

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA
CURSO DE GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA**

BRAYAN VIANA RIBEIRO

**BIOSENSORES PARA DETECÇÃO DE RESÍDUOS DE ANTIBIÓTICOS EM
LEITE DE BOVINOS: CONTEXTUALIZAÇÃO**

**PATOS DE MINAS – MG
OUTUBRO DE 2021**

BRAYAN VIANA RIBEIRO

**BIOSENSORES PARA DETECÇÃO DE RESÍDUOS DE ANTIBIÓTICOS EM
LEITE DE BOVINOS: CONTEXTUALIZAÇÃO**

Monografia apresentada ao Instituto de Biotecnologia da Universidade Federal de Uberlândia como requisito final para obtenção do título de Bacharel em Biotecnologia.

**Orientador: Prof. Dr. Diego Leoni
Franco**

**PATOS DE MINAS – MG
OUTUBRO DE 2021**

BRAYAN VIANA RIBEIRO

**Biossensores para Detecção Resíduos de Antibiótico em Leite de Bovinos:
Contextualização**

Monografia apresentada ao Instituto de Biotecnologia da Universidade Federal de Uberlândia como requisito final para obtenção do título de Bacharel em Biotecnologia.

Banca examinadora:

Dr. Diego Leoni Franco – UFU
Presidente

Dr. Lucas Franco Ferreira – UFVJM
Membro

Dr. Terezinha Aparecida Teixeira – UFU
Membro

Patos de Minas – MG, 25 de outubro de 2021

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente aos meus pais Wartuires e Ivone, bem como meu irmão Pablo, pelo apoio incondicional durante toda a graduação.

Agradeço ao meu orientador Diego, pela cumplicidade e dedicação aos nossos trabalhos.

Agradeço aos amigos e colegas do LEABE, os quais passamos momentos singulares.

Agradeço aos meus colegas e amigos do curso de Biotecnologia, pelos momentos dos quais vivenciamos durante todos esses anos de graduação.

Agradeço ao CNPq pelo apoio financeiro.

RESUMO

Os biossensores proporcionam análises com alta sensibilidade e seletividade requeridas em comparação com métodos tradicionais, associadas à portabilidade e fácil manuseio. Estes dispositivos possuem uma biomolécula imobilizada na superfície do transdutor, com intuito de detectar alterações geradas por uma reação ou interação a nível bioquímico. A aplicação desses dispositivos em diversos campos de estudos, resulta em uma gama de trabalhos e tecnologias desenvolvidas. Uma grande porção desse mercado está concentrado na agroindústria, principalmente no setor da pecuária leiteira, devido ao uso indiscriminado de antibióticos para tratamento de mastites e na terapia da vaca seca. Estima-se que o consumo anual de antibióticos somente para esse setor seja maior que 63.000 toneladas. Portanto, este trabalho apresenta uma revisão bibliográfica dos principais biossensores aplicados à pecuária leiteira, visando discutir a cerca das implicações do uso de antibiótico em bovinos leiteiros e suas consequências em humanos das principais moléculas avaliadas nas provas de conceito. Para efetuar as análises, foram selecionados trabalhos das plataformas PubMed e Periódico CAPES. A escrita foi orientada para descrever as propriedades dos biossensores, em tabelas. Quanto aos artigos, as moléculas de canamicina e cloranfenicol apresentaram maiores quantidades de trabalhos, 18 e 9 respectivamente. Apesar da revisão, o mercado carece de biossensores comerciais, sendo apenas 67 trabalhos listados nos últimos 10 anos com aplicação em amostras de leite de bovinos, resultando no uso de 100% de imunoenaios tipo ELISA e Fluxo Lateral.

Palavras-chave: Biossensores, Leite, Antibióticos, Resíduos, Bovinos.

ABSTRACT

Biosensors provide analyzes with high sensitivity and selectivity required in comparison with traditional methods, associated with portability and easy handling. These devices have a biomolecule immobilized on the transducer surface, in order to detect changes generated by a reaction or interaction at the biochemical level. The application of these devices in several fields of studies, results in a range of works and developed technologies. A large portion of this market is concentrated in the agroindustry, mainly in the dairy sector, due to the indiscriminate use of antibiotics to treat mastitis and dry cow therapy. It is estimated that the annual consumption of antibiotics for this sector alone is greater than 63,000 tons. Therefore, this work presents a literature review of the main biosensors applied to dairy farming, in order to discuss the implications of antibiotic use in dairy cattle and its consequences in humans of the main molecules evaluated in the proofs of concept. To carry out the analyses, works from the PubMed and CAPES Journal platforms were selected. The writing was oriented to describe the properties of biosensors, in tables. As for the articles, the molecules of kanamycin and chloramphenicol presented the greatest number of works, 18 and 9 respectively. Despite the review, the market lacks commercial biosensors, with only 67 works listed in the last 10 years with application in bovine milk samples, resulting in the use of 100% of immunoassays such as ELISA and Lateral Flow.

Keyword: Biosensor, Milk, Antibiotics, Residue, Cattle.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AuE: Eletrodo de ouro

AuNPs: Nanopartículas de ouro

BIA: *Biacore software*

CCS: Contagem de células somáticas

CLAE: Cromatografia líquida de alta eficiência

ECl: Eletrodo de carbono impresso

ECV: Eletrodo de carbono vítreo

EF: Espectroscopia de fluorescência

EIE: Espectroscopia de impedância eletroquímica

IFL: Imunoensaio de fluxo lateral

LMR: Limite máximo de resíduo

LOD: Limite de detecção

MHC: 6-mercaptop-1-hexanol

OEDF: Óxido de estanho dopado com flúor

PBR: Proteína bacteriana recombinante

PDECR: Particionado, diluído e enriquecido com resíduo

PRF: Peroxidase de raiz forte

SPR: Ressonância plasmônica de superfície

VC: Voltametria cíclica

VPD: Voltametria de pulso diferencial

* Demais siglas estão contidas na legenda das tabelas

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	9
1.1	Objetivos.....	10
2	DESENVOLVIMENTO.....	11
2.1	Legislação e qualidade do leite.....	11
2.2	Bovinos de leite.....	13
2.3	Leite e contaminações bacterianas.....	15
2.3.1	Antibióticos e a cadeia leiteira.....	16
2.3.2	Microrganismos patogênicos em bovinos.....	18
2.3.3	Mastite.....	21
2.3.4	Terapia vaca seca.....	22
2.4	Ferramentas de detecção de antibióticos.....	22
2.4.1	Biossensores.....	24
2.5	Metodologia de pesquisa.....	25
2.5.1.1	Biossensores óticos.....	25
2.5.1.2	Biossensores eletroquímicos.....	32
2.5.1.3	Outros biossensores.....	40
2.6	Discussão.....	41
3	Conclusão.....	47
	REFERÊNCIAS.....	48

1 INTRODUÇÃO

Com um número representativo de gado leiteiro, cerca de 37 milhões de cabeças (REUTERS, 2019), o Brasil industrializou quase 5,8 bilhões de litros de leite no segundo trimestre de 2021 (IBGE, 2021). O estado de Minas Gerais corresponde à maior produção de leite no país (26,4%) e o Brasil é o quarto colocado no mundo com produção de cerca de 34 bilhões de litros anuais, em média (MALISZEWSKI, 2020).

Para uma produção nessa magnitude, é necessário o uso de diversas categorias de medicamentos visando o controle de doenças e o cuidado com a saúde do animal em geral. Um exemplo típico encontrado na pecuária leiteira é o tratamento de enfermidades por meio do uso de antibióticos, que apesar de serem utilizados visando benefícios, podem gerar resíduos e promover má qualidade do leite comercializado. Portanto, medidas são tomadas por empresas do setor leiteiro a fim de melhorar a qualidade do leite recebido pelos produtores, com adesão de programas de boas práticas de fabricação atreladas a incentivos monetários (DPA BRASIL, 2020; HAMESTER; KÄFER, 2020). Contudo, em muitos casos, são encontradas quantidades de resíduos de antibiótico acima do limite recomendado, mesmo pós industrializados (POGURSCHI *et al.*, 2015; RAHMAN; HASSAN; CHOWDHURY, 2020; RAMA *et al.*, 2017).

Em escala mundial, a produção de leite corresponde a pouco mais de 513 bilhões de litros anualmente (MALISZEWSKI, 2020). Dados de BOECKEL *et al.*, 2015 relatam o uso médio de 63.151 toneladas de antibióticos por ano, com expectativa de crescimento até próximo das 100 mil toneladas anuais, até 2030. Uma das principais justificativa do emprego exacerbado de antimicrobianos está no controle da mastite clínica, o uso na terapia da vaca seca (SACHI *et al.*, 2019). Outro ponto está no desrespeito pelo tempo de descarte recomendado do leite contendo a medicação, o que resultara em resíduos de antibióticos sendo comercializados em altíssimas concentrações. O resultado disso são valores superiores ao limite máximo de resíduo, dificultando os processos de industrialização do alimento (KIVIRAND; KAGAN; RINKEN, 2015), além de influenciar diretamente na saúde humana, uma vez que uma quantidade do resíduo de antibiótico presente na matéria-prima não é totalmente quebrada no processo de pasteurização, principalmente o *ultra high*

temperature (UHT) (AYTENFSU; MAMO; KEBEDE, 2016; PRYLUTSKYI; STARODUB, 2019).

Resíduos de antimicrobianos oriundos de leite já processado, podem ser acumulados no corpo humano e desencadear problemas quanto a seleção de cepas mais resistentes no corpo, resultando em problemas imunológicos, como alergias e não resposta de determinados fármacos (AYTENFSU; MAMO; KEBEDE, 2016). A exemplificar a intensidade dos problemas causados pela ingestão de leite contaminado, o acúmulo de cloranfenicol, um antimicrobiano da classe dos aminoglicosídeos (SILVESTRE *et al.*, 2009), pode causar anemia aplásica e a síndrome da placenta cinzenta, doença em crianças de mãe contaminada (MARTIN, 2011).

A detecção de antibióticos em leite é comumente realizada quando a matéria-prima chega às captadoras, mediante testes cromatográficos e testes qualitativos (BABINGTON *et al.*, 2012; KIVIRAND; KAGAN; RINKEN, 2015). No entanto, devido aos custos oriundos de técnicas cromatográficas, e a existência de resultados falso-positivos em testes qualitativos de imunoensaios, resultando em baixa eficiência e efetividade das análises, a empregabilidade de biossensores no diagnóstico de antibióticos em leite demonstrou um campo promissor nos últimos 10 anos (GROSSI *et al.*, 2011; KUMAR; VERMA; SINGH, 2017; PRADO *et al.*, 2015; SAKTI *et al.*, 2016).

Os biossensores, em geral, são dispositivos práticos (BHALLA *et al.*, 2016) que empregam um transdutor, comumente óptico (DONG *et al.*, 2015; FALOHUN; MCSHANE, 2020), eletroquímico (CHEN *et al.*, 2017; RODOVALHO *et al.*, 2018) ou piezoelétrico (NASCIMENTO *et al.*, 2017; POHANKA, 2018), responsável por converter um sinal proveniente de uma reação bioquímica em um sinal quantificável (BHALLA *et al.*, 2016). Para isso, é realizada a imobilização de uma biomolécula na superfície do transdutor, principalmente anticorpos (PRYLUTSKYI; STARODUB, 2019; ZHONG *et al.*, 2019), enzima (MÁRQUEZ *et al.*, 2020; VARMIRA *et al.*, 2018) e derivados de ácidos nucleicos (SAEEDFAR; HENG; CHIANG, 2017; ZHANG *et al.*, 2017). Em virtude dos custos de fabricação e tempo de análise, bem como a altíssima sensibilidade e seletividade ao analito de interesse (DIBA; KIM; LEE, 2015; QIU *et al.*, 2020), estes dispositivos podem substituir testes padrão ouro para análise de resíduos de antibióticos.

1.1 Objetivos

O objetivo geral deste trabalho consiste em realizar uma revisão bibliográfica a respeito das provas de conceito que remetem a aplicação de biossensores no diagnóstico de resíduos de antibióticos em leite de bovinos.

Como objetivos secundários estão: dissertar a cerca da problemática envolvendo os resíduos de antibióticos mais avaliados pelas provas de conceito e biossensores comerciais; e discutir sobre a situação atual no Brasil de avaliação mediante biossensores e demais técnicas de diagnóstico.

2 DESENVOLVIMENTO

2.1 Legislação e qualidade do leite

No Brasil, as regulamentações da qualidade do leite exigidas pelo Ministério da Agricultura fornecem uma padronização mínima para coleta da matéria-prima pelo mercado. Dito isso, as Instruções Normativas do MAPA Nº 76, de 26 de novembro de 2018, e a Instruções Normativas do MAPA Nº 77, de 26 de novembro de 2018, fornecem as diretrizes para a comercialização de leite no Brasil. Algumas exigências segundo o Art. 5º da Instrução Normativa Nº 76, de 26 de novembro de 2018, são que o leite entregue para as centrais deve conter conteúdo mínimo, tais como o teor de gordura de 3g/100g, teor de proteína de 2,9g/100g, teor de lactose de 4,3g/100g, teor de sólidos totais de 11,4g/100g, teor de sólidos não gordurosos de 8,4g/100g, dentre outros fatores que abrange temperatura de resfriamento em 4°C no local de refrigeração, contagem padrão em placas menores que 900.000 UFC/mL antes de ser beneficiado, sem uso de aditivos entre outros (MINISTÉRIO DA AGRICULTURA PECUÁRIA E ABASTECIMENTO, 2018b).

Além do mais, segundo o Art. 5º do Capítulo II da Instrução Normativa do MAPA 77, de 26 de novembro de 2018, o envio de leite contendo produtos de uso veterinários é proibido. Portanto, mediante a legislação é necessário que exista uma padronização na comercialização de leite, visando a qualidade do alimento, levando aos laticínios fornecer educação contínua aos produtores em prol do manejo correto de medicação (MINISTÉRIO DA AGRICULTURA PECUÁRIA E ABASTECIMENTO, 2018a).

O não cumprimento das leis pode gerar problemas, caso empregado produtos de uso veterinários, como a alteração físico-química no leite, abrangendo desde a coloração e teores de sólidos (NAKASE *et al.*, 2018), até diminuição de ácidos essenciais que auxiliam na fabricação de derivados de leite quando na presença de bactérias, e pelo uso discriminado de antibióticos (SACHI *et al.*, 2019; SOUZA *et al.*, 2017). Além disso, a presença de medicamentos pode levar à toxicidade em determinados casos, bem como selecionar microrganismos resistentes a esses medicamentos, tornando um problema para a saúde pública (NERO *et al.*, 2007; SOUZA *et al.*, 2017). Para viés de elucidação, resíduos de antibióticos como penicilina, amplamente empregados em casos de mastites, podem causar problemas em pessoas com hipersensibilidade ao produto (10% reportam alergia, porém apenas 1% da população mundial possuem de fato) mesmo em baixíssimas concentrações (NERO *et al.*, 2007; PATTERSON; STANKEWICZ, 2020).

Apesar das legislações vigentes, a presença de antibióticos, principalmente, no leite ainda é verificada em análises clínicas e tido como objeto de estudo de pesquisadores (LI, J. H. *et al.*, 2019; RAMA *et al.*, 2017; SACHI *et al.*, 2019). Além disso, é observada uma enorme diferença entre amostras de diferentes localizações, devido às particularidades de cada região (LI *et al.*, 2019; RAMA *et al.*, 2017; SACHI *et al.*, 2019). Em 2017, Schlemper e Sachet analisaram resíduos de antibióticos em leite pasteurizado e não pasteurizado vendidos em parte do Paraná, Brasil. Com a pesquisa, os autores encontraram resíduos acima do Limite Máximo de Resíduos (LMR) para classe de beta-lactâmicos, tetracíclicos, quinolonas e sulfonamidas, concluindo a ineficácia da indústria no diagnóstico dessas moléculas pela não avaliação, uma vez que os testes utilizados foram testes comerciais imunoenzimáticos de triagem (SCHLEMPER; SACHET, 2017).

Três anos depois, pesquisadores de Bangladesh também avaliaram o leite local em relação a presença de resíduos de antibióticos. No entanto, apesar de encontrarem valores baixos para oxitetraciclina e amoxicilina, os quais em geral não causariam problemas, observou-se uma presença de resíduos em 7% do leite cru analisado da região (RAHMAN; HASSAN; CHOWDHURY, 2020). Contudo, pessoas que possuem hipersensibilidade a determinados antibióticos poderiam sofrer intoxicações quando ingerissem leite contendo quantidades mínimas desses resíduos. Dessa forma, ao avaliar o perfil de cada região frente a utilização de antibióticos exacerbadamente e/ou discriminadamente, é possível unir informações

em prol da sociedade para exercer também maiores cobranças quanto à qualidade do alimento fornecido pelos produtores.

2.2 Bovinos de leite

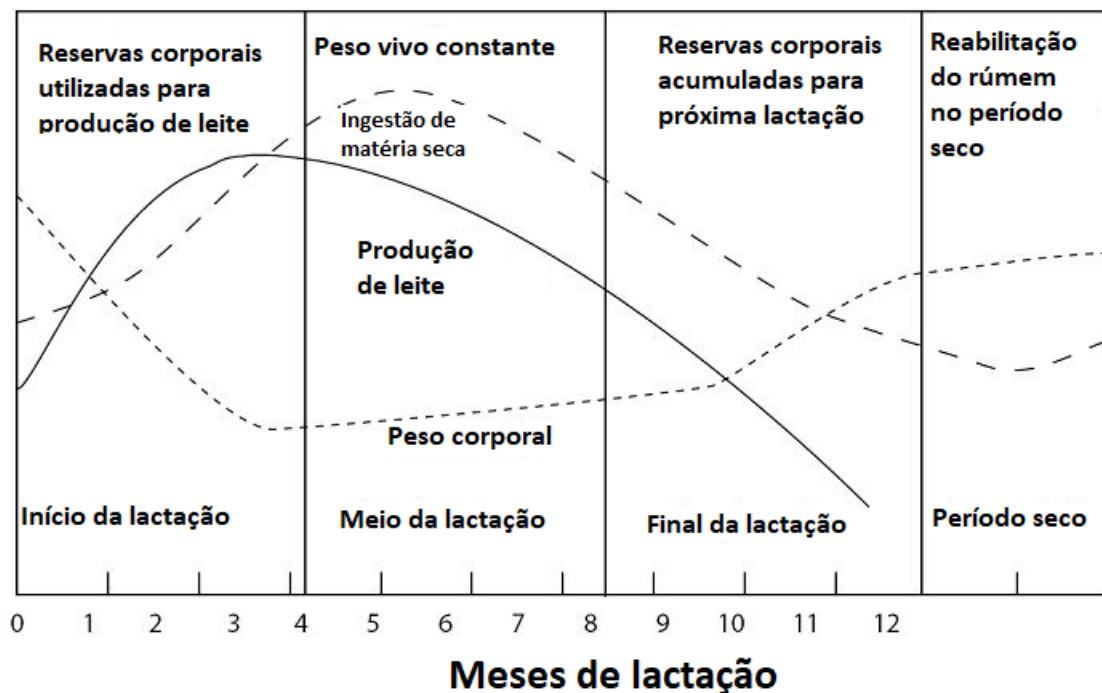
Em termos de escala de produção, o Brasil é o quarto maior produtor de leite do mundo. Contudo, a produtividade é considerada baixa, em torno de 2621 L / vaca / ano (EMBRAPA GADO DE LEITE, 2020), devido ao grande número de animais que produzem pouquíssimo leite em relação aos animais de alta produção. Dessa forma, quando observado países como os Estados Unidos e Israel, detentores de quantidade de animais inferior ao Brasil, é notório a alta produtividade e produção em âmbito mundial (CANAL RURAL, 2018; FORMIGONI, 2019). Esses fatores estão relacionados com a grande informalidade dos rebanhos, regulamentações e pouco uso de tecnologias para melhorar o sistema de produção (CANAL AGRO, 2019; PONCHIO; ALMEIDA; GIMENES, 2004).

Dentre as diversas raças de bovinos, algumas possuem fins de corte – nelore, angus, senepol; de dupla aptidão – pardo suíço, guzerá, gir leiteiro; e outras direcionadas somente para leite – *holstein*, jersey, *ayrshire* (JR., 2020; NORTH EAST AMERICAN DAIRY ASSOCIATION, 2021; PROCREARE, 2016). Entre as raças direcionadas para leite, a *Holstein-Frísia*, comumente denominada Holandesa, é a mais produtiva no mundo, em termos de quilos de leite por lactação (ALMEIDA, 2007; COFFEY *et al.*, 2016). No Canadá, em 2019, esta raça compreendia cerca de 93% do rebanho nacional, com média de produção de 10.909 kg / lactação / animal (CANADIAN DAIRY INFORMATION CENTRE, 2020).

A lactação de uma vaca é expressa fenotipicamente mediante a relação genótipo e ambiente (HOLMES, 1995). Fatores atribuídos ao ambiente como condições climáticas e adaptação da raça, manejo, tecnologias empregadas, dietas e saúde do animal atrelado ao sistema reprodutivo e a genética demonstram a performance do animal em determinada situação (FAZEL *et al.*, 2018; STRANDBERG *et al.*, 2009). Dessa forma, países como os Estados Unidos e Reino Unido lideram os rankings de produtividade, tendo em vista que existe uma boa relação genótipo e ambiente dos animais, relacionado ao poder aquisitivo do país, em geral (CHRIS; CLARKE, 2020).

A curva de lactação de um animal tem variações com base na interação genótipo e ambiente. Uma vaca *holstein-frísia* possui em média uma lactação de 360 dias (THE CATTLE SITE, 2015) – Figura 1. Contudo, outros graus de sangue fornecem características muito diferentes em termos de lactação, bem como de susceptibilidade a patógenos que está atrelada a uma maior necessidade de manejo com antiparasitários e antibióticos.

FIGURA 1: CURVA DE LACTAÇÃO DE UMA VACA *HOLSTEIN-FRÍSIA*



Fonte: Adaptado de THE CATTLE SITE, 2015.

Com base na curva de lactação, é observado que a produção de leite aumenta até um platô por volta do terceiro mês de lactação. Durante os primeiros meses de lactação podem ocorrer problemas geralmente associados a doenças no pós-parto, como metrite (EDUCAPOINT, 2018), volvo de abomasso (FUBINI; YEAGER; DIVERS, 2017), retenção de placenta (GILBERT, 2017) e hipocalcemia (MAZZUCO *et al.*, 2019). Assim, pode ser que a lactação do animal esteja comprometida até o próximo parto, fazendo com que a curva normal de lactação se altere – isto se aplica a todas as raças de bovinos de leite (SANDRUCCI *et al.*, 2007). Além disso, atrasos reprodutivos prolongam os dias em lactação e também promove redução dos quilos de leite produzido, bem como maior acúmulo de tecido

adiposo nos animais, aumentando o *score* e dificultando ainda mais o animal a emprenhar, levando a um maior surgimento de doenças metabólicas e desenvolvimento de mastite (ABEBE *et al.*, 2016; DONADEU *et al.*, 2020). Portanto, a dieta adequada torna-se uma necessidade básica para o melhor desempenho da imunidade do animal, possibilitando assim evitar o uso excessivo de antibióticos para o tratamento de enfermidades associadas ao desequilíbrio alimentar (CRNKIC; HODZIC, 2012; HERDT, 2014).

