



Jéssica Rodrigues

Avaliação da contaminação por fluoroquinolonas em aves consumidas em cantinas pré-escolares e do primeiro ciclo do ensino básico da região centro

Dissertação de Mestrado em Segurança Alimentar, orientada pela Professora Doutora Angelina Lopes Simões Pena e pela Professora Doutora Celeste Matos Lino e apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

Julho 2016



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Jéssica Rodrigues

Avaliação da contaminação por fluoroquinolonas em aves consumidas em cantinas pré-escolares e do primeiro ciclo do ensino básico da região centro

Dissertação de Mestrado em Segurança Alimentar, orientada pela Professora Doutora Angelina Lopes Simões Pena e pela Professora Doutora Celeste Matos Lino e apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

Julho 2016



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Agradecimentos

À Professora Doutora Angelina Pena, minha orientadora, por me ter proporcionado todas as condições indispensáveis à realização deste trabalho, pela disponibilidade, interesse e compreensão bem como por todas as críticas e sugestões relevantes na revisão científica deste trabalho.

À Professora Doutora Celeste Matos Lino por ter aceitado orientar este trabalho.

Ao Dr. André Pereira, por ter dispensado do seu tempo sempre que precisei da sua ajuda, pelas suas sugestões e partilha de experiências e conhecimentos, respondendo sempre a todas as minhas questões de bom agrado.

Ao meu colega, Enrico, por me ter ajudado no laboratório e por ter tornado a execução deste trabalho mais animada e agradável.

Um obrigada especial à minha mãe, Lídia, por todo o apoio incondicional e ajuda, sem o qual não teria sido possível chegar até aqui. Obrigada também ao meu pai, Carlos, por me incentivar a desenvolver as minhas potencialidades.

Ao meu irmão e a todos os meus amigos, não quero deixar de expressar a minha imensa gratidão por estarem sempre presentes, pela paciência e apoio que contribuíram para a execução deste trabalho.

Resumo

Este estudo teve como objetivo a avaliação da contaminação de resíduos de fluoroquinolonas, nomeadamente norfloxacin, ciprofloxacina e enrofloxacin em tecido muscular de carne de aves fornecidas em cantinas escolares do pré-escolar e 1º ciclo do ensino básico da zona centro de Portugal, estimando a exposição das crianças e comparando os valores encontrados com limites de referência.

Foram analisadas 74 amostras provenientes de fornecedores portugueses (n=24), ingleses (n=10) e espanhóis (n=40), por cromatografia líquida de alta pressão, acoplada a um detetor fluorimétrico, baseado na metodologia desenvolvida por Pena *et al.* (2010).

Das 74 amostras analisadas, 46 (62,2%) estavam contaminadas com pelo menos uma das fluoroquinolonas analisadas, 9 (12,2%) com norfloxacin, 41 (55,4%) com ciprofloxacina e 7 (9,5%) com enrofloxacin. Todas as amostras contaminadas com enrofloxacin também continham ciprofloxacina, o seu principal metabolito.

Uma das amostras provenientes de Inglaterra, continha teores acima do LMR permitido (100 µg/kg) para a soma da ciprofloxacina e enrofloxacin (111,9 µg/kg). Também foi encontrada uma amostra portuguesa, cuja soma de ciprofloxacina e enrofloxacin foi de 84,9 µg/kg, próximo do LMR estabelecido.

A estimativa de exposição à ENR para crianças de 3 anos foi de 0,34 µg/kg, o que é substancialmente inferior à IDA (0,002 mg/kg).

Palavras-chave: Fluoroquinolonas; norfloxacin; ciprofloxacina; enrofloxacin; tecido muscular de aves e cromatografia líquida.

Abstract

This study aimed to evaluate the contamination of fluoroquinolone residues, including norfloxacin, ciprofloxacin and enrofloxacin in muscle tissue of poultry meat that would be consumed in school canteens of pre-school and 1st cycle of basic education in the center of Portugal, estimating the exposure of children and comparing the values obtained with reference limits.

Seventy four samples were analyzed from Portuguese suppliers (n= 24), English (n= 10) and Spanish (n= 40), by high pressure liquid chromatography coupled to a fluorimetric detector, based on the methodology developed by Pena *et al.* (2010).

Of the 74 samples tested, 46 (62.2%) were contaminated with at least one of the analyzed fluoroquinolones, 9 (12.2%) with norfloxacin, 41 (55.4%) with ciprofloxacin and 7 (9.5%) with enrofloxacin. All samples contaminated with enrofloxacin were also contained ciprofloxacin, its major metabolite.

One sample from England contained above the allowed levels (100 µg/kg) for the sum of ciprofloxacin and enrofloxacin (111.9 µg/kg). There was also a Portuguese sample, that the sum of ciprofloxacin and enrofloxacin was 84.9 mg/kg, near the MRL established.

The estimation of exposure to ENR for children 3 years was 0.34 mg/kg, which is substantially lower than the ADI (0.002 mg/kg).

Keywords: Fluoroquinolones; norfloxacin; ciprofloxacin; enrofloxacin; muscle tissue of poultry and liquid chromatography.

Índice

Agradecimentos.....	v
Resumo.....	vii
Abstract.....	ix
Índice.....	xi
Índice de figuras.....	xiii
Índice de tabelas.....	xv
Abreviaturas.....	xvii
Objetivos do estudo.....	xix
I. Revisão Bibliográfica.....	1
1.1. Introdução.....	3
1.2. Consumo de aves.....	5
1.3. Quinolonas e Fluoroquinolonas.....	6
1.3.1. Mecanismo de ação.....	9
1.4. Utilização de antibióticos em medicina veterinária.....	10
1.4.1. Utilização de FQs em medicina veterinária.....	11
1.5. Avaliação da segurança.....	13
1.5.1. LMR.....	15
1.5.2. Intervalo de segurança.....	17
1.6. Toxicidade provocada pela utilização de Fluoroquinolonas.....	18
1.6.1. Toxicidade crónica - Emergência de resistências bacterianas.....	18
1.6.1.1. <i>Salmonella spp.</i>	19
1.6.1.2. <i>Campylobacter spp.</i>	24
1.7. Monitorização e vigilância.....	28
1.7.1. Estudos de pesquisa de resíduos de antibióticos em amostras de aves na União Europeia.....	29
1.8. Metodologias analíticas para determinação de FQs.....	30
1.8.1. Métodos de <i>screening</i>	31
1.8.1.1. Métodos microbiológicos.....	31
1.8.1.2. Métodos imunológicos.....	33
1.8.2. Métodos de Confirmação.....	33
1.8.2.1. Extração e purificação da amostra.....	34
1.8.2.2. Extração em fase sólida.....	35
2. Parte Experimental.....	39
2.1. Materiais e Metodologias.....	41
2.1.1. Reagentes e Soluções.....	41

2.1.1.1. Reagentes.....	41
2.1.1.2. Soluções.....	41
2.1.2. Materiais	42
2.1.3. Equipamento.....	42
2.1.4. Amostragem	43
2.1.4.1. Recolha de amostras	43
2.1.4.2. Preparação e conservação das amostras	44
2.1.4.3. Avaliação antropométrica das crianças	44
2.1.5. Metodologia analítica.....	44
2.1.5.1. Extração.....	45
2.1.5.2. Purificação da amostra	47
2.1.6. Detecção e quantificação de FQs	49
2.1.6.1. Método cromatográfico	49
2.2. Validação da metodologia analítica	50
2.2.1. Seletividade.....	50
2.2.2. Linearidade	51
2.2.3. Limite de deteção.....	51
2.2.4. Exatidão e precisão	51
2.3. Resultados e discussão	52
2.3.1. Condições cromatográficas.....	52
2.3.2. Validação.....	53
2.3.2.1. Seletividade da amostra.....	53
2.3.2.2. Linearidade	53
2.3.2.3. Limites de deteção e quantificação de FQs	57
2.3.2.4. Exatidão e precisão	57
2.3.3. Níveis de NOR, CIP e ENR nas amostras de aves analisadas	59
2.3.3.1. Contaminação de FQs em amostras de aves.....	59
2.3.3.2. Contaminações por amostras de frango e peru	61
2.3.3.3. Contaminações por país.....	62
2.3.4. Discussão de resultados.....	64
2.3.4.1. Exposição das crianças a alimentos contaminados com FQs	66
2.4. Conclusões e considerações finais.....	69
Bibliografia	71

Índice de figuras

Figura 1. Produção de carne em animais de capoeira (adaptado de INE, 2014).....	5
Figura 2. Estrutura química do ácido nalidíxico.	6
Figura 3. Classificação, décadas de descoberta e uso de quinolonas (adaptado de Emmerson et al., 2003).	7
Figura 4. Estrutura química da norfloxacin.....	8
Figura 5. Estrutura química da ciprofloxacina.....	8
Figura 6. Estrutura química da enrofloxacin.	9
Figura 7. Número de amostras-alvo analisadas e percentagem de amostras não conformes para antibacterianos (BI) em animais/produtos alimentares (Adaptado de European Food Safety Authority, 2015).....	30
Figura 8. Estratégia analítica.....	31
Figura 9. Etapas da SPE no modo de concentração ou isolamento do(s) analito(s) de interesse (adaptado de I. Jardim, 2010).	36
Figura 10. Esquema do procedimento de extração.	46
Figura 11. Esquema do procedimento de purificação da amostra.	48
Figura 12. Sistema HPLC.....	49
Figura 13. Cromatograma obtido a partir de um padrão de 100 ng/mL contendo NOR, CIP e ENR.....	52
Figura 14. Cromatograma de um ensaio branco.	53
Figura 15. Curva de calibração para a norfloxacin.	54
Figura 16. Curva de calibração para a ciprofloxacina.	54
Figura 17. Curva de calibração para a enrofloxacin.	55
Figura 18. Curva de calibração de amostras fortificadas para a norfloxacin.	55
Figura 19. Curva de calibração de amostras fortificadas para a ciprofloxacina.	56
Figura 20. Curva de calibração de amostras fortificadas para a enrofloxacin.	56
Figura 21. Cromatograma de uma amostra fortificada com NOR, CIP e ENR para um nível de 50 µg/kg.....	57
Figura 22. Amostra inglesa violativa.....	60
Figura 23. Percentagem de amostras de frangos contaminadas.	61
Figura 24. Percentagem de amostras de peru contaminadas.....	62
Figura 25. Distribuição das amostras provenientes de Portugal segundo a contaminação com FQs.....	62

Figura 26. Distribuição das amostras provenientes de Espanha segundo a contaminação com FQs.	63
Figura 27. Distribuição das amostras provenientes de Inglaterra segundo a contaminação com FQs.	63
Figura 28. Distribuição dos grupos de antibióticos encontrados em alimentos (adaptado de Cháfer-Pericás, Maquieira e Puchades, 2010).	64

Índice de tabelas

Tabela 1. Capitação de carne per capita (kg/hab.) por tipo de carnes, 2008-2012 (adaptado de DGS, 2014).	5
Tabela 2. Classificação de quinolonas de uso veterinário na EU (FAO/WHO/OIE, 2007)	11
Tabela 3. Vendas de antibióticos aplicáveis a animais produtores de alimentos, incluindo cavalos, e produção de carnes de aves, em toneladas, por país (adaptado de ESVAC e AVEC, 2014).	13
Tabela 4. LMRs estabelecidos pela EU para FQs destinadas ao uso veterinário (adaptado de Huet et al., 2006).	16
Tabela 5. Resistência bacteriana de <i>Salmonella spp.</i> ao ácido nalidíxico e à CIP, em humanos, frangos, <i>Gallus gallus</i> e perus por país em 2013 (adaptado de EFSA, 2015).	22
Tabela 6. Resistência bacteriana de estirpes de <i>Campylobacter jejuni</i> e <i>Campylobacter coli</i> à CIP e ao ácido nalidíxico em humanos, frangos e perus por país em 2013 (adaptado de EFSA, 2015).	26
Tabela 7. Resultados obtidos num estudo comparativo de 3 colunas de SPE. (adaptado de Bailac et al., 2004).	37
Tabela 8. Número de amostras recolhidas de acordo com a proveniência.	44
Tabela 9. Valores de LOD e LOQ para as FQs em estudo.	57
Tabela 10. Exatidão e precisão relativas à NOR, CIP e ENR.	58
Tabela 11. Resultados obtidos para as amostras analisadas.	59
Tabela 12. Média das concentrações de FQs obtidas nas amostras analisadas.	60

