



ESCOLA SUPERIOR DE TECNOLOGIA DA SAÚDE DO PORTO

INSTITUTO POLITÉCNICO DO PORTO

“ Desenvolvimento de métodos de extração de resíduos de antimicrobianos e quantificação em amostras alimentares”

Dissertação submetida à Escola Superior de Tecnologia da Saúde do Porto para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do Grau de Mestre em Bioquímica em Saúde, no ramo de Biotecnologia realizada sob a orientação científica do Professora Doutora Cristina Prudêncio, coorientação da Professora Doutora Mónica Vieira.

Outubro, 2014

Desenvolvimento de métodos de extração de resíduos de antimicrobianos e quantificação em amostras alimentares

Agradecimentos

À Escola Superior de Tecnologia da Saúde do Porto, em especial a Área Científica das Ciências Químicas e das Biomoléculas pelo acolhimento.

À Professora Doutora Mónica Vieira por toda a disponibilidade, simpatia e orientação científica incondicional, apoio e palavras encorajadoras, paciência, críticas e sugestões construtivas, um enorme e sincero agradecimento.

À Professora Doutora Cristina Prudêncio, o meu agradecimento pelo apoio e incentivo demonstrado ao longo desse projeto, e pelo exemplo em alcançar os seus objetivos.

À minha família, meu Pai, meu irmão e em especial à minha Mãe, pelo suporte, ajuda, apoio, paciência, carinho e incentivo que sempre revelaram ao longo de todo o meu percurso académico.

A todos os meus colegas do Mestrado em Bioquímica em Saúde pelas tardes, noites e fins de semana partilhados, pelos momentos de diversão e desespero que para sempre ficarão na minha memória, em especial à Liliana Silva e Liliana Correia, por me ajudarem em todos os momentos bons e menos bons, à Paula de Brito pelo carinho e palavras de coragem, ao Patrick Pais, meu eterno “parceiro” de laboratório e também à Rita Ferreira por toda a ajuda e carinho... Um muito obrigada.

A todos, que ao longo desse projeto, contribuíram para sua concretização, os meus profundos e sinceros agradecimentos.

Resumo

O leite é um alimento complexo, pela sua composição rico em água, proteínas, lípidos, vitaminas e minerais. Devido ao seu alto valor nutricional é fundamental para a amamentação de crianças e animais em crescimento, pois fornece componentes fundamentais para o desenvolvimento e manutenção da saúde.

Os antimicrobianos são amplamente utilizados como uma medida terapêutica no tratamento de infecções bacterianas, profilaxia e como promotores de crescimento (aditivos). A presença de resíduos de antimicrobianos no leite pode representar riscos para a saúde humana, como reações alérgicas em indivíduos hipersensíveis e resistências.

Os objetivos deste estudo são o desenvolvimento de novos métodos de limpeza e de pré-concentração para amostras de leite, por meio de extração em fase sólida (SPE), com a finalidade de realizar uma melhor identificação e quantificação de antimicrobiana por Cromatografia Líquida de Alta Performance (HPLC).

Todos os métodos desenvolvidos são de fácil execução, com taxas de recuperação dos agentes antimicrobianos viáveis, com uma percentagem de recuperação a partir de 85%. O método cromatográfico utilizado para a detecção e quantificação (HPLC-DAD) têm os limites de detecção (LD) entre 2.43ng / mL e 1.62ng / mL e os limites de quantificação (LQ) entre 7,36 ng / mL e 4.92 ng / mL, o que significa este método vai de encontro às diretrizes estipuladas pela União Europeia para os agentes antimicrobianos estudados.

A combinação dos métodos propostos de limpeza e pré-concentração por SPE e multirresíduo por HPLC-DAD permite, por conseguinte, a detecção e quantificação de resíduos de antibióticos no leite, tornando esta uma alternativa importante e útil no processo de controlo de qualidade para a indústria de alimentos e outras área.

Abstract

Milk as a complex food has water in its composition, proteins, lipids, vitamins and minerals. Due to its high nutritional value is a key to breastfeeding, children and animals growing, because it provides fundamental components for development and maintenance of health.

Antimicrobial are widely used as a therapeutic measure in the treatment of bacterial infections, disease prophylaxis and as a growth promoter (food additives). The presence of antimicrobial residues in milk may represent risks for human health, namely allergic reactions on hypersensitive individuals, or even cause problems indirectly by development of resistant strains of bacteria.

The aims of the study is a development of new clean-up and preconcentration methods for milk samples, through a solid-phase extraction (SPE), in order to perform a better identification and quantification of antimicrobial by High-Performance Liquid Chromatography (HPLC).

All developed methods showed ease of execution and recovery rates, for antimicrobial agents used and percentage of viable recovery up from 85%.

The chromatographic method used for the detection and quantification (HPLC-DAD) have the limits of detection (LD) of 2.43ng / mL and 162ng / mL and limits of quantification (LQ) of 7.36 ng / ml and 492 ng / mL, which means this method meets the guidelines stipulated by the European Union for antimicrobial studied.

The combination of the proposed methods of clean-up and pre- concentration by SPE and multiresidue HPLC-DAD allows, therefore, the detection and quantification of antimicrobial residues in milk, making this an important and useful alternative in quality control process for the food industry and other.

Índice

Agradecimentos	III
Resumo	IV
Abstract	V
Índice de Abreviaturas.....	VIII
Índice de Figuras	IX
Índice de Tabelas.....	X
1. Introdução.....	2
1.1. O Leite	2
1.2. Antimicrobianos e Antibióticos.....	3
1.3. Classificação dos antimicrobianos	3
1.4. Inibidores da síntese da parede celular	4
1.4.1. Inibidores da síntese da membrana plasmática	6
1.4.2. Inibidores da síntese de proteínas.....	7
1.4.3. Inibidores da síntese de ácidos nucleicos.....	10
1.5. Resistências Antibacterianas.....	12
1.5.1. Resistência intrínseca aos antimicrobianos.....	13
1.5.2. Resistência adquirida aos antimicrobianos.....	13
1.6. Mecanismos de resistência aos antimicrobianos	14
1.7. Principais grupos de antimicrobianos utilizados na medicina veterinária	14
1.8. Utilização de antimicrobianos na agropecuária	14
1.8.1. Utilização de antimicrobianos no tratamento terapêutico e profilaxia...	15
1.8.2. Utilização de antimicrobianos como promotores de crescimento.....	15
1.9. Resíduos de antimicrobianos de uso veterinário	17
1.10. Métodos de detecção de resíduos de antimicrobianos no leite	18
1.10.1. Métodos analíticos	18
1.10.2. Métodos rápidos	19
1.11. <i>Solid Phase Extraction</i> (SPE).....	19
2. Material e Métodos.....	23
2.1 Material	23
2.1.1. Padrões de antimicrobianos	23
2.1.2. Amostras	25

2.1.3. <i>Solid Phase Extraction</i> (SPE)	25
2.1.4. <i>High-Performance Liquid Chromatography</i> (HPLC-DAD)	26
2.1.5. Equipamentos adicionais	26
2.2. Métodos	26
3. Desenvolvimento dos métodos em SPE	31
3.1. Desenvolvimento dos métodos em SPE para extração de padrões de antimicrobianos estudados	31
4. Resultados	38
4.1. Comprimentos de onda dos antimicrobianos analisados	38
4.2. Quantificação de antimicrobianos nas amostras de leite	40
4.3. Dopagem da amostra	41
5. Discussão/ Conclusão	44
6. Perspetivas Futuras	49
7. Referências Bibliográficas	51

Índice de Abreviaturas

AB- Agente Antimicrobiano

AMOX- Amoxicilina

APC- Antimicrobianos Promotores do Crescimento

CIPRO- Ciprofloxacina

CLOR- Cloranfenicol

CLOX- Cloxacilina

DAD- Diode Array Detetor

EARSS- European Antimicrobial Resistance Surveillance System

ESAC- European Surveillance of Antimicrobial Consumption

HPLC- High-Performance Liquid Chromatography

IUPAC- International Union of Pure and Applied Chemistry

LD- Limite de Detecção

LQ- Limite de Quantificação

mRNA- Ácido Ribonucleico Mensageiro

OMS- Organização Mundial de Saúde

PABA- Para-aminobenzóico

SULFA- Sulfametoxazol

SPE- Solid Phase Extraction

TCA- Ácido Tricloroacético

TFA- Ácido Trifluoroacético

tRNA - Ácido Ribonucleico de Transporte

UE- União Europei

Índice de Figuras

Figura 1. Mecanismos de ação dos agentes antimicrobianos sobre as bactérias	4
Figura 2. Fases envolvidas no SPE: Acondicionamento da fase estacionária; Passagem da amostra; Lavagem da amostra e Eluição	19
Figura 3. Curva de calibração da mistura dos cinco agentes antimicrobianos	26
Figura 4. Condições cromatográficas utilizadas para identificação e quantificação de antimicrobianos nas amostras de leite	28

Índice de Tabelas

Tabela I. Antibióticos que inibem da síntese da parede celular	5
Tabela II. Antibióticos que inibem a síntese da membrana plasmática	6
Tabela III. Antibióticos que inibem a síntese de proteínas	8
Tabela IV. Antibióticos que inibem a síntese de ácidos nucleicos	10
Tabela V. Antibióticos que inibem os processos metabólicos	11
Tabela VI. Antimicrobianos promotores de crescimento permitidos na UE	17
Tabela VII. Agentes antimicrobianos utilizados no método cromatográfico	24
Tabela VIII. Amostras de leite colhidas no distrito do Porto e distritos limítrofes	25
Tabela IX. Limite de Detecção (LD) e Limite de Quantificação (LQ) dos cinco agentes antimicrobianos	28
Tabela X. Divisão das amostras por grupos para a análise cromatográfica	31
Tabela XI. Procedimento usado no método de <i>clean-up</i> SPE	32
Tabela XII. Divisão das amostras por grupos para a análise cromatográfica	33
Tabela XIII. Procedimento usado no método de <i>clean-up</i> SPE	33
Tabela XIV. Divisão das amostras por grupos para a análise	34
Tabela XV. Procedimento usado no método de <i>clean-up</i> SPE	35
Tabela XVI. Divisão das amostras por grupos para a análise cromatográfica	36
Tabela XVII. Quantificação do padrão interno CIPRO nas amostras de leite	39
Tabela XVIII. Quantificação do padrão interno SULFA das amostras de leite para o método 3	40

Tabela XIX. Quantificação do padrão interno SULFA das amostras de leite para o método 4 40

Tabela XX Média das áreas e tempos de retenção do padrão interno SUFA nas amostras 41

Tabela XXI Média do padrão interno SUFA antes e após da desproteinização e percentagem por grupos 42

Capítulo I- Introdução

1. Introdução

1.1. O Leite

O leite é considerado uma fonte importante de nutrientes, devido à sua complexidade nutricional pela sua composição rica em água, proteínas, lipídios, vitaminas e minerais, diferenciando-se por propriedades tendo em conta o tipo de tratamento realizado, dando origem a várias tipologias de leite: leite cru (sem tratamento), leite pasteurizado e leite ultrapasteurizado (Nascimento, Maestro, & Campos, 2001). O seu elevado valor nutritivo é fundamental para lactantes, crianças e animais em crescimento fornecendo componentes fundamentais para o desenvolvimento e saúde (Martin, 2011).

A composição química do leite pode ser alterada por vários fatores: a raça do animal, a idade, a alimentação, a lactação, variações climáticas, ou ainda por infeções na glândula mamária. (Silva, Silva, & Ribeiro, 2012). A sua constituição pode ser um meio favorável ao desenvolvimento de microrganismos patogénicos, o que pode representar um risco à saúde humana, por contaminações de resíduos de antimicrobianos ou outros medicamentos veterinários (FAO & OMS, 2009; Martin, 2011). A presença deste tipo de resíduos representa problemas para a indústria e para a saúde pública, nomeadamente, reações alérgicas em indivíduos hipersensíveis ou através do desenvolvimento de estirpes resistentes a bactérias (Tillotson, Doern, & Blondeau, 2006).

A qualidade do leite é definida pela ausência de microrganismos patogénicos, ausência de conservantes químicos, resíduos de antimicrobianos e outros fármacos, pesticidas, para além do sabor e odor (Silva et al., 2012).

O processo de pasteurização do leite é indispensável para o consumo, pois garante uma melhor qualidade da produção do alimento, bem como da saúde do consumidor. De acordo com a OMS, a temperatura necessária para a pasteurização é de 72°C por 15 segundos ou 63°C durante 30 minutos (WHO, 2000). No entanto, alguns autores relatam que a mesma pode neutralizar ou destruir componentes importantes como proteínas, nutrientes, hidratos de carbono, vitaminas e enzimas (Jay-Russell, 2010; Newkirk, Hedberg, & Bender, 2011; Oliver, Boor, Murphy, & Murinda, 2009).

Relativamente à contaminação do leite cru por microrganismos patogénicos e oportunistas, esta pode ocorrer devido a diversos fatores como o contacto direto com a matéria fecal do animal, doenças em bovinos (mastites), contaminação ambiental, convivência com outros animais ou até mesmo através de humanos (Kateete, Kabugo, & Joloba, 2013; Liu, Luo, & Zhang, 2013; Nutrition, 2013) .

1.2. Antimicrobianos e Antibióticos

Os antimicrobianos são produtos naturais ou sintéticos produzidos em laboratórios, capazes de destruir microrganismos ou de inibir o seu crescimento. O principal objetivo do uso de um antimicrobiano é o de prevenir ou tratar uma infeção bacteriana e, se possível, preservar a flora normal do organismo (Manuel, Ferreira, & Conceição, 2004). Por sua vez, um antibiótico é um termo mais restrito, referindo-se a uma fonte natural do agente antimicrobiano, enquanto que, um quimioterápico é um agente antimicrobiano químico sintético (Fernandes, Amador, & Prudêncio, 2013).

