por um detetor que fornece um registo contínuo da composição da amostra analisada em forma de cromatograma (Vercelli *et al.*, 2023).



**Figura 6.** Representação esquemática do equipamento envolvido na técnica de cromatografia líquida (adaptado de Parmar *et al.*, 2021).

Várias modalidades da cromatografia líquida têm sido desenvolvidas e utilizadas para a determinação de diferentes espécies químicas. Globalmente são uma adaptação/evolução umas das outras que permitem alcançar melhoria em termos de desempenho analítico.

Neste enquadramento, a HPLC surge como a técnica precursora deste tipo de análise quantitativa. A este instrumento foram acoplados diferentes detetores, como o detetor de ultravioleta (UV) e espectrometria de massa (MS). Entretanto, o progresso científico permitiu a evolução deste tipo de equipamento, com o aparecimento da cromatografia líquida de ultra eficiência (UPLC ou UHPLC), também ela usada como técnica associada a múltiplos detetores de entre os quais se destaca, novamente a MS por vezes em arranjo sequencial (MS/MS). Este modo de deteção, frequentemente designado de tandem, permite a deteção rápida e eficaz de um grande número de RAs, com limites de deteção e quantificação muito baixos, grande sensibilidade e seletividade (Sachi *et al.*, 2019; Sahebi *et al.*, 2023). Após eluição cromatográfica o composto é encaminhado para um primeiro MS onde sofre ionização e fragmentação. Os fragmentos gerados neste primeiro detetor são então dirigidos para um segundo MS onde volta a acontecer um novo processo de fragmentação e posterior separação dos iões formados de acordo com a sua razão massa/carga (Sahebi *et al.*, 2023).

Assim, as metodologias MS são hoje as técnicas de detecção de eleição na análise de RAs em alimentos (Tabela 9), que requerem um adequado pré-tratamento das amostras (matrizes complexas com elevado teor de gordura, proteínas, açúcares, etc.) para isolar e concentrar o maior número possível de RAs (Chen *et al.*, 2019).

**Tabela 9.** Exemplos de técnicas de cromatografia líquida para pesquisa de resíduos de ABs no leite (adaptado de Pereira *et al.*, 2017).

Classe de Antibióticos	Detetores
Aminoglicosídeos	MS/MS com ionização química à pressão atmosférica (APCI) e analisador do tipo quadruplo-tempo de voo quadripolar (QTOF)
Beta-lactâmicos	MS/MS com ionização pelo processo Electrospray (ESI) e analisador do tipo quadruplo
Tetraciclina	Absorção ultravioleta MS/MS com ionização pelo processo Electrospray (ESI) e analisador do tipo quadruplo
Sulfonamidas	Fluorescência

i. Cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC)

A HPLC é uma técnica cromatográfica que exige instrumentos específicos, procedimentos morosos (tendo em conta a preparação de amostras e reagentes) e deve ser efetuada por pessoal qualificado (Tabela 10.). É considerada um método de referência para a detecção de RAs devido à sua elevada sensibilidade, especificidade e capacidade de quantificação (Vercelli *et al.*, 2023).

O sistema de HPLC inclui vários reservatórios para fase móvel ligados a uma bomba de alta pressão, uma coluna empacotada com pequenas partículas (cujos tamanhos mais comuns variam entre 3 a 5 µm e coluna com comprimento de 15 a 30 cm), uma unidade de injeção (manual ou automática) e um sistema de detecção. As amostras são injetadas e transportadas pela fase móvel, fluem através da coluna (fase estacionária), onde ocorre a separação dos compostos de acordo com a sua afinidade diferencial para as 2 fases, e no final chegam ao detetor. Neste, é gerado um sinal que, em princípio, permite identificar o composto que foi isolado e calcular a sua concentração na amostra por comparação com valores resultantes de uma curva analítica (ou curva de calibração) (Chen *et al.*, 2019; Parmar *et al.*, 2021).

Atualmente um dos detetores utilizado em HPLC é o detetor de arranjo de fotodiodos (DAD) capaz de monitorizar vários comprimentos de onda simultaneamente. A radiação policromática incide sobre uma célula de fluxo colocada à saída da coluna cromatográfica e depois é decomposta em vários comprimentos de onda que são monitorizados em simultâneo por uma matriz de fotodiodos (cada fotodiodo é um pequeno detetor que mede a atenuação da intensidade inicial do feixe de luz num pequeno intervalo de comprimentos de onda), permitindo a quantificação concomitante de diferentes compostos (Parmar *et al.*, 2021; Vercelli *et al.*, 2023).

A utilização de HPLC foi validada para detetar tetraciclinas, sulfonamidas e anfenicóis no leite mas, por vezes, é muito difícil preparar e purificar adequadamente a amostra de leite antes de realizar o procedimento: a gordura, as proteínas e os açúcares presentes no leite podem comprometer a identificação correta dos resíduos (Parmar *et al.*, 2021; Vercelli *et al.*, 2023). Assim, além de um processo de desproteínização são geralmente necessários métodos de extração para garantir o isolamento e o enriquecimento eficaz dos analitos, sendo extração em fase sólida (SPE) amplamente aplicada para este fim (Kiszkiel-Taudul *et al.*, 2023). Um outro ponto crítico tem que ver com o facto de os resultados poderem variar significativamente de acordo com o pH e a temperatura (que ocasionam alteração de alguns analitos que não são estáveis, como a tetraciclina) levando a uma identificação final incorreta de RAs no leite (Kurjogi *et al.*, 2019).

**Tabela 10.** Vantagens e desvantagens gerais dos métodos para a deteção de antibióticos no leite (adaptado de Vercelli *et al.*, 2023).