Abreviaturas

ADN – Ácido Desoxirribonucleico

AESA – Agência Europeia de Segurança Alimentar

AIM – Autorização de Introdução no Mercado

ASAE – Autoridade de Segurança Alimentar e Económica

CE – Comunidade Europeia

CG – Cromatografia Gasosa

CIM – Concentração Mínima Inibitória

CIP – Ciprofloxacina

CL – Cromatografia Líquida

DGAV – Direção Geral da Alimentação e Veterinária

DRA – Direção Regional da Agricultura

DPR – Desvio Padrão Relativo

DSECI – Direção de Serviços de Estratégia, Comunicação e Internacionalização

DSPA – Direção de Serviços de Proteção Animal

DSSA – Direção de Serviços de Segurança Alimentar

EC – Eletroforese Capilar

EFSA – Autoridade Europeia de Segurança Alimentar

EM – Estados Membros

EMEA – Agência Europeia do Medicamento

ENR – Enrofloxacin

EUA – Estados Unidos da América

FDA – *Food and Drug Administration*

FQs – Fluoroquinolonas

FS – Fator de Segurança

Gyr-A – Girase A

Gyr-B – Girase B

HPLC – Cromatografia Líquida de Alta Pressão

IDA – Ingestão Diária Aceitável

INIAV – Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária

IPSS – Instituições Particulares de Solidariedade Social

IS – Intervalo de Segurança

LMR – Limite Máximo de Resíduo

LOD – Limite de Detecção
LOEL – Nível Mais Baixo de Efeito Observado
LOQ – Limite de Quantificação
MS – Espectrometria de Massa
NOEL – Maior Dose que Não se Observa Efeito Tóxico
NOR – Norfloxacin
PNCR – Plano Nacional de Controlo de Resíduos
OMS – Organização Mundial de Saúde
SNIRA – Sistema Nacional de Informação e Registo Animal
SPE – Extração em Fase Sólida
SRV – Serviços Regionais de Veterinária
QRDR – Região Determinante de Resistência a Quinolonas
TBA – Tetrabutylamónio
UE – União Europeia

Objetivos do estudo

- Avaliar a contaminação de amostras de carnes de aves com resíduos de fluoroquinolonas (norofloxacina, ciprofloxacina e enrofloxacina);
- Estimar a exposição de crianças do grupo etário entre os 3 e os 10 anos de idade e comparar os valores encontrados com limites de referência.

I. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

I.1. Introdução

A abordagem política da União Europeia (UE) em relação à segurança alimentar visa garantir um elevado nível de segurança para proteção da saúde dos consumidores, no seio de todos os Estados-Membros (EM), nomeadamente para os resíduos de substâncias farmacologicamente ativas nos alimentos de origem animal (EMEA/CVMP/SAGAM/184651/2005, 2007).

Devido à necessidade de produção de um volume cada vez mais elevado de alimentos de origem animal, os sistemas de produção de alimentos evoluíram, de pequenas unidades agrícolas para sistemas de produção intensiva. A produção intensiva de aves é realizada em recintos de grande dimensão com elevado número de animais, sendo necessário efetuar tratamentos a populações extensas (Urraca *et al.*, 2014).

A presença de resíduos de medicamentos veterinários nos produtos alimentares de origem animal resulta de uma utilização em medicina veterinária. A legislação comunitária estabeleceu regras para a fixação de Limites Máximos de Resíduos (LMRs) destas substâncias nos produtos alimentares para consumo humano, definida no Regulamento do Conselho Europeu n.º 2377/90 de 1990, e os EM são obrigados a controlar a observância destes limites (Regulamento n.º 2377/90, de 26 de Junho).

O Plano Nacional de Controlo de Resíduos (PNCR), obrigatório em todos os EM da comunidade, que tem como base legislativa a Diretiva n.º 96/23/CE do Conselho, relativa às medidas de controlo a aplicar a certas substâncias e aos seus resíduos nos animais e respetivos produtos (Diretiva n.º 96/23/CE, de 29 de Abril).

Diversos resíduos de antibióticos¹ usados no tratamento das doenças dos animais têm sido detetados em alimentos de origem animal destinados ao consumo humano e são geralmente atribuídos à não observância dos intervalos de segurança (IS) e ao uso excessivo de antibióticos (Donkor *et al.*, 2011).

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), a resistência bacteriana aos antibióticos emergiu como um problema global de saúde pública do século XXI (Kalter *et al.*, 2010). A utilização de antibióticos na produção intensiva de animais para consumo humano, pode levar à seleção e conseqüente disseminação de populações bacterianas resistentes (Prestes *et al.*, 2009; Donkor *et al.*, 2011).

¹ Antimicrobianos incluem todos os medicamentos que funcionam contra uma variedade de microrganismos, como as bactérias, vírus, fungos, e parasitas. Antimicrobianos que funcionam exclusivamente contra bactérias são antibióticos (Colpaart, Trist e Folliard, 2011). Os termos antimicrobianos e antibióticos foram utilizados de modo indiferenciado neste documento.

Têm sido identificadas algumas resistências a antibióticos, como é o caso das infecções por *Enterococcus* e *Estafilococos* em humanos resistentes à vancomicina, associada à utilização da avoparcina como promotor de crescimento em veterinária (EFSA, 2015).

A política de segurança dos alimentos deve basear-se numa abordagem global e integrada, ou seja, ao longo de toda a cadeia alimentar, “da exploração agrícola até à mesa”.

Torna-se imprescindível a inspeção periódica e a implementação de medidas preventivas de modo a assegurar a qualidade e segurança alimentar (Urraca *et al.*, 2014).

O principal objetivo da Agência Europeia de Segurança Alimentar (AESA) é contribuir para um nível elevado de proteção da saúde dos consumidores no domínio da segurança dos alimentos, que permita restabelecer e manter a confiança dos consumidores (EFSA, 2015).

Os alimentos de origem animal, como carne, aves e peixe, são as principais fontes proteicas. Estes alimentos são ricos em vários nutrientes essenciais, mas muitos também constituem potenciais fontes de contaminação por exposição (Yaktine, Nesheim e James, 2008).

Durante a última década, surgiu uma preocupação especial com alimentos destinados a serem ingeridos por crianças, um grupo populacional mais vulnerável aos contaminantes alimentares, para quem as necessidades proteicas são maiores por kg de peso corporal em comparação com a população em geral saudável (Herrera-Herrera *et al.*, 2011).

Geralmente, as crianças apresentam uma maior suscetibilidade à contaminação devido a uma maior necessidade de energia, ingerindo maior quantidade de alimentos que os adultos relativamente ao seu peso corporal, ao tecido renal não estar totalmente desenvolvido em comparação com os adultos, à absorção de muitos elementos químicos no trato gastrointestinal ser maior e à absorção, distribuição e acumulação de substâncias químicas em órgãos-alvo e tecidos ser muito variada (Nacano, 2012).

Existem diferenças substanciais entre a fisiologia, metabolismo e estilo de vida das crianças em comparação com os adultos, modificando os padrões de exposição e limitando a aplicabilidade dos dados obtidos a partir da população adulta. Essas diferenças afetam tanto a extensão da exposição como a cinética dos xenobióticos que entram no organismo e podem causar efeitos mais graves do que os esperados em adultos (Nacano, 2012).

Consequentemente, dados sobre a exposição diária a contaminantes via ingestão alimentar, principalmente em crianças são de extrema importância na avaliação de potenciais riscos para a saúde humana (Nacano, 2012).

Este trabalho teve como objetivo principal a deteção e quantificação de resíduos de fluoroquinolonas (FQs), um grupo de antibióticos de largo espectro de grande importância em medicina humana e veterinária, nomeadamente norfloxacina (NOR), ciprofloxacina (CIP) e

enrofloxacina (ENR), em tecido muscular de aves fornecidas em cantinas escolares do pré-escolar e 1º ciclo do ensino básico, da zona centro de Portugal, de modo a estimar a exposição e comparar os valores encontrados com limites de referência

1.2. Consumo de aves

Em Portugal, segundo a Direção Geral de Saúde (DGS), entre 2008 e 2012, pela primeira vez o consumo de carne de aves (animais de capoeira) cresceu ao contrário da de bovino e a de suíno (Tabela 1) (DGS, 2014).

Tabela 1. Capitação de carne per capita (kg/hab.) por tipo de carnes, 2008-2012 (adaptado de DGS, 2014).

	2008	2009	2010	2011	2012
Carne de bovinos	19,6	19,5	19,2	18,1	16,7
Carne de suínos	47,1	47,7	46,4	45,7	43,3
Carne de animais de capoeira	33,8	35,2	36,2	35,5	35,8
Carne de ovinos e caprinos	2,8	2,7	2,6	2,6	2,5
Outras carnes	3,0	2,6	3,0	2,6	2,5
Miudezas	6,2	6,0	6,1	5,9	5,2
Total	112,5	114,0	113,5	110,4	106,0

Em 2013, a produção de carne de animais de capoeira foi de 334 mil toneladas, mantendo-se sem alteração significativa comparativamente com o ano anterior (Figura 1). A produção de frangos (que corresponde a 82% do total de animais de capoeira) teve um aumento de volume de 0,8% em relação ao ano de 2012. Por outro lado, em 2013, a produção de carne de bovino baixou 9,7% relativamente ao ano de 2012, e a produção de carne de suíno diminuiu 4,6% (INE, 2014).

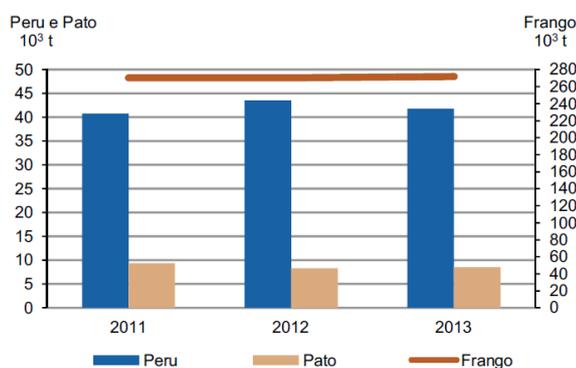


Figura 1. Produção de carne em animais de capoeira (adaptado de INE, 2014).

Na UE a carne de frango foi a menos afetada pela recessão económica, tendo aumentado a quantidade de carne produzida e consumida entre 2009 e 2012. As razões são diversas, como, por exemplo, ser uma carne de menor custo aliada ao facto de ser uma carne saudável, rica em proteínas de alto valor biológico, aminoácidos essenciais, vitaminas e minerais. Além disso, é fácil de preparar e confeccionar e livre de barreiras religiosas (AVEC, 2014).

As perspetivas futuras a nível mundial são o aumento do consumo de carne de aves em 27% até 2023 (AVEC, 2014).

I.3. Quinolonas e Fluoroquinolonas

A descoberta da penicilina por Alexander Fleming, em 1928, é um dos acontecimentos mais relevantes da história da ciência, da medicina e da farmácia do século XX. Fleming observou que algumas bactérias, como estafilococos, estreptococos e pneumococos não se desenvolviam perto de fungos da família *Penicillium spp.*. A descoberta da penicilina estimulou a investigação científica no domínio da antibioterapia e consequentemente a descoberta de novos antibióticos (Pereira e Pita, 2005; Guimarães, Momesso e Pupo, 2010).

A primeira quinolona a ser descoberta foi, em 1962, o ácido nalidíxico (Figura 2), obtido a partir da 7-cloroquinolina, um produto secundário da síntese da cloroquina (Ball, 2000). O ácido nalidíxico foi utilizado inicialmente em medicina humana no tratamento de infeções urinárias, causadas por bactérias gram-negativas (Cattoir e Nordmann, 2009). No entanto, devido às suas características farmacocinéticas (forte ligação às proteínas plasmáticas e fraca distribuição por todos os tecidos) e à sua elevada incidência de efeitos secundários e de resistências bacterianas, a sua utilização veio a tornar-se limitada (Ball, 2000; Emmerson e Jones, 2003; Van Bambeke *et al.*, 2005; Mérens e Servonnet, 2010).