A descoberta e introdução de agentes antimicrobianos na medicina humana foi considerada um grande avanço científico, conferindo-lhe a apelido de “arma milagrosa” no combate às doenças causadas por bactérias (Levy, 1992) . Os antimicrobianos podem apresentar duas funções distintas, a inibição do crescimento bacteriano através da ação bacteriostática ou a sua destruição por uma ação bactericida (Hilal-Dandan & Brunton, 2013; Pankey & Sabath, 2013).

1.3. Classificação dos antimicrobianos

A classificação dos antibióticos baseia-se no seu mecanismo de ação, ou seja, o local onde é exercido o efeito antibacteriano sobre a bactéria, como é possível de se observado na Figura 1.

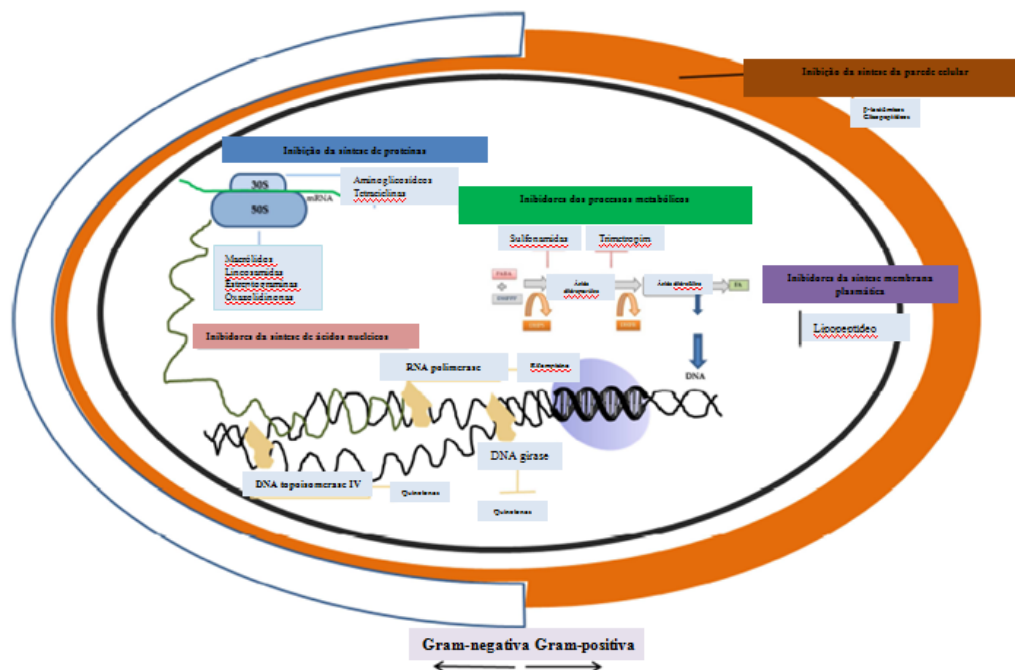


Figura 1: Mecanismos de ação dos agentes antimicrobianos sobre as bactérias (Adaptado de Vieira, 2013) .

Desta forma, a classificação dos antibióticos é feita pelos seguintes subtipos:

- Inibidores da síntese da parede celular;
- Inibidores da síntese membrana plasmática;
- Inibidores da síntese de proteínas;
- Inibidores da síntese de ácidos nucleicos;
- Inibidores dos processos metabólicos (Hilal-Dandan & Brunton, 2013; Tenover, 2006).

1.4. Inibidores da síntese da parede celular

O modo de ação destes antibióticos é pela inibição da síntese de componentes da parede celular, nomeadamente do peptidoglicano (Hilal-Dandan & Brunton, 2013). Na Tabela I estão representados os antibióticos que atuam neste modo de ação.

Tabela I. Antibióticos que inibem da síntese da parede celular – (Adaptado de Bambeke, Glupczynski, Mingeot-Leclercq, & Tulkens, 2010; Bazan & Martin, 2010; Fernandes et al., 2013; Kanafani & Corey, 2009; Kisgen & Whitney, 2008)

Classe	Subclasse	Exemplo de Fármaco	Espectro de Ação	
β-lactâmicos	Penicilinas	Penicilina G	Espectro limitado; β-lactamases sensíveis	
		Amoxicilina	Largo espectro	
		Cloxacilina, Dicloxacilina	Espectro limitado; β-lactamases resistentes	
	Cefalosporinas	1ª Geração	Cefacetila	Amplo espectro Gram-positivas; espectro moderado para Gram-negativas aeróbias
		2ª Geração	Cefaclor	Espectro Moderado Gram-positivas, Gram-negativas, Gram-negativas anaeróbias e Gram-positivas anaeróbias
		3ª Geração	Cefbuperazona, Cefixima,	Amplo espectro Gram-positivas e Gram-negativas
		4ª Geração	Cefepima	Amplo espectro Gram-positivas aeróbias e Gram-negativas aeróbias e anaeróbias.
		5ª Geração	Ceftobiprola,	Espectro estendido Gram-positivas MDR e Gram-negativas
		Cefamicinas	Cefoxitina,	Amplo espectro Gram-positivas e Gram-negativas aeróbias; Gram-positivas e Gram-negativas anaeróbias
		Carbapenemes	Imipenem	Gram-positivas Gram-negativas
	Monobactâmicos	Aztreonam,	Gram – negativas	
	Bacitracina		Gram-positivas	
	Glicopeptídeos	Vancomicina	Gram-positivas	

Os β -lactâmicos caracterizam-se pelo seu anel β -lactâmicos, incluindo-se neste grupo as penicilinas, cefalosporinas, carbapenemes e os monobactâmicos. Estes antibióticos inibem a enzima transpetidase, que catalisa a reação de transpeptidação entre as cadeias peptidoglicanas da parede celular das bactérias. O mecanismo de ação baseia-se na capacidade do antibacteriano atravessar a parede externa bacteriana e ligar-se aos recetores específicos, o PBPs (*Penicillin Binding Proteins*), e conseguir inativa-los (Cartaxo, Almeida, Souza, Santana, & Coutinho, 2005; Ferreira, Ferreira, Almeida, Naveca, & Barbosa, 2011).

A bacitracina é um antibiótico produzido pela bactéria *Bacillus subtilis* que atua nas bactérias Gram-positivas, bloqueio da passagem do pirofosfato-bactoprenol a fosfobactoprenol (Murray, Rosenthal, & Pfaller, 2010).

Os glicopeptídeos, por sua vez, inibem a síntese da parede celular bacteriana através da ligação à extremidade terminal D-alanil-D-alanina das cadeias peptídicas que constituem a parede celular das bactérias (Guimarães, Momesso, & Pupo, 2010).

1.4.1. Inibidores da síntese da membrana plasmática

Na tabela II estão representados os antibióticos que atuam na inibição da síntese da membrana plasmática.

Tabela II. Antibióticos que inibem a síntese da membrana plasmática (Adaptado de Vieira, 2013)

Classe	Subclasse	Exemplo de Fármaco	Espectro de Ação
Lipopeptídeo	Polimixinas	Polimixinas B	Gram-negativas
		Polimixinas E	
		Daptomicina	MDR Gram-positivas
		Surfactina	Gram-positivas; Gram-negativas
		Equinocandinas	Antifúngico

Os lipopeptídeos atravessam e modificam as membranas celulares de todas as tipologias bacterianas. As polimixinas são sintetizadas por estirpes de *Bacillus polimyxa*, formando um grupo de antibióticos que atua em bactérias Gram-negativas

através da membrana celular externa. Atualmente, as polimixinas B e E são utilizadas clinicamente, esta última vulgarmente designada de colistina e sintetizada pelo *Bacillus colistinus* (Mendes & Burdmann, 2009).

A daptomicina é um lipopeptídeo cíclico ativado na presença de bactérias Gram-positivas, exclusivamente. O seu mecanismo de ação caracteriza-se pela sua ligação a membrana bacteriana, originando a rápida despolarização do potencial de membrana, intervindo na síntese de proteica, no Ácido Desoxirribonucleico (ADN) e no Ácido Ribonucleico (ARN), e portanto, à morte do microrganismo (Boucher & G., 2007; Luna, Rodriguez-Noriega, Bavestrello, & Gotuzzo, 2010).

1.4.2. Inibidores da síntese de proteínas

Os antibióticos que inibem a síntese proteica atuam nos ribossomas subunidades 30S e 50S das bactérias (Hilal-Dandan & Brunton, 2013). Na tabela III estão representados os antibióticos com ação ao nível da síntese de proteínas.

Tabela III. Antibióticos que inibem a síntese de proteínas (Adaptado de Vieira, 2013)

Classe	Exemplo de Fármaco	Espectro de Ação	Local de Ação
Aminoglicosídeos	Estreptomicina	Amplo espectro Bacilos Gram-negativas Gram-positivas aeróbias	30S
Tetraciclina	Clortetraciclina	Amplo espectro Gram-positivas (aeróbios e anaeróbios) Gram-negativas (aeróbios e anaeróbios)	
Estreptograminas	Virginiamicina	Espectro estendido MDR Gram-positivas	
Cloranfenicol	Cloranfenicol	Bactérias anaeróbias, Gram -	
Macrólidos	Eritromicina	Bactérias Gram -, Gram + anaeróbias e aeróbios	50S
Lincosamidas	Clindamicina	Gram-positivas aeróbias Gram-negativas anaeróbias Gram-positivas	
Oxazolidinonas	Linezolida	Espectro estendido MDR Gram-positivas	

Os aminoglicosídeos exercem o seu efeito por ligação aos ribossomas bacterianos, através das porinas presentes na membrana externa das bactérias. É um antibiótico bactericida que atua na subunidade 30S dos ribossomas e a inibe a síntese proteica de duas formas distintas, por interferência no complexo de iniciação ou através de erros de leitura no mRNA (Ácido Ribonucleico mensageiro) (Hilal-Dandan & Brunton, 2013; J. Oliveira & Burdman, 2006).

As tetraciclinas possuem amplo espectro de ação, atuam na ligação reversível à subunidade 30S do ribossoma, bloqueando a ligação do tRNA (Ácido Ribonucleico de transporte), inibindo a síntese de novas proteínas (Couto, Montenegro, & Reis, 2000; Hilal-Dandan & Brunton, 2013).

As estreptograminas podem ser bacteriostáticos ou bactericidas. Ligam-se à subunidade 30S do ribossoma, inibindo a ligação do tRNA e a translocação do mRNA (Tenson, Lovmar, & Ehrenberg, 2003).

O cloranfenicol é um antibiótico bacteriostático de amplo espectro, sintetizado pela estirpe *Streptomyces venezuelae*, destinado ao tratamento de várias doenças infecciosas. O mecanismo de ação atua através da ligação reversível à subunidade 50S do ribossoma, que impede a ligação do tRNA, evitando a formação de um novo aminoácido (Hilal-Dandan & Brunton, 2013; Pezza, Ríos, Nozal, Arce, & Valcárcel, 2006). Em 1994, a União Europeia (UE) proibiu este antimicrobiano em alimentos de origem animal, devido à sua associação com a anemia aplástica (produção insuficiente de plaquetas, glóbulos vermelho e brancos) e com propriedades carcinogênicas (European Community Regulations; Scortichini et al., 2005).

Os macrólidos normalmente são antibióticos bacteriostáticos, no entanto em concentrações elevadas, podem ter um efeito bactericida. Estes atuam na inibição da síntese proteica, através da ligação reversível à subunidade 50S do ribossoma, impedindo a transpeptidação e translocação e subsequentemente a morte da célula bacteriana (Luisi et al., 2012).

As lincosamidas são antibióticos bacteriostáticos, o seu mecanismo de ação atua por alteração da superfície bacteriana através da ligação à subunidade 50S do ribossoma, impedindo a elongação das proteínas (Hilal-Dandan & Brunton, 2013).

De todos os antibióticos inibidores da síntese proteica, a linezolida diferencia-se dos restantes antibióticos pelo seu peculiar mecanismo de ação. Este liga-se à subunidade 50S do ribossoma, de modo a alterar o local de ligação do tRNA, impedindo a formação do complexo 70S (Hilal-Dandan & Brunton, 2013).

1.4.3. Inibidores da síntese de ácidos nucleicos

Na tabela IV estão descritos os antibióticos que atuam como inibidores da síntese de ácidos nucleicos.

Tabela IV. Antibióticos que inibem a síntese de ácidos nucleicos (Bambeke, Michot, Eldere, & Tulkens, 2005).

Classe	Subclasse	Exemplo de Fármaco	Espectro de Ação
Quinolonas	Fluoroquinolonas	1ª Geração Flumequina	Espectro estreito para estirpes Gram-negativas
		2ª Geração Ciprofloxacina	Ampla espectro Gram-positivas (aeróbios e anaeróbios); Gram-negativas
		3ª Geração Esparfloxacina	Gram-positivas e não típicos patógenos
		4ª Geração Movifloxacina	Gram-positivas resistentes à penicilina, Anaeróbios obrigatórios
5-nitroimidazol		Metronidazol	Bactérias anaeróbias e outros microrganismos

As quinolonas são antibióticos bactericidas de amplo espectro de ação, o seu mecanismo de ação atua na inibição das enzimas topoisomerase II e IV, impedindo a replicação e transcrição do ADN (Reece & Maxwell, 1991).