No Brasil, o uso de raças zebuínas em virtude a raças europeias, seja em relação a animais puros por origem (PO) zebuína, ou mestiços como o $\frac{1}{2}$ *holstein* e $\frac{1}{4}$ *holstein* possibilita um maior controle parasitário e de demais patógenos. Isto tendo em vista a rusticidade das raças zebuínas e o clima brasileiro que, em geral, é inadequado para a criação de animais europeus em sistemas rudimentares, (MIRANDA; FREITAS, 2009). Além do mais, a capacidade reprodutiva, a longevidade do animal e adaptabilidade climática ao sistema brasileiro são características também observadas nesse tipo de cruzamento (CANAZA-CAYO *et al.*, 2014; VASCONCELOS *et al.*, 2020). Por assim dizer, a tabela 1 apresenta dados comparativos do uso de mestiços gir e *holstein com holstein* puro quanto ao número de parasitas no corpo do animal.

TABELA 1 – DIFERENTES GRAUS DE SANGUE EM VACAS, E MÉDIA DE ECTOPARASITAS E ENDOPARASITAS

Grau de sangue	Média do número de carrapatos	Média do número de vermes intestinais	Média do número de bernes
1/4	44	11.917	4,18
1/2	71	4.861	4,34
5/8	151	14.610	3,94
3/4	223	26.115	8,77
7/8	282	26.422	7,28
<i>Holstein</i> puro	501	21.938	8,43

Fonte: Adaptado de LEMOS; TEODORO, 1993.

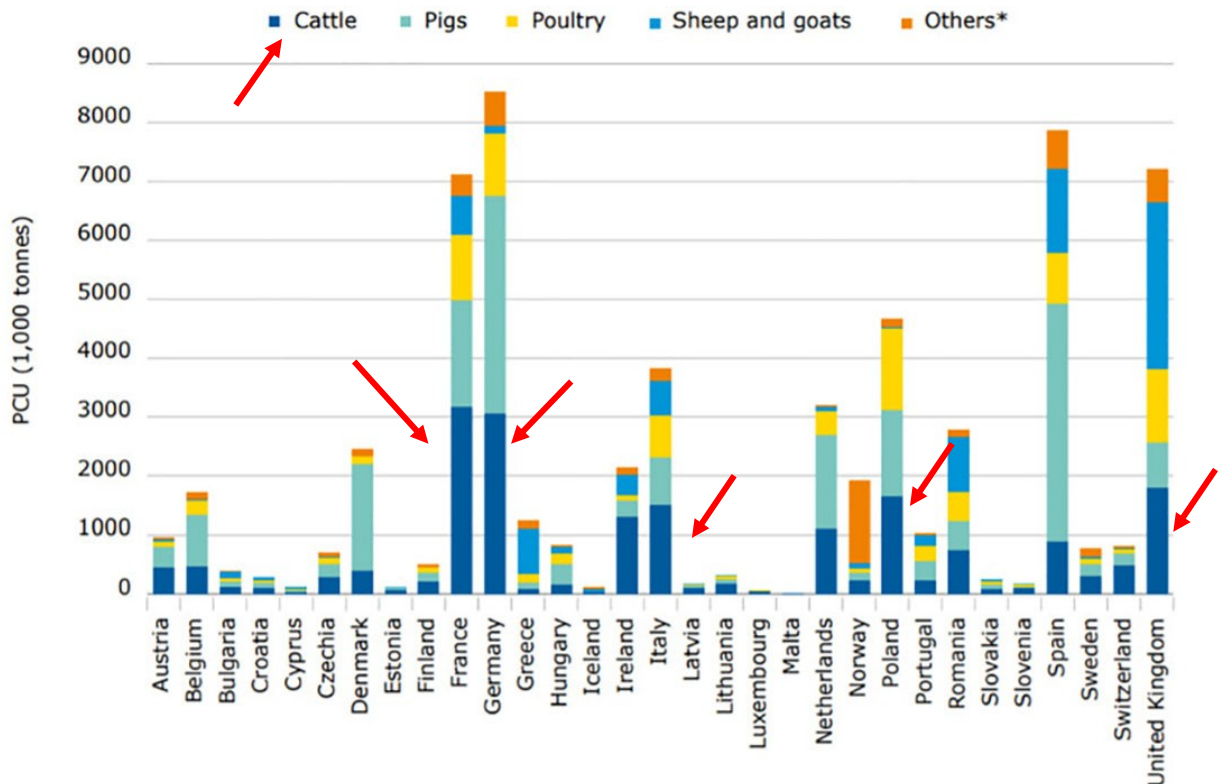
Apesar dos dados terem sido obtidos na década de 90, na prática, é observado números equivalentes em termos de proporções atualmente, sendo sempre os mestiços de zebuínos, não somente de Gir leiteiro e *Holstein*, menos susceptíveis a patógenos.

2.3 Leite e contaminações bacterianas

O leite de vaca corresponde um dos alimentos mais nutritivos disponíveis de forma acessível para o consumo humano (HERNELL, 2011; PEREIRA, 2014). Sua formação envolve cerca de 13% de sólidos totais, englobando de forma majoritária: proteínas (3 – 4%), carboidratos (4 – 5% de lactose), lipídeos (3,5 – 5,3%), minerais e vitaminas; e cerca de 87% de água (BRITO *et al.*, 2021; PEREIRA, 2014). Em virtude da qualidade nutricional, o leite de vaca é considerado alimento fundamental para o crescimento de crianças, fortalecimento dos ossos em humanos, bem como do sistema imunológico em geral (FARDELLONE *et al.*, 2017; HERNELL, 2011; RICE, B. H.; QUANN; MILLER, 2013).

As bactérias necessitam de um meio de cultura para seu desenvolvimento, ou seja, um ambiente favorável – rico em nutrientes, temperatura adequada, pH ótimo, presença ou não de oxigênio, pressão osmótica e fatores orgânicos de crescimento (TORTORA; FUNKE; CASE, 2006). O leite é considerado um excelente meio de crescimento bacteriano (ARAUZ *et al.*, 2012; UNIVERSITY OF GUELPH, 2021), o que leva a grande quantidade de infecções em bovinos, culminando em um uso exacerbado de antibióticos (HENDRICKSON *et al.*, 2018; KIVIRAND; KAGAN; RINKEN, 2015), exemplificado na figura 2.

FIGURA 2: QUANTIDADE DE ANTIBIÓTICOS VETERINÁRIOS VENDIDOS EM 31 PAÍSES EUROPEUS (1 PCU = 1 TONELADA), EM 2018



Fonte: Adaptado de BERKHOUT, 2020.

As setas vermelhas estão apontadas para o termo “cattle”, que significa vaca leiteira, o qual corresponde a porção azul-escuro das barras. Sendo assim, basicamente cinco países – França, Alemanha, Inglaterra, Polónia e Itália, mantêm a maior parte do uso de antibióticos em bovinos, resultando em pouco mais de 10.000 toneladas de antibióticos apenas na região europeia por ano.

2.3.1 Antibióticos e a cadeia leiteira

Os antibióticos são medicamentos utilizadas para o tratamento específico de bactérias, sendo o uso equivocado passível de causar efeitos colaterais. Além disso, quando existe a administração de vários medicamentos juntos existe a possibilidade de ocorrer interações medicamentosas (ANDERSON, 2019).

Os antibióticos fornecem uma resolução aos problemas associados a contaminação bacteriana em vacas, ao menos em teoria, tendo em vista os problemas com resistência de patógenos (BEURON *et al.*, 2014; CHENG *et al.*, 2019; LOO; LAI; MANSOR, 2019). Apesar da dificuldade observada na prática da

cura do animal frente a infecção, seja por falhas no manejo ou mesmo resistência dos microrganismos, existem limites máximos de resíduos de drogas veterinárias – Tabela 2. Tais resíduos podem ser encontrados no leite, levando principalmente ao receptor, responsável por industrialização desta matéria-prima, condizer com as leis e fornecer um produto nas exigências mínimas recomendadas.

TABELA 2 – LIMITE MÁXIMO DE RESÍDUO DE ALGUNS ANTIBIÓTICOS VETERINÁRIOS EM LEITE DE VACA NO CANADÁ E EUROPA

Classe de Antibióticos	Limite máximo de resíduos (ppm)
5-hidroxi flunixinina	0,006
Ampicilina	0,01
Canamicina	0,15
Cefapirina	0,02
Ceftiofur	0,1
Cetoprofeno	0,05
Clortetraciclina	0,1
Diidroestreptomicina	0,125
Dinoprost	Sem requerimento
Eprinomectina	0,02
Estreptomicina	0,125
Eritromicina	0,05
Enroflaxacina	0,1
Fenbendazol	0,6
Gentamicina	0,1
Gonadorelina	Sem requerimento
Hidrocortisona	0,01
Meloxicam	0,035
Monesin	0,01
Moxidectina	0,04
Neomicina	1,5
Novobiocina	0,1
Oxitetraciclina	0,1
Pegbovigrastrim	Sem requerimento
Penicilina G	0,01 I.U./mL
Pirlicimina	0,4
Polimixina B	4,0 µ/mL
Sulfabenzamida	0,01 isolado ou combinado com sulfas
Sulfacetamida	0,01 isolado ou combinado com sulfas
Sulfadimetoxina	0,01 isolado ou combinado com sulfas
Sulfadoxina	0,01 isolado ou combinado com sulfas
Sulfaetoxipiridazina	0,01 isolado ou combinado com sulfas
Sulfaguanidina	0,01 isolado ou combinado com sulfas
Sulfametazina	0,01 isolado ou combinado com sulfas
Sulfanilamida	0,01 isolado ou combinado com sulfas
Sulfapiridina	0,01 isolado ou combinado com sulfas
Sulfaquinoxalina	0,01 isolado ou combinado com sulfas
Sulfatiazol	0,01 isolado ou combinado com sulfas
Tetraciclina	0,1
Tiabendazol	0,05
Tilosina	0,04

Fonte: Adaptado de (GOVERNMENT OF CANADA, 2017; KIVIRAND; KAGAN; RINKEN, 2015).

2.3.2 Microrganismos patogênicos em bovinos

As bactérias infecciosas em gado comumente apresentam-se como zoonoses para humanos (MCDANIEL *et al.*, 2014; PELZER; CURRIN, 2013). Alguns tipos de patógenos são de interesse público, como os causadores de antrax, leptospirose, tuberculose e botulismo, por exemplo. Contudo, mesmo com a existência de uma gama de bactérias patogênicas – Tabela 3, a mastite é uma das justificativas do enorme uso de antibióticos, uma vez que existem vacinas para imunizar doenças como carbúnculo e brucelose (MARTINS *et al.*, 2019).

TABELA 3 – BACTÉRIAS COMUNS EM BOVINOS

Principais bactérias em bovinos	Doenças comumente atribuídas	Ref.
<i>Actinobacillus lignieresii</i>	Câncer de língua. Aborto. Outros	(TURNI <i>et al.</i> , 2019)
<i>Actinomyces bovis</i>	Zoonose. Mandíbula irregular	(TESSELE <i>et al.</i> , 2014)
<i>Arcanobacterium pyogenes</i>	Mastite. Outros	(MOTTA <i>et al.</i> , 2011)
<i>Bacillus anthracis</i>	Zoonose. Carbúnculo	(BRAWAND <i>et al.</i> , 2019)
<i>Bacteroides melaninogenicus</i>	Cara inchada. Podridão do pé. Outros	(DÖBEREINER <i>et al.</i> , 2000)
<i>Borrelia burgdorferi</i>	Zoonose. Borreliose	(BUSH; PEREZ, 2017)
<i>Brucella abortus, canis, melitensis, suis</i>	Zoonose. Brucelose	(ALBRECHT, 2012; MEIRELLES-BARTOLI; SOUSA; MATHIAS, 2014)
<i>Burkholderia pseudomallei</i>	Melioidose	(MERRITT <i>et al.</i> , 2006)
<i>Campylobacter coli, fetus subsp. venerealis, jejuni</i>	Zoonose. Desordens intestinais e genitais.	(GRESSLER <i>et al.</i> , 2012; PELZER; CURRIN, 2013)
<i>Chlamydia spp.</i>	Zoonose. Desordens reprodutivas.	(GODIN <i>et al.</i> , 2008)
<i>Clostridium botulinum, chauvoei, haemolyticum, novyi, perfringens, septicum, sordellii, tetani</i>	Zoonose. Tétano. Carbúnculo. Botulismo. Hepatites. Outros	(GRUPO APOIAR, 2020; ROBSON, 2007)
<i>Corynebacterium pseudotuberculosis, renale</i>	Abscessos crônicos	(SPIER, 2019)
<i>Cowdria ruminantium</i>	<i>Heartwater</i>	(BLOWEY; WEAVER, 2011)
<i>Coxiella burnetii</i>	Zoonose. Febre Q. Aborto	(DAMASCENO; GUERRA, 2018)
<i>Dermatophilus congolensis</i>	Zoonose. Dermatofilose	(MORIELLO, 2019)
<i>Escherichia coli</i>	Zoonose. Mastite. Outros	(STEIN; KATZ, 2017)
<i>Fusobacterium necrophorum</i>	Zoonose. Abscessos	(TADEPALLI <i>et al.</i> , 2009)
<i>Histophilus somni</i>	Desordens respiratórias. Aborto	(JANZEN, 2020)
<i>Leptospira canicola, grippityphosa, hardjo, icterohaemorrhagiae, pomona</i>	Zoonose. Leptospiroses	(BARONI <i>et al.</i> , 2020; SOARES <i>et al.</i> , 2020)
<i>Listeria monocytogenes</i>	Zoonose. Listeriose	(WIEDMANN, 2008)
<i>Mannheimia haemolytica, varigena</i>	Desordens respiratórias	(KOMATSU <i>et al.</i> , 2019; RICE, J. A. <i>et al.</i> , 2007)

<i>Moraxella bovis</i>	Ceratoconjutivite	(ELY, 2018)
<i>Mycobacterium bovis, paratuberculosis</i>	Zoonose. Tuberculose	(ABRAHÃO, 1999; COLLINS, 2021)
<i>Mycoplasma bovis, dispar, mycoides</i> <i>subsp. mycoides</i>	Mastite	(MANZI <i>et al.</i> , 2018)
<i>Pasteurella multocida</i>	Desordens respiratórias	(DABO; TAYLOR; CONFER, 2007)
<i>Prevotella melaninogenica</i>	Desordens periodontal	(BORSANELLI <i>et al.</i> , 2015)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Mastite	(PARK <i>et al.</i> , 2014)
<i>Salmonella</i>	Desordens sistêmicas	(SCOTT, 2009)
<i>Staphylococcus spp.</i>	Mastite	(WALD <i>et al.</i> , 2019)
<i>Streptococcus agalactiae, bovis,</i> <i>dysgalactiae, uberis</i>	Zoonose*. Mastite	(SANTOS <i>et al.</i> , 2007)
<i>Yersinia enterocolitica,</i> <i>pseudotuberculosis</i>	Desordens reprodutiva	(BUCHER <i>et al.</i> , 2008)

*Algumas espécies do gênero.

Fonte: Adaptado de PAGE; GAUTIER, 2012.

Atrelado ao combate de microrganismos patogênicos está o uso de suplementos minerais, vitamínicos, soros, anti-inflamatórios, antipiréticos, dentre outros, visando auxiliar o processo de melhora na saúde do animal. Portanto, existe um custo associado ao uso de antibióticos que refletem não somente no uso do produto em si, mas em toda uma terapia a qual será administrada com o objetivo de tratar o animal. Isso onera o processo, reduz a rentabilidade do animal na lactação e ainda pode levar a contaminação cruzada entre o rebanho (AGHAMOHAMMADI *et al.*, 2018; PETROVSKI; TRAJCEV; BUNESKI, 2006).

O animal submetido a um tratamento de mastite, por exemplo, pode levar a um custo base relativo ao número de tetos infectados, quadros de inchaços, febre, perfil microbiológico do patógeno, bem como dispêndios com veterinários, leite descartado e possível descarte do animal (PETROVSKI; TRAJCEV; BUNESKI, 2006; ROLLIN; DHUYVETTER; OVERTON, 2015). Um estudo para avaliar os custos com mastite clínica nos primeiros 30 dias pós-parto, nos Estados Unidos, exemplifica a magnitude em que os custos “ocultos” podem chegar (ROLLIN; DHUYVETTER; OVERTON, 2015). Neste exemplo, o custo médio por caso de mastite clínica foi de \$444,00, sendo importante ressaltar que 71% provém de custos indiretos, ou seja, perda de leite, de bonificações e até mesmo descarte do animal de forma prematura.

Outro trabalho foi realizado no Egito em 20 fazendas leiteiras contendo em média 80 animais em lactação cada. Foi avaliado o custo médio com um caso mastite clínica (AZOOZ; EL-WAKEEL; YOUSEF, 2020). Ao observar a descrição

obtida para os custos, os quais resultaram em 28,760.9 libra egípcia (EGP), nota-se que devido à possibilidade de se descartar e repor os animais, que os custos foram muito altos (77% associado à categoria). Entretanto, em casos onde a terapia é funcional, um animal em média custaria em torno de 6,615.0 EGP. Enfim, é observado que o custo é variável em relação aos diferentes países e suas moedas.

2.3.3 Mastite

A mastite é uma enfermidade ocasionada nas glândulas mamárias, seja por fatores diversos como patógenos, ambiente onde o animal reside, traumas, ação de químicos e fatores imunológicos e metabólicos do animal (DIAS, 2007; NETO; ZAPPA, 2011).

Esse quadro clínico se divide basicamente em duas categorias: mastite clínica e subclínica. No primeiro caso, a mastite resulta em alterações diversas, incluindo a coloração do leite – tons de amarelo, produção de coágulos e migração de leucócitos – grumo, devido às reações de células inflamatórias, o que resulta em edemas, febre e dor no animal (MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO, 2012). Em relação à mastite subclínica, essa manifestação é responsável pela maior perda para o produtor, pela prevalência no rebanho de forma silenciosa, ou seja, sem a produção de grumos ou sinais clínicos. Dessa forma, a doença promove uma redução na capacidade produtiva, além da prevalência de uma contagem de células somáticas (CCS) anormal – acima de 200.000 UFC / mL (BANSAL *et al.*, 2005), devido à migração de células do sistema imune.

Em todos os casos, a mastite promove perdas financeiras ao produtor, seja pelos sintomas causados pela enfermidade no rebanho, bem como pela administração de medicamentos para combate dos patógenos, ou para fins de melhorar a saúde geral do animal (KVAPILÍK *et al.*, 2015). Contudo, a mastite subclínica promove perdas muito maiores em comparação à clínica, uma vez que, em termos microbiológicos, a maior parte não é susceptível a um tratamento que promove a cura mediante antibióticos durante a lactação do bovino, sendo somente algumas cepas contagiosas capazes de serem eliminadas durante esse período (GONÇALVES, 2017; MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO, 2012). Portanto, existe grande desperdício com a empregabilidade de antimicrobianos nesse ponto, uma vez que

patógenos como o prevalente *S. aureus* subclínico não são curáveis durante a lactação (PETERSSON-WOLFE; MULLARKY; JONES, 2010; SAĞLAM *et al.*, 2017).

Devido à capacidade de prevalência no rebanho, essa enfermidade ocasiona um problema muitas vezes crônico nas fazendas, resultando em um longo emprego de antimicrobianos que, na maioria das vezes, é aplicada de forma inadequada pelos produtores.

2.3.4 Terapia da vaca seca

O período de gestação de uma vaca leiteira é, em média, de 283 dias após a inseminação, variando conforme a raça, ambiente e fisiologia particular do animal (MATHIAS, 2019; SOBEK *et al.*, 2015). Dessa forma, quando os animais estão entrando nos últimos dois meses de gestação, entram no período seco entre 45 e 60 dias, onde a gestação do animal está em sua reta final (NICKERSON, 2019; VRIES, 2017). Desta forma, é necessário efetuar o procedimento de secagem visando cortar a produção de leite deste animal, que não será ordenhado, e para prevenir e tratar as infecções nos tetos do animal.

Em animais com mastite subclínica, o tratamento é feito no ato da secagem com antibióticos em altas dosagens, com carência por quase todo o período (GOLDER; HODGE; LEAN, 2016). Além disso, o medicamento possui ação preventiva para aqueles animais que não estão infectados com microrganismos (NICKERSON, 2019; VANHOUDT *et al.*, 2017). No entanto, na prática, é observado o emprego de antimicrobianos em quase todos os casos, mesmo em casos de animais sadios.

Antibióticos utilizados nesse período são um problema devido às altas dosagens e a variação no período de gestação de uma vaca, podendo o animal parir antes do previsto, devido a erros de anotação ou mesmo gestação mais precoce, podendo resultar em altas doses residuais (ROSSI *et al.*, 2018). Portanto, existe a possibilidade de serem encontrados altos índices de resíduos de antimicrobianos quando a matéria-prima for direcionada para a indústria, prejudicando toda a cadeia leiteira e o consumidor final.

2.4 Ferramentas de detecção de antibióticos

O diagnóstico de resíduos de antibióticos no leite de vaca é comumente feito utilizando técnicas cromatográficas, imunológicas e microbiológicas, mediante o emprego de diversos kits comerciais ou equipamentos padrões (SACHI *et al.*, 2019). Dentre as técnicas cromatográficas, existem diversas variações aplicadas à análise desses resíduos. Grabsk e colaboradores propuseram em 2019 o uso de cromatografia líquida em *tandem* com espectrometria de massa para detecção de resíduos de ceftiofur, cloxacilina e enrofloxacin provenientes de diferentes metodologias de extração de antibióticos. Apesar do foco do trabalho não ser a detecção e sim a extração dos resíduos, é possível observar a qualidade oferecida pela plataforma de detecção, seja pela sua sensibilidade ou seletividade aos compostos (GRABSK *et al.*, 2019). No entanto, os custos de desenvolvimento dessas análises são altos, a mão de obra deve ser qualificada, e os processos de análise levam tempo (URH, 2019). Dessa forma, comumente é observado o emprego de testes rápidos de caráter imunológico.

Em relação às técnicas imunológicas, imunoensaios são mais utilizados devido à praticidade e baixo custo. Portanto, uma variedade de testes são encontrados no mercado, como: *SNAP duo beta-tetra® ST test*, *Eco test® BT*, *CITE Probe® Test*, *BetaStar® Plus* e *Delvotest®* (BELMAR *et al.*, 2019; CARDOSO *et al.*, 2019; JONES, 2009). Além disso, os ensaios enzimáticos como o *Charm ROSA® Test*, *LacTek® Test* e *Penzyme® Milk Test* possuem, também, ampla aplicabilidade (BELMAR *et al.*, 2019; JONES, 2009; SCHLEMPER; SACHET, 2017). Mesmo com a alta empregabilidade de testes imunológicos, esses tipos de avaliações não possuem alta sensibilidade, estando sujeitos a falsos positivos ou falsos negativos devido seletividade das biomoléculas empregadas, por exemplo (MATRICIANI *et al.*, 2018), reduzindo a confiabilidade da análise, ao contrário dos processos que empregam cromatografia.

Com os diferentes métodos de detecção, muitas das vezes é observado o uso de duas metodologias, visando fornecer dados com maior sensibilidade e seletividade para os resíduos. Kurjogi e colaboradores, em 2019, utilizaram cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) além de uma técnica de ensaio microbiológico. No trabalho, a CLAE revelou resíduos de azitromicina e tetraciclina, de amostras que passaram por um ensaio microbiológico de crescimento bacteriano em placas, utilizado para identificação de resíduos de antibióticos. Apesar da qualidade do teste, o tempo de análise é longo, principalmente devido ao tempo de

incubação na cultura microbiológica, e os custos são altos, por causa dos processos de cultura e cromatográficos (KURJOGI *et al.*, 2019).