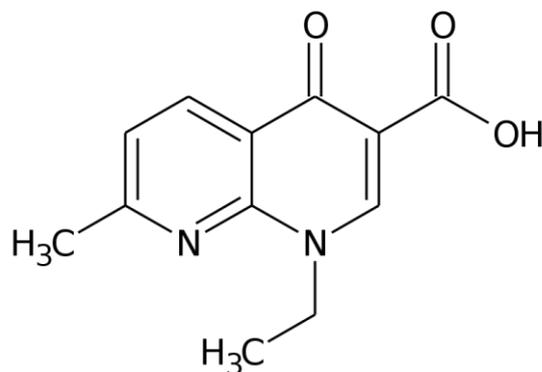


Figura 2. Estrutura química do ácido nalidíxico.

Embora os critérios utilizados para a classificação das quinolonas sejam controversos, estas são geralmente agrupadas em quatro gerações (Figura 3), de acordo com as suas características e espectro de ação (Van Bambeke *et al.*, 2005).

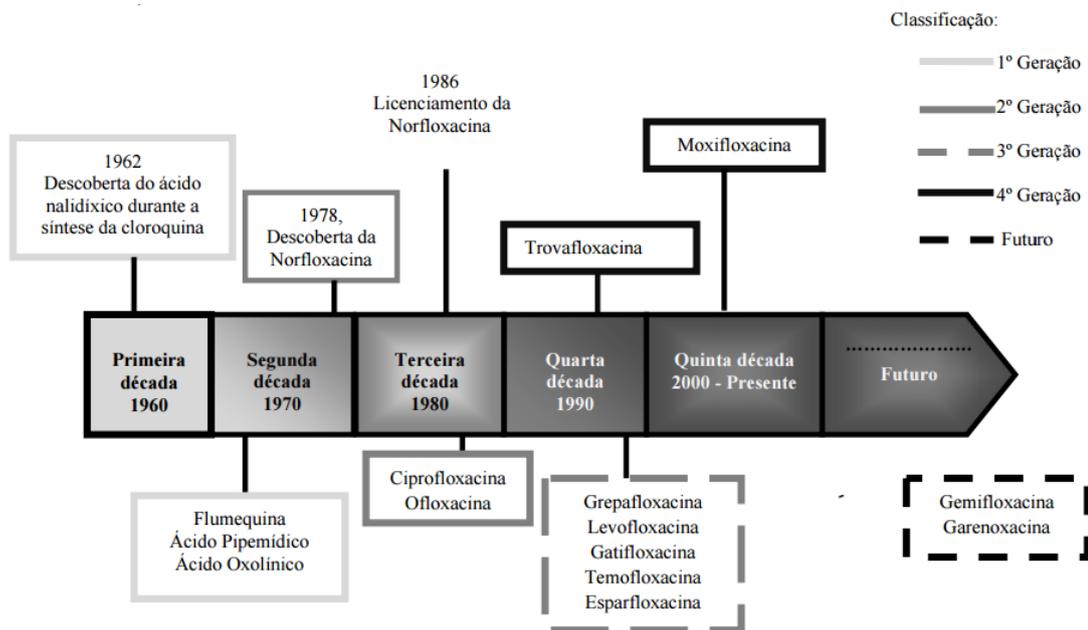


Figura 3. Classificação, décadas de descoberta e uso de quinolonas (adaptado de Emmerson *et al.*, 2003).

As quinolonas de primeira geração apresentam uma baixa biodisponibilidade oral, uma distribuição limitada nos tecidos e um limitado espectro de ação, possuindo ação antimicrobiana contra bactérias gram-negativas, mas desprovidas de atividade contra bactérias gram-positivas, bactérias atípicas e anaeróbias. Neste grupo encontram-se quinolonas originais como, por exemplo, o ácido oxolínico, o ácido pipemídico e a cinoxacina (Luzzaro, 2008; Marín Carrillo, 2008; Cattoir e Nordmann, 2009).

A segunda geração, chamadas quinolonas fluoradas ou FQs, surgiu em 1980 com aplicação principal em infeções gastrointestinais e respiratórias, onde se encontram incluídas as quinolonas monofluoradas como a norfloxacina (NOR), a ciprofloxacina (CIP) e a enrofloxacina (ENR) (Marín Carrillo, 2008). A grande inovação deve-se à introdução de um átomo de flúor ligado ao carbono 6 e do grupo piperazil na posição 7, melhorando o seu espectro de ação e a farmacocinética relativamente a compostos como o ácido nalidíxico. As mudanças estruturais existentes nesta segunda geração de quinolonas, em relação à primeira geração, permitiram aumentar a sua biodisponibilidade oral e a distribuição sistémica (Marín Carrillo, 2008; Herrera-Herrera, Hernández-Borges e Rodríguez-Delgado, 2009). Esta classe distingue-se das primeiras pelo aumento da ação antimicrobiana contra bactérias gram-negativas, aumento da atividade contra bactérias gram-positivas, embora possuam uma ação

limitada e praticamente isentas de atividade contra anaeróbios (Luzzaro, 2008; Cattoir e Nordmann, 2009).

A NOR (Figura 4) foi a primeira FQ que surgiu, sendo também a primeira a ser utilizada como antibiótico em medicina humana, em tratamentos de doenças respiratórias, biliares e infecções do trato urinário (Ovando *et al.*, 2004).

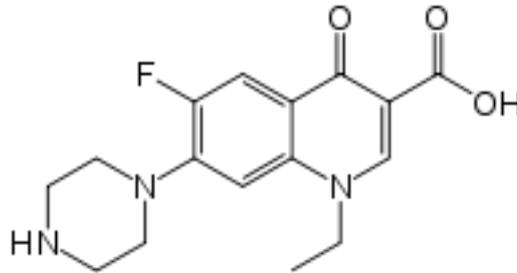


Figura 4. Estrutura química da norfloxacina.

A CIP (Figura 5) foi introduzida no mercado em 1987 e é considerada como o antibiótico da classe das quinolonas mais utilizado em todo o mundo para o tratamento de infecções no Homem, sendo que a sua utilização em animais se encontra proibida. É um dos principais metabolitos da ENR e possui um amplo espectro de atividade antibacteriana. Possui uma boa biodisponibilidade após administração e boa distribuição nos tecidos (El-Aziz *et al.*, 1997; Ovando *et al.*, 2004).

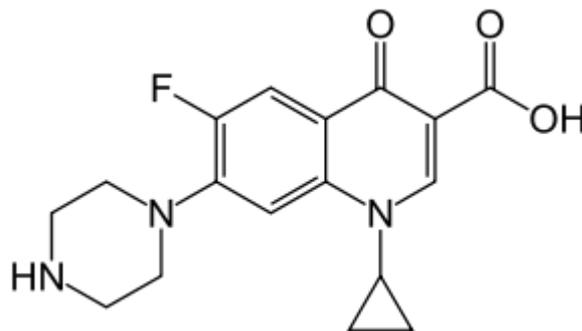


Figura 5. Estrutura química da ciprofloxacina.

A ENR (Figura 6) foi introduzida no mercado em 1988, sendo utilizada exclusivamente em medicina veterinária. Possui uma absorção quase completa e a distribuição nos tecidos garante as concentrações mínimas inibitórias contra os microrganismos que causam a maioria das doenças em animais (Otero, Mestorino e Errecalde, 2001; Takahashi, Hayakawa e Akimoto, 2002).

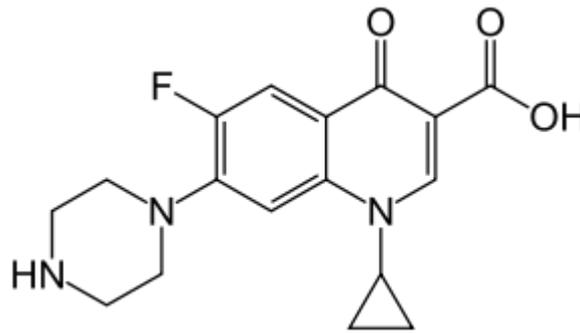


Figura 6. Estrutura química da enrofloxacin.

A constante evolução levou ao surgimento das quinolonas de terceira geração, as FQs bi- e tri-fluoradas, como, por exemplo, a levofloxacin, grepafloxacin e gatifloxacin. Neste grupo mantêm-se as características favoráveis da segunda geração, no entanto, evidencia-se um aumento da atividade contra bactérias gram-positivas, micobactérias e anaeróbios, embora ainda apresentem ação limitada contra anaeróbios. Estas quinolonas possuem uma excelente biodisponibilidade oral e um tempo de semivida prolongado, além de possuírem menor toxicidade sobre o sistema nervoso central (Marín Carrillo, 2008).

As quinolonas de quarta geração, como, por exemplo, a trovafloxacin e moxifloxacin, mantêm o bom espectro de ação contra bactérias gram-negativas, gram-positivas e ampliam a sua ação contra os anaeróbios (Sharma, Jain e Jain, 2009).

1.3.1. Mecanismo de ação

As quinolonas exercem a sua atividade intracelularmente, interferindo com enzimas necessárias para o crescimento bacteriano (Cattoir e Nordmann, 2009). Nas bactérias gram-positivas, as quinolonas chegam ao citoplasma após penetrarem a parede celular e a membrana citoplasmática (Mérens e Servonnet, 2010). No entanto, nas bactérias gram-negativas necessitam de recorrer a proteínas transmembranares, que formam canais aquosos, denominados de porinas, o que permite que ultrapassem a parede celular.

O mecanismo de ação das quinolonas é desencadeado pela inibição da atividade de duas enzimas necessárias para a replicação do Ácido Desoxirribonucleico (ADN): a topoisomerase II (ADN girase) e a topoisomerase IV (Cattoir e Nordmann, 2009).

A ADN girase é uma enzima tetramérica constituída por duas subunidades A e duas subunidades B (A_2B_2), codificadas pelos genes *gyr-A* e *gyr-B*, respetivamente (Cattoir e Nordmann, 2009, Mérens e Servonnet, 2010). A topoisomerase IV constitui também uma enzima tetramérica, sendo formada por duas subunidades C e duas subunidades E (C_2E_2),

codificadas pelos genes *parC* e *parE*, respetivamente (Dougherty, Beaulieu e Barrett, 2001). A atividade da ADN girase e da topoisomerase IV requer a presença das duas subunidades de cada uma e de ATP (Céspedes, 2008; Mérens e Servonnet, 2010).

As duas subunidades da ADN girase são responsáveis por induzir o superenrolamento negativo do ADN, ou seja, o enrolamento do ADN bacteriano numa direção oposta ao da dupla hélice de ADN. No final o ADN volta a unir-se e a ADN girase fica livre. O superenrolamento negativo de ADN é imprescindível para a replicação, transcrição, recombinação do ADN bacteriano e, eventualmente, para a sua separação (Céspedes, 2008; Cattoir e Nordmann, 2009).

A topoisomerase IV encontra-se envolvida no relaxamento e na separação do ADN e permite a cisão dos cromossomas no final da replicação, levando a que cada uma das bactérias fique com o seu próprio genoma. A ação com a ADN girase assegura o desdobramento do ADN durante a replicação e segregação do ADN (Dougherty, Beaulieu e Barrett, 2001; Céspedes, 2008).

A estrutura química das quinolonas será determinante para o seu modo de ação. Contudo, a sequência de aminoácidos codificada pelos genes *parC* e *parE* é homóloga à codificada pelos genes *gyr-A* e *gyr-B*, sendo a região correspondente designada por Região Determinante de Resistência a Quinolonas (QRDR). Esta similaridade implica que as quinolonas sejam capazes de inibir tanto a ADN girase como a topoisomerase IV (Céspedes, 2008).