Método	Custo	Tempo	Pessoal	Preparação da amostra	Limite de deteção
Teste microbiológicos	Baixo	3 – 24 h	Fácil execução. Para o rastreio no local.	Inexistente ou fácil	$\beta$ -Lactâmicos, 2 $\mu\text{g L}^{-1}$ ; tetraciclinas, 50-100 $\mu\text{g L}^{-1}$ ; macrólidos, 40 $\mu\text{g L}^{-1}$ ; sulfonamidas, 50-100 $\mu\text{g L}^{-1}$ ; fluoroquinolonas, 100-180 $\mu\text{g L}^{-1}$
Imunoensaios	Baixo	6 – 24 h	Fácil execução. Para controlo no terreno e de investigação.	Inexistente ou fácil	$\beta$ -Lactâmicos, 2,10 $\mu\text{g L}^{-1}$ ; fluoroquinolonas, 29 $\mu\text{g L}^{-1}$ ; tetraciclinas, 1,5-6,9 $\mu\text{g L}^{-1}$ ; lincosamidas, 1,65 $\mu\text{g L}^{-1}$ ; macrólidos, 6,3 $\mu\text{g L}^{-1}$
HPLC	Caro (elevado investimento para aquisição do equipamento)	Vários dias para a preparação do método. Análise da amostra: algumas horas.	É obrigatório dispor de pessoal dedicado e formado. Dedicado à investigação ou a controlos oficiais.	Necessário	Menos de 10 $\mu\text{g L}^{-1}$ para todos os antibióticos.
LC-MS/MS	Muito caro (elevado investimento para aquisição do equipamento)	Vários dias para a preparação do método. Análise da amostra: algumas horas.	É obrigatório dispor de pessoal dedicado e formado. Dedicado à investigação ou a controlos oficiais.	Necessário	Menos de 5 $\mu\text{g L}^{-1}$ para todos os antibióticos.

Corroborando a exatidão destas novas metodologias Chen e colaboradores (2019) reportaram que num conjunto de 140 amostras de leite analisadas por HPLC, 23% das quais tinham testado positivas em testes de rastreio para resíduos dos grupos da penicilina e sulfonamida ( $1-256 \mu\text{g kg}^{-1}$ ), 81% de amostras foram positivas para amoxicilina ( $68-802 \mu\text{g kg}^{-1}$ ), 41% para sulfadimetoxina ( $31-69 \mu\text{g kg}^{-1}$ ), 27% para penicilina G ( $13-353 \mu\text{g kg}^{-1}$ ) e 12% para a ampicilina ( $0,5-92 \mu\text{g kg}^{-1}$ ) sendo que maioria dos RAs excedeu os LMR (Chen *et al.*, 2019).

Um trabalho recente descreveu a otimização e validação do método HPLC-DAD para a determinação de resíduos de oxitetraciclina e amoxicilina em leite de vaca. Foram obtidas taxas de recuperação dos RAs entre 88 e 98% com um desvio padrão relativo (DPR)  $<10\%$ . Os limites de deteção foram  $2,0 \mu\text{g kg}^{-1}$  para a oxitetraciclina e  $1,3 \mu\text{g kg}^{-1}$  para a amoxicilina, e os valores limites de quantificação foram  $6,1 \mu\text{g kg}^{-1}$  e  $3,8 \mu\text{g kg}^{-1}$  para a oxitetraciclina e a amoxicilina, respetivamente (Kumar *et al.*, 2022). Neste estudo, de um total de 173 amostras de leite testadas, foram detetados RAs em 16 (9,2%) amostras com uma concentração média de ABs de  $60,9 \pm 42,8 \mu\text{g kg}^{-1}$  nas amostras positivas, sendo que destas 5 continham RAs acima dos respetivos LMRs. A taxa de deteção de oxitetraciclina em amostras de leite cru ( $n = 128$ ) e pasteurizado ( $n= 45$ ) foi de 9,4% e 4,4%, respetivamente, com concentrações que variaram entre  $31,5-150,6 \mu\text{g kg}^{-1}$ . Três amostras de leite cru (1,7%) continham resíduos de oxitetraciclina acima do limite de tolerância ( $100 \mu\text{g kg}^{-1}$ ). A avaliação das amostras para a deteção de resíduos de amoxicilina revelou que, do total das 173, apenas 2 amostras de leite cru (1,2%) deram resultados positivos com uma concentração média de  $11,3 \pm 1,1 \mu\text{g kg}^{-1}$  sendo que ambas continham níveis de amoxicilina acima do LMR ( $10 \mu\text{g kg}^{-1}$ ). No entanto, nenhuma das amostras de leite pasteurizado analisadas mostrou contaminação de resíduos de amoxicilina a níveis detetáveis provavelmente devido ao tratamento térmico ou à diluição prévia das amostras (Kumar *et al.*, 2022).

ii. Cromatografia líquida acoplada a espetrometria de massa sequencial (LC-MS/MS)

A LC-MS/MS é uma técnica analítica avançada caracterizada por um elevado desempenho na identificação e quantificação de ABs e os seus metabolitos ou resíduos em vários géneros alimentícios, incluindo leite, com exatidão e precisão notavelmente elevadas (Parmar *et al.*, 2021). É método fiável, altamente seletivo e sensível que permite

a determinação simultânea de vários compostos (Tasci *et al.*, 2021; Kiszkiel-Taudul *et al.*, 2023).

Após um processo de separação prévia dos constituintes da amostra por cromatografia líquida, estes são ionizados e vaporizados, sujeitos a fragmentação e separados de acordo com a sua razão massa/carga ( $m/z$ ) no analisador de massa. A abundância de cada ião com um valor  $m/z$  diferente é medida pelo detetor e é proporcional à concentração da substância a analisar na amostra (Parmar *et al.*, 2021).

Quando se utiliza um MS/MS, o primeiro quadrupolo é ajustado para selecionar um ião parental (o valor  $m/z$  é, na maioria das vezes, o ião molecular da substância), que passa depois para o segundo quadrupolo, onde sofre uma fragmentação adicional (Fang *et al.*, 2019; Parmar *et al.*, 2021). Os iões formados são geralmente específicos de uma determinada substância, pelo que a sua análise permite uma identificação e quantificação excepcionalmente fiáveis (Parmar *et al.*, 2021).