Outras técnicas são utilizadas, principalmente para elucidar provas de conceito, uma vez que a viabilidade do processo não é comprovada de antemão. A espectroscopia, citada anteriormente, e o uso de biossensores se enquadram nessa categoria, sendo potencial o uso dos biossensores, principalmente quando observado as aplicações recorrentes em outras categorias (JAMPASA *et al.*, 2019; LIU *et al.*, 2017).

2.4.1 Biossensores

Aplicados a diversas áreas de estudo, os biossensores possuem papel fundamental no diagnóstico de condições clínicas, seja na determinação de patógenos (DZIAŁBOWSKA; CZACZYK; NIDZWORSKI, 2018), aditivos alimentares (LAVECCHIA; TIBUZZI; GIARDI, 2010), contaminantes ambientais (BENEDETTO *et al.*, 2019), ou mesmo de parâmetros clínicos de análises médicas (PALCHETTI, 2016).

Na indústria de alimentos, mais especificamente sobre a cadeia leiteira, existe uma simplicidade nos testes realizados para detecção de resíduos de antibióticos na matéria-prima, geralmente realizado por testes rápidos qualitativos (SACHI *et al.*, 2019). Todavia, existe a necessidade da avaliação de resíduos de antibióticos de forma quantitativa, a fim de comparação com os limites de resíduos máximos permitidos no leite.

Os biossensores, no contexto de análise, se tornam ferramentas muito sensíveis e seletivas as quais possibilitam testes muitas das vezes em tempo ágil e com segurança de reprodutibilidade, assegurando a ausência ou presença de resíduos (KIVIRAND; KAGAN; RINKEN, 2015). Normalmente o emprego dos biossensores não é utilizado tão corriqueiramente, apesar de haver muitas provas de conceito (SACHI *et al.*, 2019).

Dentre as diferentes aplicações no setor alimentício, é observado muitos trabalhos envolvendo contaminantes e toxicidade em alimentos. A maior parte do mercado de biossensores nessa área corresponde à quinta maior área de concentração de trabalhos desenvolvidos no mundo (GRAND VIEW RESEARCH, 2020). Em relação a provas de conceito, existem muitos estudos que relatam o uso

de biossensores na detecção de carboidratos (SABU *et al.*, 2019), ácidos provenientes de fermentação (PONTIUS *et al.*, 2020), adulterações de alimentos (KUNDU *et al.*, 2019), na avaliação da demanda bioquímica de oxigênio (TARDY *et al.*, 2021), entre outros.

2.5 Metodologia de pesquisa

Em termos de avaliação da empregabilidade dos biossensores, trabalhos divulgados entre 2011 e 2021 foram selecionados baseando em buscas padronizadas contendo os termos: *biosensors, milk, enzymatic biosensors, whole cell biosensor, genosensor, apta-sensor, dairy, cow* e *immunosensor*; de forma individual ou conjugada. As pesquisas foram realizadas nas plataformas *PubMed* (130) e Periódicos CAPES (393) resultando na seleção de 523 trabalhos em uma pré-seleção daqueles nos quais o objetivo é analisar os resíduos de antibióticos em leite de bovinos mediante aplicação de um biossensor, fabricado ou conceituado. Enfim, destes pré-selecionados, 456 foram descartados após uma leitura individual detalhada, restando 67 artigos até o período de agosto de 2021, sendo destes 67, 11 provas de conceito que abordam imunoensaios os quais possuem características interessantes para realização de comparações.

2.5.1.1 Biossensores ópticos

Dentre os diversos trabalhos abordando biossensores com metodologias ópticas de detecção, atualmente destaca-se aquelas que consigam apresentar baixo limite de detecção (LOD), metodologia simplificada, baixo custo associado e amplo espectro de detecção. Além disso, diferentes plataformas de detecção, composição de eletrodos, resíduos avaliados e modificações realizadas promovem diferenças que, apesar de apresentação simples, o LOD resultante é muito reduzido, levando o biossensor para um patamar mais sensível e seletivo, como pode ser observado na Tabela 4.

A técnica de ressonância plasmônica de superfície (SPR) demonstraram grande empregabilidade na detecção óptica de resíduos de antibióticos em leite de bovinos leiteiros. Altintas e co-autores em 2018 demonstraram uma metodologia de detecção de vancomicina em escala nanométrica com base nessa ferramenta.

Nesse trabalho, modificaram uma plataforma de ouro com estruturas poliméricas pré-selecionadas para encaixarem à vancomicina. Dessa forma, a detecção ocorreu pela ligação da vancomicina ligada a nanopartículas de ouro (AuNPs) diretamente a esse molde imobilizado em uma superfície de ouro, através de SPR, com LOD de $17,7 \text{ ng.mL}^{-1}$ (ALTINTAS, 2018).

Outra técnica bastante empregada foi a espectroscopia de fluorescência (EF), a qual mensura a absorvância gerada em determinado comprimento de onda em um devido tempo (DIAS, 2014). Contudo, diferentemente da SPR, que é elaborada em biossensores, as técnicas espectroscópicas são na maioria das vezes empregadas em imunoenaios. Portanto, estes trabalhos fornecem importantes fontes de conhecimento a respeito principalmente de modificações, podendo ter aplicabilidade ao desenvolvimento de novos biossensores.

Em 2020, Wang, J. e colaboradores detectaram por meio da técnica de espectroscopia de fluorescência, resíduos de canamicina, com LOD de 18,0 nM de forma bastante precisa, mediante o uso de pontos quânticos de carbono. Nesse trabalho, os autores propuseram a mudança de conformação de um aptâmero na presença ou não de canamicina. Quando presente, estas espécies interagem com o aptâmero e, posteriormente, aglomeravam as AuNPs. Dessa forma, quando acrescido de pontos quânticos de carbono, estes produziam fluorescência ao aglomerado, permitindo a detecção com espectrofotômetro. É notório que as modificações para produção desse imunoenasiao podem ser aplicadas a um transdutor a fim de incrementar o sinal biológico e promover uma análise mais sensível, principalmente se utilizada a técnica de SPR ou mesmo alguma técnica eletroquímica (WANG *et al.*, 2020a).

Diferentemente das técnicas comumente empregadas, Gutiérrez e colaboradores elaboraram uma forma de detecção que se baseia em um sistema de luz, fibra óptica e radiometria, no qual permite avaliação da absorvância gerada na fibra óptica a partir da interação entre a modificação e os resíduos de antibióticos. Dessa forma, os autores propuseram uma forma diferente de realizar o diagnóstico de resíduos de anticorpos *in situ*, na própria fazenda, utilizando amostras de leite cru, com LOD na escala de ppb para todas as quatro amostras (ampicilina, canamicina, oxitetraciclina e sulfadimetoxina), simultaneamente analisadas (GUTIÉRREZ *et al.*, 2020).

Com base nas plataformas utilizadas como eletrodo para construção do biossensor óptico, a maioria tem materiais derivados do ouro como principal base, mudando apenas a modificação e o resíduo avaliado. Entretanto, alguns trabalhos empregaram silício, prata, pontos magnéticos e derivados de carbono em suas constituições. Neste contexto, um exemplo é o trabalho de Wang, J. e colaboradores, que propuseram um diferencial em termos de materiais de eletrodos para análise óptica, o papel na forma de testes rápidos (*test strips*). Aliado a uma técnica de imunensaio com microesferas fluorescentes, os autores fizeram o uso de membranas de nitrocelulose modificadas com anticorpos anti-cloranfenicol, anti-tianfenicol e anti-florfenicol, visando análise de leite proveniente de amostras cegas. Foi identificado um baixo LOD para as moléculas residuais ($0,08 - 1,90 \mu\text{g.L}^{-1}$) (WANG *et al.*, 2017). Apesar do LOD não ser expressivamente baixo em comparação aos demais trabalhos, este artigo destaca-se pela aplicabilidade em amostras cegas com alta acurácia, para produção da técnica elaborada pelos autores.

Além disso, Hu, S. e colaboradores, e Fan e colaboradores, também empregaram técnicas de imunensaio de fluxo lateral (IFL) utilizando como base os *test strips*, realizando desta vez a detecção de um resíduo e dois resíduos, respectivamente, ambos os casos em escala nanométrica (FAN *et al.*, 2020; HU *et al.*, 2018). Contudo, foram realizadas com amostras de leite comercial particionado, diluído e enriquecido com resíduo (PDECR). Esses trabalhos, portanto, apresentaram melhora em relação ao LOD encontrado, bem como maior faixa linear, tendo em vista que as modificações e o eletrodo são relativamente acessíveis tão quanto o trabalho de Wang, J., 2017.

Outros trabalhos também seguiram diferentes metodologias de estudo, abordando principalmente diferentes técnicas de detecção, eletrodos e número de resíduos analisados, sendo exemplo disso o trabalho desenvolvido por Wang, L., 2018 que utiliza leitor de microplaca acoplado a um *software* próprio, visando a detecção de cefquinonas pela fluorescência de partículas magnéticas. Também foi utilizado *Biacore software* (BIA) para detectar florfenicol e derivados em leite de vacas tratadas com esses antibióticos elaborado por Thompson e demais autores (THOMPSON, *et al.*, 2020).

Esses trabalhos apresentam baixos limites de detecção, principalmente o de WANG; WANG; LI, 2018 ($0,09 \text{ ng.mL}^{-1}$). Entretanto, a forma evidenciada mais

singular entre os trabalhos foi o descrito e realizado por Nie e colaboradores (NIE *et al.*, 2019). Mediante um detector de contagem de fótons, os autores encontraram resíduos de cloranfenicol, neomicina e sulfadiazina com precisão, na ordem de picogramas ($2,86 \text{ pg.mL}^{-1}$), mediante uso de fibra óptica quimioluminescente.

Além do fato das técnicas e baixíssimos LODs serem importantes, existe uma demanda por aparatos que realizam a detecção de diversos tipos de resíduos simultaneamente. Em vista desse pensamento, foram elucidados, na Tabela 3, oito trabalhos que empregaram análise de diversos compostos em um único sistema. Além do anteriormente citado (THOMPSON *et al.*, 2020), Chen e colaboradores detectaram quatro resíduos de forma precisa (escala nanométrica), baseado em uma metodologia de imunoensaio (CHEN *et al.*, 2016). Outro trabalho essencial foi o de Caglayan e colaboradores que, apesar de analisar somente dois tipos de resíduos simultaneamente, empregaram dois diferentes transdutores, um constituído com ouro e outro com silício, visando analisar canamicina e neomicina (CAGLAYAN, 2020).

Apesar de haverem sistemas e metodologias diferentes do comumente observado – RPS e EF, os menores LODs, bem como a maior gama de resíduos avaliados por um mesmo dispositivo foram apresentados utilizando justamente essas duas ferramentas de detecção. Lin e co-autores apresentaram o menor LOD encontrado na análise de resíduos de antibióticos em todas as categorias, mesmo em comparação as metodologias eletroquímicas e demais (LI *et al.*, 2019). Esse trabalho desenvolvido empregando espectroscopia de fluorescência em aptasensores de nanopartículas de carbono, detectou $5,00 \times 10^{-8}$ ppb de canamicina em leite comercial PDECR.

Quanto às amostras utilizadas para análise do resíduo escolhido, 25 trabalhos de um total de 29 empregaram leite comercial PDECR. Em relação às diferentes amostras, temos o uso de amostras cegas (WANG *et al.*, 2017a), amostras da indústria (Nestlé®) (FERNÁNDEZ *et al.*, 2011), bem como amostras provenientes de animais em tratamento com antibióticos (SADEGHI *et al.*, 2018; THOMPSON *et al.*, 2020). Contudo, as modificações observadas nessas análises com amostras distintas não são peculiares, podendo então empregar demais tipos de construção de biossensores ou imunoensaios na análise de amostras inteiras, sem tratamento.

As metodologias encontradas possuem características distintas que fornecem qualidade de análises diferentes. Um ponto interessante de se observar é que

trabalhos que utilizaram técnicas espectroscópicas, com uma exceção, não avaliaram mais de um resíduo com o mesmo aparato. Isso pode ser observado em alguns trabalhos com SPR, e principalmente nos trabalhos envolvendo técnicas não convencionais, as quais abordaram em sua totalidade mais de um resíduo analisado. Outras características observadas estão relacionadas aos menores LODs em trabalhos que empregam ouro e fibra óptica, em técnicas de SPR, bem como no uso de modificações com aptâmeros diversos, em eletrodos avaliados em técnicas espectroscópicas.

Vale ressaltar que nessa categoria de análise, os compostos residuais mais analisados na categoria óptica são, respectivamente: canamicina (9 trabalhos), florfenicol (4 trabalhos), cloranfenicol (4 trabalhos), enrofloxacina (3 trabalhos) e tetraciclina (3 trabalhos).

TABELA 4 – BIOUSSENSORES ÓPTICOS APLICADOS NA ANÁLISE DE RESÍDUOS DE ANTIBIÓTICOS EM LEITE

Técnica	Eletrodo	Modificação	Deteção	Resíduo	Amostra	Faixa Linear	Limite de Detecção	Ref.
IFL-MF	Test strips de NC e PVC	MN/PVC/Ac anti-CLO	Fluorescência	CLO	Leite de laboratório – amostra cega	–	0,08 $\mu\text{g.L}^{-1}$	(WANG <i>et al.</i> , 2017a)
		MN/PVC/Ac anti-TIA		TIA			0,80 $\mu\text{g.L}^{-1}$	
		MN/PVC/Ac anti-FLO		FLO			1,90 $\mu\text{g.L}^{-1}$	
SPR	Au chip	nanoPIN	Índice de refração	AuNPs@VAN	Leite comercial PDECR	10,0 – 125 ng.mL^{-1}	4,10 ng.mL^{-1}	(ALTINTAS, 2018)
BIA	Au Chip CM5 (BIACO RE@Q)	MDC/Ac anti-CLO	Índice de refração	CLO	Leite comercial PDECR	–	5,28 ng.mL^{-1}	(XIA <i>et al.</i> , 2017)
		MDC/Ac anti-GEN		GEN			2,26 ng.mL^{-1}	
SPR	Au chip	MUA/BSA/Ap anti-ENR	Índice de refração	ENR	Leite Nestlé – amostra cega	7,20 – 26,4 $\mu\text{g.L}^{-1}$	2,00 $\mu\text{g.L}^{-1}$	(FERNÁNDEZ <i>et al.</i> , 2011)
EER	Imunoensaio	AuNPs/Ap anti-TOB	Absorbância	TOB	Leite comercial PDECR	0,50 – 17,0 nM	0,19 nM	(YAN <i>et al.</i> , 2019)
EF	Imunoensaio	AuNPs/Ab anti-CAN/N aCl/PC	Absorbância	CAN	Leite comercial PDECR	0,04 – 0,24 μM	18,0 nM	(WANG <i>et al.</i> , 2020a)
BIA	Chip CM5 (BIACO)	Ap FLO-A/TG	Índice de refração	FLO-FLO-	Leite cru de VTA	–	0,44 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ 1,71	(THOMPSON <i>et al.</i> ,

	RE@Q)		o	A			$\mu\text{g.kg}^{-1}$	2020)
LMP	Imunoensaio	Ap anti-CFQ	Fluorescência	CFQ	Leite comercial PDECR	0,50 – 150 ng.mL^{-1}	0,47 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ 0,09 ng.mL^{-1}	(WANG ; WANG; LI, 2018)
EnVisi on EnSpir e® EF	Imunoensaio	AuNPs/Ap anti-TOB	Absorbância	TOB	Leite comercial PDECR	40,0 – 200 nM	23,3 nM	(MA <i>et al.</i> , 2018)
EUV	NMOF-Pt	Sonda DNA magnético em <i>hairpin</i>	Absorbância	CAN/TMB	Leite comercial PDECR	0,50 – 3,00x10 ³ pg.mL^{-1}	0,20 pg.mL^{-1}	(LUAN <i>et al.</i> , 2017)
SPR	Si wafer	MPTES/MUA	Índice de refração	CAN/Ap anti-CAN	Leite comercial PDECR	2,00x10 ⁻³ – 0,48 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	0,89 ng.mL^{-1}	(CAGLAYAN, 2020)
		MPTES/MUA		NEO/Ap anti-NEO		3,00x10 ⁻³ – 0,72 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	1,55 ng.mL^{-1}	
SPR	LVAu chip	Ap anti-CAN	Índice de refração	CAN		5,00x10 ⁻³ – 0,48 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	4,80x10 ⁻² ng.mL^{-1}	
		Ap anti-NEO		NEO		7,00x10 ⁻³ – 0,72 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	0,22 ng.mL^{-1}	
EUV	Imunoensaio	AuNPs@Ap anti-CLO/ <i>locker probe</i>	Absorbância	CLO	Leite comercial PDECR	0,10 – 10,0 nM	0,03 nM	(JAVIDI <i>et al.</i> , 2018)
LSPR	PNC	AuNPs/Ap anti-GEN	Índice de refração	GEN	Leite comercial PDECR	0,00 – 1,00x10 ³ nM	300 nM	(RAMALINGAM; COLLIER; SINGH, 2021)
DCF	FOQ	Ag anti-CLO	Quimioluminescência	CLO/RQ	Leite comercial PDECR	10,0 – 2,00x10 ⁴ pg.mL^{-1}	2,86 pg.mL^{-1}	(NIE <i>et al.</i> , 2019)
		Ag anti-SUD		SUD/RQ		0,50 – 500 ng.mL^{-1}	0,22 ng.mL^{-1}	
		Ag anti-NEO		NEO/RQ		0,10 – 300 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	0,03 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	
Fluorímetro	PM	OG/Ap anti-FLO	Fluorescência	FLO	Leite cru contaminado	5,00 – 1,20x10 ³ nM	5,75 nM	(SADGHI <i>et al.</i> , 2018)
SPR	Chip RPS	PLG/Ac anti-PEN-G	Índice de refração	PEN-G	Leite comercial PDECR	0,00 – 100 nM	8,00 pM	(PENNACCHIO <i>et al.</i> , 2015)
Autoral	FO	AuNPs@Ap anti-CAN	Absorbância	CAN	Leite cru PDECR	0,00 – 300 ppb	37,5 ppb	(GUTIÉRREZ

		AuNPs@Ap anti-AMP		AMP		0,00 – 4,00 ppb	1,00 ppb	<i>et al.</i> , 2020)
		AuNPs@Ap anti-OXI		OXI		0,00 – 100 ppb	25,0 ppb	
		AuNPs@Ap anti-SUD		SUM		0,00 – 25 ppb	6,25 ppb	
LMP Synergy H4	Imunoensaio	PM@Ap anti-OXI	Intensidade de Fluorescência	OXI/ <i>PicoGreen</i>	Leite comercial PDECR	0,20 – 800 nM	0,15 nM	(BAHREYNI <i>et al.</i> , 2021)
EF	Imunoensaio	NPsC/Ap anti-CAN	Absorbância	CAN	Leite comercial PDECR	$1,00 \times 10^{-7}$ – $1,00 \times 10^{-4}$ ppb	$5,00 \times 10^{-8}$ ppb	(LIN <i>et al.</i> , 2019)
TREF	Imunoensaio	Ap anti-ENR/Folha de OG	Fluorescência	ENR	Leite comercial PDECR	$9,76 \times 10^{-1}$ – 62,5 ng.mL ⁻¹	0,47 ng.mL ⁻¹	(ZHANG <i>et al.</i> , 2020)
FOPPR	FO	Ac anti-AMP	Índice de refração	AuNPs@AMP	Leite comercial PDECR	4,00 – $4,00 \times 10^4$ ppb	0,74 ppb	(CHAUDHARI <i>et al.</i> , 2020)
IFL	MN	Ag anti-CEF	Fluorescência	CEF	Leite comercial PDECR	0,26 – 3,56 ng.mL ⁻¹	0,26 ng.mL ⁻¹	(CHEN <i>et al.</i> , 2016)
		Ag anti-TET		TET		0,04 – 0,98 ng.mL ⁻¹	0,04 ng.mL ⁻¹	
		Ag anti-ENR		ENR		0,08 – 2,00 ng.mL ⁻¹	0,08 ng.mL ⁻¹	
		Ag anti-SUL		SUL		0,10 – 3,98 ng.mL ⁻¹	0,10 ng.mL ⁻¹	
EUV	MNE	AuNPs@Ap anti-CAN	Absorbância	CAN	Leite comercial PDECR	2,50 – 80 nM	2,50 nM	(ABEDALWAF A <i>et al.</i> , 2020)
IFL Raman	<i>Test strips</i> de NC e PVC	Au@AgNPs/DTNB/Ac anti-TET	Fluorescência	TET	Leite comercial PDECR	0,02 – 11,0 ng.mL ⁻¹	0,015 ng.mL ⁻¹	(FAN <i>et al.</i> , 2020)
		Au@AgNPs/MBA/Ap anti-PEN		PEN			0,010 ng.mL ⁻¹	
SPR	Imunoensaio	MEA	Índice de refração	TET@Fe ₃ O ₄	Leite comercial PDECR	5,00 – 100 pg.mL ⁻¹	1,00 pg.mL ⁻¹	(GAO <i>et al.</i> , 2019)
IFL	<i>Test strips</i> de NC e PVC	EuNP/BSA/Ac anti-SUZ	Fluorescência	SUZ	Leite cru ECR	0,05 – 10,0 ng.mL ⁻¹	$4,50 \times 10^{-3}$ ng.mL ⁻¹	(HU <i>et al.</i> , 2018)
EUV	MoS ₂	PC/AuNPs/Ap anti-CAN	Absorbância	CAN	Leite comercial PDECR	4,00 – 25,0 μM	1,10 μM	(WANG <i>et al.</i> , 2017b)
EUV	AuE	AuNPs/Ap anti-CAN	Absorbância	CAN	Leite comercial ECR	0,01 – 150 μg.L ⁻¹	$5,00 \times 10^{-3}$ μg.L ⁻¹	(SONG <i>et al.</i> , 2016)
ER	Imunoensaio	Ag@AuNPs/Ap	Intensidade	CAN	Leite comercial	100 ng.mL ⁻¹ –	0,90 pg.mL ⁻¹	(JIANG <i>et al.</i> ,

anti-CAN	relativa Raman	PDECR	10,0 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	2019)
----------	-------------------	-------	-------------------------------	-------

*/ = próximo componente a ser ligado; @ = ligação; ABEI = N-(4-aminobutil)-N-etilisoluminol; Ac = anticorpo; AMP = ampicilina; Ap = aptâmero; AuNPs = nanopartículas de ouro; BIA = biacore software; BSA = albumina de soro bovino; CAN = canamicina; CdS:Eu⁺³ = sulfeto de cádmio com íons európio; CFQ = cefquinona; CLO = cloranfenicol; DCF = detector de contagem de fótons; DTNB = Ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzoico; ECR = enriquecido com resíduo; EE = elipsometria espectroscópica; EER = espectroscopia de espalhamento de ressonância; EF = espectrofluorimétrico; ENR = enrofloxacina; ER = espectroscopia Raman; ESP = espectroscopia; EUV = espectroscopia de ultravioleta; FO = fibra ótica; FOQ = fibra ótica quimioluminescente; FLO = florfenicol; FLO-A = florfenicol amina; FLU = fluorquinolona; FOPPR = ressonância de plasma de partícula de fibra ótica; GEN = gentamicina; IFL = imunoenensaio de fluxo lateral; IFL-MF = imunoenensaio de fluxo lateral de microesferas fluorescentes; LMP = leitor de microplaca; LSPR = ressonância plasmônica de superfície localizada; LVAu = lâmina de vidro revestida com ouro; MBA = Ácido 4-mercaptobenzoico; MDC = matrizes de dextrano carboximetilado; MEA = mercaptoetilamina; MN = membrana de nitrocelulose; MNE = membranas de nanofibras eletrofiadas; MPTEs = mercaptopropil trimetoxissilano; MUA = Ácido 11-mercaptoundecanoico; NaCl = cloreto de sódio; NEO = neomicina; NMOF-Pt = nano Fe-MIL-88NH₂; NPsC = nanopartículas de carbono; nTiO₂ = nanobastões de dióxido de titânio monocristalino; OEDF = óxido de estanho dopado com fluor; OG = óxido de grafeno; OXI = oxitetraciclina; PC = pontos de carbono; PDECR = particionado, diluído e enriquecido com resíduo; PEN-G = penicilina G; PLG = proteína de ligação a glutamina; PNC = papel de nitrocelulose; PIN = polímeros impressos nanomolecularmente; PVC = policloreto de vinila; RQ = reagente quimioluminescente; s/d = sem dados; SUD = sulfadiazina; SPR = ressonância plasmônica de superfície; SUL = sulfonamida; SUM = sulfadimetoxina; SUZ = sulfametazina; ssDNA = simples fita de DNA; TET = tetraciclina; TF = tampão fosfato; TG = tireoglobulina; TIA = tianfenicol; TMB = 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina; TOB = tobramicina; TREF = transferência ressonante de energia por fluorescência; VAN = vancomicina; VTA = vacas tratadas com antibiótico;

2.5.1.2 Biossensores eletroquímicos

Os trabalhos que empregam técnicas ópticas têm em comum, na grande parte, a forma de detecção e/ou elaboração da prova de conceito. Nesse contexto, os biossensores de âmbito eletroquímico assemelham também nas formas de detecção, tendo como principais técnicas empregadas a amperometria, espectroscopia de impedância eletroquímica (EIE) e voltametrias, sendo a técnica voltametria de pulso diferencial (VPD) responsável pelos menores LODs observados nos artigos encontrados. Para efeito de comparação, entre os dez menores LODs para biossensores eletroquímicos descritos na Tabela 5, seis empregam como técnica de detecção a VPD, três empregam EIE e um emprega um sistema fotoeletroquímico. Além disso, os trabalhos se assemelham em relação aos eletrodos empregados para realizar as modificações, sendo principalmente constituídos por carbono e ouro, nos seguintes formatos: eletrodo de carbono impresso (ECI) (11 trabalhos), eletrodo de carbono vítreo (ECV) (8 trabalhos), e eletrodos baseados em ouro (8 trabalhos).