A topoisomerase IV é o alvo primordial das quinolonas com ação nas bactérias gram-positivas e a ADN girase será o alvo principal das quinolonas que atuam em bactérias gram-negativas (Van Bambeke *et al.*, 2005). As quinolonas utilizadas para o tratamento de infeções por bactérias gram-negativas atuam sobretudo por ligação à subunidade A da ADN girase, impedindo que os cortes produzidos por esta enzima no ADN fechem, impossibilitando a replicação do ADN. A manutenção das ruturas introduzidas conferem-lhes capacidade bactericida, pois irão funcionar como sinais para as exonucleases. Estas irão clivar nucleótidos, dando origem a ruturas permanentes ao longo de todo o ADN e conduzindo à morte celular (Céspedes, 2008; Cattoir e Nordmann, 2009).

I.4. Utilização de antibióticos em medicina veterinária

As substâncias antimicrobianas constituem, inequivocamente, o maior grupo de fármacos utilizados na medicina veterinária (Almeida *et al.*, 2014). Este grupo inclui antibióticos

de diversas classes, como, por exemplo, β -lactâmicos, tetraciclina, aminoglicosídeos, sulfamidas e quinolonas (Ravasqueira, 2010; Evaggelopoulou e Samanidou, 2013).

A UE eliminou progressivamente e em janeiro de 2006 proibiu a utilização de antibióticos como promotores de crescimento em todos os EM, no entanto, a sua utilização continua a ser permitida nos EUA. A utilização de antibióticos em medicina veterinária na UE apenas é permitida com fins terapêuticos e profiláticos (Bengtsson e Wierup, 2006; Donkor *et al.*, 2011).

A utilização de antibióticos em medicina veterinária é controlada pela Agência Europeia do Medicamento (EMA), disponibilizando listagens dos antibióticos que podem ser utilizados, o seu modo de utilização, bem como os LMRs permitidos em diferentes tecidos edíveis (EMA, 2005).

A Tabela 2 ilustra a classificação das quinolonas permitidas na UE para utilização em medicina veterinária. Destaca-se a utilização da ENR pois o seu principal metabolito é a CIP, FQ muito utilizada em medicina humana. Além disso as resistências adquiridas ao antibiótico que foi utilizado podem estender-se também a todo o seu grupo de antibióticos e a grupos diferentes (FAO/WHO/OIE, 2007).

Em 2005, nos EUA, a utilização de ENR em medicina veterinária foi proibida, na sequência de um estudo desenvolvido pela *Food and Drug Administration* (FDA), que concluiu que a sua utilização em veterinária era prejudicial à Saúde Pública (FDA, 2004).

Tabela 2. Classificação de quinolonas de uso veterinário na EU (FAO/WHO/OIE, 2007).

Classificação	Quinolona/fluoroquinolona
1ª Geração	Ácido oxolínico Flumequina
2ª Geração	Danofloxacina Difloxacina Enrofloxacina Ofloxacina

1.4.1. Utilização de FQs em medicina veterinária

Através da observação da Tabela 3, referente à utilização de quinolonas e FQs em animais produtores de alimentos em 2012, bem como à evolução da produção de aves no

período compreendido entre 2008 e 2012, pode-se concluir que vários países da UE, incluindo Portugal, apresentam um elevado consumo destes antimicrobianos.

Analisando mais detalhadamente estes dados, em 2012, Portugal apresenta um consumo de 9,2 toneladas de FQs. Segundo os dados da EMEA (2007), em 2004 foram consumidos 3 toneladas de FQs em Portugal. Embora estes dados não discriminem as espécies alvo às quais estas FQs foram administradas, conforme já referido e apresentado na Tabela I, o consumo de aves em Portugal tem vindo a aumentar. Por outro lado, como já foi referido, a produção de suínos e bovinos tem vindo a diminuir, pelo que o aumento no consumo de FQs poderá estar relacionado com o aumento da produção de aves.

Estes dados de consumo de FQs podem justificar os 100% casos de resistência ao *Campylobacter coli*, face à CIP, observada em 2012 em frangos em Portugal (AVEC, 2014; ESVAC, 2014; EFSA, 2015).

Avaliando o rácio de quantidade de FQs por aves produzida em 2012, Espanha foi o país que consumiu mais FQs, tendo em conta as aves que produz (39,2 mg FQs/kg de aves produzida), seguindo-se Portugal (28,4 mg FQs/kg de aves produzida). Este rácio é muito discrepante de outros países como a França (2,5 mg FQs /kg de aves produzida) e o Reino Unido (1,4 mg FQs/kg de aves produzida).

Em Espanha, observou-se um consumo extraordinariamente elevado de FQs em 2012 (49 toneladas), o que é concordante com os dados de resistência à CIP em *Salmonella spp.*, encontrados para a espécie *Gallus gallus* (47,8%), como irá ser referido mais adiante (ESVAC, 2014; EFSA, 2015).

Por outro lado, a Suécia apresenta um volume de consumo de FQs em 2012 (0,1 toneladas) menor que o consumo apresentado em 2003 (0,2 toneladas), tendo-se mantido o volume de produção de aves entre 2008 e 2012 (86 000 toneladas). Estes números denotam um maior controlo das quantidades de FQs administradas aos animais (AVEC, 2014; ESVAC, 2014).

Em 2010 e 2011, foi realizado um estudo em Portugal acerca do consumo de antibióticos cuja quantidade vendida para medicina veterinária foi de 179 toneladas em 2010 e 163 toneladas em 2011. Esta diminuição de 9% foi atribuída principalmente a uma menor quantidade de oxitetraciclina, que em comparação com o ano anterior, foi responsável por uma diminuição de 33,2 toneladas. As tetraciclina (doxiciclina, oxitetraciclina) e penicilinas (amoxicilina, ampicilina, benzilpenicilina) foram os grupos terapêuticos mais utilizados em ambos os anos. O consumo de quinolonas aumentou 41% em 2011, comparativamente com o ano anterior. Foram utilizadas 5,644 e 8,386 toneladas de ENR em 2010 e 2011, respetivamente. A CIP, embora não autorizada para o uso animal é um importante metabolito

ativo da ENR. A CIP foi o antibiótico mais utilizado em Portugal para medicina humana (16,90 toneladas) (Almeida *et al.*, 2014).

Tabela 3. Vendas de antibióticos aplicáveis a animais produtores de alimentos, incluindo cavalos, e produção de carnes de aves, em toneladas, por país (adaptado de ESVAC e AVEC, 2014).

	FQs (2012)	Outras quinolonas (2012)	Produção de aves (2008)	Produção de aves (2012)	mg FQs/quant de aves produzida (2012)
Hungria	8,0	0,2	442 000	448 000	17,9
França	4,6	5,3	1 762 000	1 850 000	2,5
Alemanha	10,0	0	1 391 000	1 695 000	5,9
Itália	11,4	30,2	1 174 000	1 261 000	9,0
Polónia	32,2	0,5	1 165 000	1 582 000	20,4
Portugal	9,2	0,2	321 000	324 000	28,4
Espanha	49,0	4,4	1 178 000	1 251 000	39,2
Austria	0,5	0	120 000	125 000	4,0
Suécia	0,1	0	86 000	86 000	1,2
Reino Unido	2,3	0	1 462 000	1 607 000	1,4

1.5. Avaliação da segurança

De acordo com os padrões definidos pela OMS, na avaliação do risco causado pela exposição aos resíduos das substâncias farmacologicamente ativas, são realizados testes específicos referentes a um indivíduo adulto com 60 kg de peso. Nesta avaliação é determinada a Ingestão Diária Aceitável – IDA e o nível máximo de uma substância a que os animais de laboratório podem ser expostos sem que sejam observados quaisquer efeitos deletérios (Efeito não observável - NOEL) (EMEA, 2001).

Após esta avaliação, estabelecem-se então os LMRs ou determina-se a proibição do uso da substância (Diretiva n.º 2004/28/CE, de 31 de Março; Regulamento n.º 470/2009, de 6 de Maio).

A utilização de medicamentos veterinários na UE, nomeadamente nos animais destinados à produção de alimentos para consumo humano, está definida no Regulamento n.º 2377/90 do Conselho, de 26 de Junho de 1990 (entretanto substituído pelos Regulamentos CE n.º 470/2009 de 6 de Maio de 2009 e pelo n.º 37/2010 de 22 de Dezembro de 2009), que prevê um processo comunitário para o estabelecimento de LMRs de medicamentos veterinários nos alimentos de origem animal (Donkor *et al.*, 2011; Urraca *et al.*, 2014). Assim,

no espaço da UE não podem ser utilizadas em produção intensiva de animais as substâncias cuja legislação em vigor considera como proibidas ou que ainda não tenham LMRs estabelecidos e os resíduos de substâncias permitidas não podem exceder os limites previstos (Regulamento n.º 2377/90, de 26 de Junho).

Igualmente, todos os países que pretendam exportar produtos alimentares para a UE deverão adotar processos de produção e aplicar procedimentos de inspeção que possibilitam o respeito dos critérios da Comunidade sobre esta matéria (Regulamento n.º 2377/90, de 26 de Junho).

O Regulamento n.º 37/2010, da Comissão de 22 de Dezembro de 2009 relativo a substâncias farmacologicamente ativas e respetiva classificação no que respeita aos LMRs nos alimentos de origem animal, por motivos de facilidade de utilização, organizou todas as substâncias farmacologicamente ativas numa lista ordenada alfabeticamente num anexo único. As substâncias serão incluídas no quadro I quando é permitida a sua utilização na composição de medicamentos veterinários e no quadro II quando são proibidas, sendo que estas são assim classificadas porque apresentam risco não aceitável para a saúde pública. Foram mantidos os mesmos valores de LMRs para os diferentes tecidos alvo de aves de capoeira, relativamente à soma da CIP+ENR (Regulamento n.º 37/2010, de 22 de Dezembro).

O Decreto-Lei n.º 151/2005 de 30 de agosto é o diploma legal que estabelece as condições de fabrico de alimentos medicamentosos para animais, bem como a colocação no mercado e utilização dos mesmos. Segundo este decreto-lei, a ingestão diária de substâncias medicamentosas deve ser incluída em pelo menos metade da ração diária dos animais tratados. Os alimentos medicamentosos para animais destinados ao consumo humano apenas podem ser fornecidos mediante prescrição médico-veterinária, sendo que o médico veterinário deve certificar-se que a medicação é justificável para as espécies em causa, não existindo contraindicações ou interações. As receitas são emitidas em quadruplicado, destinando-se o original e duplicado ao fabricante ou distribuidor autorizado, o triplicado ao detentor dos animais e o quadruplicado ao médico veterinário prescritor. Cada receita origina apenas um único tratamento nunca superior a um mês (Decreto-Lei n.º 151/2005, de 30 de Agosto).

Este tipo de legislação incita para o cumprimento do Intervalo de Segurança (IS) nos animais destinados à alimentação humana, ou seja, o período de tempo que decorre entre a última administração do alimento medicamentoso e o abate do animal. Para garantir que os géneros alimentícios provenientes desse animal não contenham resíduos em teor superiores aos LMRs, é proibido o abate e a utilização de produtos provenientes de animais sujeitos a tratamento antes do final do IS (Decreto-Lei n.º 151/2005, de 30 de Agosto).

O controlo e fiscalização da observância desta legislação encontra-se a cargo da Direção Regional de Agricultura (DRA), da Inspeção Geral das Atividades Económicas e da Direção Geral de Alimentação e Veterinária (DGAV), estando estipuladas coimas para as contraordenações e, consoante a gravidade das mesmas, sanções acessórias (Decreto-Lei n.º 151/2005, de 30 de Agosto).

Os regimes de vigilância nacional, criados ao abrigo da Diretiva n.º 96/23/CE, estabelecem o número de amostras a serem testadas para cada grupo de compostos (Diretiva n.º 96/23/CE, de 29 de Abril). Os métodos analíticos a utilizar para a pesquisa de resíduos foram estabelecidos na Decisão n.º 93/256/CEE. Os critérios que definem o desempenho esperado dos métodos de *screening* e confirmação de resíduos, bem como de interpretação de resultados, encontram-se na Decisão n.º 2002/657/CE. Cada EM necessita de ter um programa de controlo de resíduos de antibióticos. Em Portugal, o plano de vigilância que assegura aos consumidores alimentos de origem animal isentos de resíduos perigosos é o PNCR.