Ainda no grupo das quinolonas, a flumequina é considerada um antibiótico de 1ª Geração, sem utilização clínica terapêutica atualmente. As quinolonas de 2ª Geração apresentam na sua estrutura um átomo de flúor na posição C-6, conferindo-lhes uma maior eficácia contra bactérias Gram-negativas. A 3ª Geração das quinolonas atua em bactérias Gram-positiva e microrganismos anaeróbios. O aumento do espectro de ação das quinolonas da 3ª Geração foi obtido através da introdução de um grupo metoxi, na posição C-8, e um anel piperazínico na posição C-7. A 4ª Geração não possui o átomo de flúor na posição C-6, no entanto, foram inseridos em sua composição substituintes com ação antibacteriana (Bambeke et al., 2005).

O 5-nitroimidazol é um bacteriostático de ação em bactérias anaeróbias e protozoários, promovendo a redução do grupo nitro, por ação de mecanismos redox presentes nas cadeias transportadoras. O composto reduzido atua ao nível do ADN, por processos de fixação, interrompendo mecanismos de síntese (Jenks & Edwards, 2002).

1.4.4. Inibidores dos processos metabólicos

Na tabela V estão representados os antimicrobianos pertencentes a classe dos inibidores dos processos celulares.

Tabela V. Antibióticos que inibem os processos metabólicos – (Adaptado de Vieira, 2013)

Classe	Subclasse	Exemplo de Fármaco	Espectro de Ação
Sulfonamidas		Sulfametoxazol	Gram-negativas Cocos: <i>Branhamella catarrhalis</i>

As sulfonamidas são antimicrobianos bacteriostáticos sintéticos de amplo espectro de ação, quer em bactérias Gram-positivas e quer em Gram-negativas, com similaridades estruturais ao do ácido para-aminobenzóico (PABA), usado pelas bactérias na síntese de ácido fólico, competindo com estas para a síntese do diidropteroato. Quando existe a ligação do composto com o recetor do PABA a síntese de ácido fólico é

comprometida e conseqüentemente os mecanismos metabólicos decorrentes deste processo são interrompidos (Pérez-Trallero & Iglesia, 2003).

1.5. Resistências Antibacterianas

A resistência aos antimicrobianos evidencia-se como uma das grandes preocupações mundiais da ciência e da medicina moderna da atualidade (Nathan & Cars, 2014). O mecanismo de resistência é adquirido pela capacidade da bactéria em proliferar *in vitro*, na presença de um determinado antimicrobiano nas mesmas concentrações de uso clínico. Apresentando-se como um mecanismo de adaptação que influencia a seleção das estirpes bacterianas resistentes na população (Castro, Fernandes, & Franco, 2014; F. Oliveira, Lima, Moura, Nunes, & Oliveira, 2011; Trabulsi & Alterthum, 2008).

A prescrição arbitrária de antimicrobianos, que influenciou uso excessivo ou inadequado destes fármacos na medicina humana ou na agropecuária permitiu a transmissão de patógenos resistentes mundialmente (Gurgel & Carvalho, 2008).

As redes de vigilância epidemiológica reúnem dados referentes a padrões de suscetibilidade microbiana, no que diz respeito à variação regional e temporal, de forma a orientar as recomendações terapêuticas e a decisão em prática clínica. Na Europa, o sistema de monitorização da evolução das resistências bacterianas, *The European Antimicrobial Resistance Surveillance System* (EARSS), existe desde 1998 e integra atualmente um conjunto de 32 países, entre os quais Portugal. Disponibilizando em tempo real dados recolhidos a partir de laboratórios públicos hospitalares, nos vários países, sobre a suscetibilidade de sete bactérias relevantes no continente europeu, o que permite a análise dos padrões de resistência bacteriana ao longo do tempo, entre diferentes regiões e países (EARSS, 2006).

Para além do EARSS existe também, desde 2001, uma rede internacional, *European Surveillance of Antimicrobial Consumption* (ESAC) que promove a vigilância do uso de antibióticos e cruzando os vários sistemas dos vários países europeus, disponibilizando informação que ajuda a compreender imergência da problemática (EARSS, 2006; ESAC, 2006).

As principais conseqüências da resistência antimicrobiana interligam-se com o aumento do custo e do tempo de tratamento, por utilização de medicamentos mais caros e até mais tóxicos; aumento do tempo de hospitalização; aumento da frequência

e da gravidade das infecções hospitalares e aumento da taxa de mortalidade associada a este tipo de infecção (EARSS, 2006; Marques & Zucchi, 2006).

A pertinência de estudos sobre a resistência antimicrobiana na agropecuária, relaciona-se com o uso indiscriminado desses antimicrobianos, tanto na profilaxia e tratamento de doenças, mas principalmente como promotores de crescimento dos animais, com a finalidade de aumentar a eficiência alimentar e por consequência as taxas de crescimento em animais (Santos, Leak, & Rossi, 2006). Os mecanismos de resistência aos antimicrobianos denominam-se por intrínsecos ou adquiridos, quer por transmissão de material genético ou mutações (Santos et al., 2006)

1.5.1. Resistência intrínseca aos antimicrobianos

A resistência intrínseca, como o próprio nome indica, é referente a mecanismos internos de resistência próprios da estirpe de serem resistentes a determinados antimicrobianos (Davies & Davies, 2010). Estes mecanismos de resistência são avaliados pela ineficiência do princípio ativo do antimicrobiano; presença de enzimas capazes de inativar os antimicrobianos ou a própria morfologia da bactéria (Cloete, 2003; McBain, 2001; Wright, 2005).

1.5.2. Resistência adquirida aos antimicrobianos

A resistência adquirida, por sua vez, caracteriza-se pela troca de material genético entre os microrganismos através da transferência horizontal, nomeadamente:

- Conjugação: é a transferência de material genético unidirecional entre duas células, associados a presença de um plasmídeo;
- Transformação: é processo pelo qual a bactéria capta fragmentos de ADN presentes no meio e os engloba no seu próprio ADN;
- Transdução: o ADN é transferido de uma célula bacteriana para outra, através de vírus denominados por bacteriófagos;
- Transposição: segmentos de ADN que apresentam mobilidade para moverem-se entre as sequências de bases. Podem ser sequências de inserção ou transposões (Chen, Christie, & D, 2005; Davies & Davies, 2010).

A transferência adquirida também pode ocorrer por mutação induzida (adição de agentes químicos e radiações), mutação espontânea (inserção, deleção, alteração de

bases) ou por mutações cromossômicas (duplicação, deleção, translocação e inversão).

1.6. Mecanismos de resistência aos antimicrobianos

Os mecanismos que despoletam e caracterizam as resistências dos antimicrobianos podem ser divididos em mecanismos de alteração da permeabilidade (as modificações nos recetores dos antimicrobianos presentes na membrana externa das bactérias, podem diminuir a entrada destes e promover a resistência aos antimicrobianos); ação enzimática (inativação do antimicrobiano por enzimas presentes nas bactérias como é o caso das β -lactamases); bombas de efluxo (diminuição da concentração do antimicrobiano no interior da célula bacteriana, devido ao efluxo do antimicrobiano do meio intracelular para o meio extracelular) e alteração genética do alvo (alteração do local original de ligação do antimicrobiano a bactéria) (Guimarães et al., 2010; Uchil, Kohli, & Swami, 2014).

1.7. Principais grupos de antimicrobianos utilizados na medicina veterinária

Na medicina veterinária, os antimicrobianos mais utilizados pertencem às classes dos β -lactâmicos (penicilinas e cefalosporinas), das tetraciclinas, dos macrólidos, dos aminoglicosídeos e sulfonamidas (Butaye, Devriese, & Haesebrouck, 2003; Mcdermott et al., 2002).

1.8. Utilização de antimicrobianos na agropecuária

As infecções bacterianas, a profilaxia de doenças e a promoção do crescimento (aditivos alimentares) são os principais enfoques de utilização de agentes antimicrobianos de uso veterinário (Butaye et al., 2003; Garmo, Waage, & Reksen, 2010; Livermore, 2005; Rasheed, Thajuddin, Ahamed, Teklemariam, & Jamil, 2014; Schwaiger et al., 2014).

De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), alguns antimicrobianos ou substâncias que são administradas em animais são os mesmos utilizados na prática clínica. Na agropecuária, alguns fármacos são usados extensivamente quer para prevenir doenças ou para promover o crescimento dos animais, sendo este último ponto um fator diferenciador da utilização de antibióticos ao nível veterinário (Anderson, Nelson, Rossiter, & Angulo, 2003; Bager & Helmuth, 2001; OMS, 2012).

Nem todos os países dispõem de estatísticas abrangentes relativamente às quantidades de fármacos utilizados na criação de animais, mas estima-se que mais de 70% desses compostos sejam agentes antimicrobianos (Borges & Leal, 2010). Nos EUA, já em 1999 eram utilizados cerca de 9,3 milhões de kg de antibióticos para a produção animal. Sendo que 87% desse total para uso terapêutico, nomeadamente para prevenção e tratamento, e o restante, como promotor de crescimento animal (Sarmah, Meyer, & Boxall, 2006). Na Europa, também nesse mesmo período, o total consumido foi da ordem dos 3,9 milhões de kg aumentando para cerca de 4,6 milhões de kg de antibióticos destinados à produção animal nos países da comunidade europeia. Sendo que os antimicrobianos com maior taxa de administração foram as tetraciclina, os β -lactâmicos e as cefalosporinas (Kools, Moltmann, & Knacker, 2008).

1.8.1. Utilização de antimicrobianos no tratamento terapêutico e profilaxia

Atualmente, a utilização de antimicrobianos de âmbito veterinário já tem em consideração quer o objetivo do uso, quer a dose assim como a duração do tratamento (Spinosa, Górnaiak, & Bernardi, 2006). O tratamento terapêutico com antimicrobianos pode ser efetuado de forma individual ou em grupo. O procedimento individual é comparável ao do humano, sendo realizados testes laboratoriais e posteriormente realizada a administração dos antimicrobianos por via oral ou através de injetáveis, na dosagem adequada nos animais que apresentam sintomas da doença. Na agropecuária, devido ao número de animais, é dada a preferência à administração em grupo do tratamento (Schwarz, Kehrenberg, & Walsh, 2001).

O uso profilático de antimicrobianos é uma estratégia que deverá ser utilizada com precaução, caracterizando-se pela administração de dosagens abaixo das doses terapêuticas recomendadas, muitas vezes com base em conhecimento empírico e não científico, utilizada de forma individual ou em grupo (Evans, 2005; Spinosa et al., 2006).

1.8.2. Utilização de antimicrobianos como promotores de crescimento

O mecanismo de ação dos antimicrobianos como promotores do crescimento (APC) animal não é bem conhecido, estudos referem que o uso dos APC pode causar resistência antimicrobiana e tornar-se um problema de saúde pública (Diarra & Malouin, 2014). A transmissão das resistências aos seres humanos pode ocorrer

através dos alimentos de origem animal, podendo comprometer a eficácia dos tratamentos com antimicrobianos (Lin, 2014; Wegener, 2003).

Hipóteses sobre os mecanismos de ação incidem sobre a teoria de os nutrientes possuírem proteção contra a ação bacteriana; ou o aumento da absorção de nutrientes ser devida à diminuição do diâmetros barreira intestinal; ou os antimicrobianos podem diminuir a produção de toxinas pelas bactérias intestinais e a possível redução nas infecções intestinais (Butaye et al., 2003; Lorençon et al., 2007).

No entanto, nestes casos os antimicrobianos são administrados em concentrações inferiores ao usual, tornando-se assim insuficientes para eliminar de todas as bactérias patogênicas do organismo, influenciando mecanismos de adaptação e que induzem o aparecimento bactérias resistentes (Kutzepa, 2009).

Na Diretiva 70/524 da legislação da União Europeia (UE) existe uma lista de aditivos utilizados na agropecuária com referência dos limites máximos de mínimos das doses de administração, espécies referentes e períodos de interrupção da administração antes do abate do animal. Na diretiva são ainda incluídos os APC que tenham um efeito positivo na produção animal; não coloquem em perigo a saúde humana ou animal; a origem e os níveis das suas dosagens, e as concentrações permitidas para uso, sem comprometerem os níveis utilizados em terapia ou profilaxia. Por isso mesmo, o uso das penicilinas, tetraciclina, tilosina e sulfonamidas como promotores de crescimento foi suspenso (Butaye et al., 2003). Na tabela VI estão apresentados a lista de aditivos permitidos pela UE.

Tabela VI. Antimicrobianos promotores de crescimento permitidos na UE (Adaptado de Butaye et al., 2003)

Antimicrobianos	Classe	Terapêuticas Relacionadas	Mecanismo de Ação
Bambermicina	Glicolípido		Inibição da síntese da parede celular
Monensina	Ionoforo		Desintegração da membrana celular
Salinomicina	Ionoforo		Desintegração da membrana celular
Avilamicina	Ortosomicina	Everninomicina	Inibição da síntese de proteínas
Efrotomicina	Elfamicina		Inibição da síntese de proteínas

Outros promotores de crescimento utilizados em agropecuária são as hormonas de crescimento, por exemplo, nas vacas leiteiras têm a finalidade de aumentar a produção de leite, carne e produtos de origem animal em geral (Theodoridis, 2013).

Apesar de estudos mencionarem a contribuição no desempenho animal, os APC contribuíram para o incremento das resistências, devido ao consumo de produtos de origem animal, como o leite e carnes.