Quanto às técnicas, a VPD é uma metodologia que emprega medidas de pulso apresentadas por uma curva de Gauss a qual possui menor interferência da corrente capacitiva, quando comparada com a técnica de pulso normal ou a voltametria cíclica. Dessa forma, existe uma maior sensibilidade na técnica, a qual fornece baixíssimos LODs (SOUZA; MACHADO; AVACA, 2003). A sensibilidade da VPD pode ser observada no trabalho de Roushani, G., 2019. Os autores obtiveram

um LOD de $0,33 \text{ fg.mL}^{-1}$ do resíduo de estreptomicina em leite comercial, baseado no uso de um eletrodo de ouro modificado com filme de sílica e aptâmero. Trabalhos como o de Zeng e colaboradores, em 2018, também fornecem uma visualização do poder da VPD. Com um LOD de $36,0 \text{ fM}$ de resíduo de canamicina encontrado, mediante o uso de discos de ouro modificados com aptâmeros em modelo *hairpin* específico para canamicina, os autores apresentaram um teste, além de sensível, seletivo.

Em relação à EIE, a técnica proporciona conhecimento sobre os mecanismos eletroquímicos mediante o uso de uma tensão variável em certa frequência para avaliar determinada impedância no sistema, geralmente pelo acompanhamento da amplitude *versus* tensão (LABSOLUTIONS, 2021; USP, 2021). Devido a essas características, o método não contamina ou destrói a amostra, sendo empregado em, por exemplo, metodologias em que a amostra não é replicável, como análise forense, bem como em técnicas de avaliação de corrosão (CARDOSO DE MIRANDA *et al.*, 2018).

É possível notar, com a utilização da EIE, baixíssimos LODs e ampla faixa de trabalho com os eletrodos utilizados. Dois trabalhos entre os demais destacaram-se primeiramente pelos baixos LODs e ampla faixa linear, respectivamente, obtidos: $2,74 \times 10^{-4} \text{ ng.L}^{-1}$ ($0,274 \text{ fg.mL}^{-1}$) de penicilina-g, e $3,34 \times 10^{-3} - 3,34 \times 10^3$ (LI, H. *et al.*, 2015); $0,849 \text{ pg.mL}^{-1}$ de penicilina, e $1,00 \times 10^{-3} - 0,50 \text{ ng.mL}^{-1}$ (HE *et al.*, 2020). Contudo um terceiro trabalho, desenvolvido por Rosati e colaboradores em 2019, apresentou uma característica diferente dos demais presentes na tabela, a produção do eletrodo com base em uma impressora comum. Baseado no uso de tinta condutiva comercial, os autores modificaram os eletrodos impressos com auxílio de uma impressora, com aptâmeros para detecção de ampicilina, obtendo um LOD na escala de microgramas por litro, além de realizar o processo em poucos minutos. O diferencial está na própria premissa de um biossensor: fornecer alta sensibilidade e seletividade em um curto período de tempo, associado a um baixo custo. Portanto, trabalhos como de Rosati fornecem uma base a ser aprimorada para melhorias na sensibilidade e seletividade, tendo em vista que o aparato possui baixo custo e rapidez.

Um outro trabalho a se atentar é o de Wang, Y. e colaboradores em 2018, os quais propuseram uma metodologia de detecção fotoeletroquímica. Neste artigo os autores empregaram OEDF como substrato do eletrodo e modificaram com dióxido

de titânio e pontos quânticos de carbono, seguido de um aptâmero específico para o resíduo avaliado (cloranfenicol). Portanto, quando em contato com o antígeno específico de cloranfenicol, ocorre a formação de um complexo com o material imobilizado no eletrodo, promovendo uma redução da fotocorrente, podendo realizar a determinação do composto. Com este trabalho, os autores identificaram um LOD de 0,36 pM, dentre os dez melhores avaliados para os biossensores eletroquímicos. Apesar disso o tempo de análise é grande e o método emprega materiais dispendiosos, levando a uma característica ruim frente as outras metodologias avaliadas.

Em relação ao número de resíduos detectados, foram encontrados sete trabalhos com LOD semelhantes ao observado nos biossensores ópticos – escala nanométrica, em geral. No entanto, apesar da semelhança, três trabalhos apresentaram determinações simultâneas (>4 resíduos), um a mais em comparativo com os encontrados nos biossensores ópticos. Gamella e colaboradores, em 2013, analisaram seis tipos diferentes de resíduos de antibióticos (penicilina-g, amoxicilina, ampicilina, ceftiofur, oxatetraciclina e cloxacina) mediante amperometria com base em um ECI. Com esse trabalho, Gamella obteve LOD e faixa linear em escalas nanométricas por meio da modificação do eletrodo com antígenos de cada resíduo com posterior adição de anticorpos marcados com peroxidase de raiz forte (PRF). O biossensor desenvolvido conferiu respostas decentes em pouco mais de trinta minutos de análise, se tornando um experimento rápido, quando comparado aos demais biossensores ópticos presentes na tabela 4.

Posteriormente, Wang, L. e colaboradores propuseram o uso de voltametria cíclica, eletrodos de carbono vítreo e o uso de proteína bacteriana recombinante (PBR) como modificação no eletrodo de trabalho, o qual é o mesmo empregado por Gamella, 2020. Dessa forma, empregou a metodologia para realizar a detecção de seis resíduos de antibióticos (cefalexina, ceftiofur, cefquinoxima, ceftotafur, penicilina-g e amoxicilina). Ao contrário de Gamella, Wang, L. não apresentou a faixa linear para todos os compostos, ficando limitado somente ao ceftiofur. Contudo o LOD foi avaliado para todos, obtendo escalas micrométricas, de forma bem inferior as análises de Gamella, cerca de 7 anos antes. Portanto, a aplicação de um biossensor eletroquímico pode, na maioria das vezes, analisar diversos compostos baseando-se em um único eletrodo com modificações semelhantes.

Em relação aos tipos de eletrodos, um trabalho que se destaca frente aos demais é o de Wu e colaboradores em 2012. Por meio de testes rápidos (*test strips*), os autores avaliaram resíduos de neomicina em leite comercial mediante a técnica de voltametria cíclica, a qual permitiu a identificação de $0,04 \text{ ng.mL}^{-1}$, um LOD bom em virtude do tipo de técnica empregada na detecção. Além do LOD, este biossensor supre muito bem a demanda de baixo custo, baseando nos custos dos materiais envolvidos, bem como possui agilidade de execução. Portanto, o uso de técnicas mais sensíveis e seletivas (VPD, EIE, VOQ) podem melhorar a faixa de detecção, bem como o LOD estabelecido.

Uma outra vertente está nas modificações nas quais são em grande parte feitas com base em um aptâmero específico e nanopartículas de ouro. No entanto, a considerar os dez melhores resultados de sensibilidade e seletividade, todos realizaram modificações distintas, sendo cinco realizadas sobre AuE, três sobre eletrodos de ECV, uma em ECI, e a última sobre um OEDF. Entre os selecionados, os que realizaram modificações mais simples no eletrodo transdutor ainda com bons resultados de sensibilidade e seletividade foram os trabalhos de Wang. H. e colaboradores, de 2015; autores que modificaram um AuE com aptâmeros anti-ampicilina e obtiveram LOD de $1,09 \text{ pM}$, com alta seletividade em suas análises. Além disso, temos o trabalho de Wang, T. e colaboradores de 2019, os quais empregaram eletrodo de carbono vítreo e imobilizaram aptâmero anti-ampicilina conjugados com AuNPs, obtendo um LOD de $32,0 \text{ pM}$, algo menos eficaz em comparação ao grupo de autores anteriores.

As modificações realizadas pelos dois trabalhos com LOD mais baixos (ROUSHANI; GHANBARI, 2019; ZENG *et al.*, 2018) propuseram a utilização do eletrodo de ouro. Contudo o trabalho de Zeng e colaboradores, em 2018, fez o uso de um processo de seleção de aptâmeros para formar um *hairpin* conjugado com 6-mercaptop-1-hexanol (MHC) para obter excelente sensibilidade de análise por VPD. Em relação ao trabalho de Roushani, G. e colaboradores, em 2019, eles empregaram o uso de nanopartículas de ouro com aptâmeros anti-estreptomicina, sendo tudo imobilizado em um filme de sílica mesoporosa a qual está no AuE. Portanto, com esses trabalhos observa-se a presença valiosa do AuE nas análises mais sensíveis, porém o custo associado do ouro se torna um impasse na escolha de substrato, podendo ser trocado por bases de carbono, como o próprio ECV, eletrodo presente nos dez melhores LOD. Além disso, os materiais imobilizados

também inferem diretamente no custo, sendo quanto menor for o trabalho realizado, tempo de análise, e tipo de material, menos custo terá o biossensor, o que resulta em trabalhos mais simples, porém efetivos, como o de Wang, H., 2015, por exemplo.

Em termos de detecção, os principais resíduos avaliados com as metodologias eletroquímicas foram: canamicina (8 trabalhos), ampicilina (6 trabalhos), penicilina-g (5 trabalhos), e cloranfenicol (5 trabalhos). Com isso, novamente é possível avaliar que a quantidade de trabalhos está voltada para análise de 1 composto prioritário, a canamicina.

TABELA 5 – BIOSSENSORES ELETROQUÍMICOS APLICADOS A ANÁLISE DE RESÍDUOS DE ANTIBIÓTICOS EM LEITE

Técnica	Eletrodo	Modificação	Deteção	Resíduo	Amostra	Faixa Linear	Limite de Deteção	Ref.
Amperometria	ECI	Co ²⁺ @ANT/PL-PBR	Reações redox e frequência	AMP/PEN-G@P RF CEF/PEN-G@P RF	Leite comercial PDECR	1,73 – 17,2 ng.mL ⁻¹ 0,80 – 11,3 ng.mL ⁻¹	0,890 ng.mL ⁻¹ 0,370 ng.mL ⁻¹	(CONZUELO <i>et al.</i> , 2013)
VPD	PC/Pt	β-lactamase	Reações redox e frequência	PEN-G/FC	Leite comercial PDECR	2,60x10 ⁻⁷ – 6,60x10 ⁻⁷ mol.L ⁻¹	7,90x10 ⁻² μmol.L ⁻¹	(PRADO <i>et al.</i> , 2015)
VPD	ECV	NTsCPM/Ap anti-TET	Reações redox	TET	Leite comercial PDECR	1,00x10 ⁻⁸ – 5,00x10 ⁻⁵ M	5,00x10 ⁻⁹ M	(ZHOU <i>et al.</i> , 2012)
Amperometria	ECI	4-ABA/Ac anti-SUP	Reações redox e frequência	SUP/PRF SUD/PRF	Leite comercial PDECR	1,60 – 118,6 ppb 0,50 – 39,0 ppb	0,44 ppb 0,12 ppb	(CONZUELO <i>et al.</i> , 2012)
Amperometria	ECI	BRM/PM@PBR BRM/PM@Ac anti-SUP BRM/PM@Ac anti-TET	Reações redox e frequência	CEL/PRF SUP/PRF TET/PRF	Leite cru e comercial PDECR	–	–	(CONZUELO <i>et al.</i> , 2014b)
Amperometria	ECI	MN-P(AV)-co-E/Ac anti-CLO/B SA	Reações redox e frequência	CLO	Leite orgânico diluído PDECR	0,01 – 10,0 ng.mL ⁻¹	4,70x10 ⁻³ ng.mL ⁻¹	(EL-MOGH AZY <i>et al.</i> , 2018)
EIE	AuE	Ag-EMO(Sif ⁶⁻ ₂)/Ap anti-PEN	Reações redox e frequência	PEN	Leite cru PDECR	1,00x10 ⁻³ – 0,50 ng.mL ⁻¹	0,849 pg.mL ⁻¹	(HE <i>et al.</i> , 2020)

EIE	GCE	BML/ AuNPs/Ac anti-PEN-G	Reaçõe s redox e frequên cia	PEN- G	Leite cru PDECR	3,34x10 ⁻³ – 3,34x10 ³ ng.L ⁻¹	2,74x10 ⁻⁴ ng.L ⁻¹	(LI <i>et al.</i> , 2015)
VPD	GCE	Grafeno/ Zn/Ni-ZIF-8 800)/Citosa n/AuNPs/A c anti- MON/BSA	Reaçõe s redox	MON	Leite comercial PDECR	0,25 – 100 ng.mL ⁻¹	0,11 ng.mL ⁻¹	(HU <i>et al.</i> , 2019)
VOQ	AuE	Ap tiolado/ Ap de CLO	Reaçõe s redox	CLO	Leite comercial PDECR	1,60x10 ⁻⁹ – 4,20x10 ⁻⁷ M	1,60x10 ⁻⁹ M	(PILEH VAR <i>et al.</i> , 2012)
Amper ometri a	ECI	BRM/ PBR/His- Tag-PM	Reaçõe s redox e frequên cia	PEN- G/ PEN- G@P RF	Leite comercial PDECR	34,0 – 255,1 nM	12,0 nM	(GAME LLA <i>et al.</i> , 2013)
				AMO/ PEN- G@P RF		52,9 – 129,5 nM	39,0 nM	
				AMP/ PEN- G@P RF		62,0 – 238,1 nM	38,0 nM	
				CEF/ PEN- G@P RF		33,5 – 290,8 nM	15,6 nM	
				OXA/ PEN- G@P RF		49,3 – 270,2 nM	34,0 nM	
				CLX/ PEN- G@P RF		75,3 – 531,2 nM	44,8 nM	
Amper ometri a	ECI	BRM/ PG@PM/ Ac anti- TET PG@PM/ Ac anti- OXA PG@PM/ Ac anti- CLT PG@PM/ Ac anti- DOX	Reaçõe s redox e frequên cia	TET/ PRF	Leite comercial PDECR	17,8 – 189,6 ng.mL ⁻¹	8,90 ng.mL ⁻¹	(CONZ UELO <i>et al.</i> , 2012)
				OXA/ PRF		4,00 – 242,3 ng.mL ⁻¹	1,20 ng.mL ⁻¹	
				CLT/ PRF		144,2 – 2,00x10 ³ ng.mL ⁻¹	66,8 ng.mL ⁻¹	
				DOX/ PRF		2,60 – 234,9 ng.mL ⁻¹	0,70 ng.mL ⁻¹	
VPD	Disco de Au	HP2/MCH	Reaçõe s redox	CAN/ AM	Leite comercial PDECR	0,05 – 200 pM	36 fM	(ZENG <i>et al.</i> , 2018)
VPD	ECI	NTsCMPG/ NFsC@Au NPs/Ag	Reaçõe s redox	CAN	Leite comercial PDECR	0,10 – 100 nM	74,50 pM	(LI <i>et al.</i> , 2018)

		anti-CAN/Cd		EST			36,45 pM	
VC	<i>Test strips</i> papel de filtro	NTsCMPG/NFsC@Au NPs/Ag anti-EST/Pb	Reações redox	NEO	Leite comercial PDECR	0,20 – 125 ng.mL ⁻¹	0,04 ng.mL ⁻¹	(WU <i>et al.</i> , 2012)
Amperometria	EMGE	PM-Ac anti-CIP/EH	Reações redox e frequência	CIP/PRF	Leite comercial PDECR	4,30x10 ⁻² – 7,38 µg.mL ⁻¹	0,90 ng.mL ⁻¹	(PINACHO <i>et al.</i> , 2014)
EIE	ECV	OG-3ampi/AgNPs/Ap anti-CLO	Reações redox e frequência	CLO	Leite comercial PDECR	1,00 – 1x10 ⁻³ nM	0,30 pM	(ROUSHANI <i>et al.</i> , 2019)
VC	ECV	GT/PLP <i>BlaR-CTD</i>	Reações redox	CEX CEF/PRF CFX CTT PEN-G AMP	Leite comercial PDECR	– 0,10 – 8,00 µg.L ⁻¹ s/d – – –	14,9 µg.L ⁻¹ 0,16 µg.L ⁻¹ 2,46 µg.L ⁻¹ 17,2 µg.L ⁻¹ 0,06 µg.L ⁻¹ 0,21 µg.L ⁻¹	(WANG <i>et al.</i> , 2020b)
EIE	ECI	Ap anti-PEN-G	Reações redox e frequência	PEN-G	Leite comercial PDECR	0,40 – 1,00x10 ³ µg.L ⁻¹	0,17 µg.L ⁻¹	(PANIEL <i>et al.</i> , 2017)
EIE	ECI	OG/PEDOT/Ac anti-CLE	Reações redox e frequência	CLE/PRF	Leite comercial PDECR	5,00 – 150 ng.mL ⁻¹	1,96x10 ⁻¹ ng.mL ⁻¹	(TALIB; SALAM; SULAIMAN, 2018)
EIE	ECI	4-CP/Ap anti-CAN	Reações redox e frequência	CAN	Leite comercial PDECR	1,20 – 600,0 ng.mL ⁻¹	0,11 ng.mL ⁻¹	(SHARMA <i>et al.</i> , 2017)
EIE	PET, Sigel, AgIC	Ap anti-AMP	Reações redox e frequência	AMP	Leite comercial PDECR	100 – 1,00x10 ⁴ µM	10 µg.L ⁻¹	(ROSA TI <i>et al.</i> , 2019)
Amperometria	Grafite	PG/Ac anti-SUP (cátodo); CDH (ânodo)	Reações redox e frequência	SUP/PRF	Leite comercial PDECR	5,00 – 55,0 ng.mL ⁻¹	2,4 ng.mL ⁻¹	(CONZUELO <i>et al.</i> , 2014a)
VPD	ECV	AuNPs/Ap	Reação	AMP	Leite	0,10 –	32,0 pM	(WANG

		anti-AMP	s redox		comercial	100 nM		<i>et al.</i> , 2019)
VPD	AuE	Ap anti-AMP	Reações redox	AMP/AM	Leite comercial PDECR	5,00 pM – 10 nM	1,09 pM	(WANG <i>et al.</i> , 2015)
VPD	AuE	Ap HP de CAN/hemin	Reações redox	CAN/PRF	Leite comercial PDECR	1,00 – 10,0 pM	0,50 pM	(HAN <i>et al.</i> , 2017)
VVL	ECV	OG/AgNPs/Ap anti-CLO/MHC	Reações redox	CLO	Leite comercial PDECR	0,01 – 35,0 µM	2,00 nM	(LIU <i>et al.</i> , 2017)
VOQ	ECV	UiO-66-NH ₂ /MCA/NtsCPM@OGR/Ap anti-CAN	Reações redox	CAN	Leite comercial PDECR	25,0 – 900 nM	13,0 nM	(YAO <i>et al.</i> , 2020)
VPD	AuE	TI/AuNPs/Ap anti-CAN	Reações redox	CAN	Leite comercial PDECR	0,01 – 0,20 µM	8,60 nM	(LI <i>et al.</i> , 2014)
EIE	ECV	CB/CT/T4A	Reações redox e frequência	CAN	Leite comercial PDECR	0,70 – 50,0 nM	0,30 nM	(KULIKOVA <i>et al.</i> , 2020)
EIE	ECV	NTsC/MoSe ₂ /AuNPs	Reações redox e frequência	CAN	Leite comercial PDECR	100 nM – 10,0 µM	0,28 pM	(AZADB AKHT; ABBASI, 2019)
VPD	AuE	MSF/AgNPs/Ap anti-EST	Reações redox	EST	Leite comercial PDECR	1,00 fg.mL ⁻¹ – 6,20 ng.mL ⁻¹	0,33 fg.mL ⁻¹	(ROUSHANI; GHANBARI, 2019)
Fotoeletroquímico	OEDF	nTiO ₂ /CdS:Eu ⁺³ PC	Alteração de resistência e fotocorrente	CLO	Leite comercial PDECR	1,00 pM – 3,00 nM	0,36 pM	(WANG <i>et al.</i> , 2018b)
VPD	ECI	Ap anti-TET/AuNPs/ferróceno Ap anti-TET/AuNPs/NFC	Reações redox	TET	Leite comercial PDECR	1,00x10 ⁻⁸ – 1,00x10 ⁻³ g.L ⁻¹	3,30x10 ⁻⁷ g.L ⁻¹	(XU <i>et al.</i> , 2017)

*4-ABA = Ácido 4-aminobenzoico; 4-CP = 4-carboxifenil; Ag = prata; AgIC = papel brilhante; AgNPs = nanopartículas de prata; AM = azul de metileno; AMO = amoxicilina; ANT = Ácido nitrilotriacético tetradentado; AuE = eletrodo de ouro; BlaR-CTD = tipo específico de proteína; BML = bicamada de membrana lipídica; BRM = bloco de retenção magnético; CAM = cronoamperometria; CB = carbon black; Cd = cádmio; CDH = celobiose desidrogenase; CEF = ceftiofur; CEL = cefalosporina; CEX = cefalexina; CFX = cefquinoxima; CLE = clenbuterol; CT = quitosana; CTT = ceftotafur; CLT = clortetraciclina; CLX = cloxacina; DOX = doxiciclina; ECI = eletrodo de carbono impresso; EIE = espectroscopia de impedância eletroquímica; EH = enzima haptenizada; EMGE = eletrodo magnético de grafite-epóxi; EMO = estrutura metal orgânica; EST = estreptomicina; FC = ftalalocianina de cobalto; GCE = eletrodo de carbono vítreo; GT = grafeno/thionina; HP = hairpin; M = mol.L⁻¹; MCH = 6-mercaptop-1-hexanol; MON = monensina; MoSe₂ = seleneto de molibdênio; MN-P(AV)-co-E = Membrana de nanofibras de poli (álcool vinílico) co-etileno; MSF = filme de sílica mesoporosa; NFC = nanofibra de carbono; NFsCAuNPs = nanofibra de carbono ligado a nanopartículas de ouro; NTsC = nanotubo de carbono; NTsCPS = nanotubo de carbono de paredes simples; NTsCMPG = nanotubo de carbono de múltiplas paredes grafítadas; NTsCPM = nanotubos de carbono de parede múltipla; OG-3ampi = óxido de grafeno funcionalizado com 3-aminometil piridina; OGR =

óxido de grafeno reduzido; OXA = oxatetraciclina; Pb = chumbo; PC = pasta de carbono; PEDOT = poli(3,4-etilenodioxitiofeno); PEN = penicilina; PET = tereftalato de polietileno; PG = proteína G; PLP = proteína de ligação a penicilina; PL-PBR = proteína de ligação a penicilina bacteriana recombinante; PM = partículas magnéticas; PRF = peroxidase de raiz forte; Pt = platina; SiF_6^{2-} = íon hexafluoreto de silício; Sigel = papel fotográfico comercial; SUP = sulfapiridina; T4A = thiocalix [4] areno; UiO-66-NH₂ = nanocompósito de estrutura orgânica de metal funcionalizada com amina; VC = voltametria cíclica; VOQ = voltametria de onda quadrada; VPD = voltametria de pulso diferencial; VVL = voltametria de varredura linear.