O Laboratório Nacional de Investigação Veterinária (LNIV) é o laboratório de referência em Portugal para as análises necessárias, ou outro credenciado pela DGAV e pelo LNIV para os ensaios a efetuar.

1.5.1.LMR

O LMR é a concentração máxima de resíduo resultante da utilização de um medicamento veterinário (expresso em mg/kg ou µg/kg de peso edível) que a UE pode aceitar como legalmente autorizada, para evitar efeitos nocivos aos consumidores. Resíduos de substâncias farmacologicamente ativas são todas as substâncias ativas, excipientes ou produtos de degradação, e os seus metabolitos, que permanecem nos géneros alimentícios de origem animal (EMEA, 2005).

O LMR é estabelecido com base na IDA que representa a quantidade do composto, presente no alimento e/ou água que pode ser ingerida diariamente ao longo da vida sem que ocorram efeitos adversos à saúde humana, expressa no peso corporal. A IDA é normalmente definida para aditivos alimentares, medicamentos veterinários e pesticidas, compostos cuja concentração nos alimentos pode ser controlada pelas autoridades reguladoras. A IDA é calculada através da maior dose onde não se observa efeito tóxico nos animais de experimentação (NOEL) ou no nível mais baixo de efeito observado (LOEL), dividindo pelo Fator de Segurança (FS). O FS pode ser variável, entre 10 a 100, consoante a toxicidade do

composto e os dados sobre ele disponíveis (Jardim e Caldas, 2009). Para determinar a IDA, considera-se que o peso médio de um ser humano é de 60 kg. Como a IDA é expressa em $\mu\text{g}/\text{Kg}$ ou mg/Kg , é multiplicada por 60 para se obter a quantidade de resíduo aceitável diariamente (EMEA, 2001). A equação 1 demonstra como é feito o cálculo da IDA farmacológica.

$$IDA (\mu\text{g ou mg/kg}) = \frac{NOEL/LOEL}{FS \times 60\text{kg}}$$

Equação 1. Cálculo da IDA.

Não existe nenhuma fórmula para o cálculo do LMR. Além do valor da IDA, o cálculo do LMR deverá ter em atenção a distribuição tecidual e o cálculo da quantidade ingerida. Para o cálculo em carne de aves, estima-se que o consumo diário é de 500 g, sendo 300 g de músculo, 100 g de fígado, 10 g de rim e 90 g de tecido adiposo. Perante estas proporções, são estipulados os LMRs para os diferentes tipos de tecidos edíveis referidos, com observância das concentrações de resíduo da mesma ordem de grandeza da IDA (EMEA, 2005).

Na Tabela 4 apresentam-se LMRs estabelecidos pela UE para FQs em diversas espécies de animais e tecidos-alvo. O LMR para a ENR é estabelecido como soma de CIP+ENR, estando estipulado para as aves de capoeira, 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ sendo o tecido alvo o músculo ou o tecido adiposo; 300 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ para o rim e 200 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ para o fígado. Não existe LMR estabelecido para a CIP e NOR, uma vez que o seu uso encontra-se proibido em medicina veterinária (EMEA, 2002; 2005).

Tabela 4. LMRs estabelecidos pela EU para FQs destinadas ao uso veterinário (adaptado de Huet *et al.*, 2006).

Antibiótico	Espécies	LMR ($\mu\text{g kg}^{-1}$)		
		Músculo	Rim	Ovo
Danofloxacin	Aves	100 ^a	400	
	Bovino, ovino e caprino	200	400	
	Todas as outras espécies	100	200	b
Enrofloxacin + ciprofloxacina	Aves	100 ^a	300	
	Bovino, ovino e caprino	100	200	
	Coelho e porco	100	300	
	Todas as outras espécies	100	200	b
Flumequina	Aves	400	1000	
	Bovino, ovino, caprino e porco	200	1500	
	Peixe	600 ^a		
	Todas as outras espécies	200	1000	b
Difloxacina	Aves	300 ^a	600	
	Bovino, ovino, caprino e porco	400	800	
	Todas as outras espécies	300	600	b

b- não administrados em animais que produzem ovos para consumo humano.

1.5.2. Intervalo de segurança

Segundo a Diretiva n.º 2004/28/EC o pedido de autorização de introdução no mercado de um medicamento veterinário deve incluir o conjunto das informações administrativas e a documentação científica necessárias para comprovar sua qualidade, segurança e eficácia. O processo deve incluir, em particular, o IS dos medicamentos para espécies produtoras de géneros alimentícios, para todas as espécies em causa e para os diferentes géneros alimentícios afetados (carne e vísceras, ovos, leite e mel). Se tiverem sido estabelecidos os LMRs pela Comunidade Europeia (CE), o IS deve assegurar que esse limite máximo não seja excedido nos géneros alimentícios (Diretiva n.º 2004/28/CE, de 31 de Março).

Ainda segundo a Diretiva n.º 2001/82/CE, a Autorização de Introdução no Mercado de um medicamento veterinário será recusada se o IS indicado pelo requerente for inadequado para que os géneros alimentícios derivados do animal tratado não contenham resíduos que possam apresentar perigos para a saúde do consumidor, ou não estiver suficientemente justificado (Diretiva n.º 2001/82/CE, de 6 de Novembro).

Não existe IS para a CIP e para a NOR pois a sua utilização em medicina veterinária encontra-se proibida. Alguns estudos realizados em suínos demonstraram que após a administração de 18 mg/kg de NOR durante 5 dias consecutivos, os resíduos de NOR permaneciam até 6 dias no fígado e no rim e 4 dias no músculo. No plasma e tecido adiposo foram encontrados níveis detetáveis apenas 24 h após a última dose (Díaz *et al.*, 2001).

Para a ENR, a farmacêutica Bayer aconselha a que, quando administrada em frangos, o IS seja de 7 dias e no caso de perus seja de 10 dias. Um estudo em que foram administradas doses de 10 mg/Kg de ENR a frangos durante 5 dias consecutivos, demonstraram que não é possível detetar resíduos de ENR no cérebro, coração, baço, tecido muscular do peito e da coxa ao final de 2 dias; no soro, pulmão e pele não foram detetados resíduos ao final de 3 dias. Para o fígado, rim e gordura foram necessários 4 dias para que não fossem detetados resíduos (El-Aziz *et al.*, 1997).

Segundo o Decreto-Lei n.º 314/2009 de 28 de Outubro n.º 5 do Art.º 78º, a menos que o medicamento utilizado indique um IS para as espécies em causa, o IS a aplicar não pode ser inferior a 28 dias para a carne de aves de capoeira (Decreto-Lei n.º 314/2009, de 28 de Outubro).

I.6. Toxicidade provocada pela utilização de Fluoroquinolonas

A Agência Europeia de Segurança Alimentar (EMEA) refere que as concentrações de FQs existentes na carne de aves destinadas ao consumo humano não apresentam riscos de toxicidade aguda (EMEA/CVMP/SAGAM/184651/2005, 2007).

I.6.1. Toxicidade crónica - Emergência de resistências bacterianas

Há evidência científica que a utilização de antibióticos em medicina veterinária, incluindo as FQs e, em particular, a ENR induz a emergência de bactérias patogénicas multiresistentes no trato digestivo de aves, constituindo um problema de saúde animal e pública (Costa, 2002). A sua utilização excessiva faz com que as bactérias do trato digestivo destes animais estejam em contacto permanente com o antibiótico, formando um reservatório de estirpes de bactérias resistentes às FQs. Acresce que, a maior parte das vezes, estas estirpes de bactérias adquirem resistência a todo o grupo das FQs e não apenas às que foram administradas (FAO/WHO/OIE, 2007).

Segundo Young, a administração de doses subterapêuticas de determinados antibióticos, de forma contínua à ração, proporciona um aumento significativo do ganho de peso e melhor conversão alimentar. Por outro lado, aumenta a probabilidade do aparecimento de resistência bacteriana, diminuindo assim a eficiência destes antibióticos em medicina humana e veterinária (Young, 1994, Manie *et al.*, 1998).

A carência de recursos de diagnóstico laboratorial ou a não utilização destes quando disponíveis pode levar alguns médicos veterinários a prescreverem antibióticos sem haver necessidade. Ainda, o tratamento pode não ser suspenso aquando da melhora clínica do animal, o IS pode não ser observado, factos estes que também contribuem para a emergente resistência bacteriana aos antibióticos (Mota *et al.*, 2005).

As zoonoses são infeções e doenças transmissíveis entre animais e seres humanos. Através do consumo de produtos alimentares de origem animal ou do contato do homem com um animal doente, as bactérias antibioresistentes podem ser transferidas para humanos, podendo colonizar estes novos hospedeiros e passar a sua resistência para outra bactéria já presente (Manie *et al.*, 1998; Mota *et al.*, 2005).

De facto, a dispersão de genes que expressam mecanismos de resistência aos antibióticos, bem como a seleção de novas estirpes microbianas antibiorresistentes, coincidiu com o uso generalizado de antibióticos (Costa, 2002). De salientar que mesmo quando um antibiótico é utilizado de forma adequada, a exposição pode desencadear um mecanismo de resistência bacteriana.

Para avaliar a resistência de uma bactéria a um antibiótico, é calculada a Concentração Mínima Inibitória (CIM), havendo parâmetros pré-definidos para cada bactéria e antibiótico. Quando este valor se encontra aumentado significa que a bactéria pode ter sensibilidade reduzida ou ser resistente ao antibiótico testado (FAO/WHO/OIE, 2007).

A preocupação relativamente ao uso de FQs na produção de animais é crescente, em particular o uso da ENR e CIP (metabolito da ENR). Muitas vezes as estirpes de bactérias adquirem resistência a todas as FQs, não se restringindo apenas às que são administradas (resistência cruzada) (FAO/WHO/OIE, 2007). A resistência à ação antibacteriana das quinolonas ocorre através de dois mecanismos fundamentais: 1 - Alterações nas moléculas alvo: as enzimas ADN girase e topoisomerase IV; 2 - Alterações ao nível da acumulação intracelular dos antibióticos (Van Bambeke *et al.*, 2005).

A acumulação intracelular reduzida do antibiótico pode dever-se a uma diminuição da permeabilidade da membrana externa ao fármaco pelo facto das proteínas membranares (porinas) sofrerem alterações que afetam a sua expressão ou pela estimulação dos sistemas de efluxo celular que levam à expulsão do fármaco, mediante transporte ativo (Van Bambeke *et al.*, 2005).

1.6.1.1. *Salmonella spp.*

Na natureza, é ampla a distribuição da *Salmonella spp.*, que coloniza animais, como mamíferos, anfíbios, répteis, aves e insetos. A *Salmonella enterica* sorotipo *typhi* e *paratyphi* são patógenos especificamente humanos e podem causar infeções sistémicas graves. Os restantes sorotipos causam as chamadas salmoneloses não-tifóides e podem atingir tanto humanos como animais (Butaye *et al.*, 2006; Forshell e Wierup, 2006).

As salmoneloses ocorrem frequentemente em humanos, no entanto, a transmissão direta de uma pessoa para outra é incomum, sendo a maior parte das infeções associadas à transmissão através de produtos alimentares contaminados (Oliveira *et al.*, 2005).

Alimentos de origem animal, especialmente os produtos avícolas, são os veículos mais frequentes de transmissão de *Salmonella spp.* As carnes de aves cruas representam um dos principais veículos de transmissão *Salmonella spp.* ao homem, mediante preparação inadequada

ou contaminação cruzada com outros alimentos. As aves podem ser portadoras desta bactéria sem apresentarem sintomas (Ribeiro *et al.*, 2007).

As infecções devido a *Salmonella spp.* geralmente resultam em casos de gastroenterite auto-limitada, que abrangem sintomas como dores abdominais, náuseas, vômitos, diarreia, febre moderada e dores de cabeça, sendo administrados antibióticos apenas nos casos de pacientes imunodeprimidos, idosos, crianças, ou doentes com bacteriemia, meningite ou outras infecções extra-intestinais (Hopkins, Davies e Threlfall, 2005).