1.9. Resíduos de antimicrobianos de uso veterinário

A presença de resíduos antimicrobianos nos alimentos tem sido um dos maiores desafios quer para as entidades reguladoras de saúde pública e quer para a indústria alimentar. No leite a presença de resíduos antimicrobianos apresenta-se como um risco à saúde do consumidor, quer pelo desenvolvimento de reações alérgicas (beta-lactâmicos), indução de carcinogénese (cloranfenicol), processos de resistência adaptativos das bactérias da flora normal (Spinosa et al., 2006; Stolker & Brinkman, 2005) e problemas na fermentação. Ou seja, as bactérias lácticas *Streptococcus cremoris* e *Lactobacillus bulgaricus*, sensíveis aos antimicrobianos, são responsáveis pela acidificação e coagulação do leite, no entanto se a amostra estiver contaminada a

coagulação não ocorrerá, interferindo na elaboração de diversos produtos lácteos, como queijo, iogurte e manteiga (Mota, Siva, Freitas, Porto, & Silva, 2005) .

Uma grande parte dos antimicrobianos utilizados na agropecuária para prevenção, tratamento ou como promotores de crescimento é mal absorvida no intestino dos animais. Estima-se que 25% a 75% dos antibióticos consumidos na ração animal podem ser excretados sem serem alterados nas fezes e persistir após a aplicação do adubo no solo. (Gustafson & Bowen, 1997).

A clortetraciclina, oxitetraciclina, enrofloxacina, amoxicilina, florfenicol, lincomicina, tilosina, sulfadiazina e trimetoprina são antimicrobianos frequentemente utilizados na criação de animais, e portanto, apresentam alto potencial de disseminação no ambiente (Boxall, Kolpin, Halling-Sorensen, & Tolls, 2003). No Reino Unido, a amoxicilina, benzilpenicilina, trimetoprim e sulfadiazina foram algumas das substâncias classificadas como prioritárias para realização de estudos de monitoramento ambiental, pelo seu uso excessivo e pela sua toxicidade (Capleton et al., 2006).

É necessário analisar os resíduos de medicamentos veterinários nos alimentos devido a possível utilização irregular desses fármacos, devido ao incumprimento da bula, rótulos e período de carência, que podem resultar em toxicidade aguda e crônica e ainda, em alergias e problemas endócrinos, efeitos possivelmente mutagênicos, carcinogênicos ou teratogênicos, para além do desenvolvimento de resistência aos antimicrobianos. A legislação sobre o uso de medicamentos veterinários na agropecuária é regulada por várias entidades reguladoras em todo o Mundo, contudo há variações consideráveis no processo de regulamentação, já que em alguns países se verifica um controlo altamente legislado e apertado e noutros inspeção mínima (Botsoglou & Fletouris, 2001).

1.10. Métodos de deteção de resíduos de antimicrobianos no leite

1.10.1. Métodos analíticos

Os métodos analíticos para a deteção de resíduos de antimicrobianos da classe dos β -lactâmicos, Cloranfenicol, são o *High-Performance Liquid Chromatography* (HPLC), o *Gas Chromatography* (GC) e eletroforese em gel.

1.10.2. Métodos rápidos

Os métodos rápidos disponíveis para a detecção de antimicrobianos no leite podem ser realizados com kits, tais como *RIDASCREEN*®; *TetraStar*® e apresentam resultados qualitativos (presença ou ausência). A metodologia é simples, de baixo custo em relação aos métodos analíticos convencionais. Esses testes realizam a detecção dos β -lactâmicos, sulfonamidas, tetraciclina, aminoglicosídeos e outras toxinas através de ensaios imunoenzimáticos.

1.11. *Solid Phase Extraction* (SPE)

O *Solid Phase Extraction* (SPE) é um método de extração que requer uma fase sólida e uma fase líquida para isolar um tipo de analito a partir de uma solução. É utilizado para pré-concentrar ou no *clean-up* da amostra, ou seja, remover os componentes que interferem na análise cromatográfica (Sodré, Locatelli, & Jardim, 2010). Na figura 2 apresenta-se o método de eluição das amostras pelo SPE, que geralmente envolve três ou quatro fases.

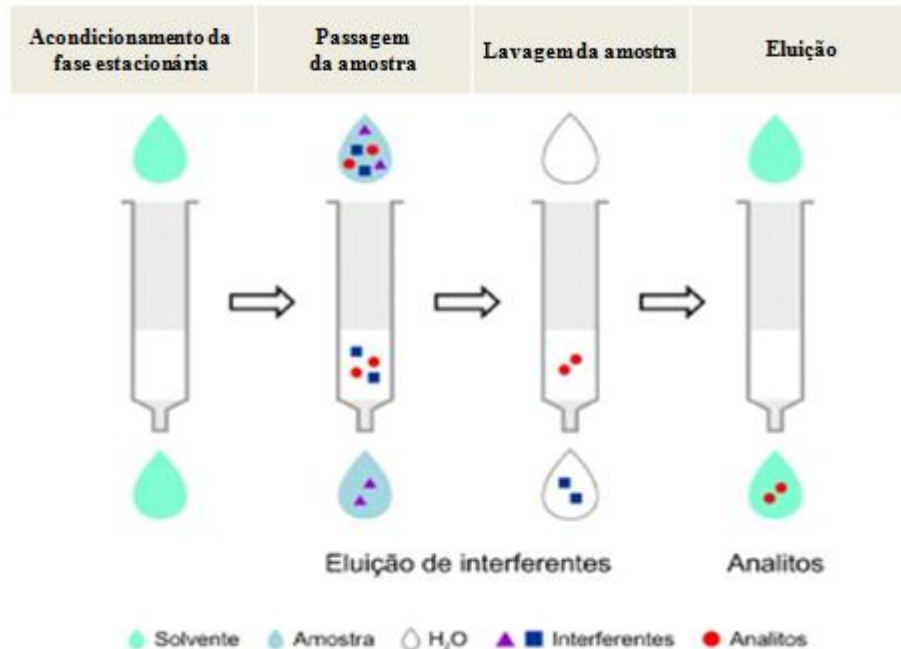


Figura 2: Fases envolvidas no SPE: Acondicionamento da fase estacionária; Passagem da amostra; Lavagem da amostra e Eluição (Adaptado de Caldas et al., 2011)

A primeira fase caracteriza-se pelo acondicionamento da fase estacionária, através de solventes adequados – Acondicionamento da fase estacionária.

A segunda etapa é a passagem da amostra na fase sólida (cartuchos), ou seja, o analito é extraído juntamente com os compostos interferentes da amostra pelo auxílio do sistema de vácuo ou pela ação da gravidade – Passagem da amostra.

Já a terceira fase – Lavagem da amostra - pode ser opcional, a qual envolve a lavagem da fase sólida para remover impurezas, sem remover o analito.

A última fase é a eluição do analito em análise pelo uso de um solvente apropriado à amostra em questão. Nesta fase, o volume do eluente é ajustado de forma a permitir uma máxima recuperação do analito (Barrionuevo & Lanças, 2001; Girotto et al., 2007).

Atualmente existem vários tipos de fases sólidas (cartuchos) para utilização em SPE, como é o exemplo da C-8, da C-18, do Fenil, da Sílica, do Amino, do Ciano, do Florisil, da Poliamina, da 300 A (compostos com polaridade média), LCC (composto com polaridade média), Modo misto (troca de iões hidrofóbicos), Troca Aniônica e Catiônica, Hidrofílico, Lipofílica, Ambiental (hidrofílicas/hidrofóbicas) e HLB (hidrofílicas/hidrofóbicas equilibradas) com volumes de 1mL, 3mL e 6mL (retirado do site x).

Alguns estudos mencionam o uso do SPE no *clean-up* e pré-concentração para facilitar a identificação e quantificação de antimicrobianos em amostras de leite por métodos cromatográficos (Feltrin, Mello, Santos, Marques, & Fontoura, 2007; Martins, Bustillos, Pires, Lebre, & Wang, 2006).

Outras técnicas utilizadas para a extração em fase sólida evidenciam-se a microextração em fase sólida (SPME -*Solid Phase Microextraction*), a extração sortiva em barra magnética (SBSE -*Stir Bar Sorptive Extraction*) e a microextração líquido-líquido dispersiva (DLLME- *Dispersive Liquid-Liquid Microextraction*)(Valente et al., 2000).

Perante o aumento do uso excessivo de antimicrobianos na indústria agropecuária e o aumento da suscetibilidade da passagem dos mesmos para a cadeia alimentar, introduzindo e aumentando a resistência aos antimicrobianos nos humanos é determinante e pertinente o estudo e o desenvolvimento de métodos qualitativos e

quantitativos, rápidos e económicos de deteção dos mesmos para a Saúde Pública, já que Portugal é um dos maiores consumidores de antimicrobianos do Mundo.

O principal objetivo do modelo experimental desenvolvido ao longo desta dissertação, que teve por base o método de identificação e quantificação desenvolvido por Vieira et al., 2013, foi adaptado e testado em amostras de leite para o desenvolvimento de novas metodologias de SPE, que facilitem a identificação e quantificação de antimicrobianos em amostras para futura aplicação na indústria alimentar.

Capítulo II- Material e Métodos

2. Material e Métodos

De acordo com os objetivos propostos anteriormente, decidiu-se testar várias hipóteses de forma a desenhar novos métodos sensíveis de *clean-up* e pré-concentração para o SPE, efetuando-se a análise cromatográfica por HPLC e, posteriormente, a análise dos resultados obtidos.

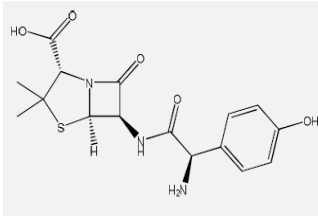
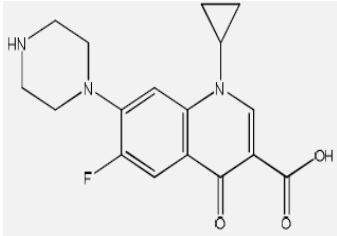
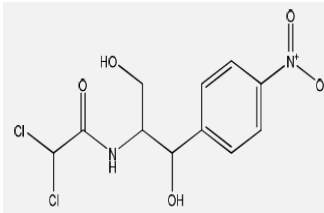
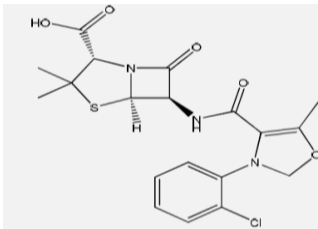
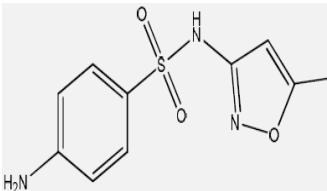
2.1 Material

2.1.1. Padrões de antimicrobianos

Vieira et al. no método que desenvolveu utilizou para a sua análise diversas classes de antimicrobianos, acordo com a classificação adotada (IUPAC): beta-lactâmicos - AMOX, quinolonas -CIPRO, cloranfenicol -CLOR, beta-lactâmicos -CLOX, sulfonamidas - SULFA-, (Sigma-Aldrich, Co., USA). No presente estudo foram utilizados a quinolonas -CIPRO e a sulfonamidas – SULFA.

Os padrões dos referidos antimicrobianos foram preparados com uma concentração de 0,8mg/mL, através da sua dissolução (em pó) em água ultra pura (*Thermo Scientific™ Barnstead™ GenPure™*). Na tabela VII estão representados os agentes antimicrobianos utilizados no método cromatográfico (HPLC), assim como, os padrões usados na análise das amostras.

Tabela VII. Agentes antimicrobianos utilizados no método cromatográfico. Padrões usados na análise das amostras de leite (*) – (Adaptado de Bambeke et al., 2005)

Nome	Grupos de Antimicrobianos	Estrutura Química	Peso molecular g/mol^{-1}	Marca
Amoxicilina (AMOX)	β -lactâmicos	 <p><chem>CC1(C)SC(=O)N1C(=O)N[C@@H](C(=O)Nc2ccc(O)cc2)C</chem></p> <p>$\text{C}_{16}\text{H}_{19}\text{N}_3\text{O}_5\text{S}$</p>	365.4	Sigma-Aldrich, Co., USA
Ciprofloxacina* (CIPRO)	Quinolonas	 <p><chem>CC1(C)NCCN1c2cc(F)c(=O)c(C(=O)O)c2N3C4CC4N3</chem></p> <p>$\text{C}_{17}\text{H}_{18}\text{FN}_3\text{O}_3$</p>	331	Sigma-Aldrich, Co., USA
Cloranfenicol 1 (CLOR)	Cloranfenicol	 <p><chem>ClC(Cl)C(=O)N[C@@H](CO)C[C@@H](O)c1ccc(cc1)[N+](=O)[O-]</chem></p> <p>$\text{C}_{11}\text{H}_{12}\text{Cl}_2\text{N}_2\text{O}_5$</p>	323	Sigma-Aldrich, Co., USA
Cloxacilina (CLOX)	β -lactâmicos (penicilinas)	 <p><chem>CC1(C)SC(=O)N1C(=O)N[C@@H](C(=O)N2C(=O)C(C)OC2)c3cc(Cl)ccc3</chem></p> <p>$\text{C}_{19}\text{H}_{18}\text{ClN}_3\text{O}_5\text{S}$</p>	435.88	Sigma-Aldrich, Co., USA
Sulfametoxazol* (SULFA)	Sulfonamida	 <p><chem>Cc1cc(N)nn1S(=O)(=O)c2ccc(N)cc2</chem></p> <p>$\text{C}_{10}\text{H}_{11}\text{N}_3\text{O}_3\text{S}$</p>	253.28	Sigma-Aldrich, Co., USA

2.1.2. Amostras

As amostras de leite foram recolhidas aleatoriamente em diferentes estabelecimentos comerciais, do distrito do Porto e distritos limítrofes. Tendo sido, posteriormente, identificadas e guardadas sob refrigeração em caixas térmicas a uma temperatura de -80°C até a sua análise laboratorial.