Fonte: O autor, 2021.

2.5.1.3 Outros biossensores

Demais biossensores encontrados na literatura possuem características peculiares entre si, como análise de variação de massa, bem como diferentes materiais imobilizados. Em 2014, Gruhl e colaboradores desenvolveram um biossensor baseado na variação da frequência por uma técnica de onda acústica – Tabela 6. Com um eletrodo de ouro modificado com antígenos específicos para penicilina-g, os autores encontraram um LOD em escala nanométrica ($2,20 \text{ ng.mL}^{-1}$) em amostras de leite comercial PDCER.

No ano seguinte, Mishra e colaboradores desenvolveram uma metodologia que resultou em um LOD também em escala nanométrica. Nesse trabalho, os autores utilizaram um cristal de quartzo de ouro para realizar a imobilização de anticorpos específicos para o resíduo de antibiótico estreptomicina, sendo empregando uma técnica de injeção de fluxo neste sistema piezoelétrico.

Por fim, o último trabalho diferente dos demais estudados foi o de Lu e colaboradores, publicado em 2019. No artigo é proposto uma forma diferente de análise, mediante a captura de imagens com a câmera de um smartphone para análise de resíduos de ciprofloxacina em amostras comerciais de leite PCDER. Nesta metodologia, células de *E. coli* foram imobilizadas sobre um chip comercial (BacChip), e submetidas aos resíduos de ciprofloxacina, sendo quando presente na amostra, promove uma alteração da intensidade da luz, devido o contato entre o resíduo e a bactéria.

TABELA 6 – OUTROS BIOSSENSORES APLICADOS A ANÁLISE DE RESÍDUOS DE ANTIBIÓTICOS EM LEITE

Técnica	Eletrodo	Modificação	Deteção	Resíduo	Amostra	Faixa Linear	Limite de Detecção	Ref.
NMR	Imunoensaio	SPIO-Ag/ Ac-BIO/ ESV	Tempo transversal de relaxação	CAN	Leite comercial PDCER	1,50 – 25,2 ng.mL^{-1}	0,10 ng.mL^{-1}	(CHEN <i>et al.</i> , 2013)

Images capturadas pela câmera de smartphone	BacChip	Células repórter de <i>E. coli</i>	mento Luminescência	CIP	Leite comercial PDECR	8,00 – 32,0 ng.mL ⁻¹	7,20 ng.mL ⁻¹	(LU <i>et al.</i> , 2019)
FIA-EQCN	AuCQ	Ac anti-EST	Variação de massa	EST	Leite comercial PDECR	0,30 – 300 ng.mL ⁻¹	0,30 ng.mL ⁻¹	(MISHRA; SHARMA; BHAND, 2015)
OAS	AuE	Ag anti-PEN-G	Variação de frequência	PEN-G	Leite comercial PDECR	–	2,20 ng.mL ⁻¹	(GRUHL; LÄNGE, 2014)

*AuCQ = cristal de quartzo de ouro; BIO = biotimidado; CIP = ciprofloxacina; ESV = estreptavidina; FIA-EQCN = injeção de fluxo em nanobalança de cristal de quartzo; NBCQ = nanobalança de cristal de quartzo; NMR = ressonância magnética nuclear; OAS = onda acústica superficial; SPIO= óxido de ferro super-paramagnético.

Fonte: O autor, 2021.

2.6 Discussão

Os biossensores descritos nos tópicos anteriores e nas tabelas resumem os estudos de provas de conceito publicados nos últimos dez anos. Devido à preocupação do cenário mundial de uso de antibióticos em bovinos leiteiros, a necessidade de metodologias ágeis aplicadas a campo, bem como as contaminações provenientes do consumo de leite de bovinos contaminados, estes dispositivos propõem características suficientes para realizar a detecção em tempo correto (KIVIRAND; KAGAN; RINKEN, 2015).

Apesar da quantidade de trabalhos, dificilmente é observado o emprego de biossensores no setor lácteo, considerando a retirada, captação e armazenamento do leite, sem processamento. A justificativa para este fato está no emprego de técnicas de imunoenaios pela indústria (SOMATICELL, 2021). Além disso, a viabilidade dos biossensores ainda é muito precária, no sentido de conseguir automatização, escalabilidade do aparato, bem como viabilidade econômica adequada ao setor.

Em termos gerais, os trabalhos dos últimos dez anos avaliaram dezenas de compostos residuais diferentes (34 resíduos de antibióticos diferentes em 67

trabalhos), sendo a canamicina (18 trabalhos), o cloranfenicol (9 trabalhos), a ampicilina (6 trabalhos) e penicilina-g (6 trabalhos) como os principais compostos. Essas drogas terapêuticas necessitam de uso racional, visando contornar resíduos nos alimentos devido aos problemas enfrentados na indústria, sendo assim o conhecimento sobre os fármacos o fator primordial antes de um processo de análise.

Com o maior número de trabalhos, a canamicina é um aminoglicosídeo empregado para combater doenças infecciosas ocasionadas por bactérias gram-negativas, mediante inibição da síntese proteica (DRUGS.COM, 2020). Antigamente, esse composto era amplamente empregado para combater a bactéria causadora da Tuberculose, em humanos (ARBEX *et al.*, 2010). Contudo os efeitos extremamente tóxicos – problemas graves de audição, equilíbrio e nos rins; e baixo espectro de ação, fizeram a substituição deste composto (LAWRENCE R. LUSTIG, 2020). No entanto, a canamicina possui uma empregabilidade no tratamento de vacas com mastite clínica, sendo que atualmente, os fármacos contendo esta droga são muito eficazes, principalmente intramamário como o Ubrolexin®, a qual possui cinco dias de carência, após a última aplicação, para consumo do leite (nível de tolerância no Brasil) (BOEHRINGER INGELHEIM, 2021).

Ao contrário do Brasil, nos Estados Unidos da América (EUA) a canamicina não é autorizada para ser empregada em animais produtores de alimentos. Portanto, os testes para avaliarem resíduos de canamicina são mais rígidos e presentes em países com legislações semelhantes ao dos EUA (FOOD AND DRUG ADMINISTRATION (FDA); U.S. DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES, 2015). Dentre as formas de detecção atualmente empregadas para avaliar a canamicina em leite, com base ao utilizado nos EUA, estão o uso de testes rápidos, baseados em IFL e teste ELISA. No primeiro caso, temos o *BALLYA Kanamycin Test*, que realiza a avaliação de até 96 amostras em um período de 7 a 10 minutos (BALLYA, 2021). Em relação os testes de ELISA, temos como exemplo o produzido pela empresa Ringbio®, o qual possui um custo base de \$400,00 e sensibilidade de 1 ng.mL⁻¹, em uma faixa de 0,01 – 1.000 ng.mL⁻¹ (RINGBIO, 2021b). Além disso, existem testes com base em amostras de leite preparadas em laboratório para avaliar somente a canamicina, tendo como exemplos os produzidos pela CD Creative Diagnostics®, que detectam até uma sensibilidade de 50 ppb em 5 a 8 minutos (CREATIVE DIAGNOSTICS, 2021); e o produzido pela BioVision®, o

qual detecta até uma sensibilidade de 0,50 ppb e o kit custa \$750,00 (BIOVISION, 2021).

Quanto aos biossensores, nenhum biossensor comercial para canamicina foi encontrado à venda na internet. Contudo, ao observar o material selecionado nas tabelas 3, 4 e 5, é possível identificar trabalhos que possuem características interessantes a serem trabalhadas comercialmente, como baixo LOD atrelado a uma boa faixa linear, sistema de detecção, eletrodo e modificação menos onerosos. Dentre os 18 trabalhos que avaliaram canamicina, dois biossensores e um imunoenensaio apresentaram características sensíveis e seletivas. Em 2017 com Luan e colaboradores, mediante a técnica de EUV e o uso de nano Fe-MIL-88NH₂ na constituição do eletrodo, juntamente a aptâmeros formato *hairpin*, obtendo LOD de 0,20 pg.mL⁻¹ (LUAN *et al.*, 2017); no ano seguinte Zeng e co-autores empregaram VPD, disco de ouro como eletrodo e seleção de aptâmero *hairpin*, obtendo LOD de 36 fM (0,017 pg.mL⁻¹) (ZENG *et al.*, 2018); e em 2019, o imunoenensaio de Lin e colaboradores, por meio da técnica EF com o ensaio desenvolvido na forma de ensaio imunoabsorvente ligado a aptâmero baseado em fluorescência (EILAF), e NPsC para resultar em excepcional sinal fotoquimioluminescence, obtendo um LOD de 0,05 fg.mL⁻¹ (LIN *et al.*, 2019).

Trabalhos como os descritos acima proporcionam baixíssimos LOD, excelente faixa linear, bem como observações peculiares. Os trabalhos de Luan e Zeng empregaram seleção de aptâmero na forma de *hairpin* para selecionar moléculas de extrema sensibilidade e desenvolver seus biossensores. Em outro ponto, Lin elaborou um imunoenensaio com qualidade muito superior aos demais de forma mais rápida e sensível, possibilitando assim, demais trabalhos se basearem para desenvolver metodologias semelhantes aplicadas a biossensores. Nestes casos, esses trabalhos possuem maior direcionamento para pesquisa e, principalmente, em grandes indústrias de produtos lácteos (Nestlé, Embaré, Vigor, Laticínios Bela Vista, entre outros), visando controle de qualidade no recebimento da matéria bruta.

Seletivos e sensíveis, características que envolvem preço, como material dos eletrodos e modificações, ainda são um problema nesse tipo de trabalho, uma vez que empregam formas de obter baixíssimos LODs e muitas das vezes o custo para escalabilidade da técnica se torna oneroso, principalmente para o produtor de leite. Materiais alternativos como os eletrodos de grafite de lapiseira constituem formas

baratas para produção de biossensores (MELO *et al.*, 2011), podendo utilizar da engenharia genética para seleção e produção de aptâmeros específicos produzidos em laboratório, e escalonados, por exemplo, em biorreatores (GUIMARÃES *et al.*, 2003), com intuito de diminuir o custo em larga escala, tornar acessível os materiais, e produzir sistemas sensíveis e seletivos, como visto nos biossensores de canamicina.

Outro antibiótico diversamente empregado, no entanto, no exterior, é o cloranfenicol e seus derivados de classe, os anfenicóis. Utilizado geralmente como antibiótico para problemas de conjuntivite, esse fármaco possui aplicação tópica, via oral ou endovenosa, sendo os dois últimos somente em casos mais graves. Além disso, possui aplicações em doenças respiratórias, do trato gastro intestinal e infecções uterinas, atuando por inibição da síntese proteica (MATHIAS, 2020). Também, o cloranfenicol é um fármaco que não deve ser consumido por mulheres grávidas, uma vez que pode desencadear a Síndrome da Plaqueta Cinzenta, um quadro clínico que consiste na acumulação de cloranfenicol no recém-nascido, gerando sintomas como vômitos, cianose, colapso circulatório e morte (SILVESTRE *et al.*, 2009).

Testes para diagnóstico dos níveis de cloranfenicol no corpo de um ser humano são disponibilizados no mercado. Para avaliação em bovinos produtores de leite, existem testes empregados no mercado dos EUA, onde existe maior índice de uso, disponíveis comercialmente. Entre eles temos o Charm® *ROSA Chloramphenicol Milk Test Kit*, o qual custa \$94,58 + \$230,42 do incubador necessário para realizar o processo. A sensibilidade da detecção é 0,10 ppb entre um intervalo de 8 minutos, podendo ser aplicado em amostra de leite sem tratamento (CHARM, 2021). Além deste citado, existe um produzido pela RingBio®, denominado *Chloramphenicol ELISA kit*, o qual realiza um teste de imunoensaio com sensibilidade de 0,025 ppb em 96 amostras distribuídas pela placa de ELISA. Além disso, o aparato leva 75 minutos para ser realizado, podendo empregar amostras não tratadas (RINGBIO, 2021a).

Outros testes são disponibilizados no mercado, contudo não foram encontrados biossensores comerciais para estes fins. Porém, como observado para a canamicina, no caso do cloranfenicol existem metodologias interessantes. Wang, J. e colaboradores desenvolveram um IFL-MF, para detecção de vários anfenicóis, incluindo o cloranfenicol, onde sua funcionalidade está baseada no suporte de papel

e membrana de nitrocelulose, por onde ocorrerá o imunoensaio na forma de teste rápido (WANG *et al.*, 2017a). Além disso, o trabalho produziu alta sensibilidade teórica para o cloranfenicol (LOD 0,08 pg.mL⁻¹), atrelado ao possível uso em amostras cegas de leite, ou seja, sem tratamento.

Um ano após o trabalho de Wang, J., 2017, El Moghazy e co-autores também desenvolveram uma metodologia eletroquímica interessante, com base no uso de amperometria em ECI (EL-MOGHAZY *et al.*, 2018). Neste trabalho, os autores utilizaram materiais poliméricos para modificar o eletrodo, juntamente a anticorpos anti-CLO. Além disso, também desenvolveram uma metodologia capaz de ser empregada em amostras não tratadas de leite, com alta sensibilidade teórica (LOD 4,70 pg.mL⁻¹).

Por fim, temos o trabalho de Nie e colaboradores, os quais por meios ópticos desenvolveram uma metodologia que utiliza fibra óptica quimioluminescente para detectar diferentes compostos, incluindo o cloranfenicol, em amostras de leite, por meio de imobilização de anticorpos e imunoensaios múltiplos com marcadores fluorescentes (NIE *et al.*, 2019). As fibras empregadas possuem diâmetros diferentes para cada composto, sendo a que realizaram o teste com CLO a de menor diâmetro, e por isso o maior LOD entre os resíduos analisados (2,86 pg.mL⁻¹).

Assim como observado nos trabalhos da canamicina, as provas de conceito do cloranfenicol apresentam diversas formas de eletrodos, modificações e técnica empregada. Contudo, a falta de escalabilidade desses biossensores, visto que existem imunoensaios comerciais que suprem a demanda da indústria láctea, promove um menor investimento das empresas para disponibilizar dispositivos acessíveis aos produtores, a fim de aplicação corriqueira e controle total dos resíduos na matéria-prima.

Apesar de existirem outros trabalhos com resíduos mais avaliados, como é o caso da ampicilina e da penicilina-g, ambos são fármacos que não promovem efeitos colaterais graves semelhantes aos supracitados (BLUMENTHAL, 2019; CUNHA, 2020). Portanto, outros resíduos não tão bem evidenciados nas buscas são, quanto aos problemas associados, importantes de serem abordados. Entre eles temos os resíduos de outros aminoglicosídeos, como estreptomicina e neomicina – problemas graves de equilíbrio, por exemplo (WERTH, 2020); medicamentos com base amplamente empregadas em terapias de vaca seca e mastites, como cloxacilina e gentamicina – problemas gastrointestinais, no sangue e rins, por

exemplo (DAILYMED, 2021). Além disso, existem outros fármacos que possuem proibições para serem aplicados em animais produtores de alimento, e mesmo assim são encontrados em alguns casos, tendo como exemplo as sulfas.

O problema dos resíduos de antibióticos, principalmente daqueles que não possuem muitos biossensores descritos, que, por coincidência são altamente empregados, está na relação entre o saber do produtor da matéria-prima (pecuaristas) e a falta de disseminação de políticas de incentivo a melhor qualidade do produto por parte dos laticínios. Isto afeta principalmente os pequenos produtores, evidenciando um uso de diversas formulações, muitas das vezes não aplicadas a animais produtores de leite, promovendo a produção de resíduos. Outro ponto está relacionado a erros de anotações quanto ao tempo adequado de descarte de leite de determinado animal em tratamento, levando não somente a contaminação dos produtores ao ingerirem o leite contaminado com resíduos, bem como prejuízos financeiros devido às punições dos laticínios, os quais geralmente cobram em cima do volume de leite da carga do caminhão de transporte, o que compromete a renda do trabalhador em campo.

Para controle eficaz dessa vertente, empresas responsáveis por assistência técnica na qualidade do leite, as quais promovem a disseminação de conhecimento acerca do melhor controle de anotações sobre a administração de antibióticos no gado, bem como o uso de ferramentas de cultura de microrganismos e análise de contagem bacteriana total (CBT) e CSS, são necessárias para direcionamento das fazendas a um uso racional de antibióticos. Com esse trabalho é possível determinar: qual antibiótico deverá ser empregado mediante análise de cultura de leite de determinado animal contaminado com alguma mastite clínica; quais animais são necessários utilizar a terapia da vaca seca, na maioria das vezes não necessária; que apenas certos microrganismos causadores de mastite subclínica são tratáveis durante a lactação; a necessidade de realizar análises de todo o rebanho quanto aos parâmetros que definem contaminação, geralmente o CCS (MILKPOINT, 2020); separação de animais que produzem grumo e descarte adequado desse leite; e também o uso de uma dieta elaborada para evitar transtornos imunológicos. Outras formas relacionadas à persistência de determinado microrganismo na fazenda também podem ser tomadas, visando redução.

Em termos de análise de resíduos de antibióticos, o uso de biossensores ainda carece de empregabilidade no mercado, principalmente pelo fato de existirem

métodos ágeis, já empregados pela indústria, que filtram boa parte da matéria-prima. Contudo, existe uma necessidade de desenvolver metodologias mais aplicadas ao setor, visando sempre o baixo custo, fácil manejo, e detecção em parâmetros de lei (FAGNANI, 2019), tendo em vista comercialização ao produtor primário. Portanto, atualmente as metodologias citadas nesse trabalho podem ser rearranjadas a fim de redução de tempo e prototipação, empregando materiais mais baratos como o grafite oriundo de lapiseira, ou métodos com fluoróforos.

3. CONCLUSÃO

Apesar de existirem testes presentes no mercado, os mesmos são onerosos o suficiente para serem aplicados somente na indústria, sendo muitas das vezes selecionados somente alguns tipos de resíduos a serem avaliados, mediante a legislação de cada país. Com isso, os biossensores desenvolvidos devem tomar como uma das direções, desenvolver aparelhos com custo relativo ao disponibilizado pelos pecuaristas, para que o teste possa ser vendido direto ao produtor para ser realizado de forma mais corriqueira, ou mesmo visando ampliar o leque de validações da indústria, de forma a captar um leite com maior qualidade. Além do fato de que, o tempo hábil de análise é algo indiscutível no momento de elaboração de biossensor, visando não somente a competição de mercado, quanto a real funcionalidade para os produtores.

REFERÊNCIAS

- ABEBE, Rahmeto *et al.* Bovine mastitis: prevalence, risk factors and isolation of *Staphylococcus aureus* in dairy herds at Hawassa milk shed, South Ethiopia. **BMC Veterinary Research**, [s. l.], v. 12, n. 270, p. 1–11, 2016. Disponível em: <https://doi.org/https://doi.org/10.1186/s12917-016-0905-3>
- ABEDALWAFI, Mohammed Awad *et al.* An aptasensor strip-based colorimetric determination method for kanamycin using cellulose acetate nanofibers decorated DNA–gold nanoparticle bioconjugates. **Microchimica Acta**, [s. l.], v. 187, n. 6, p. 1–9, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00604-020-04348-x>. Acesso em: 23 jun. 2021.
- ABRAHÃO, Regina Maura Cabral de Melo. Tuberculose humana causada pelo *Mycobacterium bovis*: considerações gerais e importância dos reservatórios animais. **Archives of Veterinary Science**, Curitiba, v. 4, n. 1, p. 5–15, 1999. Disponível em: <https://doi.org/10.5380/AVS.V4I1.3771>. Acesso em: 6 jul. 2021.
- AGHAMOHAMMADI, Mahjoob *et al.* Herd-level mastitis-associated costs on canadian dairy farms. **Frontiers in Veterinary Science**, [s. l.], v. 5, n. 100, p. 1–12, 2018. Disponível em: <https://doi.org/https://doi.org/10.3389/fvets.2018.00100>
- ALBRECHT, Helmut. Granulomatous Diseases of the Liver. *In*: BOYER, Thomas D.; MANNS, Michael P.; SANYAL, Arun J. (org.). **Zakim and Boyer's Hepatology**. Sixth edited. [S. l.]: W.B. Saunders, 2012. p. 671–682. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/B978-1-4377-0881-3.00037-1>
- ALMEIDA, Rodrigo de. **Raça holandesa: pontos fortes, limitações de hoje e oportunidades no futuro**. [S. l.], 2007. Disponível em: <https://www.milkpoint.com.br/artigos/producao-de-leite/raca-holandesa-pontos-fortes-limitacoes-de-hoje-e-oportunidades-no-futuro-36674n.aspx>. Acesso em: 5 fev. 2021.
- ALTINTAS, Zeynep. Surface plasmon resonance based sensor for the detection of glycopeptide antibiotics in milk using rationally designed nanoMIPs. **Scientific Reports**, [s. l.], v. 8, n. 11222, p. 1–12, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41598-018-29585-2>
- ANDERSON, Leigh Ann. **Antibiotics Guide**. [S. l.]: Drugs.com, 2019. Disponível em: <https://www.drugs.com/article/antibiotics.html>. Acesso em: 25 fev. 2021.

ARAUZ, Luciana Juncioni de *et al.* Culture medium of diluted skimmed milk for the production of nisin in batch cultivations. **Annals of Microbiology**, [s. l.], v. 62, p. 419–426, 2012. Disponível em: <https://doi.org/https://doi.org/10.1007/s13213-011-0278-6>

ARBEX, Marcos Abdo *et al.* Drogas antituberculose: Interações medicamentosas, efeitos adversos e utilização em situações especiais. Parte 2: Fármacos de segunda linha. **J. Bras. Pneumol.**, São Paulo, v. 35, n. 5, p. 641–656, 2010.