A partir de 1940 tem-se registrado um aumento progressivo da incidência de *Salmonella typhimurium* e mais recentemente, *Salmonella enteritidis* em humanos e animais (Forshell e Wierup, 2006). A *Salmonella* não-tifóide é o agente mais frequente das infecções alimentares nos países desenvolvidos. Anualmente, uma estimativa sugere que existam em torno de 94 milhões de casos de infecções por *Salmonella* não-tifóide, resultando em 155 000 mortes. Em Portugal, são notificados em média 450 casos por ano, 80% dos quais em crianças (Pignatelli *et al.*, 2014; WHO, 2014).

Durante décadas, foram amplamente utilizados para o tratamento de salmoneloses antibióticos como a ampicilina, o cloranfenicol e o trimetoprim-sulfametoxazol. Contudo, o aumento na resistência a estes agentes reduziu significativamente a sua eficácia, e outros antibióticos, como as FQs e cefalosporinas de largo espectro passaram a ser administradas (Hopkins, Davies e Threlfall, 2005).

É preocupante o aumento da incidência de estirpes de *Salmonella spp.* resistentes às quinolonas de primeira geração, como o ácido nalidíxico, facto este que pode estar relacionado com o surgimento de resistência a FQs como a CIP em medicina humana. Em 1990, na Europa, ocorreu o primeiro relato de resposta negativa da *Salmonella spp.* à terapia com CIP, em estirpes do sorotipo *typhimurium* (Hooper, 2001; Giraud, Baucheron e Cloeckert, 2006).

O critério para resistência à CIP é que a estirpe apresente $CIM \geq 4 \mu\text{g/mL}$. Cientificamente, são consideradas estirpes com sensibilidade reduzida aquelas que apresentam $CIM > 0,125 \mu\text{g/mL}$, podendo consequentemente responder negativamente ao tratamento clínico com o antibiótico (EFSA, 2015).

De acordo com a Autoridade Europeia de Segurança Alimentar (EFSA), em 2013 as maiores proporções de resistência em humanos na UE à *Salmonella spp.*, foram encontradas para a ampicilina (36,1%), as sulfonamidas/sulfametoxazol (35,7%) e as tetraciclina (34,5%). Os valores de resistência encontrados para a CIP foram de 3,8% (EFSA, 2015).

Os dados de resistência bacteriana de *Salmonella spp.* ao ácido nalidíxico e à CIP encontram-se na Tabela 5. Em Malta foi encontrado o valor mais elevado de resistência em

humanos (53,7%). Em frangos, os níveis relatados de resistência de *Salmonella spp.* ao ácido nalidíxico e à CIP, foram elevados (45%-100%), tendo-se registado valores mais baixos na Irlanda (8,1%) e na Bélgica (26,8%). No caso da espécie *Gallus gallus*, em quatro EM (Espanha, Holanda, Roménia e Eslováquia) foram encontrados níveis elevados de resistência ao ácido nalidíxico e à CIP. Em carne de peru, os níveis de resistência encontrados foram extremamente elevados (51,6-100%) na Alemanha, Holanda, Hungria e República Checa. De salientar que não existem dados disponíveis de Portugal.

Tabela 5. Resistência bacteriana de *Salmonella spp.* ao ácido nalidíxico e à CIP, em humanos, frangos, *Gallus gallus* e perus por país em 2013 (adaptado de EFSA, 2015).

	Humanos				Frangos				<i>Gallus gallus</i>				Peru			
	Ácido nalidíxico		CIP		Ácido nalidíxico		CIP		Ácido nalidíxico		CIP		Ácido nalidíxico		CIP	
	N	%R	N	%R	N	%R	N	%R	N	%R	N	%R	N	%R	N	%R
Alemanha	2016	5,0	2017	0,8	132	44,7	132	47,7	62	1,6	62	1,6	31	51,6	31	64,5
Áustria	135	18,3	1035	1,1	-	-	-	-	17	0,0	17	0,0	-	-	-	-
Bélgica	887	12,2	887	4,8	112	26,8	112	26,8	55	0,0	55	0,0	-	-	-	-
Croácia	-	-	-	-	-	-	-	-	25	4,0	25	4,0	-	-	-	-
Dinamarca	297	3,0	297	0,7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Eslováquia	13	30,8	343	6,1	15	73,3	15	73,3	12	8,3	12	8,3	-	-	-	-
Eslovênia	314	9,6	314	19,4	25	96	25	96	-	-	-	-	-	-	-	-
Estónia	143	8,4	149	6,0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Espanha	1873	22,5	1894	1,4	-	-	-	-	23	47,8	23	47,8	-	-	-	-
Finlândia	340	11,2	340	0,3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
França	997	27,0	997	15,4	-	-	-	-	10	0,0	10	0,0	-	-	-	-
Grécia	138	11,6	138	0,0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Holanda	455	0,4	455	0,2	137	76,6	137	78,8	36	25,0	36	25,0	39	84,6	39	89,7
Hungria	675	18,8	675	2,1	155	100	155	100	23	4,3	23	4,3	59	100	59	98,3
Irlanda	268	7,8	268	0,4	37	8,1	37	8,1	=	=	=	=	=	=	=	=
Itália	671	11,8	672	4,5	-	-	-	-	17	0,0	17	5,9	11	36,4	11	45,5
Letónia	-	-	34	0,0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

	Humanos				Frangos				<i>Gallus gallus</i>				Peru			
	Ácido nalidíxico		CIP		Ácido nalidíxico		CIP		Ácido nalidíxico		CIP		Ácido nalidíxico		CIP	
	N	%R	N	%R	N	%R	N	%R	N	%R	N	%R	N	%R	N	%R
Linuânia	526	15,0	958	0,3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Luxemburgo	121	9,1	121	1,7	-	-	-	-	-	-	-	47,2	-	-	-	-
Malta	-	-	82	53,7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Polónia	-	-	-	-	83	57,8	84	65,5	218	44,0	218	2,5	-	-	-	-
Reino Unido	613	13,5	646	2,9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
República checa	-	-	-	-	80	45	80	46,3	158	1,9	158		10	90	10	90
Roménia	221	21,7	221	7,2	219	84	219	87,2	80	47,5	80	46,3	42	11,9	42	33,3
Total	11603	14,4	11286	1,4	995	65,8	996	68,0	736	0,5	736	23,0	192	65,6	192	73,4

N: Número de amostras testadas; %R: Percentagem de amostras resistentes; -: sem dados reportados.

1.6.1.2. *Campylobacter spp.*

A infeção por *Campylobacter spp.*, principalmente *Campylobacter jejuni*, é considerada a causa mais frequente de gastroenterite aguda em humanos, sobretudo nos países desenvolvidos, inclusive na UE desde 2004 (EFSA, 2015).

A infeção é auto-limitada na maioria dos casos e o quadro clínico associado traduz-se maioritariamente em diarreias inflamatórias, acompanhadas por febre, dores abdominais, cefaleias e náuseas. A duração média da doença é de dois a cinco dias, mas pode ir até 10 dias. Podem surgir complicações graves como septicémias, infeções extraintestinais e sequelas neurológicas, como é o caso da síndrome de Guillian-Barré (Silva *et al.*, 2011; Team, 2012; EFSA, 2015).

Os frangos são frequentemente colonizados com *Campylobacter spp.* às duas semanas de vida, devido à exposição a outros animais contaminados, excretando nas fezes grandes quantidades de *Campylobacter spp.*, apesar de não apresentarem sintomatologia. A principal fonte de infeção é o consumo e a manipulação de alimentos contaminados, sobretudo carne de aves, mas também leite cru e outros produtos lácteos; pode também infetar peixe e produtos derivados, mexilhões e legumes frescos. Existem ainda outras formas de contaminação, como, por exemplo, o contacto com aves vivas, ingestão de água a partir de fontes de água não tratada, contacto com animais de estimação e outros animais que possam ser identificados como fontes de possível infeção (EFSA, 2015).

A resistência aos antibióticos em *Campylobacter spp.* é um motivo de grande preocupação devido ao grande número de infeções humanas e ao facto de alguns casos requererem antibioterapia. Os antibióticos mais frequentemente utilizados para tratar as infeções mais severas por *Campylobacter spp.* são os macrólidos e as FQs. O aumento da emergência da resistência bacteriana surgiu nos anos 90, após as FQs terem sido permitidas para o uso em aves de capoeira (Santos *et al.*, 2013).

São variados os mecanismos pelos quais esta bactéria se torna resistente aos antibióticos. Um deles resulta de uma mutação no gene que codifica a subunidade Gyr-A. Em *Campylobacter jejuni* esta alteração provoca uma troca de um aminoácido que é suficiente para conferir uma elevada resistência às FQs. Ao ser administrada ENR, proporciona um ambiente favorável ao desenvolvimento de estirpes com esta mutação, que podem também ser resistentes a outros grupos de antibióticos (Hakanen *et al.*, 2002).

Em Portugal, entre 2009 e 2012, foram analisadas pelo Instituto de Saúde Doutor Ricardo Jorge (INSA) 837 casos de infeção em humanos, das quais 84,5% foram identificados como sendo *C. jejuni* e 14,8% *C. coli*. No geral, foi observado uma elevada taxa de estirpes

resistentes, sendo as estirpes *C. Coli* mais resistentes que as *C. jejuni*. Todas as estirpes foram resistentes ao ácido nalidíxico, comparativamente ao período entre 1984 e 1989, em que não foi detetada qualquer resistência ao ácido nalidíxico. Foram resistentes às FQs 92,8% das estirpes e à tetraciclina/doxiciclina 76% das estirpes. Destaca-se que a prevalência de estirpes multirresistentes (resistentes a pelo menos 3 antibióticos não estruturalmente relacionados) foi de 87,2% (Santos *et al.*, 2013).

Segundo um relatório da EFSA (2015), em 2013 na EU, foram identificados 84 585 casos de campilobacteriose em humanos, sendo que destes 96,6% foram devidos a *C. jejuni* e *C. coli*. Mais de metade das estirpes de *C. jejuni* (54,6%) foram resistentes à CIP. Foram encontradas proporções mais elevadas de resistência por *C. coli*, sendo para a CIP 66,7% (EFSA, 2015).

A tabela 6 ilustra a resistência de estirpes de *Campylobacter coli* e *Campylobacter jejuni* à CIP e ao ácido nalidíxico nos EM da EU. Em Espanha foi encontrado um elevado nível de resistência à CIP em humanos infetados (91,5% e 94,3% para *Campylobacter coli* e *Campylobacter jejuni*, respetivamente). Em frangos, a resistência observada geralmente foi maior em *C. coli* que *C. jejuni*. Geralmente, foram encontrados altos níveis de resistência por *C. coli* à CIP (76,2%) e ao ácido nalidíxico (72,6%). Em Portugal, todas as estirpes de *C. coli* foram resistentes ao ácido nalidíxico e CIP em frangos, embora o número de amostras testado tivesse sido reduzido (n=11). Os valores de resistência por *C. jejuni* relatados face à CIP (53,0%) e ao ácido nalidíxico (50,3%) também foram elevados em frangos. Em perus apenas foram reportados dados da Hungria, sendo a resistência do *Campylobacter coli* e *Campylobacter jejuni* à CIP de 72,7% e 80%, respetivamente (EFSA, 2015).

Tabela 6. Resistência bacteriana de estirpes de *Campylobacter jejuni* e *Campylobacter coli* à CIP e ao ácido nalidíxico em humanos, frangos e perus por país em 2013 (adaptado de EFSA, 2015).