Assim, esta técnica é uma ferramenta útil e versátil de confirmação de RAs que permite quantificar dezenas de RAs em amostras de alimentos a níveis de concentração tão baixos quanto o nanograma por litro ou nanograma por quilograma (Chen *et al.*, 2019). As suas vantagens são a deteção simultânea de RAs de diferentes classes e a elevada exatidão analítica que é assegurada pelo facto de ser obtida informação estrutural da substância a analisar, permitindo a identificação e doseamento de quantidades muito pequenas, com limites de deteção e quantificação mais baixos em comparação com a HPLC com deteção convencional (Parmar *et al.*, 2021; Vercelli *et al.*, 2023). As principais desvantagens são o elevado custo, o longo tempo de execução e a necessidade de trabalhar em condições experimentais normalizadas (por exemplo, controlo da ionização, pH, estabilidade do analito, etc.). Todas estas metodologias implicam a otimização de múltiplos parâmetros instrumentais dependentes dos componentes em análise sendo, por isso, sempre procedimentos direcionados para rastrear antibióticos alvo. Também neste caso, a complexidade da composição do leite pode levar a resultados enganosos sendo fundamental uma adequada preparação da amostra antes da sua análise por LC-MS/MS. Com efeito, o elevado teor de proteínas e gorduras do leite torna-o numa matriz complexa capaz de ligar os antibióticos e impedir a sua extração eficaz. A SPE, a precipitação de proteínas, a extração por solvente simples e o QuEChERS (*Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, Safe*) são alguns dos métodos para pré-tratamento das amostras com o objetivo

de reduzir efeitos de matriz e, em simultâneo extrair e pré-concentrar os RAs de várias classes (Sahebi *et al.*, 2023).

Uma técnica avançada que tem sido aplicada com sucesso para detetar RAs é a UPLC acoplada à espectrometria de massa sequencial (UPLC-MS/MS) (Castillo-Aguirre *et al.*, 2021). A UPLC tem os mesmos princípios de separação e funcionamento do HPLC, sendo considerada uma evolução desta técnica que, comparativamente, permite análises mais rápidas e eficientes (Castillo-Aguirre *et al.*, 2021). As principais diferenças entre as duas prendem-se com a dimensão das partículas de suporte da fase estacionária, que possuem diâmetro de cerca aproximadamente 2 µm (ao invés dos 3 a 5 µm das de HPLC), e o menor comprimento da coluna (5 a 10 cm). Em consequência, este novo sistema instrumental para LC, possui requisitos adicionais para os sistemas de bombeamento já que é necessário atingir pressões da ordem dos 8000 a 15000 psi durante as separações, valores consideravelmente superiores aos 2500 a 5000 psi necessários em HPLC (Castillo-Aguirre *et al.*, 2021).

Recentemente Castillo-Aguirre e colaboradores (2021) propuseram metodologias inovadoras para a determinação de oxitetraciclina, enrofloxacina, ciprofloxacina, sulfadoxina e trimetoprim em leite de vaca por HPLC-DAD e por UPLC-MS após extração com disco rotativo (RDSE). A RDSE consiste numa estratégia de preparação da amostra que já foi utilizada em matrizes de origem animal (tais como plasma ou urina) mas, este é a primeira publicação em que foi reportado o seu uso para a análise de leite. Obtiveram-se taxas de recuperação entre 85,5 e 106,4%, desvios padrão relativos (DPR) entre 3,7 e 9,9% e limites de quantificação inferiores ao LMR para cada analito por HPLC-DAD demonstrando a adequabilidade do método. O UPLC-MS apresentou recuperações absolutas de 88,5 a 114,1%, com DPRs entre 4,3 e 15,4%. Os limites de quantificação obtidos por UPLC-MS foram também inferiores aos LMRs para cada analito. A combinação de RDSE com UPLC-MS tornou possível identificar e quantificar inequivocamente os analitos investigados neste estudo a níveis inferiores a 1 µg kg<sup>-1</sup>. O método proposto é mais simples, menos dispendioso, utiliza a química verde, ao mesmo tempo, que fornece valores de mérito/desempenho comparáveis com os de outros métodos analíticos (Castillo-Aguirre *et al.*, 2021).

Um outro estudo muito recente relatado por Sahebi e colaboradores (2023) descreveu um método rápido e eficiente para a pré-concentração e determinação simultâneas de 22 ABs

e seus metabolitos em amostras de leite, utilizando nanopartículas magnéticas de quitosano (composto biodegradável e bastante utilizado em métodos de extração devido à elevada capacidade de adsorção) modificadas com líquido iônico funcional à base de imidazol, seguido de UPLC-MS/MS. Estes ABs abrangem 5 classes: 3 sulfonamidas, 4 fluoroquinolonas, 6  $\beta$ -lactâmicos, 6 tetraciclinas e seus metabolitos e 3 macrólidos. A SPE magnética (MSPE) utiliza adsorventes baseados em materiais magnéticos para introduzir um campo magnético externo, eliminando a necessidade de filtração e centrifugação no processo de pré-tratamento da amostra, poupando tempo e custos operacionais. Foram obtidas taxas de recuperações médias de 85,9 a 107,5%, e valores de precisão com DPRs inferiores a 9,2%. Os limites de detecção foram de 0,04-0,19  $\mu\text{g kg}^{-1}$ . Foram detetados RAs em 124 amostras de um total de 241 amostras de leite recolhidas nas zonas rurais (133 de leite de vaca cru e 108 de leite pasteurizado) sendo que em 39 delas os valores estavam acima dos LMRs (24 de leite de vaca cru e 15 de leite pasteurizado) (Sahebi *et al.*, 2023).

Noutro estudo, Tasci e colaboradores investigaram a presença de ABs em 130 amostras, incluindo 10 de colostro, 68 de leite de vaca cru, 21 de leite de cabra cru e 31 de leite a temperatura ultra-alta (UHT) por LC-MS/MS. Relativamente a este estudo foram determinados RAs em 55% das amostras de leite: 4 de 10 (40%) amostras de colostro, 30 de 68 (44,12%) amostras de leite de vaca cru, 13 de 21 (61,90%) amostras de leite de cabra cru e 24 de 31 (77,42%) amostras de leite UHT. Os RAs detetados foram de tetraciclina, 4-epitetraciclina, 4-epioxitetraciclina, 4-epiclorotetraciclina e ciprofloxacina e embora os níveis de resíduos não tenham suscitado preocupações toxicológicas, a sua presença num número tão elevado de número de amostras indicou a utilização generalizada destes compostos na produção leiteira, não respeitando as boas práticas veterinárias seguidas por todos os produtores de leite (Tasci *et al.*, 2021).