AYTENFSU, Samuel; MAMO, Gezehegne; KEBEDE, Bedaso. Review on Chemical Residues in Milk and Their Public Health Concern in Ethiopia. **Journal of Nutrition & Food Sciences**, [s. l.], v. 6, n. 4, p. 1–11, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.4172/2155-9600.1000524>

AZADBAKHT, Azadeh; ABBASI, Amir Reza. Impedimetric aptasensor for kanamycin by using carbon nanotubes modified with MoSe₂ nanoflowers and gold nanoparticles as signal amplifiers. **Microchimica Acta**, [s. l.], v. 186, n. 1, p. 1–10, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00604-018-3130-x>. Acesso em: 26 jun. 2021.

AZOOZ, M. F.; EL-WAKEEL, Safaa A.; YOUSEF, H. M. Financial and economic analyses of the impact of cattle mastitis on the profitability of Egyptian dairy farms. **Veterinary World**, [s. l.], v. 13, n. 9, p. 1750–1759, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.14202/vetworld.2020.1750-1759>

BABINGTON, Ruth *et al.* Current bioanalytical methods for detection of penicillins. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, [s. l.], v. 403, p. 1549–1566, 2012. Disponível em: <https://doi.org/https://doi.org/10.1007/s00216-012-5960-4>

BAHREYNI, Amirhossein *et al.* A fluorescent sensing strategy for ultrasensitive detection of oxytetracycline in milk based on aptamer-magnetic bead conjugate, complementary strand of aptamer and PicoGreen. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, [s. l.], v. 246, n. 119009, p. 1–7, 2021. Disponível em: <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.saa.2020.119009>

BALLYA. **Kanamycin Test - Kanamycin Uses - BALLYA**. Gunangzhou, China, 2021. Disponível em: <https://ballyabio.com/kanamycin-test/>. Acesso em: 21 jul. 2021.

BANSAL, B. K. *et al.* Variation in the composition of selected milk fraction samples from healthy and mastitic quarters, and its significance for mastitis diagnosis. **Journal Dairy Research**, Boston, Massachusetts, v. 72, n. 2, p. 144–152, 2005. Disponível em: <https://doi.org/10.1017/s0022029905000798>

BARONI, André Eller *et al.* Prevalência soroepidemiológica de *Leptospira* spp. em rebanhos bovinos leiteiros da mesorregião do Rio Doce no Estado do Espírito Santo.

PUBVET, [s. l.], v. 14, n. 2, p. 1–11, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.31533/pubvet.v14n2a505.1-11>. Acesso em: 4 ago. 2021.

BELMAR, Marlene *et al.* Evaluation of four commercial tests for detecting ceftiofur in waste milk bulk tank samples. **PLoS ONE**, Davis, United States of America, v. 14, n. 11, p. 1–11, 2019. Disponível em: <https://doi.org/https://doi.org/10.1371/journal.pone.0224884>

BENEDETTO, Giuseppe Egidio De *et al.* Response surface methodology for the optimisation of electrochemical biosensors for heavy metals detection. **Biosensors**, [s. l.], v. 9, n. 1, p. 26–36, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/bios9010026>

BERKHOUT, Natalie. **EU: sales of veterinary antibiotics dropping**. [S. l.], 2020. Disponível em: <https://www.allaboutfeed.net/Feed-Additives/Articles/2020/12/EU-Sales-of-veterinary-antibiotics-dropping-678637E/>. Acesso em: 22 jan. 2021.

BEURON, Daniele C. *et al.* Risk factors associated with the antimicrobial resistance of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, Brazil, v. 34, n. 10, p. 947–952, 2014. Disponível em: <https://doi.org/https://doi.org/10.1590/S0100-736X2014001000004>

BHALLA, Nikhil *et al.* Introduction to biosensors. **Essays in Biochemistry**, London, England, v. 60, n. 1, p. 1–8, 2016. Disponível em: <https://doi.org/https://doi.org/10.1042/EBC20150001>

BIOVISION. **Kanamycin ELISA Kit | K4210**. [S. l.], 2021. Disponível em: <https://www.biovision.com/kanamycin-elisa-kit.html>. Acesso em: 21 jul. 2021.

BLOWEY, W. Roger; WEAVER, A. David. Infectious diseases. *In*: COLOR ATLAS OF DISEASES AND DISORDERS OF CATTLE. 3th Ed.ed. [S. l.: s. n.], 2011. p. 221–245. Disponível em: <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-7234-3602-7.00018-2>

BLUMENTHAL, Kimberly. **Do you really have a penicillin allergy?**. [S. l.], 2019. Disponível em: <https://www.health.harvard.edu/blog/do-you-really-have-a-penicillin-allergy-2019022616017>. Acesso em: 21 jul. 2021.

BOECKEL, Thomas P. Van *et al.* Global trends in antimicrobial use in food animals. **PNAS**, [s. l.], v. 112, n. 18, p. 5649–5654, 2015. Disponível em: <https://doi.org/https://doi.org/10.1073/pnas.1503141112>

BOEHRINGER INGELHEIM. **Ubrolxin®**. [S. l.], 2021. Disponível em: <https://www.boehringer-ingelheim.com.br/saude-animal/bovinos/ubrolxin>. Acesso em: 21 jul. 2021.

BORSANELLI, Ana Carolina *et al.* Presence of Porphyromonas and Prevotella species in the oral microflora of cattle with periodontitis. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, [s. l.], v. 35, n. 10, p. 829–834, 2015. Disponível em: <https://doi.org/https://doi.org/10.1590/S0100-736X2015001000002>

BRAWAND, Stefanie Gobeli *et al.* An unusual case of bovine anthrax in the canton of Jura, Switzerland in 2017. **BMC Veterinary Research**, [s. l.], v. 15, n. 265, 2019. Disponível em: <https://doi.org/https://doi.org/10.1186/s12917-019-1996-4>

BRITO, Maria Aparecida *et al.* **Composição**. [S. l.], 2021. Disponível em: https://www.agencia.cnptia.embrapa.br/Agencia8/AG01/arvore/AG01_128_21720039243.html. Acesso em: 20 jan. 2020.

BUCHER, Michael *et al.* Epidemiological Data on Pathogenic Yersinia enterocolitica in Southern Germany During 2000–2006. **Foodborne Pathogens and Disease**, [s. l.], v. 5, n. 3, p. 273–280, 2008. Disponível em: <https://doi.org/https://doi.org/10.1089/fpd.2007.0076>

BUSH, Larry M.; PEREZ, Maria T. **Doença de Lyme**. [S. l.], 2017. Disponível em: <https://www.msmanuals.com/pt-pt/profissional/doencas-infecciosas/espiroquetas/doenca-de-lyme>. Acesso em: 26 jan. 2021.

CAGLAYAN, Mustafa Oguzhan. Aptamer-based ellipsometric sensor for ultrasensitive determination of aminoglycoside group antibiotics from dairy products. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, [s. l.], v. 100, n. 8, p. 3386–3393, 2020. Disponível em: <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/jsfa.10372>

CANADIAN DAIRY INFORMATION CENTRE. **Average milk production by breed based on milk recording**. [S. l.], 2020. Disponível em: <https://www.dairyinfo.gc.ca/eng/dairy-statistics-and-market-information/dairy-animal-genetics/average-milk-production-by-breed/?id=1502476121954>. Acesso em: 3 fev. 2021.

CANAL AGRO. **Por que a pecuária leiteira é tão importante?**. [S. l.], 2019. Disponível em: <https://summitagro.estadao.com.br/agro-no-brasil/negocios-rurais/por-que-a-pecuaria-leiteira-e-tao-importante-para-o-pais/>. Acesso em: 5 fev. 2021.

CANAL RURAL. **Leite: Israel tem a maior produtividade do mundo**. [S. l.], 2018. Disponível em: <https://www.canalrural.com.br/programas/leite-israel-tem-maior-produtividade-mundo-75072/>. Acesso em: 5 jul. 2021.

CANAZA-CAYO, Ali William *et al.* Estrutura populacional da raça Girolando. **Ciência Rural**, [s. l.], v. 44, n. 11, p. 2072–2077, 2014. Disponível em: <https://doi.org/https://doi.org/10.1590/0103-8478cr20131307>

CARDOSO, Clarissa V. *et al.* Farm Test for Rapid Identification of Antibiotic Residues in Raw Milk. **Adv Biotech & Micro**, [s. l.], v. 13, n. 1, p. 9–15, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.19080/AIBM.2019.13.555853>

CARDOSO DE MIRANDA, Matheus *et al.* **Aplicação da técnica de espectroscopia de impedância eletroquímica no estudo de corrosão de ligas metálicas Co-W em meios corrosivos diversos**. 2018. - Universidade Federal Rural do Semiárido, [s. l.], 2018.

CHARM. **ROSA Chloramphenicol Milk Test Kit**. [S. l.], 2021. Disponível em: <https://www.pbsanimalhealth.com/products/rosa-chloramphenicol-milk-test-kit>. Acesso em: 21 jul. 2021.

CHAUDHARI, Pallavi P *et al.* A fiber optic nanoplasmonic biosensor for the sensitive detection of ampicillin and its analogs. **Mikrochim Acta**, [s. l.], v. 187, n. 7, p. 396, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00604-020-04381-w>

CHEN, Jinyuan *et al.* Electrochemical DNA biosensor based on grafting-to mode of terminal deoxynucleoside transferase-mediated extension. **Biosensors and Bioelectronics**, [s. l.], v. 98, n. 15 December 2017, p. 345–349, 2017. Disponível em: <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.bios.2017.07.012>

CHEN, Yiqiang *et al.* Near-infrared fluorescence-based multiplex lateral flow immunoassay for the simultaneous detection of four antibiotic residue families in milk. **Biosensors and Bioelectronics**, [s. l.], v. 79, p. 430–434, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bios.2015.12.062>

CHEN, Yi Ping *et al.* Immunosensor based on magnetic relaxation switch and biotin–streptavidin system for the detection of Kanamycin in milk. **Biosensors and Bioelectronics**, [s. l.], v. 39, n. 1, p. 112–117, 2013. Disponível em: <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.bios.2012.06.056>

CHENG, Jia *et al.* Antimicrobial resistance profiles of 5 common bovine mastitis pathogens in large Chinese dairy herds. **Journal of Dairy Science**, [s. l.], v. 102, n. 3, p. 2416–2426, 2019. Disponível em: <https://doi.org/https://doi.org/10.3168/jds.2018-15135>

CHRIS, Gooderham; CLARKE, Hannah. **UK milk productivity: The global context**. [S. l.], 2020. Disponível em: <https://ahdb.org.uk/news/uk-milk-productivity-the-global-context>. Acesso em: 5 fev. 2021.

COFFEY, E. L. *et al.* Milk production and fertility performance of Holstein, Friesian, and Jersey purebred cows and their respective crosses in seasonal-calving commercial farms. **Journal of Dairy Science**, [s. l.], v. 99, n. 7, p. 5681–5689, 2016. Disponível em: <https://doi.org/https://doi.org/10.3168/jds.2015-10530>

COLLINS, Michael T. **Paratuberculosis ruminants - digestive system**. Wisconsin, 2021. Disponível em: <https://www.merckvetmanual.com/digestive-system/intestinal-diseases-in-ruminants/paratuberculosis-in-ruminants#:~:text=Paratuberculosis%2C caused by Mycobacterium avium paratuberculosis%2C is a,made by PCR. There is no satisfactory treatment.> Acesso em: 4 ago. 2021.

CONZUELO, Felipe *et al.* Disposable and integrated amperometric immunosensor for direct determination of sulfonamide antibiotics in milk. **Biosensors and Bioelectronics**, [s. l.], v. 36, n. 1, p. 81–88, 2012. Disponível em: <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.bios.2012.03.044>

CONZUELO, Felipe *et al.* Immunologically controlled biofuel cell as a self-powered biosensor for antibiotic residue determination. **ChemElectroChem**, [s. l.], v. 1, n. 11, p. 1854–1858, 2014a. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/celec.201402098>. Acesso em: 23 jun. 2021.

CONZUELO, Felipe *et al.* Integrated Amperometric Affinity Biosensors Using Co²⁺–Tetradentate Nitrilotriacetic Acid Modified Disposable Carbon Electrodes: Application to the Determination of β -Lactam Antibiotics. **Analytical Chemistry**, [s. l.], v. 85, n. 6, p. 3246–3254, 2013. Disponível em: <https://doi.org/dx.doi.org/10.1021/ac303604b>

CONZUELO, Felipe *et al.* Rapid screening of multiple antibiotic residues in milk using disposable amperometric magnetosensors. **Analytica Chimica Acta**, [s. l.], v. 820,

p. 32–38, 2014b. Disponível em:
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.aca.2014.03.005>

CREATIVE DIAGNOSTICS. **Kanamycin residue rapid test (milk) (DTS761)**. [S. l.], 2021. Disponível em: <https://www.creative-diagnostics.com/Kanamycin-Residue-Rapid-Test-122847-452.htm>. Acesso em: 21 jul. 2021.

CRNKIC, Cazim; HODZIC, Aida. Nutrition and Health of Dairy Animals. *In*: CHAIYABUTR, Narongsak (org.). **Milk Production - An Up-to-Date Overview of Animal Nutrition, Management and Health**. [S. l.]: IntechOpen, 2012. Disponível em: <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.5772/50804>

CUNHA, John P. **Side Effects of Principen (ampicillin): Interactions & Warnings**. [S. l.], 2020. Disponível em:
https://www.medicinenet.com/side_effects_of_principen_ampicillin/side-effects.htm#:~:text=Common side effects of ampicillin include%3A 1 nausea%2C,itching%2C 8 headache%2C 9 confusion and 10 dizziness. Acesso em: 21 jul. 2021.

DABO, S. M.; TAYLOR, J. D.; CONFER, A. W. Pasteurella multocida and bovine respiratory disease. **Anim Health Res Rev**, [s. l.], v. 8, n. 2, p. 129–150, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1017/S1466252307001399>

DAILYMED. **GENTAMICIN - gentamicin sulfate injection, solution**. [S. l.], 2021. Disponível em: <https://dailymed.nlm.nih.gov/dailymed/drugInfo.cfm?setid=84f5c763-1cd3-4d85-9afb-934db8666fbf#:~:text=As with other aminoglycosides%2C gentamicin injection is potentially,those who receive high dosage of prolonged therapy.> Acesso em: 21 jul. 2021.

DAMASCENO, Iângla Araujo de Melo; GUERRA, Ricardo Consigliero. Coxiella burnetii e a febre Q no Brasil, uma questão de saúde pública. **Ciência & Saúde Coletiva**, [s. l.], v. 23, n. 12, 2018. Disponível em:
<https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1590/1413-812320182312.27772016>

DIAS, Diogo Lopes. **Espectroscopia de Fluorescência Aplicada ao Estudo das Interações de Formação de Nanoestruturas de Peptídeos Contendo Maguemita**. 1–122 f. 2014. - UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS, [s. l.], 2014.

DIAS, Regina Valéria da Cunha. Principais métodos de controle e diagnósticos de mastite bovina. **Acta Veterinária Brasileira**, [s. l.], v. 1, n. 1, p. 23–27, 2007. Disponível em: <https://doi.org/https://doi.org/10.21708/avb.2007.1.1.255>

DIBA, Farhana Sharmin; KIM, Suhee; LEE, Hye Jin. Amperometric bioaffinity sensing platform for avian influenza virus proteins with aptamer modified gold nanoparticles on carbon chips. **Biosensors and Bioelectronic**, [s. l.], v. 72, n. 15 October 2015, p. 355–361, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bios.2015.05.020>

DÖBEREINER, Jürgen *et al.* “Cara inchada” of cattle, an infectious, apparently soil antibiotics-dependant periodontitis in Brazil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, [s. l.], v. 20, n. 2, 2000. Disponível em: <https://doi.org/https://doi.org/10.1590/S0100-736X2000000200001>

DONADEU, Francesc X. *et al.* Farmer and Veterinary Practices and Opinions Related to the Diagnosis of Mastitis and Metabolic Disease in UK Dairy Cows. **Frontiers in Veterinary Science**, [s. l.], v. 7, n. 127, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fvets.2020.00127>

DONG, Shibiao *et al.* Electrochemical DNA Biosensor Based on a Tetrahedral Nanostructure Probe for the Detection of Avian Influenza A (H7N9) Virus. **Applied Materials and Interfaces**, [s. l.], v. 7, n. 16, p. 8834–8842, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/acsami.5b01438>

DPA BRASIL. **Boas Práticas na Fazenda (BPF)**. [S. l.], 2020. Disponível em: <https://www.produtordpa.com.br/programas/boas-praticas-na-fazenda-bpf>. Acesso em: 14 jan. 2021.

DRUGS.COM. **Kanamycin injection advanced patient information**. [S. l.], 2020. Disponível em: <https://www.drugs.com/cons/kanamycin-injection.html>. Acesso em: 21 jul. 2021.

DZIĄBOWSKA, Karolina; CZACZYK, Elżbieta; NIDZWORSKI, Dawid. Detection Methods of Human and Animal Influenza Virus-Current Trends. **Biosensors**, [s. l.], v. 8, n. 4, p. 94, 2018. Disponível em: <https://doi.org/https://doi.org/10.3390/bios8040094>

EDUCAPOINT. **Doenças do puerpério: saiba mais sobre metrite e endometrite em vacas**. [S. l.], 2018. Disponível em: <https://www.milkpoint.com.br/colunas/educapoint/doencas-do-puterperio-saiba-mais-sobre-metrite-e-endometrite-em-vacas-211404/>. Acesso em: 12 fev. 2021.

EL-MOGHAZY, Ahmed Y. *et al.* Ultrasensitive label-free electrochemical immunosensor based on PVA-co-PE nanofibrous membrane for the detection of chloramphenicol residues in milk. **Biosensors and Bioelectronics**, [s. l.], v. 117, p.

838–844, 2018. Disponível em:
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.bios.2018.07.025>

ELY, Valessa Lunkes. **Moraxella bovis, Moraxella ovis e Moraxella bovoculi: formação de biofilme e atividade de lisozima**. 43 f. 2018. - Universidade Federal de Santa Maria, [s. l.], 2018.

EMBRAPA GADO DE LEITE. Anuário Leite 2020. **Embrapa**, [s. l.], p. 53, 2020. Disponível em:
<https://www.embrapa.br/busca-de-publicacoes/-/publicacao/1124722/anuario-leite-2020-leite-de-vacas-felizes>

FAGNANI, Rafael. **Resumão das INs 76 e 77 de qualidade do leite**. [S. l.], 2019. Disponível em: <https://www.milkpoint.com.br/colunas/rafael-fagnani/resumao-das-ins-76-e-77-elas-estao-chegando-212785/>. Acesso em: 22 jul. 2021.

FALOHUN, Tokunbo; MCSHANE, Michael J. An Optical Urate Biosensor Based on Urate Oxidase and Long-Lifetime Metalloporphyrins. **Sensors**, [s. l.], v. 20, n. 4, p. 959, 2020. Disponível em: <https://doi.org/https://doi.org/10.3390/s20040959>

FAN, Ruiqi *et al.* Duplex surface enhanced raman scattering-based lateral flow immunosensor for the low-level detection of antibiotic residues in milk. **Molecules**, Basel, Switzerland, v. 25, n. 22, p. 5249, 2020. Disponível em:
<https://doi.org/10.3390/molecules25225249>. Acesso em: 24 jun. 2021.

FARDELLONE, Patrice *et al.* Osteoporosis: Is milk a kindness or a curse? **Joint Bone Spine**, [s. l.], v. 8, n. 3, p. 275–281, 2017. Disponível em:
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jbspin.2016.06.006>

FAZEL, Y. *et al.* Importance of genotype by environment interaction on genetic analysis of milk yield in Iranian Holstein cows using a random regression model. **Animal Production Science**, [s. l.], v. 59, n. 8, p. 1438–1445, 2018. Disponível em:
<https://doi.org/https://doi.org/10.1071/AN17714>

FERNÁNDEZ, Fátima *et al.* Portable Surface Plasmon Resonance Immunosensor for the Detection of Fluoroquinolone Antibiotic Residues in Milk. **J. Agric. Food Chem.**, [s. l.], v. 59, n. 9, p. 5036–5043, 2011. Disponível em:
<https://doi.org/https://doi.org/10.1021/jf1048035>

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION (FDA); U.S. DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES. **Multicriteria-based ranking model for risk**

management of animal drug residues in milk and milk products. [S. l.]: U.S. Department of Health and Human Services, 2015. *E-book*.

FORMIGONI, Ivan. **Maiores rebanhos mundiais de bovinos, perspectivas para 2020.** [S. l.], 2019. Disponível em: <https://www.farmnews.com.br/mercado/maiores-rebanhos-mundiais-2/>. Acesso em: 5 jul. 2021.

FUBINI, Susan L.; YEAGER, Amy E.; DIVERS, Thomas J. Noninfectious Diseases of the Gastrointestinal Tract. *In*: PEEK, Simon F.; DIVERS, Thomas J. (org.). **Rebhun's Diseases of Dairy Cattle.** Third Edited. [S. l.]: Elsevier, 2017. p. 168–248. Disponível em: <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/C2013-0-12799-7>

GAMELLA, M. *et al.* An amperometric affinity penicillin-binding protein magnetosensor for the detection of β -lactam antibiotics in milk. **Analyst**, [s. l.], v. 138, n. 7, p. 2013–2022, 2013. Disponível em: <https://doi.org/https://doi.org/10.1039/C3AN36727D>

GAO, Wanru *et al.* A highly sensitive tetracycline sensor based on a combination of magnetic molecularly imprinted polymer nanoparticles and surface plasmon resonance detection. **Microchimica Acta**, [s. l.], v. 186, n. 9, p. 1–8, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00604-019-3718-9>. Acesso em: 24 jun. 2021.

GILBERT, Robert O. Reproductive Diseases. *In*: PEEK, Simon F.; DIVERS, Thomas J. (org.). **Rebhun's Diseases of Dairy Cattle.** Third Edited. [S. l.]: Elsevier, 2017. p. 466–507. Disponível em: <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/C2013-0-12799-7>

GODIN, Ann-Charlotte *et al.* Investigation of Chlamydophila spp. in dairy cows with reproductive disorders. **Acta Vet Scand.**, [s. l.], v. 50, n. 1, p. 39, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/1751-0147-50-39>

GOLDER, H. M.; HODGE, A.; LEAN, I. J. Effects of antibiotic dry-cow therapy and internal teat sealant on milk somatic cell counts and clinical and subclinical mastitis in early lactation. **J. Dairy Sci.**, [s. l.], v. 99, n. 9, p. 7370–7380, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.3168/jds.2016-11114>

GONÇALVES, Juliano Leonel. **Impact of subclinical mastitis on milk yield and economic return of dairy cows.** 1–149 f. 2017. - Universidade de São Paulo, [s. l.], 2017.

GOVERNMENT OF CANADA. **List of Maximum Residue Limits (MRLs) for Veterinary Drugs in Foods**. [S. l.], 2017. Disponível em: <https://www.canada.ca/en/health-canada/services/drugs-health-products/veterinary-drugs/maximum-residue-limits-mrls/list-maximum-residue-limits-mrls-veterinary-drugs-foods.html>. Acesso em: 26 jan. 2021.

GRABSK, Andressa H. A. *et al.* Determination of Antibiotics Residues in Milk Using a QuEChERS Method Using Full Factorial Design and Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, [s. l.], v. 30, n. 7, p. 1498–1505, 2019. Disponível em: <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.21577/0103-5053.20190046>

GRAND VIEW RESEARCH. **Biosensors Market Size, Share & Trends Report Biosensors Market Size, Share & Trends Analysis Report By Application (Medical, Agriculture, Bioreactor) By Technology (Thermal, Electrochemical, Optical), By End Use, By Region, And Segment Forecasts, 2020 - .** [S. l.], 2020. Disponível em: <https://www.grandviewresearch.com/industry-analysis/biosensors-market>. Acesso em: 5 mar. 2021.