	Humanos				Frangos (<i>Gallus gallus</i>)						Peru					
	<i>C. jejuni</i>		<i>C. coli</i>		<i>C. jejuni</i>			<i>C. coli</i>			<i>C. jejuni</i>		<i>C. coli</i>			
	CIP		CIP		Ácido nalidíxico		CIP		Ácido nalidíxico		CIP		CIP			
	N	%R	N	%R	N	%R	N	%R	N	%R	N	%R	N	%R		
Alemanha	-	-	-	-	266	52,3	266	61,3	103	84,5	103	87,4	-	-	-	-
Áustria	303	63	34	61,8	144	68,8	144	71,5	99	68,7	99	69,7	-	-	-	-
Bélgica	-	-	-	-	216	39,8	216	38,9	60	65,0	60	65,0	-	-	-	-
Dinamarca	65	23,1	-	-	70	20,0	70	20,0	22	36,4	22	36,4	-	-	-	-
Eslováquia	992	39,9	25	36,0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Eslovénia	877	64,1	73	58,9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Estónia	293	57,7	9	NA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Espanha	281	91,5	53	94,3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
França	3816	49,7	678	61,7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Grécia	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Holanda	2811	56,9	236	59	54	61,1	54	57,4	72	80,6	72	81,9	-	-	-	-
Hungria	-	-	-	-	24	79,2	24	75,0	56	83,9	56	85,7	10	80	11	72,7
Irlanda	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Itália	235	67,2	24	79,2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Linuânia	178	88,2	12	NA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

	Humanos				Frangos (<i>Gallus gallus</i>)								Peru			
	<i>C. jejuni</i>		<i>C. coli</i>		<i>C. jejuni</i>				<i>C. coli</i>				<i>C. jejuni</i>		<i>C. coli</i>	
	CIP		CIP		Ácido nalidíxico		CIP		Ácido nalidíxico		CIP		CIP		CIP	
	N	%R	N	%R	N	%R	N	%R	N	%R	N	%R	N	%R	N	%R
Luxemburgo	566	59,4	90	68,9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Malta	138	69,6	44	68,2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Polónia	-	-	-	-	53	49,1	46	47,8	15	0	55	72,7	-	-	-	-
Portugal	-	-	-	-	-	-	-	-	11	100	11	100	-	-	-	-
Reino Unido	1110	46,9	132	47	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Roménia	44	77,3	5	NA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Suécia	-	-	-	-	12	50,0	12	50,0	-	-	-	-	-	-	-	-
Total	11709	54,6	1415	66,6	839	50,3	832	53,0	438	72,6	478	76,2	-	-	-	-

N: Número de amostras testadas; %R: Percentagem de amostras resistentes; -: sem dados reportados; NA- Não aplicável (amostras inferiores a 20 unidades)

I.7. Monitorização e vigilância

O controlo de resíduos de substâncias farmacologicamente ativas, tanto para os produtos provenientes dos EM da UE, como para os alimentos importados de países terceiros, é obrigatório desde 1997, pelo estabelecido na Diretiva n.º 96/23/CE, de 29 de Abril de 1996, relativa às medidas de controlo a aplicar a certas substâncias e aos seus resíduos nos animais e respetivos produtos, pela Decisão n.º 97/747/CE, de 27 de Outubro de 1997, relativa ao nível e frequência de amostragens previstos pela Diretiva n.º 96/23/CE, e pela Decisão n.º 98/179/CE da Comissão, de 23 de Fevereiro de 1998, que estabelece regras para a colheita das amostras oficiais a utilizar na pesquisa de determinadas substâncias e seus resíduos nos animais e respetivos produtos, transpostas para a legislação nacional. Para além do cumprimento da legislação anterior, existe a obrigatoriedade de cumprir o estabelecido na Diretiva n.º 96/22/CE do Conselho, de 29 de Abril, relativa à proibição de utilização de certas substâncias com efeitos hormonais ou tireostáticos e de 21 substâncias beta-agonistas em produção animal, com as alterações que lhe foram introduzidas pela Diretiva n.º 2003/74/CE, do Parlamento Europeu e do Conselho, de 22 de Setembro, transposta para o Decreto-lei n.º 185/05 de 4 de Novembro.

Para a promoção e reforço da proteção da saúde animal da saúde humana são criados planos de monitorização de modo a avaliar os níveis de resíduos de medicamentos veterinários nos tecidos edíveis de animais. Através destes planos é possível identificar as irregularidades que possam estar a ocorrer nas diversas fases de produção dos animais para consumo. Ainda, fomenta o recurso a técnicas e meios alternativos aos antibióticos para o uso em animais produtores de alimentos para consumo humano, nomeadamente, ao nível da formação e sensibilização de utilizadores de medicamentos veterinários, a venda responsável, a redução dos riscos associados ao seu uso, o armazenamento de e a gestão dos seus resíduos. (DGAV, 2014).

Em Portugal existem várias entidades responsáveis pelo cumprimento do PNCR, nomeadamente a DGAV, que tem por missão definir, executar e avaliar as políticas de segurança alimentar, de proteção animal e de sanidade animal, de proteção vegetal e fitossanidade (DGAV, 2014).

De acordo com o PNCR um resultado não conforme é quando um animal ou produto derivado deste após análise apresenta resíduos de substâncias proibidas ou valores de resíduos superiores aos LMRs permitidos (EFSA, 2015).

1.7.1. Estudos de pesquisa de resíduos de antibióticos em amostras de aves na União Europeia

O relatório da EFSA de 2015 resume os dados de monitorização recolhidos em 2013 sobre a presença de resíduos de medicamentos veterinários e outras substâncias em animais e produtos de origem animal na UE. Foram apresentados resultados referentes a 1 005 835 amostras provenientes de 28 EM da EU, das quais 419 528 eram amostras-alvo, 17 561 eram amostras suspeitas notificadas ao abrigo da Diretiva 96/23/CE, 3 329 eram amostras provenientes da importação e 565 417 eram amostras recolhidas no âmbito de programas desenvolvidos ao abrigo da legislação nacional (European Food Safety Authority, 2015).

O número mínimo preconizado pela Diretiva n.º 96/23/CE, de uma amostra analisada por 200 toneladas de produção anual foi alcançada em 2013 para o conjunto da EU, não tendo sido alcançado na Grécia e Hungria. No Reino Unido foram analisadas 9546 amostras, em Espanha foram analisadas 6985 amostras e em Portugal foram analisadas 1701 amostras (European Food Safety Authority, 2015).

Da totalidade de amostras suspeitas (n=17 561), 706 (4,0%) eram não conformes, da totalidade de amostras importadas (n=3 329), 2,46% eram não conformes e da totalidade de amostras de aves recolhidas no âmbito de programas desenvolvidos ao abrigo da legislação nacional (n=565 417), 0,22% eram não conformes. Das 261 amostras de aves suspeitas analisadas, 13 eram não conformes. Das 623 amostras de aves importadas, 12 eram não conformes e das 602 amostras de aves recolhidas no âmbito de programas desenvolvidos ao abrigo da legislação nacional, 2 eram não conformes (European Food Safety Authority, 2015).

Das 419 528 amostras-alvo, 1 299 encontravam-se não conformes (0,31%) o que foi comparável aos seis anos anteriores (0,25-0,34%). Do total de amostras alvo, 45% foram analisadas para substâncias com efeito anabolizante e substâncias não autorizadas (grupo A) e 61% para medicamentos e contaminantes veterinários (grupo B) (European Food Safety Authority, 2015).

O grupo dos antibacterianos (BI) inclui, por exemplo, beta-lactâmicos, tetraciclina, macrólidos, aminoglicosídeos, sulfonamidas e quinolonas. O número total de análises efetuadas para agentes antimicrobianos em amostras-alvo foi de 124 262, das quais 258 (0,21%) eram não conformes (European Food Safety Authority, 2015).

A Figura 7 representa o número de amostras-alvo analisadas e percentagem de não conformidades para cada espécie animal. Das 19 769 amostras de aves analisadas para agentes antimicrobianos, 30 amostras (0,15%) provenientes de 10 EM não se encontravam conformes.

A percentagem de amostras não conformes foi superior em porcos (0,19%) e vacas (0,26%) (European Food Safety Authority, 2015).

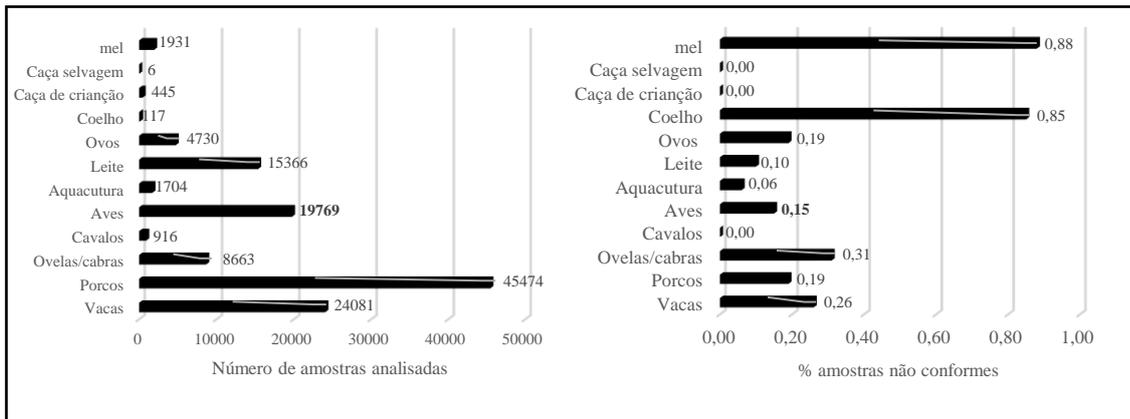


Figura 7. Número de amostras-alvo analisadas e percentagem de amostras não conformes para antibacterianos (BI) em animais/ produtos alimentares (Adaptado de European Food Safety Authority, 2015).

I.8. Metodologias analíticas para determinação de FQs

A análise laboratorial aplicada aos programas de monitorização da UE no âmbito da segurança alimentar, tem de ter em conta que a maioria das amostras são negativas e a existência de resultados falsos negativos põe em perigo a saúde dos consumidores (Toldrá e Reig, 2006).

Os métodos de monitorização de resíduos encontram-se divididos em métodos de *screening* ou triagem e em métodos de confirmação.

Os métodos de *screening* ideais são metodologias simples, rápidas, de relativo baixo custo e de grande eficácia. Assim, estes métodos devem apresentar resultados fidedignos para valores de concentração ao nível dos LMRs. São exemplos de métodos de triagem os métodos microbiológicos e imunológicos. Todas as amostras suspeitas pelos métodos de triagem são sujeitas a procedimentos analíticos de confirmação. (Companyó *et al.*, 2009).

Os métodos de confirmação devem apresentar elevada exatidão, precisão, especificidade e sensibilidade, bem como garantir resultados inequívocos, isto é, fornecer informações relativamente à estrutura química do antibiótico a analisar e permitir a sua quantificação exata para valores de concentração ao nível dos LMRs. Como métodos de confirmação, é utilizada a Cromatografia Líquida acoplada à Espectrometria de Massa em Tandem (LC-MS/MS) (MacNeil e Ellis, 1995; Companyó *et al.*, 2009).

Na Figura 8 pode ser observado um esquema acerca da estratégia analítica habitualmente utilizada.

Em Portugal, como já foi referido, o controlo de resíduos de medicamentos veterinários em produtos de origem animal é realizado através do PNCR, onde o nº de amostras a recolher depende do nº de abates e consumo relativo ao ano anterior. As substâncias a serem analisadas são seleccionadas com especial atenção aos resultados positivos do ano anterior.