Um estudo transversal que incluiu um total de 300 amostras de leite cru e processado considerou 5 ABs veterinários comumente utilizados: amoxicilina, gentamicina, ceftriaxona, oxitetraciclina e estreptomicina para o rastreio de amostras de leite (Rahman *et al.*, 2021). As amostras de leite cru ( $n = 200$ ) eram constituídas por 150 amostras individuais e 50 combinadas (recolhidas do tanque de armazenamento do leite após a ordenha do rebanho) obtidas a partir de diferentes explorações leiteiras da área. O teste de rastreio foi aplicado a todas as amostras e, em seguida, apenas as amostras positivas que continham resíduos de amoxicilina e oxitetraciclina foram analisadas por UPLC-

DAD. Os resultados do teste de triagem mostraram uma prevalência de 7 % (14 em 200) em amostras de leite cru não tendo sido encontrados testes positivos nas 100 amostras de leite processado. Em todas as amostras combinadas positivas (2 em 50), apenas foi encontrado gentamicina (4 %). As amostras individuais de leite foram reconhecidas como positivas (12 em 150) para os cinco antibióticos testados nas seguintes percentagens: 2% amoxicilina, 3,3% oxitetraciclina, 1,3% estreptomicina, 0,6% gentamicina e 0,6% ceftriaxona. No caso da amoxicilina a concentração média de resíduos era superior ao LMR e para a oxitetraciclina, das 5 amostras positivas, uma possuía um valor inferior ao LMR e duas ultrapassavam-no. Não foram detetados RAs nas amostras de leite processado, provavelmente por serem amostras de leite pasteurizadas, resultados que são concordantes com trabalhos anteriores que testaram 94 leites UHT e não encontraram níveis detetáveis de ABs, nomeadamente tetraciclina. Neste estudo, foi encontrada uma prevalência total de 7% de RAs no leite cru, que era mais elevada (8%) em amostras individuais de leite do que nas amostras combinadas (4%) (Rahman *et al.*, 2021).

Recentemente Kiszkiel-Taudul e colaboradores (2023) reportaram a determinação de amoxicilina em diferentes tipos de amostras de leite (aromatizado, magro e gordo) por LC-MS/MS após SPE. Os resultados obtidos indicaram uma prevalência 3,2% de AB nas amostras de leite adquiridas nos mercados locais com um nível de concentração de  $9,40 \pm 0,11 \mu\text{g kg}^{-1}$ , valor este superior ao LMR que é de  $4 \mu\text{g kg}^{-1}$ , o que leva os autores a enfatizarem a necessidade de determinação de ABs em produtos lácteos (Kiszkiel-Taudul *et al.*, 2023).

### **2.3.3. Outros métodos**

Algumas técnicas inovadoras têm sido testadas nos últimos anos estando a ser avaliadas e eventualmente validadas e comercializadas.

Um novo método baseado na espectroscopia de infravermelho próximo com transformada de Fourier (FT-NIR) permitiu o desenvolvimento de um protótipo portátil para detetar resíduos de cloridrato de ceftiofur no leite bovino de forma rápida e precisa (Vercelli *et al.*, 2023).

As técnicas baseadas em biossensores são também apostas prometedoras que têm vindo a ser continuamente aperfeiçoadas e validadas nos últimos anos. Estes procedimentos muitas vezes dispensam a preparação preliminar de amostras, permitindo uma deteção

seletiva para a avaliar *in loco* da qualidade do leite. Os biossensores são dispositivos compactos e geralmente portáteis, de fácil utilização capazes de transformar o reconhecimento bioquímico seletivo num sinal físico mensurável para análise em tempo real (entre 30 a 40 minutos), (Vercelli *et al.*, 2023).

Recentemente, um bioensaio baseado em células inteiras foi desenvolvido para a deteção de ABs no leite. Células de *Escherichia coli* expressando uma proteína fluorescente foram usadas como agente de reconhecimento, e a deteção de ABs foi realizada monitorizando a taxa de inibição da intensidade da fluorescência como resultado da inibição de células pelos RAs. O desempenho do bioensaio foi testado para diferentes ABs e os resultados obtidos mostraram que o método desenvolvido pode ser utilizado com êxito para a deteção de ampicilina, benzilpenicilina, gentamicina, neomicina e tetraciclina com valores de limite de deteção de 3,33; 0,29; 28,00; 618,36 e 33,17  $\mu\text{g L}^{-1}$ , respetivamente e todos estavam abaixo do LMR. O método foi também testado com amostras de leite (leite UHT desnatado, UHT gordo e leite cru) a que foram adicionadas quantidades rigorosas de ABs tendo os valores de recuperação obtidos sido adequados para todas as amostras. A metodologia apresentada é de baixo custo, simples, possui limites de deteção em conformidade com os limites regulamentares, e é promissora para uso na monitorização da qualidade do leite (Yazgan Karacaglar *et al.*, 2020).

Estão disponíveis no mercado ensaios baseados em biossensores óticos, os biochips. Estes dispositivos são revestidos com anticorpos ou recetores específicos para várias classes de ABs, ou apenas para um único AB, permitindo a deteção e quantificação simultânea de diferentes ABs. Esta é a tecnologia por trás do kit Infiniplex® (Randox, Reino Unido), que permite a deteção qualitativa simultânea de quinolonas, penicilinas, cefalosporinas, macrólidos, lincosamidas, aminoglicosídeos, anfenicois e tetraciclina no leite de vaca cru (Gaudin *et al.*, 2018). O kit foi validado de acordo com a decisão europeia EC/2002/657 (CE, 2002) e de acordo com a diretiva europeia para a validação de métodos de rastreio (CRL, 2010). A taxa de falsos positivos reportada foi 1,7%, pelo que a especificidade deste biossensor é bastante satisfatória (Gaudin *et al.*, 2018).

#### 2.4. Uso de alternativas aos antibióticos

O aumento das bactérias resistentes aos ABs impulsionou a investigação científica em áreas direcionadas para a prevenção e controlo de doenças animais com recurso a

tratamentos que não potenciam a resistência antimicrobiana, preservando assim a terapêutica-chave para uso humano. Neste domínio tem sido dada particular atenção o desenvolvimento de vacinas, produtos microbianos derivados, fitoquímicos, produtos imunológicos e enzimas (Garcia *et al.*, 2019).