GRESSLER, Letícia Trevisan *et al.* Campylobacter fetus subespécie fetus: abortamento e natimortalidade em ovinos. **Ciência Rural**, [s. l.], v. 42, n. 4, 2012. Disponível em: <https://doi.org/https://doi.org/10.1590/S0103-84782012000400020>

GROSSI, Marco *et al.* A portable biosensor system for bacterial concentration measurements in cow's raw milk. *In:* , 2011, Savelletri di Fasano, Italy. **4th IEEE International Workshop on Advances in Sensors and Interfaces**. Savelletri di Fasano, Italy: Institute of Electrical and Eletronics Engineers, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1109/IWASI.2011.6004703>

GRUHL, Friederike J.; LÄNGE, Kerstin. Surface acoustic wave (SAW) biosensor for rapid and label-free detection of penicillin G in milk. **Food Analytical Methods**, [s. l.], v. 7, n. 2, p. 430–437, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s12161-013-9642-4>. Acesso em: 22 jun. 2021.

GRUPO APOIAR. **Clostridioses em bovinos**. [S. l.], 2020. Disponível em: <http://www.grupoapoiar.com/clostridioses-em-bovinos/>.

GUIMARÃES, Luciana Maria *et al.* Produção do antibiótico retamicina em biorreatores por streptomyces olindensis ICB20: Influência das fontes de carbono e nitrogênio. *In:* , 2003, Florianópolis. (Universidade Federal de Santa Catarina, Org.) **Simpósio Nacional de Fermentações**. Florianópolis: [s. n.], 2003.

GUTIÉRREZ, Pablo *et al.* Improved Antibiotic Detection in Raw Milk Using Machine Learning Tools over the Absorption Spectra of a Problem-Specific Nanobiosensor. **Sensors**, [s. l.], v. 20, n. 16, p. 4552, 2020. Disponível em: <https://doi.org/https://doi.org/10.3390/s20164552>

HAMESTER, Leandro Augusto; KÄFER, Éderson Moisés. **Boas Práticas na Fazenda - Agregando Renda e Qualidade na Produção de Leite**. [S. l.], 2020. Disponível em: <https://www.languiru.com.br/noticias/boas-praticas-de-fazenda-agregando-renda-e-qualidade-na-producao-de-leite/>. Acesso em: 14 jan. 2021.

HAN, Cong *et al.* Ultrasensitive voltammetric determination of kanamycin using a target-triggered cascade enzymatic recycling couple along with DNAzyme amplification. **Microchimica Acta**, [s. l.], v. 184, n. 8, p. 2941–2948, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00604-017-2311-3>. Acesso em: 24 jun. 2021.

HE, Hongming *et al.* Construction of electrochemical aptasensors with Ag(I) metal–organic frameworks toward high-efficient detection of ultra-trace penicillin. **Applied Surface Science**, [s. l.], v. 531, p. 147342, 2020. Disponível em: <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2020.147342>

HENDRICKSON, O. D. *et al.* Highly Sensitive Immunochromatographic Detection of Antibiotic Ciprofloxacin in Milk. **Applied Biochemistry and Microbiology**, [s. l.], v. 54, p. 670–676, 2018. Disponível em: <https://doi.org/https://doi.org/10.1134/S000368381806008X>

HERDT, Thomas H. **Nutrition and Disease in Dairy Cattle**. [S. l.], 2014. Disponível em: <https://www.msdtvetmanual.com/management-and-nutrition/nutrition-dairy-cattle/nutrition-and-disease-in-dairy-cattle>. Acesso em: 12 fev. 2021.

HERNELL, Olle. Human milk vs. cow's milk and the evolution of infant formulas. **Milk and Milk Products in Human Nutrition**, [s. l.], v. 67, p. 17–28, 2011. Disponível em: <https://doi.org/https://doi.org/10.1159/000325572>

HOLMES, C. W. Genotype X environment interactions in dairy cattle: a New Zealand perspective. **Cambridge University Press**, [s. l.], p. 51–58, 1995. Disponível em: <https://doi.org/https://doi.org/10.1017/S0263967X00031797>

HU, Mei *et al.* Label-free electrochemical immunosensor based on AuNPs/Zn/Ni-ZIF-8-800@graphene composites for sensitive detection of monensin in milk. **Sensors and Actuators B: Chemical**, [s. l.], v. 288, p. 571–578, 2019. Disponível em: <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.snb.2019.03.014>

HU, Song *et al.* Ultra-sensitive method based on time-resolved fluorescence immunoassay for detection of sulfamethazine in raw milk. **Food and Agricultural Immunology**, [s. l.], v. 29, n. 1, p. 1137–1149, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/09540105.2018.1520816>. Acesso em: 24 jun. 2021.

IBGE. **Quantidade de leite cru adquirido e industrializado no mês e no trimestre (Mil Litros), 2º trimestre 2021**. [S. l.], 2021. Disponível em: <https://www.ibge.gov.br/estatisticas/economicas/agricultura-e-pecuaria/9209-pesquisa-trimestral-do-leite.html?t=destaques>. Acesso em: 26 out. 2021.

JAMPASA, Sakda *et al.* Electrochemical immunosensor based on gold-labeled monoclonal anti-LipL32 for leptospirosis diagnosis. **Biosensors and Bioelectronics**, [s. l.], v. 142, n. 1 October 2019, p. 111539, 2019. Disponível em: <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.bios.2019.111539>

JANZEN, Eugene D. **Histophilosis**. [S. l.], 2020. Disponível em: <https://www.msdtvetmanual.com/generalized-conditions/histophilosis/histophilosis>. Acesso em: 26 jan. 2021.

JAVIDI, Mahbobeh *et al.* Detection of chloramphenicol using a novel apta-sensing platform based on aptamer terminal-lock in milk samples. **Analytica Chimica Acta**, [s. l.], v. 1039, p. 116–123, 2018. Disponível em: <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.aca.2018.07.041>

JIANG, Yingfen *et al.* Ultrasensitive analysis of kanamycin residue in milk by SERS-based aptasensor. **Talanta**, [s. l.], v. 197, p. 151–158, 2019. Disponível em: <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.talanta.2019.01.015>

JONES, G. M. **On-farm Tests for Drug Residues in Milk**. [S. l.], 2009. Disponível em: <https://www.pubs.ext.vt.edu/404/404-401/404-401.html>. Acesso em: 6 mar. 2021.

JR., Célio Gomes de Aguiar. **Raças de Bovinos de Corte**. Brasília: Universidade de Brasília, 2020. Disponível em: <https://www.google.com/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=&ved=2ahUKEwjo-MvBv9PuAhUNLLkGHYkBDxwQFjACegQIARAC&url=https%3A%2F%2Fwww.bibliotecaagptea.org.br%2Fzootecnia%2Fbovinocultura%2Fflivros%2FRACAS%2520DE%2520BOVINOS%2520DE%2520CORTE.pdf&usg=AOvVaw1>

KIVIRAND, Kairi; KAGAN, Margarita; RINKEN, Toonika. Biosensors for the detection of antibiotic residues in milk. *In*: RINKEN, Toonika (org.). **Biosensors - Micro and**

Nanoscale Applications. [S. l.]: IntechOpen, 2015. p. 425–456. Disponível em: <https://doi.org/10.5772/60464>. Acesso em: 21 jul. 2021.

KOMATSU, Tetsuya *et al.* Pyelonephritis caused by *Mannheimia varigena* in a Holstein calf. **The Journal of Veterinary Medical Science**, [s. l.], v. 81, n. 8, p. 1113–1116, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1292/JVMS.19-0211>. Acesso em: 4 ago. 2021.

KULIKOVA, Tatiana *et al.* Impedimetric determination of kanamycin in milk with aptasensor based on carbon black-oligolactide composite. **Sensors**, Basel, Switzerland, v. 20, n. 17, p. 1–17, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/s20174738>. Acesso em: 26 jun. 2021.

KUMAR, Sachin; VERMA, Neelam; SINGH, Ashish Kumar. Development of cadmium specific recombinant biosensor and its application in milk samples. **Sensors and Actuators B: Chemical**, [s. l.], v. 240, n. March 2017, p. 248–254, 2017. Disponível em: <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.snb.2016.08.160>

KUNDU, Monika *et al.* Development of electrochemical biosensor based on CNT-Fe 3 O 4 nanocomposite to determine formaldehyde adulteration in orange juice. **J Food Sci Technol.**, [s. l.], v. 56, n. 4, p. 1829–1840, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s13197-019-03635-7>

KURJOGI, Mahantesh *et al.* Detection and determination of stability of the antibiotic residues in cow's milk. **PLoS ONE**, [s. l.], v. 14, n. 10, p. e0223475, 2019. Disponível em: <https://doi.org/https://doi.org/10.1371/journal.pone.0223475>

KVAPILÍK, J. *et al.* Mastitis of Dairy Cows and Financial Losses: An Economic Meta-analysis and Model Calculation. **Bulgarian Journal of Agricultural Science**, [s. l.], v. 21, n. 5, p. 1092–1105, 2015.

LABSOLUTIONS. **Espectroscopia de impedância eletroquímica (EIS)**. [S. l.], 2021. Disponível em: <https://www.labsolutions.com.br/produtos/espectroscopia-de-impedancia-eletroquimica-eis/>. Acesso em: 13 jul. 2021.

LAVECCHIA, Teresa; TIBUZZI, Arianna; GIARDI, Maria Teresa. Biosensors for functional food safety and analysis. *In*: **BIO-FARMS FOR NUTRACEUTICALS**. [S. l.]: Springer, 2010. p. 267–281. Disponível em: https://doi.org/https://doi.org/10.1007/978-1-4419-7347-4_20

LAWRENCE R. LUSTIG. **Ototoxicidade induzida por fármacos - Distúrbios do ouvido, nariz e garganta**. New York, 2020. Disponível em: [https://www.msmanuals.com/pt/profissional/distúrbios-do-ouvido,-nariz-e-garganta/distúrbios-da-orelha-interna/ototoxicidade-induzida-por-fármacos](https://www.msmanuals.com/pt/profissional/disturbios-do-ouvido,-nariz-e-garganta/disturbios-da-orelha-interna/ototoxicidade-induzida-por-farmacos). Acesso em: 21 jul. 2021.

LEMOS, A. de M.; TEODORO, R. L. **Utilizacao de racas, cruzamentos e selecao em bovinos leiteiros**. Coronel Pacheco: Embrapa Gado de Leite, 1993.

LI, Falan *et al.* Aptasensor based on thionine, graphene-polyaniline composite film, and gold nanoparticles for kanamycin detection. **European Food Research and Technology**, [s. l.], v. 239, n. 2, p. 227–236, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00217-014-2211-2>. Acesso em: 26 jun. 2021.

LI, Falan *et al.* Multiplexed aptasensor based on metal ions labels for simultaneous detection of multiple antibiotic residues in milk. **Biosensors and Bioelectronics**, [s. l.], v. 115, p. 7–13, 2018. Disponível em: <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.bios.2018.04.024>

LI, Han *et al.* Immunosensor for trace penicillin G detection in milk based on supported bilayer lipid membrane modified with gold nanoparticles. **Journal of Biotechnology**, [s. l.], v. 203, p. 97–103, 2015. Disponível em: <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2015.03.013>

LI, J. H. *et al.* Effects of antibiotic residues in milk on growth, ruminal fermentation, and microbial community of preweaning dairy calves. **J. Dairy Sci.**, [s. l.], v. 102, n. 3, p. 2298–2307, 2019. Disponível em: <https://doi.org/https://doi.org/10.3168/jds.2018-15506>

LI, Nan *et al.* Diazonium-Modified Screen-Printed Electrodes for Immunosensing Growth Hormone in Blood Samples. **Biosensors**, [s. l.], v. 9, n. 3, p. 88, 2019. Disponível em: <https://doi.org/https://doi.org/10.3390/bios9030088>

LIN, Xuexia *et al.* Luminescent carbon nanodots based aptasensors for rapid detection of kanamycin residue. **Talanta**, [s. l.], v. 202, p. 454–459, 2019. Disponível em: <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.talanta.2019.04.075>

LIU, Shun *et al.* Amperometric aptasensing of chloramphenicol at a glassy carbon electrode modified with a nanocomposite consisting of graphene and silver nanoparticles. **Microchimica Acta**, [s. l.], v. 184, n. 5, p. 1445–1451, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00604-017-2138-y>. Acesso em: 24 jun. 2021.

LOO, Enli; LAI, Kok Song; MANSOR, Rozaihan. Antimicrobial Usage and Resistance in Dairy Cattle Production. *In: BEKOE, Samuel Opong et al. (org.). **Veterinary Medicine and Pharmaceuticals***. [S. l.]: IntechOpen, 2019. p. 1–15. Disponível em: <https://doi.org/10.5772/intechopen.81365>

LU, Mei-Yi *et al.* A smartphone-based whole-cell array sensor for detection of antibiotics in milk. **Sensors**, Basel, Switzerland, v. 19, n. 18, p. 3882, 2019. Disponível em: <https://doi.org/https://doi.org/10.3390/s19183882>

LUAN, Qian *et al.* Mimicking an Enzyme-Based Colorimetric Aptasensor for Antibiotic Residue Detection in Milk Combining Magnetic Loop-DNA Probes and CHA-Assisted Target Recycling Amplification. **J. Agric. Food Chem.**, [s. l.], v. 65, n. 28, p. 5731–5740, 2017. Disponível em: <https://doi.org/https://doi.org/10.1021/acs.jafc.7b02139>

MA, Qiang *et al.* Colorimetric aptasensors for determination of tobramycin in milk and chicken eggs based on DNA and gold nanoparticles. **Food Chemistry**, [s. l.], v. 249, p. 98–103, 2018. Disponível em: <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.01.022>

MALISZEWSKI, Eliza. **Dia Mundial do Leite: os desafios da cadeia**. [S. l.], 2020. Disponível em: https://www.agrolink.com.br/noticias/dia-mundial-do-leite--os-desafios-da-cadeia_434701.html. Acesso em: 14 jan. 2021.

MANZI, Marcela P. *et al.* Prevalência de *Mycoplasma bovis* em rebanhos de vacas leiteiras. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, [s. l.], v. 38, n. 4, 2018. Disponível em: <https://doi.org/https://doi.org/10.1590/1678-5150-pvb-5192>

MÁRQUEZ, Augusto *et al.* Photoelectro-Enzymatic Glucose Reusable Biosensor by Using Dithienylethene Mediators. **Chemistry A European Journal**, [s. l.], v. 26, n. 40, p. 8714–8719, 2020. Disponível em: <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/chem.202000865>

MARTIN, José Guilherme Prado. Resíduos de Antimicrobianos em Leite - Uma Revisão. **Segurança Alimentar e Nutricional**, Campinas, São Paulo, v. 18, n. 2, p. 80–87, 2011.

MARTINS, Sofia A. M. *et al.* Biosensors for On-Farm Diagnosis of Mastitis. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, [s. l.], v. 7, p. 186, 2019. Disponível em: <https://doi.org/https://doi.org/10.3389/fbioe.2019.00186>

MATHIAS, Francielle Tatiana. **Cloranfenicol: Bula original, extraída manualmente da Anvisa**. [S. l.], 2020. Disponível em: <https://consultaremedios.com.br/cloranfenicol/bula>. Acesso em: 21 jul. 2021.

MATHIAS, João. **Qual o tempo de gestação por inseminação artificial nas vacas?**. [S. l.], 2019. Disponível em: <https://revistagloborural.globo.com/vida-na-fazenda/gr-responde/noticia/2019/01/qual-o-tempo-de-gestacao-por-inseminacao-artificial-nas-vacas.html>. Acesso em: 14 fev. 2021.

MATRICIANI, Barbara *et al.* False-negative results in the immunoassay analysis of drugs of abuse: can adulterants be detected by sample check test? **The Association for Clinical Biochemistry & Laboratory Medicine**, [s. l.], v. 55, n. 3, p. 348–354, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1177/0004563217725089>

MAZZUCO, Daiana *et al.* Hipocalcemia em Vacas Leiteiras da Agricultura Familiar. **Cienc. anim. bras.**, [s. l.], v. 20, n. e-47229, p. 1–10, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/1089-6891v20e-47229>

MCDANIEL, Clinton J. *et al.* Humans and Cattle: A Review of Bovine Zoonoses. **Vector Borne and Zoonotic Diseases**, [s. l.], v. 1, n. 14, p. 1–19, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1089/vbz.2012.1164>

MEIRELLES-BARTOLI, Raphaella Barbosa; SOUSA, Daniel Bartoli de; MATHIAS, Luis Antonio. Aspectos da brucelose na saúde pública veterinária. **PUBVET**, [s. l.], v. 8, n. 10, 2014.

MELO, Edmar Isaías *et al.* A biosensor using poly(4-aminophenol)/acetylcholinesterase modified graphite electrode for the detection of dichlorvos. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, [s. l.], v. 54, n. 6, p. 1217–1222, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S1516-89132011000600018>. Acesso em: 21 jul. 2021.

MERRITT, Adam *et al.* Identificação de Burkholderia pseudomallei baseada em PCR. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, [s. l.], v. 48, n. 5, p. 239–244, 2006. Disponível em: <https://doi.org/https://doi.org/10.1590/S0036-46652006000500001>

MILKPOINT. **O que são CCS e CBT do leite?**. [S. l.], 2020. Disponível em: <https://www.milkpoint.com.br/noticias-e-mercado/giro-noticias/youtube-o-que-e-ccs-e-cbt-220838/#:~:text=A CCS refere-se às células do sistema imune,a CBT refere-se à proliferação bacteriana no.> Acesso em: 21 jul. 2021.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. **Instrução Normativa MAPA 77** 2018 a.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. **INSTRUÇÃO NORMATIVA Nº 76** 2018 b. p. 9.

MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO. **Mastite Bovina: Controle e Prevenção**. Lavras, MG: Gráfica UFLA, 2012.

MIRANDA, João Eustáquio Cabral de; FREITAS, Ary Ferreira de. **Raças e tipos de cruzamentos para produção de leite**. Juiz de Fora: Embrapa Gado de Leite, 2009.

MISHRA, Geetesh K.; SHARMA, Atul; BHAND, Sunil. Ultrasensitive detection of streptomycin using flow injection analysis-electrochemical quartz crystal nanobalance (FIA-EQCN) biosensor. **Biosensors and Bioelectronics**, [s. l.], v. 67, p. 532–539, 2015. Disponível em: <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.bios.2014.09.033>

MORIELLO, Karen A. **Dermatophilosis in Animals**. [S. l.], 2019. Disponível em: <https://www.msddvetmanual.com/integumentary-system/dermatophilosis/dermatophilosis-in-animals>. Acesso em: 26 jan. 2021.

MOTTA, R.G. *et al.* Surto de mastite bovina causada por *Arcanobacterium pyogenes*. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, [s. l.], v. 63, n. 3, 2011. Disponível em: <https://doi.org/https://doi.org/10.1590/S0102-09352011000300027>

NAKASE, Flávia M. *et al.* Detecção de Fraudes de Leite no seu Recebimento em um Laticínio de Londrina, PR. **Ciência Veterinária Unifil**, [s. l.], v. 1, n. 1, p. 61–67, 2018. Disponível em: <http://periodicos.unifil.br/index.php/revista-vet/article/view/31>

NASCIMENTO, Noelle M. do *et al.* Label-free piezoelectric biosensor for prognosis and diagnosis of Systemic Lupus Erythematosus. **Biosensors and Bioelectronics**, [s. l.], v. 90, n. 15 April 2017, p. 166–173, 2017. Disponível em: <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.bios.2016.11.004>

NERO, Luís Augusto *et al.* Resíduos de antibióticos em leite cru de quatro regiões leiteiras no Brasil. **Food Science and Technology**, [s. l.], v. 27, n. 2, p. 391–393, 2007. Disponível em: <https://doi.org/https://doi.org/10.1590/S0101-20612007000200031>

NETO, Floriano Peres; ZAPPA, Vanessa. Mastite em Vacas Leiteiras - Revisão de Literatura. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**, [s. l.], n. 16, p. 1–28, 2011. Disponível em: http://faef.revista.inf.br/imagens_arquivos/arquivos_destaque/5birfPwQOBxdHFp_2013-6-26-11-19-44.pdf

NICKERSON, Stephen C. **Importance of Dry Cow Management in the Control of Mastitis**. [S. l.], 2019. Disponível em: <https://dairy-cattle.extension.org/importance-of-dry-cow-management-in-the-control-of-mastitis/>. Acesso em: 14 fev. 2021.

NIE, Rongbin *et al.* Optical fiber-mediated immunosensor with a tunable detection range for multiplexed analysis of veterinary drug residues. **ACS Sensors**, Washington, United States of America, v. 4, n. 7, p. 1864–1872, 2019. Disponível em: <https://doi.org/https://doi.org/10.1021/acssensors.9b00653>

NORTH EAST AMERICAN DAIRY ASSOCIATION. **Dairy Cows**. [S. l.], 2021. Disponível em: <https://www.americandairy.com/dairy-farms/dairy-cows/>. Acesso em: 5 fev. 2021.

PAGE, S. W.; GAUTIER, P. Use of antimicrobial agents in livestock. **Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.**, [s. l.], v. 31, n. 1, p. 145–188, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.20506/rst.31.1.2106>

PALCHETTI, Ilaria. New Trends in the Design of Enzyme-based Biosensors for Medical Applications. **Mini Rev Med Chem**, [s. l.], v. 16, n. 14, p. 1125–1133, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.2174/1389557516666160623101511>

PANIEL, Nathalie *et al.* Selection of DNA aptamers against penicillin G using capture-SELEX for the development of an impedimetric sensor. **Talanta**, [s. l.], v. 162, p. 232–240, 2017. Disponível em: <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.talanta.2016.09.058>

PARK, Hye Rim *et al.* Characterisation of *Pseudomonas aeruginosa* related to bovine mastitis. **Acta Vet Hung.**, [s. l.], v. 62, n. 1, p. 1–12, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1556/AVet.2013.054>

PATTERSON, Rachel A.; STANKEWICZ, Holly A. **Penicillin Allergy**. [S. l.], 2020. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK459320/>. Acesso em: 24 fev. 2021.

PELZER, Kevin D.; CURRIN, Nancy. **Zoonotic Diseases of Cattle**. [S. l.], 2013. Disponível em: <https://www.pubs.ext.vt.edu/400/400-460/400-460.html>. Acesso em: 2 fev. 2021.