No presente estudo foram utilizadas 12 amostras de leite de vaca de diferentes marcas e tipos, na tabela VIII estão descritas as amostras de acordo com o tipo, quantidade e local da recolha.

Tabela VIII. Amostras de leite colhidas no distrito do Porto e distritos limítrofes.

Tipo de leite	Quantidade	Distrito
Magro	2	Porto
Meio Gordo	4	Porto
Gordo	2	Vila Nova de Gaia
Desidratado	1	Maia
Sem lactose	1	Maia
Sem açúcares	1	Maia
Leite cru	1	Resende/Viseu

2.1.3. *Solid Phase Extraction* (SPE)

2.1.3.1. Equipamento SPE

O equipamento de SPE utilizado dispunha de um sistema com capacidade de análise simultânea de 12 amostras e uma bomba de vácuo Laboport KNF Neureberger. Os cartuchos aplicados foram SPE-C18 de 500mg com volume de 3mL (Lichrolut RP-18 Standard PP).

2.1.3.2. Soluções utilizadas no SPE

As soluções utilizadas para o desenvolvimento dos métodos foram a água ultra pura, o metanol (CH_3OH), a amónia (NH_3), o ácido fosfórico (H_3PO_4) e o ácido acético (CH_3COOH) (Sigma-Aldrich, Co., USA).

2.1.4. High-Performance Liquid Chromatography (HPLC-DAD)

2.1.4.1. Equipamento HPLC

O equipamento de cromatografia utilizado para o estudo foi o sistema *Hitachi® HPLC LaChrom Elite*, constituído por uma bomba quaternária HTA L-2130; série *Lachrom Elite*; um desgaseificador de solventes por vácuo, em linha, incorporado; autosampler L-2200, série *LaChrom Elite*. O detetor utilizado foi o *Diode Array Detetor* (DAD L-2455), série *LaChrom Elite* e o Forno de colunas L-2300, série *LaChrom Elite*.

2.1.4.2. Eluentes utilizados no HPLC

Os eluentes utilizados no decorrer do estudo foram o ácido tricloroacético (TCA- CCl_3COOH), ácido trifluoroacético (TFA- CF_3COOH) e acetonitrilo (CH_3CN) (Sigma-Aldrich, Co., USA).

2.1.4.3. Software de análise

A recolha e tratamento dos dados obtidos nos cromatogramas efetuou-se com o recurso à utilização do *software EZChrom Elite*, série *Lachrom Elite*. A análise estatística e o planeamento experimental foram tratados e analisados através do programa *Microsoft Office Excel 2007*.

2.1.5. Equipamentos adicionais

Outros equipamentos utilizados no decorrer do estudo foram o medidor de pH (pH 211 - *Hanna Instruments*, Portugal), a balança analítica (*Kern ABJ 120-4M*), o *vortex* (*Labnet International, Inc.*), a centrífuga (*Swing-bucket rotor A-4-44 for Centrifuges 5804/5804 R*).

2.2. Métodos

2.2.1. Tratamento das amostras

As amostras de leite foram descongeladas a temperatura ambiente e, seguidamente, homogeneizadas no *vortex* durante 1 minuto. Retiraram-se 2mL de cada amostra para tubos de falcon e acrescentando-se 3mL de TCA em água ultra pura a 20%, segundo o

método de Van Bruijnsvoort et al., (van Bruijnsvoort, Ottink, Jonker, & de Boer, 2004). Em seguida as amostras foram centrifugadas a 8000 rotações por minuto (rpm), durante 10 minutos para a desproteinização das amostras. O sobrenadante foi recolhido e armazenado a uma temperatura de -80°C até à sua análise no HPLC.

2.2.2. SPE

O desenvolvimento dos métodos de extração em fase sólida foi realizado através da otimização do estudo realizado por Kijak et al (Kijak, Jackson, & Shaikh, 1997). Todos os procedimentos executados são descritos na secção 3 do presente estudo, bem como o desenvolvimento dos métodos finais.

2.2.3. HPLC

O método de identificação e quantificação usado neste estudo, o *Monitoring antibiotics in the environment. Study of Quinoxaline derivatives bioactivity* (Vieira, 2013) foi desenvolvido para a análise em simultâneo de cinco tipos de antimicrobianos: Amoxicilina (AMOX), Ciprofloxacina (CIPRO), Sulfametoxazol (SULFA), Cloranfenicol (CLOR) e Cloxacilina (CLOX). Na figura 3 encontram-se representadas as curvas de calibração dos respetivos antimicrobianos.

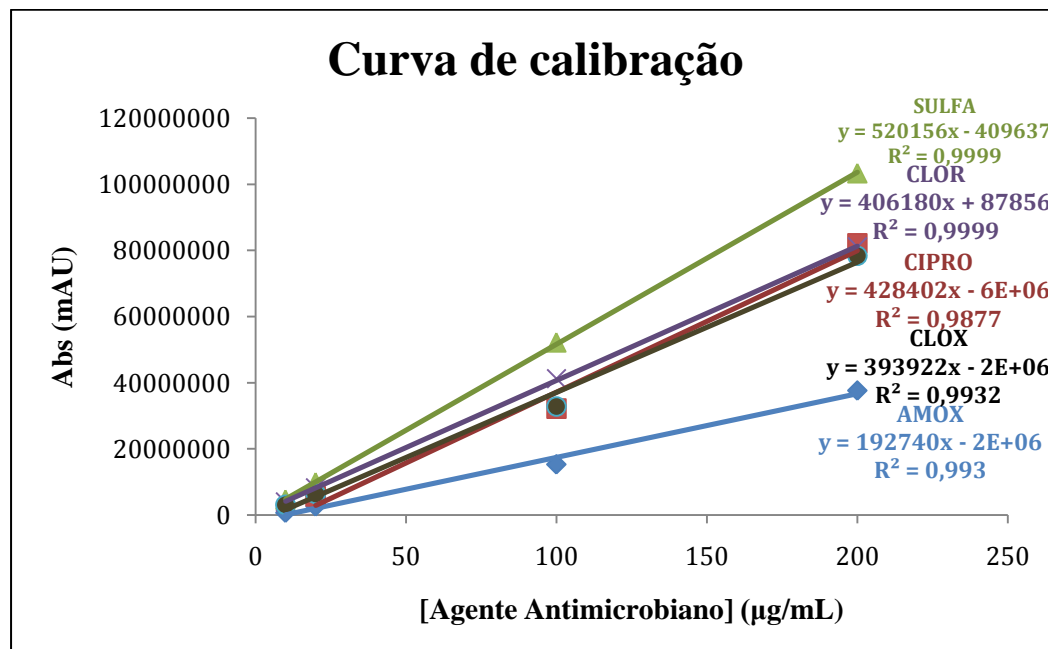


Figura 3: Curva de calibração da mistura dos cinco agentes antimicrobianos (Amoxicilina, Ciprofloxacina, Cloranfenicol, Cloxacilina e Sulfametoxazol) (Adaptado de (Vieira, 2013)).

A Tabela IX apresenta os limites de detecção e quantificação, que representam a seletividade e linearidade, respetivamente, para o método cromatográfico já referenciado.

Tabela IX. Limite de Detecção (LD) e Limite de Quantificação (LQ) dos cinco agentes antimicrobianos.

	AMOX	CIPRO	SULFO	CLOR	CLOX
LD ($\mu\text{g/mL}$)	0.162569	0.044277	0.020993	0.00243	0.135142
LQ ($\mu\text{g/mL}$)	0.492633	0.134173	0.063616	0.007363	0.409523

Para a análise das amostras de leite alterou-se o pH da matriz para 2,2 e mantendo-se em todas as fases do tratamento, para assegurar a estabilidade do agente antimicrobiano.

Utilizou-se uma coluna de fase reversa C18, com 5 μm de tamanho de partícula e 4,6 x 250 mm dimensões internas e forno a 40°C. As amostras foram mantidas a 4°C em *autosampler* e as condições de separação decorreram em sistema de gradiente, com aplicação de uma fase móvel com dois solventes CH_3CN e água com ácido TFA a 0,02% (pH 2.0), a um fluxo de 1mL min^{-1} , durante 25 minutos. As injeções das amostras e padrões foram feitas em triplicado com um volume de 20 μL . O detetor usado foi DAD, com varrimento entre 190 e 400nm. A figura 4 representa as condições cromatográficas usadas na identificação e quantificação dos agentes antimicrobianos.

Desenvolvimento de métodos de extração de resíduos de antimicrobianos e quantificação em amostras alimentares

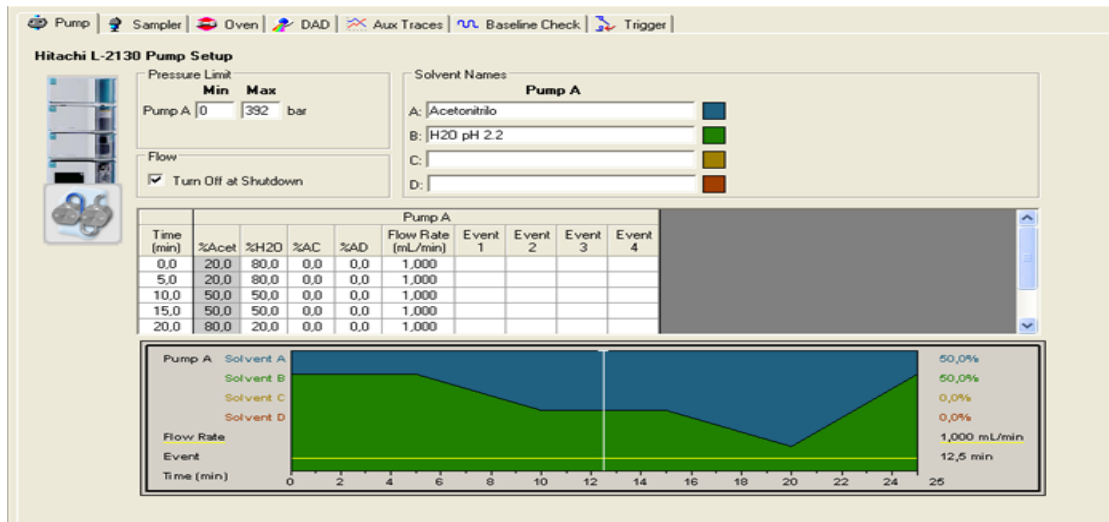


Figura 4: Condições cromatográficas utilizadas para identificação e quantificação de antimicrobianos nas amostras de leite (Vieira, 2013)

Capítulo III- Desenvolvimento dos métodos em SPE

3. Desenvolvimento dos métodos em SPE

3.1. Desenvolvimento dos métodos em SPE para extração de padrões de antimicrobianos estudados

Uma vez que havia sido demonstrado que o método para quantificação simultânea dos 5 antimicrobianos seria apropriado para os ácidos (Vieira, 2013), tentou-se desenvolver métodos de *clean-up* e pré-concentração, para o SPE, em condições semelhantes.

3.1.1. Método número 1

Numa primeira fase do estudo, 12 amostras foram escolhidas aleatoriamente e divididas em 4 grupos (A, B, C e D), num total de 48 amostras por ensaio (ver Tabela X). No grupo A as amostras foram previamente desproteinizadas com TCA 20% e analisadas diretamente no HPLC. No grupo B foram adicionados 200µL do agente antimicrobiano CIPRO, com uma concentração final de 117µg/mL e, em seguida, as amostras foram desproteinizadas com TCA 20% e analisadas no HPLC. No grupo C as amostras foram desproteinizadas com TCA 20%, submetidas ao *clean-up* através da técnica de extração SPE e, posteriormente, analisadas no HPLC. Por último, no grupo D foram adicionados 200µL de CIPRO, com a concentração final de 117µL, as amostras foram desproteinizadas com TCA 20% antes da técnica do SPE e análise no HPLC.

Tabela X. Divisão das amostras por grupos para a análise cromatográfica

Número de Amostras	Grupo	Tipo de Amostras
12	A	Amostras
12	B	Amostra + AB
12	C	Amostra + SPE
12	D	Amostra + AB + SPE

Nota: AB: agente antimicrobiano; SPE: *clean-up* das amostras por extração em fase sólida

Numa abordagem prévia, desenvolveu-se o primeiro método de acordo com a tabela XI. Estes foram passados através do cartucho SPE-C18 com um fluxo de 2-3 gotas por minuto e recolhido para tubos de *falcon* estéreis de 15mL. Em seguida, retirou-se 1mL desta solução e transferiu-se para *vials* de 1 mL para a análise em HPLC-DAD.

Tabela XI. Procedimento usado no método de *clean-up* SPE

	Ordem dos eluentes	Fase	Método 1 Solventes
Acondicionamento da fase estacionária	1	C-18	2 mL metanol
	2	C-18	2 mL água ultra pura
Passagem da amostra	3	C-18	2 mL leite
	4	C-18	4 mL água pura
Lavagem	5	C-18	4 mL água e metanol (1:1)
	6	C-18	4 mL metanol
Eluição dos antimicrobianos	7	C-18	3 mL amónia e metanol a 16% (m/v)

3.1.2. Método número 2

Numa segunda abordagem do estudo, 2 amostras de leite foram selecionadas e divididas em 4 grupos, num total de 8 amostras por ensaio (ver tabela XII). Foram testados diferentes solventes de eluição dos antimicrobianos, de forma a garantir uma melhor percentagem de recuperação das amostras. Em todos os grupos foram adicionados 300µL do agente antimicrobiano CIPRO, com uma concentração final de 104µg/mL e, em seguida, as amostras passaram pela desproteinização com TCA 20%, antes da técnica de extração SPE e análise no HPLC.