Os produtos derivados de microrganismos, tais como bacteriófagos, são uma área de investigação reemergente. A atividade científica neste domínio diminuiu após a descoberta dos ABs nos anos 40, ganhando agora particular interesse. Os fagos são vírus, onnipresentes na natureza, que podem ser facilmente isolados, e que infetam e se replicam numa gama estreita de bactérias hospedeiras. Após invasão da célula, iniciam de imediato o seu processo de reprodução, que em pouco tempo leva à lise da bactéria e concomitante libertação de novos fagos (Garcia *et al.*, 2019).

Pesquisas recentes indicam que a utilização de enzimas antimicrobianas, como as endolisinas, pode ser útil na saúde humana e animal. As endolisinas são hidrolases de mureína, que rompem a membrana bacteriana, por clivagem dos peptidoglicanos na parede celular, permitindo que os fagos produzidos sejam libertados da célula hospedeira e reinfectem outras células. Estas enzimas têm o potencial de serem utilizadas na medicina humana para combater bactérias resistentes aos antibióticos (Garcia *et al.*, 2019).

A agricultura biológica e a política de utilização prudente de antibióticos têm levado à exploração de compostos orgânicos e ecológicos para a higiene do úbere e o biocontrolo na indústria leiteira. Estes compostos são a primeira linha de defesa na higiene do úbere e o método mais eficaz de prevenção da mastite. Embora a investigação científica sobre as formulações de produtos biológicos seja limitada, muitos líderes da indústria leiteira como a DeLaval oferecem uma variedade de produtos aprovados para utilização em explorações biológicas tanto nos Estados Unidos como na UE. Uma investigação mais aprofundada relativa ao uso de produtos químicos orgânicos e lavagens ácidas, atualmente utilizados como aditivos e conservantes em alimentos para prolongar o prazo de validade e reduzir a contaminação microbiana, pode revelar-se valiosa para fazer avançar esta área de investigação (Garcia *et al.*, 2019).

A proibição do uso de ABs como promotores de crescimento no gado pela UE impulsionou o uso de probióticos pelos produtores de gado (Tabela 11) como forma de

melhorar o desempenho do animal, aumentando, assim a biodisponibilidade dos nutrientes e a conservação alimentar, proporcionando efeitos semelhantes, mas mais seguros em relação aos ABs (Suryadi *et al.*, 2019).

A FAO e a OMS definem os probióticos como “microrganismos vivos que, quando administrados em quantidades adequadas, conferem benefício à saúde do hospedeiro” (Hill *et al.*, 2014). A sua utilização consiste numa alternativa eficiente e segura face aos antibióticos convencionais (Arsene *et al.*, 2021).

Vários estudos demonstraram que a suplementação com probióticos na alimentação animal modifica a microbiota intestinal de forma positiva, diminuindo a proliferação de agentes patogénicos e dos sintomas associados e promovendo a imunidade a nível intestinal. Portanto, como melhoram a microflora intestinal, vão reduzir a transmissão dos agentes patogénicos provenientes de alimentos contaminados, designadamente de *Salmonella*, *Campylobacter*, *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* (Arsene *et al.*, 2021).

**Tabela 11.** Alguns dos microrganismos probióticos usados no gado (Popova, 2017; Suryadi *et al.*, 2019).

Microrganismos	Género	Espécies
Bactérias	Lactobacillus	<i>rhamnosus, reuteri, casei,</i>
	Bacillus	<i>acidophilus.</i>
	Bifidobacterium	<i>coagulans.</i>
	Enterococcus	<i>animalis, bifidium.</i>
Fungos	Aspergillus	<i>faecium</i>
Levedura	Saccharomyces	<i>niger, oryzae</i>
		<i>boulardii</i>

### **III. Conclusão**

A utilização de antibióticos na indústria leiteira é de maior importância para o controle de doenças nos animais (designadamente, a mastite), de forma a manter o seu bem-estar e um elevado nível de produtividade. No entanto, persiste a preocupação quanto aos possíveis riscos associados à existência de resíduos de antibióticos neste alimento, e seus derivados, geralmente decorrentes de más práticas nomeadamente no que concerne a dosagens e períodos de espera necessários após a administração da última dose.

Apesar da incerteza quanto aos possíveis perigos causados pela exposição a longo prazo a estes resíduos presentes nos produtos alimentares é seguro afirmar que foram estes os principais responsáveis pelo aumento da resistência bacteriana, uma ameaça global para a saúde pública.

A redução da quantidade de antibióticos usada na medicina humana e veterinária é, por isso, essencial. Para assegurar o cumprimento desta política de gestão global foi necessário ajustar leis e regulamentos para o uso de ABs em medicina veterinária e garantir procedimentos adequados para monitorizar os RAs nos produtos alimentares de modo a salvaguardar a saúde dos consumidores.

Os objetivos e características dos procedimentos utilizados são diferentes e, globalmente, pertencem a uma de duas categorias: testes de triagem ou métodos de confirmação (em caso de positividade). Os primeiros incluem os ensaios microbiológicos, os imunoensaios e os biossensores. São de mais simples execução, são rápidos e podem ser efetuados por pessoas sem formação específica, sendo adequados como rastreio. No entanto, em caso de positividade, é necessário efetuar procedimentos analíticos mais complicados, demorados e de elevado custo que comprovam a identidade do RA e permitem a sua quantificação. Os procedimentos por LC-MS/MS destacam-se neste campo, sendo referência para os controlos oficiais e de comparação de novas técnicas.

De salientar que apesar de muitos avanços nas técnicas de deteção e quantificação, a preparação de amostras continua a ser um problema que influencia na determinação de ABs no leite e interfere nos procedimentos analíticos. Para a maioria das técnicas citadas, o elevado teor em proteína e gordura do leite é apontado como possível interferência podendo afetar a seletividade, sensibilidade e precisão do método, razão pela qual vários procedimentos implicam etapas prévias de diluição, precipitação e/ou extração.

As perspectivas futuras certamente serão orientadas em pesquisas, para encontrar métodos mais sensíveis, específicos, precisos, baratos e rápidos que possam garantir resultados confiáveis para preservar a saúde do consumidor. Neste panorama os testes de triagem com biossensores representam provavelmente uma ferramenta mais promissora.

Adicionalmente, devem ser promovidas alternativas aos antibióticos, tais como vacinas e a terapia com fagos. O uso de prebióticos e probióticos em alimentação animal e a utilização de ervas medicinais tradicionais devem também ser objeto de investigação mais aprofundada para reduzir, em última análise, o uso de antibióticos na criação de animais.