PENNACCHIO, Anna *et al.* A Rapid and Sensitive Assay for the Detection of Benzylpenicillin (PenG) in Milk. **PLoS ONE**, Brussel, Belgium, v. 10, n. 7, p. e0132396, 2015. Disponível em: <https://doi.org/https://doi.org/10.1371/journal.pone.0132396>

PEREIRA, C. Paula. Milk nutritional composition and its role in human health. **Nutrition**, [s. l.], v. 30, n. 6, p. 619–627, 2014. Disponível em: <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.nut.2013.10.011>

PETERSSON-WOLFE, C. S.; MULLARKY, I. K.; JONES, G. M. Staphylococcus aureus Mastitis: Cause, Detection, and Control. **VCE Publications**, [s. l.], n. 404–229, p. 1–7, 2010. Disponível em: <https://www.pubs.ext.vt.edu/404/404-229/404-229.html>

PETROVSKI, K. R.; TRAJCEV, M.; BUNESKI, G. A review of the factors affecting the costs of bovine mastitis. **J S Afr Vet Assoc.**, [s. l.], v. 77, n. 2, p. 52–60, 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.4102/jsava.v77i2.344>

PILEHVAR, Sanaz *et al.* Aptasensing of chloramphenicol in the presence of its analogues: reaching the maximum residue limit. **Anal. Chem.**, Washington, United States of America, v. 84, n. 15, p. 6753–6758, 2012. Disponível em: <https://doi.org/https://doi.org/10.1021/ac3012522>

PINACHO, Daniel G. *et al.* Electrochemical detection of fluoroquinolone antibiotics in milk using a magneto immunosensor. **Sensors**, Basel, Switzerland, v. 14, n. 9, p. 15965–15980, 2014. Disponível em: <https://doi.org/https://doi.org/10.3390/s140915965>

POGURSCHI, Elena *et al.* Identification of Antibiotic Residues in Raw Milk Samples Coming from the Metropolitan Area of Bucharest. **Agriculture and Agricultural Science Procedia**, [s. l.], v. 6, n. 2015, p. 242–245, 2015. Disponível em: <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.aaspro.2015.08.066>

POHANKA, Miroslav. Piezoelectric biosensor for the determination of Tumor Necrosis Factor Alpha. **Talanta**, [s. l.], v. 178, n. 1 February 2018, p. 970–973, 2018. Disponível em: <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.talanta.2017.10.031>

PONCHIO, Leandro Augusto; ALMEIDA, Alexandre Nunes de; GIMENES, Raquel Mortari. Fatores Sócio-econômicos que Interferem na Produção de Leite nos Cinco Maiores Estados Produtores do Brasil. **CEPEA/ESALQ/USP**, [s. l.], p. 15, 2004.

PONTIUS, Katrin *et al.* Automated Electrochemical Glucose Biosensor Platform as an Efficient Tool Toward On-Line Fermentation Monitoring: Novel Application Approaches and Insights. **Front. Bioeng. Biotechnol.**, [s. l.], v. 8, n. 436, 2020. Disponível em: <https://doi.org/https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.00436>

PRADO, Thiago M. do *et al.* β -Lactamase-based biosensor for the electrochemical determination of benzylpenicillin in milk. **Sensors and Actuators B: Chemical**, [s. l.], v. 210, p. 254–258, 2015. Disponível em: <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.snb.2014.12.108>

PROCREARE. **Raças de Bovinos de Leite**. [S. l.], 2016. Disponível em: <https://procreare.com.br/racas-de-bovinos-leiteiro/>. Acesso em: 5 fev. 2021.

PRYLUTSKYI, M. P.; STARODUB, M. F. Detection of polyamines using immunobiosensor based on zinc oxide nanoparticles. **Experimental Oncology**, [s. l.], v. 41, n. 4, p. 363–365, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.32471/exp-oncology.2312-8852.vol-41-no-4.13920>

QIU, Guangyu *et al.* Dual-Functional Plasmonic Photothermal Biosensors for Highly Accurate Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 Detection. **ACS Nano**, [s. l.], v. XXXX, n. XXX, p. XXX–XXX, 2020. Disponível em: <https://doi.org/https://doi.org/10.1021/acsnano.0c02439>

RAHMAN, Md.; HASSAN, Mohammad; CHOWDHURY, Sharmin. Determination of Antibiotic Residue in Milk and Assessment of Human Health Risk in Bangladesh. **Preprints**, [s. l.], n. 2020060221, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.20944/preprints202006.0221.v1>

RAMA, Adem *et al.* Assessment of antibacterial drug residues in milk for consumption in Kosovo. **Journal of Food and Drug Analysis**, [s. l.], v. 25, n. 3, p. 525–532, 2017. Disponível em: <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jfda.2016.07.007>

RAMALINGAM, Saipriya; COLLIER, Christopher M.; SINGH, Ashutosh. A paper-based colorimetric aptasensor for the detection of gentamicin. **Biosensors**, Basel, Switzerland, v. 11, n. 2, p. 29–42, 2021. Disponível em: <https://doi.org/https://doi.org/10.3390/bios11020029>

RICE, Beth H.; QUANN, Erin E.; MILLER, Gregory D. Meeting and exceeding dairy recommendations: effects of dairy consumption on nutrient intakes and risk of chronic disease. **Nutrition Reviews**, [s. l.], v. 71, n. 4, p. 209–223, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/nure.12007>

RICE, J. A. *et al.* Mannheimia haemolytica and bovine respiratory disease. **Anim Health Res Rev**, [s. l.], v. 8, n. 2, p. 117–128, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1017/S1466252307001375>

RINGBIO. **Chloramphenicol ELISA Kit for milk, tissue and other food samples**. [S. l.], 2021a. Disponível em: <http://www.ringbio.com/food-test/elisa/chloramphenicol-elisa-kit>. Acesso em: 21 jul. 2021.

RINGBIO. **Kanamycin ELISA Kit**. [S. l.], 2021b. Disponível em: <https://www.foodtestkit.com/products/kanamycin-elisa-kit/>. Acesso em: 21 jul. 2021.

ROBSON, Sarah. **Clostridial diseases in cattle**. [S. l.], 2007. Disponível em: https://www.google.com/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=&cad=rja&uact=8&ved=2ahUKEwjUu62I87nuAhWkF7kGHfbiCjYQFjACegQIAxAC&url=https%3A%2F%2Fwww.dpi.nsw.gov.au%2F__data%2Fassets%2Fpdf_file%2F0013%2F111163%2Fclostridial-diseases-in-cattle.pdf&usg=AOvV. Acesso em: 26 jan. 2021.

RODOVALHO, V. R. *et al.* Peptide-based electrochemical biosensor for juvenile idiopathic arthritis detection. **Biosensors and Bioelectronics**, [s. l.], v. 100, n. 15 February 2018, p. 577–582, 2018. Disponível em: <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.bios.2017.10.012>

ROLLIN, E.; DHUYVETTER, K. C.; OVERTON, M. W. The cost of clinical mastitis in the first 30 days of lactation: An economic modeling tool. **Preventive Veterinary Medicine**, [s. l.], v. 122, n. 3, p. 257–264, 2015. Disponível em: <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2015.11.006>

ROSATI, Giulio *et al.* Silver nanoparticles inkjet-printed flexible biosensor for rapid label-free antibiotic detection in milk. **Sensors and Actuators, B: Chemical**, [s. l.], v. 280, p. 280–289, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.snb.2018.09.084>

ROSSI, Rosanna *et al.* Multiclass methods for the analysis of antibiotic residues in milk by liquid chromatography coupled to mass spectrometry: A review. **Food Additives & Contaminants: Part A**, [s. l.], v. 35, n. 2, p. 241–257, 2018. Disponível em: <https://doi.org/https://doi.org/10.1080/19440049.2017.1393107>

ROUSHANI, Mahmoud *et al.* Impedimetric ultrasensitive detection of chloramphenicol based on aptamer MIP using a glassy carbon electrode modified by 3-ampy-RGO and silver nanoparticle. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, [s. l.], v. 183, p. 110451–110460, 2019. Disponível em: <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2019.110451>

ROUSHANI, Mahmoud; GHANBARI, Kazhal. An electrochemical aptasensor for streptomycin based on covalent attachment of the aptamer onto a mesoporous silica thin film-coated gold electrode. **Microchimica Acta**, [s. l.], v. 186, n. 2, p. 1–9, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00604-018-3191-x>. Acesso em: 26 jun. 2021.

SABU, Chinnu *et al.* Advanced biosensors for glucose and insulin. **Biosensors and Bioelectronics**, [s. l.], v. 141, n. 111201, 2019. Disponível em: <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.bios.2019.03.034>

SACHI, Sabhya *et al.* Antibiotic residues in milk: Past, present, and future. **Journal of Advanced Veterinary and Animal Research**, [s. l.], v. 6, n. 3, p. 315–332, 2019. Disponível em: <https://doi.org/http://doi.org/10.5455/javar.2019.f350>

SADEGHI, Atefeh Sarafan *et al.* Development and characterization of DNA aptamers against florfenicol: fabrication of a sensitive fluorescent aptasensor for specific detection of florfenicol in milk. **Talanta**, [s. l.], v. 182, p. 193–201, 2018. Disponível em: <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.talanta.2018.01.083>

SAEEDFAR, Kasra; HENG, Lee Yook; CHIANG, Chew Poh. A DNA biosensor based on gold nanoparticle decorated on carboxylated multi-walled carbon nanotubes for gender determination of Arowana fish. **Bioelectrochemistry**, [s. l.], v. 118, n. December 2017, p. 106–113, 2017. Disponível em: <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.bioelechem.2017.07.012>

SAĞLAM, Aliye Gülmez *et al.* The role of staphylococci in subclinical mastitis of cows and lytic phage isolation against to *Staphylococcus aureus*. **Vet World**, [s. l.], v. 10, n. 12, p. 1481–1485, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.14202/vetworld.2017.1481-1485>

SAKTI, Setyawan P. *et al.* Development of QCM Biosensor with Specific Cow Milk Protein Antibody for Candidate Milk Adulteration Detection. **Journal of Sensor**, [s. l.], n. 1807647, p. 1–7, 2016. Disponível em: <https://doi.org/https://doi.org/10.1155/2016/1807647>

SANDRUCCI, A. *et al.* Factors Affecting Milk Flow Traits in Dairy Cows: Results of a Field Study. **Journal of Dairy Science**, [s. l.], v. 90, n. 3, p. 1159–1167, 2007. Disponível em: [https://doi.org/https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(07\)71602-8](https://doi.org/https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(07)71602-8)

SANTOS, Emília Maricato Pedro dos *et al.* Streptococcus e gêneros relacionados como agentes etiológicos de mastite bovina. **Acta Scientiae Veterinariae**, [s. l.], v. 35, n. 1, p. 17–27, 2007. Disponível em: www.ufrgs.br/favet/revista. Acesso em: 4 ago. 2021.

SCHLEMPER, Valfredo; SACHET, Ana Paula. Antibiotic residues in pasteurized and unpasteurized milk marketed in southwest of Paraná, Brazil. **Ciência Rural**, [s. l.], v. 47, n. 12, p. e20170307, 2017. Disponível em: <https://doi.org/https://doi.org/10.1590/0103-8478cr20170307>

SCOTT, Phil. **Salmonellosis in Cattle**. [S. l.], 2009. Disponível em: <https://www.nadis.org.uk/disease-a-z/cattle/salmonellosis-in-cattle/>. Acesso em: 26 jan. 2021.

SHARMA, Atul *et al.* Disposable and portable aptamer functionalized impedimetric sensor for detection of kanamycin residue in milk sample. **Sensors and Actuators, B: Chemical**, [s. l.], v. 245, p. 507–515, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.snb.2017.02.002>

SILVESTRE, Joana *et al.* Caso clínico síndrome da plaqueta cinzenta. **Acta Med Port**, [s. l.], v. 22, p. 99–104, 2009. Disponível em: www.actamedicaportuguesa.com. Acesso em: 21 jul. 2021.

SOARES, Pollyanna M. *et al.* Serological and molecular characterization of *Leptospira kirschneri* serogroup Grippotyphosa isolated from bovine in Brazil. **Microbial Pathogenesis**, [s. l.], v. 138, p. 103803, 2020. Disponível em: <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.micpath.2019.103803>

SOBEK, Zbigniew *et al.* The evaluation of gestation length range for different breeds of Polish dairy cattle. **Biometrical Letters**, [s. l.], v. 52, n. 1, p. 37–45, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1515/bile-2015-0004>

SOMATICCELL. **Testes de resíduos de antibióticos em leite**. [S. l.], 2021. Disponível em: <https://www.somaticell.com.br/residuos-antibioticos>. Acesso em: 21 jul. 2021.

SONG, Hai Yan *et al.* Highly sensitive voltammetric determination of kanamycin based on aptamer sensor for signal amplification. **Analytical Methods**, [s. l.], v. 8, n. 16, p. 3366–3372, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1039/c6ay00152a>. Acesso em: 26 jun. 2021.

SOUZA, Djenaine de; MACHADO, Sergio A. S.; AVACA, Luis A. Voltametria de onda quadrada. Primeira parte: aspectos teóricos. **Química Nova**, [s. l.], v. 26, n. 1, p. 81–89, 2003. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0100-40422003000100015>. Acesso em: 13 jul. 2021.

SOUZA, Lara Barbosa de *et al.* Resíduos de Antimicrobianos em Leite Bovino Cru no Estado do Rio Grande do Norte. **Ciência Animal Brasileira**, [s. l.], v. 18, n. e23050, 2017. Disponível em: <https://doi.org/https://doi.org/10.1590/1089-6891v18e-23050>

SPIER, Sharon J. **Corynebacterium pseudotuberculosis Infection of Horses and Cattle**. [S. l.], 2019. Disponível em: <https://www.msdtvetmanual.com/circulatory-system/lymphadenitis-and-lymphangitis/corynebacterium-pseudotuberculosis-infection-of-horses-and-cattle>. Acesso em: 26 jan. 2021.

STEIN, Richard A.; KATZ, David E. Escherichia coli, cattle and the propagation of disease. **Microbiology Letters**, [s. l.], v. 364, n. 6, 2017. Disponível em: <https://doi.org/https://doi.org/10.1093/femsle/fnx050>

STRANDBERG, E. *et al.* Genotype by environment interaction for first-lactation female fertility traits in UK dairy cattle. **Journal of Dairy Science**, [s. l.], v. 92, n. 7, p. 3437–3446, 2009. Disponível em: <https://doi.org/https://doi.org/10.3168/jds.2008-1844>

TADEPALLI, S. *et al.* Fusobacterium necrophorum: A ruminal bacterium that invades liver to cause abscesses in cattle. **Anaerobe**, [s. l.], v. 15, n. 1–2, p. 36–43, 2009. Disponível em: <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2008.05.005>

TALIB, Nurul Ain A.; SALAM, Faridah; SULAIMAN, Yusran. Development of highly sensitive immunosensor for clenbuterol detection by using poly(3,4-ethylenedioxythiophene)/graphene oxide modified screen-printed carbon electrode. **Sensors**, Basel, Switzerland, v. 18, n. 12, p. 4324–4337, 2018. Disponível em: <https://doi.org/https://doi.org/10.3390/s18124324>

TARDY, Gábor Márk *et al.* Microbial fuel cell biosensor for the determination of biochemical oxygen demand of wastewater samples containing readily and slowly

biodegradable organics. **Biotechnol Lett.**, [s. l.], v. 43, n. 2, p. 445–454, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10529-020-03050-5>

TESSELE, Bianca *et al.* Actinomicose atípica em bovinos. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, [s. l.], v. 34, n. 7, 2014. Disponível em: <https://doi.org/https://doi.org/10.1590/S0100-736X2014000700010>

THE CATTLE SITE. **Managing Cow Lactation Cycles**. [S. l.], 2015. Disponível em: <https://www.thecattlesite.com/articles/4248/managing-cow-lactation-cycles/>. Acesso em: 3 fev. 2021.

THOMPSON, Colin S. *et al.* Screening method for the detection of residues of amphenicol antibiotics in bovine milk by optical biosensor. **FOOD ADDITIVES & CONTAMINANTS: PART A**, [s. l.], v. 37, n. 11, p. 1854–1864, 2020. Disponível em: <https://doi.org/https://doi.org/10.1080/19440049.2020.1809718>

TORTORA, Gerald J.; FUNKE, Berdell R.; CASE, Christine L. Crecimento Microbiano. *In*: MICROBIOLOGIA. 8 ed.ed. Porto Alegre: Artmed, 2006. p. 155–182.

TURNI, C. *et al.* Diverse strains of *Actinobacillus lignieresii* isolated from clinically affected cattle in a geographically restricted area. **Australian Veterinary Journal**, [s. l.], v. 97, n. 11, p. 440–446, 2019. Disponível em: <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/avj.12868>

UNIVERSITY OF GUELPH. **Milk as a growth medium**. [S. l.], 2021. Disponível em: <https://www.uoguelph.ca/foodscience/book-page/milk-growth-medium>. Acesso em: 22 jan. 2021.

URH, John. **How much is my flash chromatography system really going to cost?**. [S. l.], 2019. Disponível em: <https://selekt.biotage.com/blog/how-much-is-my-flash-chromatography-system-really-going-to-cost>. Acesso em: 6 mar. 2021.

USP. **Medidas iniciais de impedância eletroquímica**. [S. l.], 2021. Disponível em: <http://sites.poli.usp.br/pqi/lec/nano/primarias/impedancia.htm>. Acesso em: 13 jul. 2021.

VANHOUDT, A. *et al.* Effects of reduced intramammary antimicrobial use during the dry period on udder health in Dutch dairy herds. **J. Dairy Sci.**, [s. l.], v. 101, p. 3248–3260, 2017. Disponível em: <https://doi.org/https://doi.org/10.3168/jds.2017-13555>

VARMIRA, Kambiz *et al.* Fabrication of a novel enzymatic electrochemical biosensor for determination of tyrosine in some food samples. **Talanta**, [s. l.], v. 183, n. 1 June 2018, p. 1–10, 2018. Disponível em: <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.talanta.2018.02.053>

VASCONCELOS, Angela Maria de *et al.* Adaptive profile of dairy cows in a tropical region. **International Journal of Biometeorology**, [s. l.], v. 64, p. 105–113, 2020. Disponível em: <https://doi.org/https://doi.org/10.1007/s00484-019-01797-9>

VRIES, Ruben de. **Dry Period Length of Dairy Cows: Milk Composition and Quality**. 1–54 f. 2017. - Swedish University of Agricultural Sciences, [s. l.], 2017.

WALD, Regina *et al.* Characterization of staphylococcus species isolated from bovine quarter milk samples. **Animals**, Basel, Switzerland, v. 9, n. 5:200, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/ani9050200>

WANG, Hongzhi *et al.* Target-aptamer binding triggered quadratic recycling amplification for highly specific and ultrasensitive detection of antibiotics at the attomole level. **Chemical Communications**, [s. l.], v. 51, n. 39, p. 8377–8380, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1039/c5cc01473e>. Acesso em: 23 jun. 2021.

WANG, Jianyi *et al.* Development of a quantitative fluorescence-based lateral flow immunoassay for determination of chloramphenicol, thiamphenicol and florfenicol in milk. **Food and Agricultural Immunology**, [s. l.], v. 29, n. 1, p. 56–66, 2017. Disponível em: <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1080/09540105.2017.1359498>

WANG, Jinlong *et al.* A label-free and carbon dots based fluorescent aptasensor for the detection of kanamycin in milk. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, [s. l.], v. 226, p. 117651–117658, 2020. Disponível em: <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.saa.2019.117651>

WANG, Lei *et al.* Construction of an electrochemical receptor sensor based on graphene/thionine for the sensitive determination of β -lactam antibiotics content in milk. **International Journal of Molecular Sciences**, Basel, Switzerland, v. 21, n. 9, p. 3306–3318, 2020. Disponível em: <https://doi.org/https://doi.org/10.3390/ijms21093306>

WANG, Lihui; WANG, Chuchu; LI, Hao. Selection of DNA aptamers and establishment of an effective aptasensor for highly sensitive detection of cefquinome residues in milk. **Analyst**, [s. l.], v. 143, n. 13, p. 3202–3208, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1039/c8an00709h>

WANG, Tingting *et al.* Electrochemical aptasensor for ampicillin detection based on the protective effect of aptamer-antibiotic conjugate towards DpnII and Exo III digestion. **Talanta**, [s. l.], v. 197, p. 42–48, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2019.01.010>

WANG, Yan *et al.* Visible light photoelectrochemical aptasensor for chloramphenicol by using a TiO₂ nanorod array sensitized with Eu(III)-doped CdS quantum dots. **Microchimica Acta**, [s. l.], v. 185, n. 3, p. 1–10, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00604-018-2711-z>. Acesso em: 26 jun. 2021.

WANG, Yashan *et al.* Fluorometric determination of the antibiotic kanamycin by aptamer-induced FRET quenching and recovery between MoS₂ nanosheets and carbon dots. **Microchimica Acta**, [s. l.], v. 184, n. 1, p. 203–210, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00604-016-2011-4>. Acesso em: 26 jun. 2021.

WERTH, Brian J. **Aminoglicosídeos - Doenças infecciosas**. [S. l.], 2020. Disponível em: <https://www.msmanuals.com/pt-br/profissional/doencas-infecciosas/bacterias-e-farmacos-antibacterianos/aminoglicosideos>. Acesso em: 21 jul. 2021.

WIEDMANN, Martin. **Listeria monocytogenes: transmission and disease in ruminants**. Ithaca, United States of America, 2008. Disponível em: <https://www.vin.com/apputil/content/defaultadv1.aspx?id=3865527&pid=11262&>. Acesso em: 26 jan. 2021.

WU, Xiaoling *et al.* Paper supported immunosensor for detection of antibiotics. **Biosensors and Bioelectronics**, [s. l.], v. 33, n. 1, p. 309–312, 2012. Disponível em: <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.bios.2012.01.017>

XIA, Yinqiang *et al.* Design of elution strategy for simultaneous detection of chloramphenicol and gentamicin in complex samples using surface plasmon resonance. **Biosensors and Bioelectronics**, [s. l.], v. 92, p. 66–272, 2017. Disponível em: <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.bios.2017.02.022>

XU, Qingcui *et al.* Ratiometric electrochemical aptasensor based on ferrocene and carbon nanofibers for highly specific detection of tetracycline residues. **Scientific Reports**, [s. l.], v. 7, n. 14729, 2017. Disponível em: <https://doi.org/https://doi.org/10.1038/s41598-017-15333-5>

YAN, Shang *et al.* Label free aptasensor for ultrasensitive detection of tobramycin residue in pasteurized cow's milk based on resonance scattering spectra and

nanogold catalytic amplification. **Food Chemistry**, [s. l.], v. 295, p. 36–41, 2019. Disponível em: <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.05.110>

YAO, Xin *et al.* A novel electrochemical aptasensor for the sensitive detection of kanamycin based on UiO-66-NH₂/MCA/MWCNT@rGONR nanocomposites. **Analytical Methods**, [s. l.], v. 12, n. 41, p. 4967–4976, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1039/d0ay01503b>. Acesso em: 26 jun. 2021.

ZENG, Ruijin *et al.* Ultrasensitive and label-free electrochemical aptasensor of kanamycin coupling with hybridization chain reaction and strand-displacement amplification. **Analytica Chimica Acta**, [s. l.], v. 1038, p. 21–28, 2018. Disponível em: <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.aca.2018.07.010>

ZHANG, Yanyan *et al.* An ultra-sensitive Au nanoparticles functionalized DNA biosensor for electrochemical sensing of mercury ions. **Materials Science and Engineering: C**, [s. l.], v. 75, n. 1 June 2017, p. 175–181, 2017. Disponível em: <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.msec.2017.02.058>

ZHANG, Ying *et al.* Aptamer-modified sensitive nanobiosensors for the specific detection of antibiotics. **Journal of Materials Chemistry B**, [s. l.], v. 8, n. 37, p. 8607–8613, 2020. Disponível em: <https://doi.org/https://doi.org/10.1039/D0TB01441A>

ZHONG, Miao *et al.* An electrochemical immunobiosensor for ultrasensitive detection of Escherichia coli O157:H7 using CdS quantum dots-encapsulated metal-organic frameworks as signal-amplifying tags. **Biosensors and Bioelectronics**, [s. l.], v. 126, n. 1 February 2019, p. 493–500, 2019. Disponível em: <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.bios.2018.11.001>

ZHOU, Ling *et al.* Electrochemical aptasensor for the detection of tetracycline with multi-walled carbon nanotubes amplification. **Sensors and Actuators B: Chemical**, [s. l.], v. 162, n. 1, p. 201–208, 2012. Disponível em: <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.snb.2011.12.067>