Tabela XII. Divisão das amostras por grupos para a análise cromatográfica

Número de amostras	Grupo	Tipo de amostras
2	A	Amostras+AB+SPE
2	B	Amostra+AB+SPE
2	C	Amostra+AB+SPE
2	D	Amostra+AB +SPE

Nota: AB: agente antimicrobiano; SPE: *clean-up* das amostras por extração em fase sólida

Em todos os grupos foram utilizados a mesma ordem de eluentes para o desenvolvimento dos métodos de SPE em meio ácido, com exceção dos solventes de eluição da amostra, de acordo com a tabela XIII. Estes foram passados através do cartucho SPE-C18 com um fluxo de 2-3 gotas por minuto e recolhidos para tubos de *falcon* estéreis de 15mL. Em seguida, retirou-se 1mL desta solução e transferiu-se para *vials* de 1 mL para a análise em HPLC-DAD.

Tabela XIII. Procedimento usado no método de *clean-up* SPE

	Grupos	Ordem dos eluentes	Fase	Método 2 Solventes
Acondicionamento da fase estacionária		1	C-18	2 mL metanol
	A	2	C-18	2 mL água ultra pura
Passagem da amostra	B	3	C-18	2 mL leite
	C	4	C-18	4 mL água pura
	D	4	C-18	4 mL água pura
Lavagem		5	C-18	4 mL água e metanol (1:1)
		6	C-18	4 mL metanol
Eluição dos antimicrobianos	A	7	C-18	3 mL ácido fosfórico pH 5-7
	B	7	C-18	3 mL ácido fosfórico pH 2-4
	C	7	C-18	3 mL ácido acético pH 5-7
	D	7	C-18	3 mL ácido acético pH 2-4

3.1.3. Método número 3 e 4

Na terceira abordagem, repetiu-se um dos ensaios efetuados na primeira fase do estudo (Amostra + AB + SPE), no entanto, com alterações nas quantidades dos eluentes usados. Selecionaram-se 5 amostras de leite, que foram divididas em 2 grupos de forma a perfazer 10 amostras por ensaio (ver tabela XIV). Em ambos os grupos, foram adicionados 300 μ L do agente antimicrobiano SULFA, com uma concentração final de 104 μ g/mL e em seguida, as amostras passaram pela desproteinização com TCA 20% antes da técnica de extração SPE e análise no HPLC.

Tabela XIV. Divisão das amostras por grupos para a análise

Número de amostras	Grupo	Tipo de amostras
5	A	Amostras+AB+SPE
5	B	Amostra+AB+SPE

Nota: AB: agente antimicrobiano; SPE: *clean-up* das amostras por extração em fase sólida

No grupo A, as quantidades de eluentes usadas foram aumentadas duas vezes e no grupo B em três vezes, em relação às utilizadas na primeira fase do estudo.

Na tabela XV desenvolveu-se o método utilizado. Os eluentes foram passados através do cartucho SPE-C18 com um fluxo de 2-3 gotas por minuto e recolhido para tubos de *falcon* estéreis de 15mL. Em seguida, retirou-se 1mL desta solução e transferiu-se para *vials* de 1 mL para a análise em HPLC-DAD.

Tabela XV. Procedimento usado no método de *clean-up* SPE

	Ordem dos eluentes	Fase	Método 3 Solventes Grupo A	Ordem dos eluentes	Fase	Método 4 Solventes Grupo B
Acondicionamento da fase estacionária	1	C-18	4 mL metanol	1	C-18	6 mL metanol
	2	C-18	4 mL água ultra pura	2	C-18	6 mL água ultra pura
Passagem da amostra	3	C-18	2 mL leite	3	C-18	2 mL leite
Lavagem	4	C-18	4 mL água pura	4	C-18	12 mL água pura
	5	C-18	4 mL água e metanol (1:1)	5	C-18	12 mL água e metanol (1:1)
	6	C-18	8 mL metanol	6	C-18	12 mL metanol
Eluição dos antimicrobianos	7	C-18	6 mL amónia e metanol a 16% (m/v)	7	C-18	9 mL amónia e metanol a 16% (m/v)

3.1.4. Dopagem da amostra

Para verificar a influência da desproteínização das amostras de leite, alteraram-se as concentrações do agente antimicrobiano SULFA. Doparam-se as amostras com 3 diferentes concentrações antes e após a desproteínização. Nestes ensaios, usaram-se 5 amostras escolhidas, divididas em 6 grupos, totalizando-se 30 amostras por ensaio. Nos grupos A, B e C, o procedimento de desproteínização realizado foi o mesmo para

todos os testes efetuados ao longo deste estudo: foram adicionados 600µL, 1.0 mL e 1.5mL do agente antimicrobiano SULFA, respetivamente.

Nos grupos D, E e F, as amostras foram previamente desproteinizadas com TCA 20% e em seguida foram adicionados 600µL, 1.0mL e 1.5mL do agente antimicrobiano SULFA, respetivamente (ver tabela XVI). Os 3 volumes de antimicrobiano utilizados na amostra, apresentavam uma concentração final de 184, 267 e 342 µg/mL, respetivamente. As amostras foram analisadas diretamente no HPLC.

Tabela XVI. Divisão das amostras por grupos para a análise cromatográfica

Número de amostras	Grupo	Concentração de AB	Tipo de amostras
Antes da desproteínização			
5	A	600µL	Amostras+AB
5	B	1.0mL	Amostra+AB
5	C	1.5mL	Amostra+AB
Após a desproteínização			
5	D	600µL	Amostras+AB
5	E	1.0mL	Amostra+AB
5	F	1.5mL	Amostra+AB

Nota: AB: agente antimicrobiano

Capítulo IV- Resultados

4. Resultados

O método de análise de HPLC utilizado no presente estudo foi desenvolvido para a análise em simultâneo de cinco tipos de antimicrobianos (Vieira, 2013). Dos dados obtidos analisaram-se os espectros de absorção e os tempos de retenção de todas as amostras em estudo.

4.1. Comprimentos de onda dos antimicrobianos analisados

Os comprimentos de onda seleccionados para monitorizar os analitos são para a maior absorção AMOX= 226 nm, CIPRO=275 nm, CLOR=273 nm, CLOX=215 nm e SULFA= 206 nm.

4.2. Quantificação de antimicrobianos nas amostras de leite

De acordo com a literatura, para validação de procedimentos cromatográficos, as taxas de recuperações devem estar entre 85 e 115% (Lanças, 2004).

4.2.1. Método 1

Na primeira fase do estudo, as amostras do grupo A foram analisadas sem nenhum tratamento prévio, exceto a desproteínização e apresentaram algumas dificuldades na análise direta por HPLC. No grupo B e C, não foi possível detetar a presença do agente antimicrobiano (CIPRO), usado como padrão interno ou qualquer resíduo de antimicrobianos nas amostras observadas.

As amostras estudadas no grupo D, onde foram adicionados 200µL de CIPRO, com a concentração final de 117µg/mL, submetidas ao *clean-up* através da técnica de extração SPE e em seguida analisadas no HPLC, apresentaram uma percentagem de recuperação dentro de intervalo proposto anteriormente por Lanças e tal., (Barrionuevo & Lanças, 2001). Os resultados obtidos estão expressos na tabela XVII.

Tabela XVII. Quantificação do padrão interno CIPRO nas amostras de leite.

Amostra	[CIPRO] µg/mL	%Recuperação CIPRO
1D	79,8	68,21*
2D	127,5	108,94
3D	117,5	100,46
4D	107,9	92,20
5D	105,2	89,93
6D	73,9	63,18*
7D	118,2	101,00
8D	111,1	95,00
9D	108,5	88,10
10D	104,5	89,28
11D	101,7	86,89
12D	104,1	88,96

* Amostras que não estão incluídas na média de percentagem de recuperação de CIPRO

O valor médio para a concentração do padrão interno CIPRO obtido pela análise da amostra foi de $110,61 \pm 7,69$ mg/mL, a percentagem de recuperação foi de $94,54 \pm 6,90\%$, variando entre 86,89 e 108,94%.

4.2.2. Método 2

Neste método 2, nos solventes de eluição utilizados constatou-se que em nenhum deles se observou picos nos cromatogramas obtidos.

4.2.3. Método 3 e 4

Os resultados obtidos estão expressos nas tabelas XVIII e XIX para os grupos A e B, respetivamente.

Tabela XVIII. Quantificação do padrão interno SULFA das amostras de leite para o método 3

Amostra	[SULFA] µg/mL	%Recuperação SULFA
1A	1,40	134,78
2A	1,22	118,10
3A	1,19	114,09
4A	0,97	93,69
5A	1,29	124,44

Tabela XIX. Quantificação do padrão interno SULFA das amostras de leite para o método 4

Amostra	[SULFA] µg/mL	%Recuperação SULFA
1B	1,36	131,13
2B	1,19	115,06
3B	1,33	128,37
4B	0,99	95,48
5B	1,41	136,07

O valor médio para a concentração de SULFA no grupo A obtido pela análise da amostra foi de 1.21 ± 0.15 µg/mL. A percentagem de recuperação foi de $117,02 \pm 15.20\%$, variando entre 93,69e 134,78%.

No grupo B, o valor médio para a concentração de SULFA obtido pela análise da amostra foi de 1.26 ± 0.17 µg/mL. A percentagem de recuperação foi de $121.22 \pm 16.36\%$, variando entre 95.48 e 136.07%

4.3. Dopagem da amostra

Na última fase do trabalho, constituídos pelos diferentes grupos (A, B, C, D, E e F) não se realizou extração por SPE. Na tabela XX, encontram-se representados os resultados da média das áreas e tempos de retenção obtidos no estudo.

Tabela XX. Média das áreas e tempos de retenção do padrão interno SUFA nas amostras

Amostras	[AB]	Média t.r	Média Á	Amostras	[AB]	Média t.r	Média Á
Antes da desproteínização				Após a desproteínização			
A		10,556	1018250	D		10,424	3976682
A		10,442	1795559	D		10,489	4091525
A	600µL	-	-	D	600 µL	10,566	3717563
A		-	-	D		10,509	4041709
A		10,671	1118729	D		10,537	4582769
B		10,513	3396256	E		10,473	6492561
B		10,473	3719474	E		10,466	6095184
B	1.0mL	10,522	4434566	E	1.0mL	10,467	5950403
B		10,4623	4047464	E		10,444	6024087
B		10,440	3300726	E		10,424	6079134
C		10,398	4681379	F		10,455	7028880
C		10,369	5345765	F		10,380	8251926
C	1.5mL	10,426	6333676	F	1.5mL	10,362	9156983
C		10,340	4377919	F		10,338	8002820
C		10,359	5058260	F		10,358	7330414

Na tabela XXI estão os resultados das médias das concentrações do antimicrobiano SULFA obtidas nos ensaios, e a percentagem de acordo com as concentrações do antimicrobiano antes e após a desproteínização das amostras.

Exemplo do cálculo realizado:

$$\text{HPLC (A/D)} \times 100 = 190,82 + 830,31 \times 100 = 22,98\%$$

Tabela XXI. Média do padrão interno SUFA antes e após da desproteínização e percentagem por grupos

Grupos	[SULFA]	Antes da desproteínização	Após a desproteínização	% SULFA
A/D	600 μ L	190,82	830,31	22.98
B/E	1.0mL	774,42	1208,57	64.07
C/F	1.5mL	1029,46	1546,10	66.58

Capítulo V- Conclusão/Discussão

5. Discussão/ Conclusão

A presença de resíduos de antimicrobianos em alimentos de origem animal, como é o exemplo do leite, podem despoletar resistência aos antibióticos apresentando-se um problema de saúde pública.

De acordo com estudos realizados anteriormente, os métodos existentes para a determinação de resíduos de antibióticos em leite bovino requer a separação das proteínas e gorduras do leite. Estas podem interferir na fase de extração, provocando a obstrução dos cartuchos, comprometendo a análise cromatográfica.

O desenvolvimento dos métodos de SPE mostrou-se eficaz na pré-concentração e *clean-up* das amostras de leite. Esta técnica apresentou algumas vantagens, nomeadamente ao nível do uso de pequenos volumes de amostra e de solventes de extração, redução do número de interferentes; rapidez e facilidade de execução, resultando assim numa melhor deteção e quantificação de agentes antimicrobianos nas amostras em estudo.

Os cartuchos C-18 utilizados neste estudo também foram reportados noutros trabalhos, onde apresentaram resultados satisfatórios, ao nível da percentagem de recuperação de antimicrobianos em leites (Furusawa, 2003; Koesukwiwat, Jayanta, & Leepipatpiboon, 2007).

O objetivo essencial deste trabalho, foi desenvolver metodologias para o SPE que permitissem obter uma percentagem de recuperação viável, ou seja, dentro do intervalo de 85 a 115% de percentagem de recuperação.

No 1º método apresentado, mesmo com a desproteínização prévia, foram detetadas dificuldades na análise diretamente no HPLC, devido aos constituintes do leite que mascararam os resultados obtidos. Apesar da adição de 200µL de CIPRO num dos grupos de estudo, com a concentração final de 117µL do agente antimicrobiano, os cromatogramas apresentaram limitação na identificação dos picos. No grupo C, não foi possível calcular a percentagem de recuperação. No grupo D, também foram adicionados 200µL de CIPRO, com a concentração final de 117µL, os resultados obtidos apresentaram uma média de percentagem de recuperação do agente

antimicrobiano CIPRO de $94,54 \pm 6,90\%$ variando desde 86,89% a 108,94% em 10 amostras de leite.