#### IV. Referências Bibliográficas

- Ahmed, S. *et al.* (2020). Current advances in immunoassays for the detection of antibiotics residues: a review. *Food and Agricultural Immunology*, 31(1), pp. 268-290.
- Alves, C. M. G. *et al.* (2016). Avaliação de Resíduos de Antibióticos no Leite no Recebimento de matéria-prima em Latércios no Estado de Rondônia. *Boletim Técnico da Produção Animal elaborada pela Biblioteca da UNICASTELO/Campus de Descalvado-SP*, 16, pp. 2318-3837.
- Araújo, C. B. *et al.* (2017). ANÁLISE DA OCORRÊNCIA DE RESÍDUOS DE ANTIBIÓTICOS EM LEITE PROVENIENTE DE PROPRIEDADES EM PATOS DE MINAS. *Revista Agroveterinária, Negócios e Tecnologias*, 2, pp. 08-25.
- Arsene, M. M. J. *et al.* (2021). The use of probiotics in animal feeding for safe production and as potential alternatives to antibiotics. *Vet World*, 14(2), pp. 319-328.
- Aslam, B. *et al.* (2021). Antibiotic Resistance: One Health One World Outlook. *Front Cell Infect Microbiol*, 11, pp. 1-20.
- Beltrán, M. C. *et al.* (2014). Detection of antibiotics in sheep milk by receptor-binding assays. *International Dairy Journal*, 34(2), pp. 184-189.
- Castillo-Aguirre, A. *et al.* (2021). Determination of veterinary antibiotics in cow milk using rotating-disk sorptive extraction and liquid chromatography. *Microchemical Journal*, 162, pp. 1-9.
- CE. (2002). Decisão da Comissão de 12 de Agosto de 2002 que dá execução ao disposto na Directiva 96/23/CE do Conselho relativamente ao desempenho de métodos analíticos e à interpretação de resultados [Em linha]. Disponível em <<https://eur-lex.europa.eu/legal-content/PT/TXT/PDF/?uri=CELEX:32002D0657&from=pt>> [Consultado em 1 de abril/2023].
- CE. (2009). Regulamento (CE) N.º 470/2009 do Parlamento Europeu e do Conselho de 6 de Maio de 2009 que prevê procedimentos comunitários para o estabelecimento de limites máximos de resíduos de substâncias farmacologicamente activas nos alimentos de origem animal, que revoga o Regulamento (CEE) n.º 2377/90 do Conselho e que altera a Directiva 2001/82/CE do Parlamento Europeu e do Conselho e o Regulamento (CE) n.º 726/2004 do Parlamento Europeu e do Conselho [Em linha]. Disponível em <<https://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2009:152:0011:0022:pt:PDF>> [Consultado em 15 de janeiro/2023].
- Chen, J., Ying, G. G. e Deng, W. J. (2019). Antibiotic Residues in Food: Extraction, Analysis, and Human Health Concerns. *J Agric Food Chem*, 67(27), pp. 7569-7586.

- Chowdhury, S. *et al.* (2015). Antibiotic residues in milk and eggs of commercial and local farms at Chittagong, Bangladesh. *Vet World*, 8(4), pp. 467-471.
- CRL. (2010). GUIDELINES FOR THE VALIDATION OF SCREENING METHODS FOR RESIDUES OF VETERINARY MEDICINES [Em linha]. Disponível em <[https://food.ec.europa.eu/system/files/2016-10/cs\\_vet-med-residues\\_guideline\\_validation\\_screening\\_en.pdf](https://food.ec.europa.eu/system/files/2016-10/cs_vet-med-residues_guideline_validation_screening_en.pdf)> [Consultado em 20 de julho/2023].
- de Faria, L. V. *et al.* (2021). Electrochemical methods for the determination of antibiotic residues in milk: A critical review. *Anal Chim Acta*, 1173, pp. 1-24.
- DGAV. (2021). Regulamento dos Medicamentos Veterinários- Utilização de Medicamentos Veterinários Contendo Antimicrobianos [Em linha]. [Consultado em 14 de julho/2023].
- DGAV. (2022a). Publicação do 12º relatório ESVAC [Em linha]. Disponível em <<https://www.dgav.pt/destaques/conteudo/publicacao-do-12o-relatorio-esvac/>> [Consultado em 10 de julho/2023].
- DGAV. (2022b). Sales trends (mg/PCU) of antibiotic VMPs PORTUGAL for food-producing animals [Em linha]. Disponível em <[https://www.dgav.pt/wp-content/uploads/2022/11/pcu-antibiotic-veterinary-medicinal-products-food-producing-animals-2010-2021\\_en.pdf](https://www.dgav.pt/wp-content/uploads/2022/11/pcu-antibiotic-veterinary-medicinal-products-food-producing-animals-2010-2021_en.pdf)> [Consultado em 5 de junho/2023].
- Durel, L., Gallina, G. e Pellet, T. (2019). Assessment of ceftiofur residues in cow milk using commercial screening test kits. *Vet Rec Open*, 6(1), pp. 1-7.
- EFSA. (2014). Report for 2012 on the results from the monitoring of veterinary medicinal product residues and other substances in live animals and animal products [Em linha]. Disponível em <<https://efsa.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.2903/sp.efsa.2013.EN-363>> [Consultado em 24 de novembro/2022].
- EMA. (2020). Categorisation of antibiotics used in animals promotes responsible use to protect public and animal health [Em linha]. Disponível em <[https://www.ema.europa.eu/en/documents/press-release/categorisation-antibiotics-used-animals-promotes-responsible-use-protect-public-animal-health\\_en.pdf](https://www.ema.europa.eu/en/documents/press-release/categorisation-antibiotics-used-animals-promotes-responsible-use-protect-public-animal-health_en.pdf)> [Consultado em 8 de julho/2023].
- Fang, J. *et al.* (2019). Evaluation of gas chromatography-atmospheric pressure chemical ionization tandem mass spectrometry as an alternative to gas chromatography tandem mass spectrometry for the determination of polychlorinated biphenyls and polybrominated diphenyl ethers. *Chemosphere*, 225, pp. 288-294.
- FAO. (2019). Dairy and dairy products [Em linha]. Disponível em <[https://www.fao.org/3/CA4076EN/CA4076EN\\_Chapter7\\_Dairy.pdf](https://www.fao.org/3/CA4076EN/CA4076EN_Chapter7_Dairy.pdf)> [Consultado em 6 de maio/2023].
- Freitas, C. R. *et al.* (2017). ANÁLISE DA OCORRÊNCIA DE RESÍDUOS DE ANTIBIÓTICOS EM LEITE PROVENIENTE DE PROPRIEDADES EM