Verificou-se também, que as amostras desproteinizadas apresentavam uma maior facilidade para a análise no HPLC. Para o estudo apresentado, verificou-se que o 1º método apresentava facilidade na execução e percentagens de recuperação para o agente antimicrobiano usado acima dos 85%, como indica a literatura (Barrionuevo & Lanças, 2001)

No segundo método apresentado, Método 2, testaram-se dois diferentes tipos de solventes de lavagem com variação de pH, nomeadamente, o ácido fosfórico (pH 5-7; 2-4) e ácido acético (pH 5-7; 2-4). Os cromatogramas obtidos em todos os grupos (A, B, C e D) não apresentaram picos para todos os solventes de eluição usados, sugerindo que o antimicrobiano e a amostra, tenham sido retidos no processo de extração (SPE).

De acordo com os resultados obtidos na fase inicial, relativamente às percentagens de recuperação, decidiu-se repetir um dos ensaios realizados com a amónia e metanol a 16% (m/v) como o solvente de lavagem no 3º e 4º método. No entanto, o agente antimicrobiano usado foi a SULFA e as quantidades de eluentes foram alterados.

No terceiro método, Método 3, a média das percentagens de recuperação obtidas para o SULFA foi de $117,02 \pm 15,20\%$, variando entre 93,69e 134,78%.

No quarto método, Método 4, a média da percentagem de recuperação para o mesmo agente antimicrobiano foi de $121,22 \pm 16,36\%$, variando entre 95,48 e 136,07%. De acordo com a literatura, ambos os métodos apresentados podem ser aplicáveis à análise do agente antimicrobiano estudado.

Observou-se que nas amostras de leite 1, 2 e 4 (1A, 2A, 1B, 2B, 4A e 4B) no terceiro e quarto método desenvolvidos, os resultados obtidos não apresentavam diferenças significativa nas percentagens de recuperação. Nas amostras 3 e 5 (3B, 3B, 5A e 5B) as percentagens de recuperação obtidas no 4º Método eram superiores em mais de 10% em relação ao 3º método, sugerindo que o tipo de amostra de leite (leite gordo, meio gordo magro, cru, desidratado, sem açúcares e sem lactose) pode influenciar no método de extração (SPE), facilitando ou dificultando o processo.

Na última fase do estudo, a fase de Dopagem das amostras, observou-se que o agente antimicrobiano SULFA utilizado como padrão interno, no decorrer dos cromatogramas obtidos verificou-se que os tempos de retenção aumentaram de análise em análise de HPLC, o que indica houve retenção de compostos (amostra e antimicrobiano) na coluna do HPLC.

A desproteíntização revelou-se influência nos resultados. Nas amostras que eram adicionados o agente antimicrobiano SULFA e em seguida eram desproteíntizadas, observou-se que as áreas obtidas eram menores em relação às amostras que eram previamente desproteíntizadas e em seguida dopadas com agente antimicrobiano. Concluiu-se que a desproteíntização prévia das amostras diminuíam a concentração obtida em todos os grupos estudados, pelo que se sugere perda do antimicrobiano no processo de desproteíntização das amostras.

Após a comparação por grupos (tabela XXI) das concentrações de antimicrobianos utilizados, antes e após a desproteíntização e análise dos resultados obtidos, verificou-se que a média das concentrações do antimicrobiano SULFA nos grupos A-D foram as mais baixas. No entanto, entre os grupos B-E e C-F, os resultados obtidos apresentavam concentrações similares. A perda de antimicrobiano no processo de desproteíntização nos grupos B-E e C-F fora as mesmas, apesar da adição de 0.5mL a mais do antimicrobiano no grupo C-F.

Vários estudos referem a utilização do HPLC com o detetor DAD, para a deteção e determinação de antimicrobianos em leites (Huang, Qiu, & DYuan, 2009; Reyesb & Rath, 2009). Neste estudo, a utilização do método de Vieira et al., em conjunto com os métodos desenvolvidos para o SPE permitiram e facilitaram a identificação e quantificação de resíduos antimicrobianos, especulando-se a sua futura utilização noutras amostras quer de leite quer de outros produtos de origem animal, podendo ser utilizado até em âmbito industrial.

De acordo com a Comissão de Regulação na União Europeia (UE), o Limite Máximo de Resíduos (LMR) refere-se à quantidade máxima permitida de concentração de determinada substância farmacológica ativa presente nos alimentos de origem animal, disponíveis para consumo (*Commission Regulation (EU) No 37/2010, OJ L15, 20.1.2010, p11*).

Os LD e LQ determinados pelo método cromatográfico (HPLC-DAD) apresentam valores abaixo dos LMR estabelecidos pela UE para os cinco antimicrobianos estudados (*Commission Regulation (EU) No 37/2010, OJ L15, 20.1.2010,pl1*). Os valores do LD para os antimicrobianos estão entre 0.00243 µg/mL (CLOR) a 0.162569 µg/mL (AMOX). As percentagens de recuperação obtidas para os métodos 1, 3 e 4 demonstraram que o *clean-up* e pré-concentração das amostras de leite, permitem análises mais eficientes e válidas para este tipo de amostras.

No leite, o LMR é de 100µg/kg para ciprofloxacina e sulfametoxazol, apesar das percentagens de recuperação, para os métodos cromatográficos desenvolvidos (SPE-HPLC-DAD) serem superiores a 85%, não foram encontrados os antimicrobianos estudados nas amostras de leite acima dos valores máximos permitidos.

Das 12 amostras de leite usadas neste estudo, 11 eram UHT (*Ultra-High Temperature*) pressupondo o tratamento a altas temperaturas entre 135 a 150°C, por um curto período de tempo, 2 a 3 segundos (WHO, 2000). Apenas uma amostra estudada tratava-se de leite cru. Não foi possível fazer uma comparação entre leites ultrapasteurizados e cru, devido ao número de amostras não serem suficientes para ambos os tipos.

O 1º Método apresentou percentagens de recuperação acima dos 85%, já o 3º e 4º método apresentaram as melhores percentagens de recuperação, acima dos 93%. De acordo com a literatura, os seguintes métodos referidos podem ser aplicáveis para a análise deste tipo de amostras. As percentagens de recuperação obtidas para os métodos desenvolvidos por SPE demonstraram que o *clean-up* e pré-concentração das amostras de leite são eficientes e válidos.

Em conclusão, o estudo realizado apresenta a combinação dos métodos propostos de *clean-up* e pré-concentração por SPE para a deteção e quantificação por HPLC-DAD em simultâneo de antimicrobianos no leite, tornando-se uma alternativa importante e útil no processo de controlo de qualidade na indústria alimentar, apresentando aplicabilidade em várias áreas relevantes do setor.

Capítulo VI- Perspetivas Futuras

6. Perspetivas Futuras

Relativamente aos trabalhos futuros, propõe-se testar os outros antimicrobianos (AMOX, CLOR e CLOX) referenciados no método de Vieira et al, já que não foi possível realizar esse estudo até ao momento presente.

Igualmente é sugerido testar outros tipos de amostras, nomeadamente, leite cru, leite de soja, leite de cabra, etc.

Dos métodos de SPE desenvolvidos existe ainda a necessidade de cruzar a aplicabilidade de cada um com um tipo de amostra de leite diferente das utilizadas.

É proposto ainda testar outros ácidos na desproteinização das amostras, compreender se há influência entre a escolha dos ácidos e os tipos de amostras.

Capítulo VII- Referências Bibliográficas

7. Referências Bibliográficas

Anderson, D., Nelson, M., Rossiter, S., & Angulo, J. (2003). Public health consequences of use of antimicrobial agents in food animals in the United States. *Microbial Drug Resistance*, 9, 373-379.

Bager, F., & Helmuth, R. (2001). Epidemiology of resistance to quinolones in *Salmonella*. *Veterinary Research*, 32, 285-290.

Bambeke, F. V., Glupczynski, Y., Mingeot-Leclercq, M., & Tulkens, P. (2010). *Infectious Diseases, Section 7, Chapter 130: Mechanisms of Action* (3 ed. Vol. 2). Mosby.

Bambeke, F. V., Michot, J. M., Eldere, j. V., & Tulkens, P. M. (2005). Quinolones in 2005: an update. *Clinical Microbiology and Infection*, 11, 256-280.

Barrionuevo, W., & Lanças, F. (2001). Extração em fase sólida (SPE) e micro extração em fase sólida (SPME) de piretróides em água. *Química Nova*, 24(2). doi: org/10.1590/S0100-40422001000200003

Bazan, A. J., & Martin, I. S. (2010). Ceftaroline fosamil: a novel broad-spectrum cephalosporin (Vol. 46).

Borges, J., & Leal, R. (2010). Comportamento e impacto ambiental de antibióticos usado na produção animal brasileira. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, 34(3), 601-616.

Botsoglou, A., & Fletouris, J. (2001). *Drug residues in food- pharmacology, food safety, and analysis* (M. Dekker Ed. 1 ed.). New York.

Boucher, H. W., & G., G. S. (2007). Perspectives on Daptomycin resistance, with emphasis on resistance in *Staphylococcus aureus*. *Clin Infect Dis.*, 45(5), 601-608.

Boxall, A. B. A., Kolpin, W. D., Halling-Sorensen, B., & Tolls, J. (2003). Are veterinary medicines causing environmental risks? *Environ. Sci. Technol*, 37, 286A-294A.

Butaye, P., Devriese, A., & Haesebrouck, F. (2003). Antimicrobial Growth Promoters Used in Antibiotics on Gram-Positive Bacteria Animal Feed: Effects of Less Well

Known. *Clinical Microbiology Reviews*, 16(2), 175-188. doi: 10.1128/CMR.16.2.175-188.2003

Caldas, S., Gonçalves, F., Primel, E., O Prestes, e, M. M., & Zanella, R. (2011). Modern techniques of sample preparation for pesticide residues determination in water by liquid chromatography with detection by diode array and mass spectrometry. *Química Nova*, 34(9), 1604-1617.

Capleton, A. C., Courage, C., Rumsby, P., Holmes, P., Stutt, E., Boxall, A. B. A., & Levy, S. L. (2006). Prioritising veterinary medicines according to their potential indirect human exposure and toxicity profile. *Toxicol. Lett*, 163, 213-223.

Cartaxo, M. M. R., Almeida, T., Souza, L., Santana, W., & Coutinho, H. (2005). Mechanisms of resistance and detection of beta-lactamases *Ciências Biológicas da Saúde*, 7(1), 59-63.

Castro, A., Fernandes, G., & Franco, O. (2014). Insights into novel antimicrobial compounds and antibiotic resistance genes from soil metagenomes. *Frontiers in Microbiology*, 5(489).

Chen, I., Christie, J., & D, D. D. (2005). The ins and outs of DNA transfer in bacteria. *Science*, 310, 1456-1460. doi: 10.1126/science.1114021

Cloete, T. E. (2003). Resistance mechanisms of bacteria to antimicrobial compounds. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 51(4), 277-282.

Couto, C., Montenegro, M., & Reis, S. (2000). Tetracycline, oxytetracycline and chlortetracycline complexation with copper II. Potentiometric study *Química Nova*, 23(4).

Davies, J., & Davies, D. (2010). Origins and Evolution of Antibiotic Resistance. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 74(3), 417-433. doi: 10.1128/MMBR.00016-10.

Diarra, M., & Malouin, F. (2014). Antibiotics in Canadian poultry productions and anticipated alternatives. *Frontiers in Microbiology*, 5(282).

EARSS, M. T. (2006). EARSS Annual Report 2005. Bilthoven.

ESAC. (2006). Outpatient antibiotic use in Europe. *Antimicrob. Chemother* 2006, 58(2), 401-407.

European Community Regulations, Annexure IV and 1430/94, 1994.

Evans, A. (2005). Tulatromycin: An overview of a new triamilide antimicrobial for livestock respiratory disease. *Vet. Ther. Res. App. Vet. Med.*, 6, 83-95.

FAO, & OMS. (2009). Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. Producción de alimentos de origen animal: código de prácticas de higiene para la leche y los productos lácteos. *CAC/RCP*, 2, 57.

Feltrin, C., Mello, A., Santos, J., Marques, M., & Fontoura, N. S. L. (2007). Sulfadimethoxyne quantification in milk by High-Performance Liquid Chromatography. *Química Nova*, 30(1), 80-82.

Fernandes, R., Amador, P., & Prudêncio, C. (2013). β -Lactams: chemical structure, mode of action and mechanisms of resistance. *Reviews in Medical Microbiology* 24, 7-17.

Ferreira, C., Ferreira, W., Almeida, N., Naveca, F., & Barbosa, M. (2011). Extended-spectrum beta-lactamase-producing bacteria isolated from hematologic patients in Manaus, State of Amazonas, Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology* 42(3), 1076-1084. doi: 10.1590/S1517-838220110003000028

Furusawa, N. (2003). Isolation of tetracyclines in milk using a solid-phase extracting column and water eluent *Talanta* 59(1), 155-159. doi: doi.org/10.1016/S0039-9140(02)00472-1

Garmo, R., Waage, S., & Reksen, O. (2010). Reproductive Performance, Udder Health, and Antibiotic Resistance in Mastitis Bacteria isolated from Norwegian Red cows in Conventional and Organic Farming. *Plos One*, 52(1).

Giroto, G., Nogueira, L., Moura, A., Souza, B., Giacometti, L., & Marchi, M. (2007). Estrógenos em água: otimização da extração em fase sólida utilizando ferramentas quimiométricas. *Eclética Química*, 32(2), 61-67.

Guimarães, D., Momesso, L., & Pupo, M. (2010). Antibiotics: therapeutic importance and perspectives for the discovery and development of new agents. *Química Nova* vol.33, 33(3). doi: org/10.1590/S0100-40422010000300035

Gurgel, T., & Carvalho, A. W. (2008). Assistência Farmacêutica e o Aumento da Resistência Bacteriana aos Antimicrobianos. *Latin American Journal of Pharmacy* 2008; 27 (1): 118-23, 27(1), 118-123.

Gustafson, H., & Bowen, E. (1997). Antibiotic use in animal agriculture. *Journal of Applied Microbiology*, 83, 531-541.

Hilal-Dandan, R., & Brunton, L. (2013). *Manual of Pharmacology and Therapeutics*. Nova Iorque: McGraw Hill.

Huang, X., Qiu, N., & DYuan. (2009). Simple and sensitive monitoring of sulfonamide veterinary residues in milk by stir bar sorptive extraction based on monolithic material and high performance liquid chromatography analysis *Journal of Chromatography A*, 1216(46), 8240-8245. doi: doi.org/10.1016/j.chroma.2009.05.031

Jay-Russell, M. T. (2010). Raw (unpasteurized) milk: are health-conscious consumers making an unhealthy choice? *Clin Infect Dis.*, 51(12), 1418-1419.

Jenks, P., & Edwards, I. (2002). Metronidazole resistance in *Helicobacter pylori*. *International Journal of Antimicrobial Agents* 19, 1-7., 19(1-7).

Kanafani, A. Z., & Corey, R. G. (2009). Ceftaroline: a cephalosporin with expanded Gram-positive activity (Vol. 4).

Kateete, D., Kabugo, U., & Joloba, M. (2013). Prevalence and Antimicrobial Susceptibility Patterns of Bacteria from Milkmen and Cows with Clinical Mastitis in and around Kampala, Uganda. *Plos One*, 8(5).

Kijak, P., Jackson, J., & Shaikh, B. (1997). Determination of gentamicin in bovine milk using liquid chromatography with post-column derivatization and fluorescence detection. *Journal of Chromatography B*, 691 (1997) 377-382, 691, 377-382.

Kisgen, J., & Whitney, D. (2008). Ceftobiprole, a Broad-Spectrum Cephalosporin With Activity against Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *P & T : a peer-reviewed journal for formulary management*, 33, 631-641.

Koesukwiwat, U., Jayanta, S., & Leepipatpiboon, N. (2007). Solid-phase extraction for multiresidue determination of sulfonamides, tetracyclines, and pyrimethamine in Bovine's milk. *Journal of Chromatography A*, 1149(1), 102-111. doi: doi.org/10.1016/j.chroma.2007.02.075

Kools, E., Moltmann, F., & Knacker, T. (2008). Estimating the use of veterinary medicines in the European Union. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 50, 59-65.

Kutzepa, D. (2009). O uso indiscriminado de antibióticos na bovinocultura leiteira uma análise dos riscos para o meio ambiente e a saúde humana. *Fórum ambiental da Alta Paulista IV*, 1-9.

Lanças, M. (2004). *Extração em fase sólida (SPE) (Vol. 1)*. São Carlos: Rima.

Levy, B. (1992). *The antibiotic paradox: how miracle drugs are destroying the miracle*. New York: Plenum.

Lin, J. (2014). Antibiotic growth promoters enhance animal production by targeting intestinal bile salt hydrolase and its producers. *Frontiers in Microbiology*, 5(33). doi: 10.3389/fmicb.2014.00033

Liu, J., Luo, Y., & Zhang, Y. (2013). Anti-Bacterial Activity of Recombinant Human β -Defensin3 Secreted in the Milk of Transgenic Goats Produced by Somatic Cell Nuclear Transfer. *Plos One*, 8(6), 653-679.

Livermore, M. (2005). Minimising antibiotic resistance. *The Lancet Infectious Diseases*, 5, 450-459. doi: 10.1016/S1473-3099(05)70166-3

Lorençon, L., Nunes, R. V., Pozza, P. C., Pozza, M. S., Appelt, M. D., & Silva, W. M. (2007). Utilização de promotores de crescimento para frangos de corte em rações fareladas e peletizadas. *Ata Scientiarum. Animal Sciences*, 29(2), 151-158.

Luisi, F., Gandolfi, T., Daudt, A., Sanvitto, J., Pitrez, P., & Pinto, L. (2012). Efeito anti-inflamatório dos macrolídeos em doenças pulmonares da infância. *Jornal Brasileiro Pneumologia.*, 38(6). doi: doi.org/10.1590/S1806-37132012000600016

Luna, C., Rodriguez-Noriega, E., Bavestrello, L., & Gotuzzo, E. (2010). Tratamento de *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina na América Latina. *Brazilian Journal of Infectious Diseases*, 14(2). doi: org/10.1590/S1413-86702010000800007

Manuel, J., Ferreira, E., & Conceição, G. (2004). Betalactamases de espectro Ampliado (ESBL): um Importante Mecanismo de Resistência Bacteriana e sua Detecção no Laboratório Clínico. *NewsLab*, 152-174.

Marques, D., & Zucchi, P. (2006). Comissões farmacoterapêuticas no Brasil: aquém das diretrizes internacionais. *Panam Salud Publica/Pan Am J Public Health*, 19(1).

Martin, J. (2011). Antimicrobials residues in milk – a review. *Segurança Alimentar e Nutricional*, 18(2), 80-87.

Martins, H., Bustillos, O., Pires, M., Lebre, D., & Wang, A. (2006). Determination of chloramphenicol residues in industrialized milk and honey samples using LC-MS/MS. *Química Nova*, 29(3). doi: org/10.1590/S0100-40422006000300030

McBain, P. G. A. (2001). Biofilms: their impact on health and their recalcitrance toward biocides. *American Journal of Infection Control*, 29(4), 252-255.

Mcdermott, F., Zhao, S., DWagner, Simjee, S., Walker, D., & White, G. (2002). The food safety perspective of antibiotic resistance. *Animal Biotechnology*, New York, 13(1), 71-84.

Mendes, C., & Burdman, E. (2009). Polimixinas - revisão com ênfase na sua nefrotoxicidade. *Revista Associação Médica Brasileira* vol.55 no.6 São Paulo 2009, 55(6). doi: org/10.1590/S0104-42302009000600023

Mota, R., Siva, K., Freitas, M., Porto, W., & Silva, L. (2005). Utilização indiscriminada de antimicrobianos e sua contribuição a multirresistência bacteriana. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*, 42(6), 465-470.

Murray, P., Rosenthal, k., & Pfaller, M. (2010). *Metabolismo e genética bacterianas* (6 ed.). Rio de Janeiro: Elsevier.

Nascimento, F., Maestro, V., & Campos, P. (2001). Ocorrência de resíduos de antibióticos no leite comercializado em Piracicaba. *Revista de Nutrição*, 14(2), 119-124.

Nathan, C., & Cars, O. (2014). Antibiotic Resistance — Problems, Progress, and Prospects. *New England Journal of Medicine*. doi: 10.1056/NEJMp1408040

Newkirk, R., Hedberg, C., & Bender, J. (2011). Establishing a milkborne disease outbreak profile: potential food defense implications. *Foodborne Pathogens and Disease*, 8(3), 433-437.

Nutrition, C. o. I. D. a. C. o. (2013). Consumption of Raw or Unpasteurized Milk and Milk Products by Pregnant Women and Children *American Academy of Pediatrics*, 133;175. doi: doi: 10.1542/peds.2013-3502

Oliveira, F., Lima, L., Moura, M., Nunes, B., & Oliveira, B. (2011). Indiscriminate use of antibiotics and antimicrobial resistance: a reflection on the treatment of hospital infections- Review. *NOVAFAPI*, 4(4), 72-77.

Oliveira, J., & Burdmann, J. C. E. (2006). Aminoglycoside nephrotoxicity. *Braz J Cardiovasc Surg*, 21(4), 444-452.

Oliver, S. P., Boor, K. J., Murphy, S. C., & Murinda, S. E. (2009). Food safety hazards associated with consumption of raw milk. *Foodborne Pathog Dis*, 6(7), 793-806.

OMS, O. M. d. S. (2012). A crescente ameaça da resistência antimicrobiana. Switzerland: Serviço de produção de documentos da OMS, Genebra, Suíça.

Pankey, G., & Sabath, L. (2013). Clinical relevance of bacteriostatic versus bactericidal mechanisms of action in the treatment of Gram positives bacterial infections. *Oxford Journals*, 38(864-865).

Pezza, L., Ríos, À., Nozal, L., Arce, L., & Valcárcel, M. (2006). Simultaneous determination of chloroamphenicol, thiamphenicol and florfenicol residues in bovine milk by micellar electrokinetic chromatography *Química Nova*, 29(5). doi: dx.doi.org/10.1590/S0100-40422006000500008

Pérez-Trallero, E., & Iglesia, L. (2003). Tetraciclina, sulfamidas y metronidazol. *Enferm Infecc Microbiol Clin*, 21(9), 520-529.

Rasheed, M., Thajuddin, N., Ahamed, P., Teklemariam, Z., & Jamil, K. (2014). Antimicrobial drug resistance in strains of *Escherichia coli* isolated from food

sources. Instituto de Medicina Tropical 56(4), 341-346. doi: 10.1590/S0036-46652014000400012

Reece, R., & Maxwell, A. (1991). DNA gyrase: Structure and function. *Critical Review of Biochemical Molecular Biology*, 26, 335-375.

Reyesb, M. M., & Rath, S. (2009). Multiresidue determination of tetracyclines, sulphonamides and chloramphenicol in bovine milk using HPLC-DAD *Food Chemistry*, 117(3), 545-552.

Santos, M., Leak, S., & Rossi, A. (2006). Frequência e suscetibilidade a antimicrobianos de *Staphylococcus* spp isolados de leite de vacas com mastites recorrentes de rebanhos da região de Uberlândia – MG. *Veterinária Notícias*, 12(2), 83-88.

Sarmah, K., Meyer, T., & Boxall, A. (2006). A global perspective on the use, sales, exposure pathways, occurrence, fate and effects of veterinary antibiotics (Vas) in the environment. *Chemosphere*, 65, 725-759.

Schwaiger, K., Harms, K., Bischoff, M., Preikschat, P., Mölle, G., Bauer-Unkauf, I., . . . Hölze, C. S. (2014). Insusceptibility to disinfectants in bacteria from animals, food and humans—is there a link to antimicrobial resistance? *Frontier Microbiology*. 2014; 5: 88, 5, 88. doi: 10.3389/fmicb.2014.00088

Schwarz, S., Kehrenberg, C., & Walsh, T. R. (2001). Use of antimicrobial agents in veterinary medicine and food animal production. *International Journal of Antimicrobial Agents* 17 (2001) 431–437, 17, 431-437.

Scortichini, G., Annunziata, L., Haouet, M. N., Benedetti, F., Krusteva, I., & Galarini, R. (2005). ELISA qualitative screening of chloramphenicol in muscle, eggs, honey and milk: method validation according to the Commission Decision 2002/657/EC criteria *Analytica Chimica Acta*, 535(1-2), 43-48.

Silva, M., Silva, C., & Ribeiro, B. (2012). Resíduos de Antibióticos em Leite. *SaBios: Saúde e Biologia*, 7(1), 30-44.

Sodré, F., Locatelli, M., & Jardim, W. (2010). An in-line clean system for the road the solid-phase extraction of emerging contaminants in natural. *Química Nova*, 33(1), 216-219.

Spinosa, H., Górnaiak, S., & Bernardi, M. (2006). Considerações gerais sobre o uso de antimicrobianos - *Farmacologia Aplicada à Medicina Veterinária* (4 ed.). Rio de Janeiro: Guanabara Koogan.

Stolker, M. A. A., & Brinkman, T. A. U. (2005). Analytical strategies for residue analysis of veterinary drugs and growth-promoting agents in food-producing animals—a review. *Journal of Chromatography A*, 1067, 15-53.

Tenover, F. (2006). Mechanisms of Antimicrobial Resistance in Bacteria. *The American Journal of medicine*, 119(6), S3-S9.

Tenson, T., Lovmar, M., & Ehrenberg, M. (2003). The mechanism of action of macrolides, lincosamides and streptogramin B reveals the nascent peptide exit path in the ribosome. *Journal of Molecular Biology*, 330, 1005-1014.

Theodoridis, G. K. G. (2013). Rapid multimethod for the determination of growth promoters in bovine milk by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography B* 930, 22-29. doi: 10.1016/j.jchromb.2013.04.013

Tillotson, G. S., Doern, G. V., & Blondeau, J. M. (2006). Optimal antimicrobial therapy: the balance of potency and exposure. *Expert Opin Investig Drugs*, 15(4), 335-337.

Trabulsi, L. R., & Alterthum, F. (2008). *Microbiologia*. São Paulo: Atheneu.

Uchil, R., Kohli, G., & Swami, O. (2014). Strategies to Combat Antimicrobial Resistance. *Journal of Clinical and Diagnostic Research*, 8(7).

Valente, A., Augusto, F., absolute, l. d. d.-a. q. q. d.-c.-w. q. q. d.-f.-n. q. T. q. s. q. p., 268px, l., 145.517px, t., 15px, f.-s., . . . Augusto, q. g. e. F. (2000). SPME, Solid Phase Micro-extraction. *Química Nova*, 23(4), 523-530.

Vieira, M. (2013). Monitoring antibiotics in the environment. Study of Quinoxaline derivatives bioactivity. (Doctor), Faculdade de Ciências e Tecnologia, <http://run.unl.pt/handle/10362/11350>.

Wegener, C. H. (2003). Antibiotics in animal feed and their role in resistance development. *Current Opinion in Microbiology*, 6, 439-445. doi: 10.1016/j.mib.2003.09.009

WHO, W. H. O. (2000). Codex Committee on Milk and Milk Products. Food and Agriculture Organization.

Wright, D. (2005). Bacterial resistance to antibiotics: enzymatic degradation and modification. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 57(10), 1451-1470.