- PATOS DE MINAS – MG. *Revista Agroveterinária, Negócios e Tecnologias*, 2, pp. 08-25.
- Fu, X. *et al.* (2021). Mechanism and Prevention of Ototoxicity Induced by Aminoglycosides. *Front Cell Neurosci*, 15, pp. 1-8.
- Garcia, S. N., Osburn, B. I. e Cullor, J. S. (2019). A one health perspective on dairy production and dairy food safety. *One Health*, 7, pp. 2352-7714.
- Gaudin, V. *et al.* (2018). Multiplex immunoassay based on biochip technology for the screening of antibiotic residues in milk: validation according to the European guideline. *Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess*, 35(12), pp. 2348-2365.
- Guedes, C. C. *et al.* (2022). Avaliação da utilização da espectrofotometria de uv/vis na quantificação de antibióticos em extratos de leite de vaca. *Revista da Faculdade Ciências da Saúde*, 6, pp. 232-243.
- Halabi, S. F. (2015). The Codex Alimentarius Commission, Corporate Influence, and International Trade: A Perspective on FDA's Global Role. *Am J Law Med*, 41(2-3), pp. 406-421.
- Hill, C. *et al.* (2014). Expert consensus document. The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 11(8), pp. 506-514.
- Holko, I. *et al.* (2019). Prevalence and antimicrobial susceptibility of udder pathogens isolated from dairy cows in Slovakia. *J Dairy Res*, 86(4), pp. 436-439.
- Hosain, M. Z., Kabir, S. M. L. e Kamal, M. M. (2021). Antimicrobial uses for livestock production in developing countries. *Vet World*, 14(1), pp. 210-221.
- INE. (2021). Consumo humano de leite e produtos lácteos per capita (kg/ hab.) [Em linha]. Disponível em [https://www.ine.pt/xportal/xmain?xpid=INE&xpgid=ine\\_indicadores&indOcorCod=0000214&contexto=bd&selTab=tab2](https://www.ine.pt/xportal/xmain?xpid=INE&xpgid=ine_indicadores&indOcorCod=0000214&contexto=bd&selTab=tab2) [Consultado em 10 de maio/2023].
- Jamali, H. *et al.* (2018). Invited review: Incidence, risk factors, and effects of clinical mastitis recurrence in dairy cows. *J Dairy Sci*, 101(6), pp. 4729-4746.
- Jindal, P. *et al.* (2021). Epidemiological assessment of antibiotic residues in dairy farm milk and farm waste and water in northern India. *Environ Sci Pollut Res Int*, 28(23), pp. 29455-29466.
- Kiszkiel-Taudul, I., Starczewska, B. e Wierzbowska, M. (2023). Development of chromatographic techniques connected with corona and tandem mass spectrometry detection systems for determination of amoxicillin in bovine milk. *Food Control*, 144, pp. 15-245.
- Kojok, H. E. *et al.* (2022). Microbiological and chemical evaluation of dairy products commercialized in the Lebanese market. *Vet World*, 15(11), pp. 2575-2586.

- Kumar, A., Panda, A. K. e Sharma, N. (2022). Determination of antibiotic residues in bovine milk by HPLC-DAD and assessment of human health risks in Northwestern Himalayan region, India. *J Food Sci Technol*, 59(1), pp. 95-104.
- Kurjogi, M. *et al.* (2019). Detection and determination of stability of the antibiotic residues in cow's milk. *PLoS One*, 14(10), pp. e0223475.
- Lobato, L. C. e De Los Santos, R. J. (2019). RESÍDUOS DE ANTIBIÓTICOS NO LEITE: CAUSAS E IMPACTOS PARA A INDÚSTRIA E SAÚDE PÚBLICA. *Faculdade de Veterinária, curso de Mestrado Profissional em Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 7, pp. 232-250.
- Lu, G. *et al.* (2021). Status of antibiotic residues and detection techniques used in Chinese milk: A systematic review based on cross-sectional surveillance data. *Food Res Int*, 147, pp. 110450.
- Madougou, A. M. *et al.* (2019). Survey on the presence of antibiotic residues in raw milk samples from six sites of the dairy pool of Niamey, Niger. *Vet World*, 12(12), pp. 1970-1974.
- MedVet. (2017a). RESUMO DAS CARACTERÍSTICAS DO MEDICAMENTO- Estreptomicina [Em linha]. Disponível em <<https://medvet.dgav.pt/products/1134-01-17nfvpt-depomicina-200-mg-200-mg-suspensao-injetavel-para-bovinos-suinos-ovinos-equinos-caes-e-gatos-7667>> [Consultado em 11 de março/2023].
- MedVet. (2017b). RESUMO DAS CARACTERÍSTICAS DO MEDICAMENTO- Sulfadiazina [Em linha]. Disponível em <<https://medvet.dgav.pt/products/1153-01-17dfvpt-diatrim-200-mg-ml-40-mg-ml-solucao-injetavel-7999>> [Consultado em 11 de março/2023].
- MedVet. (2017c). RESUMO DAS CARACTERÍSTICAS DO MEDICAMENTO - Oxitretaciclina [Em linha]. Disponível em <<https://medvet.dgav.pt/products/1048-01-16nfvpt-terramicina-la-200-mg-ml-solucao-injetavel-para-bovinos-ovinos-caprinos-e-suinos-7601>> [Consultado em 11 de março /2023].
- MedVet. (2018). RESUMO DAS CARACTERÍSTICAS DO MEDICAMENTO- Ampicilina [Em linha]. Disponível em <<https://medvet.dgav.pt/products/611-01-12nfvpt-albipen-la-100-mg-ml-suspensao-injetavel-para-bovinos-ovinos-suinos-caes-e-gatos-3629>> [Consultado em 11 de março/2023].
- Moretti, S. *et al.* (2016). Multiclass method for the determination of 62 antibiotics in milk. *J Mass Spectrom*, 51(9), pp. 792-804.
- Mushtaq, S. *et al.* (2018). Bovine mastitis: An appraisal of its alternative herbal cure. *Microb Pathog*, 114, pp. 357-361.
- O'Neill, J. (2016). TACKLING DRUG-RESISTANT INFECTIONS GLOBALLY: FINAL REPORT AND RECOMMENDATIONS. *THE REVIEW ON ANTIMICROBIAL RESISTANCE*, pp. 1-84.

- Overgaauw, P. A. M. *et al.* (2020). A One Health Perspective on the Human-Companion Animal Relationship with Emphasis on Zoonotic Aspects. *Int J Environ Res Public Health*, 17(11), pp. 297.
- Parmar, J. K. *et al.* (2021). Assessment of various veterinary drug residues in animal originated food products. *Veterinary World*, pp. 1650-1664.
- Pereira, M. N. e Scussel, V. M. (2017). Resíduos de antimicrobianos em leite bovino: fonte de contaminação, impactos e controle. *Revista de Ciências Agroveterinárias*, 16(2), pp. 170-182.
- Popova, T. (2017). Effect of probiotics in poultry for improving meat quality. *Current Opinion in Food Science*, 14, pp. 72-77.
- Quigley, L. *et al.* (2013). The complex microbiota of raw milk. *FEMS Microbiol Rev*, 37(5), pp. 664-698.
- Rahman, M. S., Hassan, M. M. e Chowdhury, S. (2021). Determination of antibiotic residues in milk and assessment of human health risk in Bangladesh. *Heliyon*, 7(8), pp. 2405-8440.
- Reis, A. C. *et al.* (2020). Biodegradation of antibiotics: The new resistance determinants - part II. *N Biotechnol*, 54, pp. 13-27.
- Ribeiro, B. V., Ferreira, L. F. e Franco, D. L. (2022). Advances in biosensor development for the determination of antibiotics in cow's milk - A review. *Talanta Open*, 6, pp. 1-14.
- Sachi, S. *et al.* (2019). Antibiotic residues in milk: Past, present, and future. *J Adv Vet Anim Res*, 6(3), pp. 315-332.
- Sahebi, H. *et al.* (2023). Rapid determination of multiclass antibiotics and their metabolites in milk using ionic liquid-modified magnetic chitosan nanoparticles followed by UPLC-MS/MS. *Talanta*, 253, pp. 039-9140.
- Suryadi, U. *et al.* (2019). Evaluation of effects of a novel probiotic feed supplement on the quality of broiler meat. *Vet World*, 12(11), pp. 1775-1778.
- Tasci, F., Canbay, H. S. e Doganturk, M. (2021). Determination of antibiotics and their metabolites in milk by liquid chromatography-tandem mass spectrometry method. *Food Control*, 127, pp. 956-7135.
- Treiber, M. F. e Beranek-Knauer, H (2021). Antimicrobial Residues in Food from Animal Origin- A Review of the Literature Focusing on Products Collected in Stores and Markets Worldwide, *Antibiotics*, 10 (534), pp. 1-15.
- UE. (2003). Regulamento (CE) N.º 1831/2003 do Parlamento Europeu e do Conselho relativo aos aditivos destinados à alimentação animal [Em linha]. Disponível em <<https://eur-lex.europa.eu/legal-content/PT/TXT/PDF/?uri=CELEX:32003R1831>> [Consultado em 8 de abril/2023].

- UE. (2009). Regulamento (CE) n.º 1069/2009 do Parlamento Europeu e do Conselho de 21 de Outubro de 2009 que define regras sanitárias relativas a subprodutos animais e produtos derivados não destinados ao consumo humano e que revoga o Regulamento (CE) n.º 1774/2002 (regulamento relativo aos subprodutos animais) [Em linha]. Disponível em <<https://eur-lex.europa.eu/legal-content/PT/TXT/PDF/?uri=CELEX:32009R1069&from=HU>> [Consultado em 8 de abril/2023].
- UE. (2010). Regulamento (UE) N.º 37/2010 da Comissão de 22 de Dezembro de 2009 relativo a substâncias farmacologicamente activas e respectiva classificação no que respeita aos limites máximos de resíduos nos alimentos de origem animal [Em linha]. Disponível em <<https://eur-lex.europa.eu/legal-content/PT/TXT/PDF/?uri=CELEX:32010R0037&from=DA>> [Consultado em 10 de julho/2023].
- UE. (2019a). Regulamento (UE) 2019/6 do Parlamento Europeu e do Conselho de 11 de dezembro de 2018 relativo aos medicamentos veterinários e que revoga a Diretiva 2001/82/CE [Em linha]. Disponível em <<https://eur-lex.europa.eu/legal-content/PT/TXT/PDF/?uri=CELEX:32019R0006&from=EN>> [Consultado em 8 de julho/2023].
- UE. (2019b). Regulamento Delegado (UE) 2019/2090 DA COMISSÃO de 19 de junho de 2019 que complementa o Regulamento (UE) 2017/625 do Parlamento Europeu e do Conselho no que diz respeito aos casos de suspeita de incumprimento ou de incumprimento comprovado das regras da União aplicáveis à utilização ou aos resíduos de substâncias farmacologicamente ativas autorizadas em medicamentos veterinários ou como aditivos para a alimentação animal ou das regras da União aplicáveis à utilização ou aos resíduos de substâncias farmacologicamente ativas proibidas ou não autorizadas [Em linha]. Disponível em <<https://eur-lex.europa.eu/legal-content/PT/TXT/PDF/?uri=CELEX:32019R2090>> [Consultado em 10 de julho/2023].
- Vercelli, C. *et al.* (2023). A review on the most frequently used methods to detect antibiotic residues in bovine raw milk. *International Dairy Journal*, 144, pp. 958-994.
- Yaghoubi, S. *et al.* (2022). Tigecycline antibacterial activity, clinical effectiveness, and mechanisms and epidemiology of resistance: narrative review. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 41(7), pp. 1003-1022.
- Yazgan Karacaglar, N. N. *et al.* (2020). Development of a green fluorescence protein (GFP)-based bioassay for detection of antibiotics and its application in milk. *J Food Sci*, 85(2), pp. 500-509.