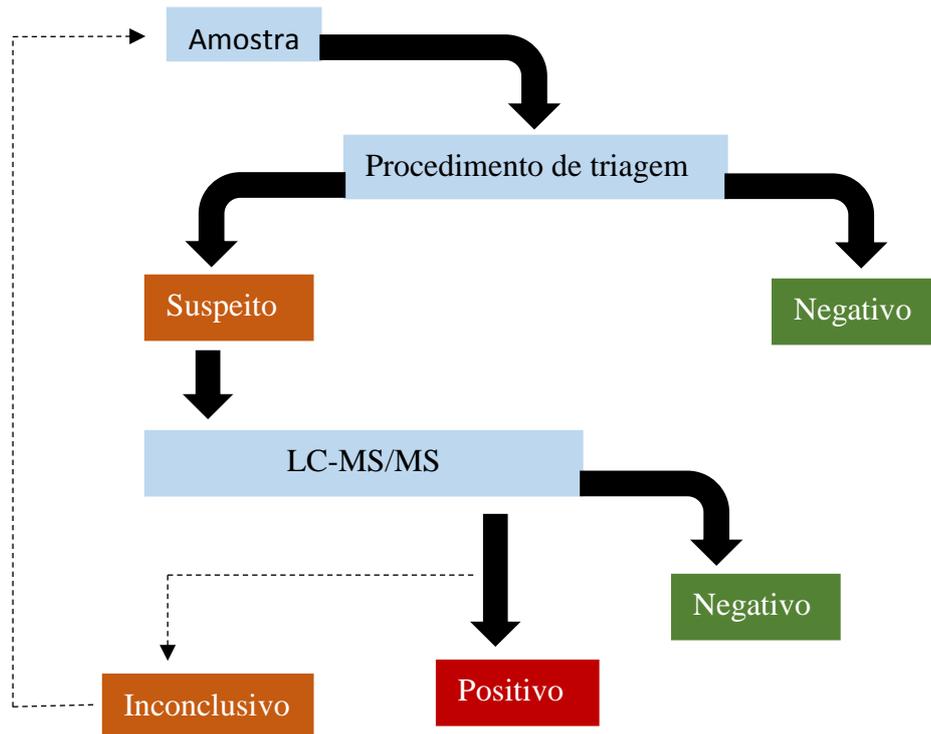


Figura 8. Estratégia analítica.

1.8.1. Métodos de *screening*

1.8.1.1. Métodos microbiológicos

As técnicas microbiológicas são qualitativas ou semi-quantitativas e baseiam-se na inibição do crescimento de microrganismos, podendo detetar qualquer antibiótico ou substância com atividade antibacteriana, sendo efetuadas normalmente com *kits* comerciais (Companyó *et al.*, 2009; Pacheco-Silva, Souza e Caldas, 2014).

O método das quatro placas é amplamente utilizado na UE. Um estudo realizado por Tajik *et al.* (2010) com o método das quatro placas em 160 amostras de aves, incluindo

músculo, fígado e rim, revelou que 17,5% das amostras se encontravam contaminadas com cloranfenicol. Posteriormente, as amostras foram submetidas ao ensaio imunológico ELISA, demonstrando que, das amostras contaminadas, apenas 78,5%, 75% e 50% das amostras foram positivas para fígado, rim e músculo, respetivamente (Tajik *et al.*, 2010).

O protocolo STAR é um Teste de Cinco Placas (TCP), desenvolvido há vários anos pelo Laboratório Comunitário de Referência (LCR) em Fougères, França, para a triagem de resíduos de antimicrobianos no leite e tecido muscular. O protocolo STAR é aplicável para a deteção de resíduos de antibióticos de largo espectro no tecido muscular das diferentes espécies animais (suínos, bovinos, ovinos, aves de capoeira). O método tem boa especificidade (taxa de falsos positivos de 4%). A sensibilidade foi determinada para vários antibióticos de diferentes famílias em relação ao seu respetivo LMR sendo o limite de deteção para a ENR entre 100 e 200 µg/kg (Gaudin *et al.*, 2010).

O Premi[®]Test é utilizado em programas de vigilância em França, Alemanha, Rússia, Bélgica, África do Sul, China, entre outros. Deteta um amplo espectro de antibióticos em tecido muscular bovino, suíno e de aves, ovos, alimentos para animais e urina. Disponibiliza resultados em menos de 4 horas, no entanto, os limites de deteção da ENR em tecido muscular são superiores a 600 µg/kg (Pikkemaat *et al.*, 2011).

Assim, apesar de possuírem uma boa relação custo-eficácia, verifica-se que para muitos antibióticos estes testes não são suficientemente sensíveis, pois os limites de deteção são superiores aos LMRs estabelecidos (Pikkemaat, 2009; Cháfer-Pericás, Maquieira e Puchades, 2010).

Estas técnicas muitas vezes são pouco seletivas e específicas, não permitindo a distinção entre compostos relacionados ou combinações de antibióticos. Portanto, deve existir sempre uma análise e interpretação cuidada dos resultados obtidos (Companyó *et al.*, 2009).

É importante mencionar que, em alguns EM, devido ao elevado número de amostras a analisar nos PNCR, existem programas específicos de controlo que utilizam testes microbiológicos. Em alguns casos, um resultado positivo num teste microbiológico é suficiente para rejeitar a amostra. Isso pode significar que o resultado não é confirmado através de um método físico-químico e, portanto, não há identificação conclusiva da substância em causa. Em outros casos, um resultado positivo no teste de rastreio é confirmado por meio de um ensaio imunológico ou físico-químico e é então possível identificar a substância e determinar se a sua concentração é superior ao LMR (EFSA, 2015).

1.8.1.2. Métodos imunológicos

Os ensaios imunológicos baseiam-se na reação antígeno-anticorpo e são frequentemente utilizados para uma deteção qualitativa e quantitativa de antibióticos nos produtos de origem animal (Veloso *et al.*, 2002).

O método de ELISA competitivo (*Enzyme-linked immunosorbent assay*) é uma técnica particularmente comum na qual o analito da amostra e uma quantidade conhecida de um analito marcado com enzima competem por um número conhecido e limitado de sítios de ligação e anticorpos. A adição de um substrato adequado produz cor por reação com a enzima do analito marcado que se ligou ao anticorpo. A quantificação é conseguida comparando o sinal produzido pela amostra desconhecida com uma curva padrão. Assim, o método de ELISA envolve os seguintes passos: 1) Imobilização de anticorpo nos poços de uma microplaca; 2) Competição entre o analito da amostra e o analito marcado com a enzima pelos locais de ligação do anticorpo; 3) o material que não se liga é retirado por lavagem e 4) é adicionado substrato cromogénico que desenvolve cor, que por sua vez é depois lida através de um espectrofotómetro (Toldrá e Reig, 2006; Cháfer-Pericás, Maquieira e Puchades, 2010; Tajik *et al.*, 2010).

Os testes ELISA permitem analisar um grande número de amostras. Essencialmente combinam anticorpos, reagentes, padrão, substratos e, em alguns casos, dispositivos de extração em unidades de campo portáteis, prontas para usar (Toldrá e Reig, 2006; Cháfer-Pericás, Maquieira e Puchades, 2010).

No estudo de Huet *et al.* (2006), utilizando o método ELISA, foi conseguido detetar 15 (fluoro)quinolonas em várias matrizes incluindo o músculo de aves de capoeira. Foi observado que os limites de deteção foram inferiores a 10 µg/kg para a maioria dos antibióticos, incluindo a CIP e a ENR (Huet *et al.*, 2006).

Assim, estes métodos geralmente apresentam elevada sensibilidade e limites de deteção inferiores aos LMRs. São mais rápidos e simples de executar. Apesar de serem mais práticos do que os métodos microbiológicos, são mais dispendiosos (Toldrá e Reig, 2006).

1.8.2. Métodos de Confirmação

A Cromatografia Líquida de Alta Pressão (HPLC) acoplada a um detetor é o método instrumental mais utilizado para a determinação de FQs em alimentos (Zhao *et al.*, 2007). Em HPLC, o solvente ou fase móvel é bombeado a alta pressão através de uma coluna contendo

partículas de tamanho 1,5-5 μm . Estas partículas podem constituir a fase estacionária, ou servirem de suporte a uma fase estacionária líquida (p. ex. sílica microporosa com uma fase líquida de cadeias octadecilo ligadas covalentemente). No desenho normal, a fase estacionária é mais polar do que o eluente; em HPLC de fase inversa, a configuração é oposta (Meyer, 2013).

A cromatografia líquida compreende um conjunto de métodos que permitem separar, identificar, quantificar e isolar componentes semelhantes de uma mistura complexa. Apesar destes métodos serem muito diferentes entre si, todos utilizam uma fase estacionária e uma fase móvel. Os componentes da mistura passam através da fase estacionária (com a qual deverão interagir, adsorvendo-se a ela, dissolvendo-se nela ou reagindo quimicamente com ela) por ação da fase móvel (onde são solúveis), sendo as separações baseadas nas diferentes distribuições entre as duas fases e consequentemente nas diferentes velocidades de migração (que ocorre apenas na fase móvel) dos vários componentes da mistura (Theodoridis *et al.*, 2012; Meyer, 2013).

Na análise das FQs, a maior parte das fases móveis utilizadas são constituídas por água, metanol e acetonitrilo, existindo descritas na bibliografia científica alguma diversidade de combinações (Garcia *et al.*, 2005; Hermo, Barrón e Barbosa, 2006; Stoilova e Petkova, 2010). É importante o tamponamento das fases móveis a $\text{pH}=3$ de modo a que as FQs permaneçam na sua forma catiónica (Zhao *et al.*, 2007).

Os detetores fluorimétricos são os mais utilizados para a deteção de FQs, devido à sua fluorescência nativa. Consistem numa lâmpada de excitação (de espectro de bandas ou contínuo) seguida de um filtro de excitação ou uma rede de difração, incidindo o feixe luminoso sobre a célula de amostra, excitando-a. Ao regressar ao estado fundamental, é emitido um feixe de luz, o qual é posteriormente dirigido a um segundo filtro ou monocromador, que seleciona o comprimento de onda emitido, fazendo-o incidir por último no fotodetector (Meyer, 2013). A deteção por fluorimetria apresenta várias vantagens, nomeadamente sensibilidade (na ordem dos $\mu\text{g}/\text{kg}$) e seletividade (Zhao *et al.*, 2007). No entanto, atualmente é necessário efetuar a confirmação por MS/MS, um equipamento mais complexo e dispendioso mas essencial para a identificação dos compostos (Hermo, Barrón e Barbosa, 2006; Rocha *et al.*, 2015).

1.8.2.1. Extração e purificação da amostra

Em matrizes alimentares complexas com interferentes é difícil isolar resíduos de antibióticos (Toldrá e Reig, 2006).

A preparação da amostra pretende promover a concentração dos compostos de interesse e remover, tanto quanto possível, os interferentes da matriz, evitando que estes interfiram ou coeluem com os analitos-alvo (Prestes *et al.*, 2009). Esta constitui a etapa mais onerosa e demorada envolvida no processo analítico, absorvendo cerca de 80% do tempo total de análise, e pode introduzir erros, particularmente devido à perda do analito e à contaminação da amostra (Chen *et al.*, 2008; Prestes *et al.*, 2009).

A homogeneização da amostra é normalmente realizada recorrendo a um vortex e ultra-sons com o objetivo de fragmentar as células, de modo a permitir toda a extração do conteúdo tecidual, com solventes antes do processo de purificação (Shim *et al.*, 2003).

Após a extração, é efetuada uma centrifugação para que ocorra a separação da amostra sólida do extrato líquido, sendo aconselhável efetuar mais do que um processo de centrifugação de modo a obter uma melhor separação (Samanidou, Christodoulou e Papadoyannis, 2005).

O processo de extração é seguido de purificação ou *clean-up*. As técnicas mais comumente utilizadas para purificação de compostos são: extração em fase sólida, extração com fluido supercrítico e extração com membranas sólidas (diálise e ultrafiltração) ou líquidas (Queiroz, Collins e Jardim, 2001).

Atualmente os métodos de preparação da amostra têm evoluído para aproximações mais amigas do ambiente (menor consumo de solventes orgânicos), miniaturização, automatização e, idealmente, ligação em linha com a determinação instrumental final (deste modo obtêm-se extratos menos manipulados pelo analista, diminuindo a probabilidade de erros experimentais) (Queiroz, Collins e Jardim, 2001).

1.8.2.2. Extração em fase sólida

A extração em fase sólida (SPE) é uma técnica de separação líquido-sólido que envolve competição, extensamente utilizada para purificar analitos semi-voláteis e não voláteis de amostras líquidas e amostras sólidas extraídas com solventes. Os principais objetivos da SPE prendem-se com a remoção de interferentes da matriz, a concentração e o isolamento dos analitos das matrizes (Nováková e Vičková, 2009).

As principais vantagens deste processo relativamente à extração líquido-líquido são a redução do uso de solventes orgânicos, aos quais está normalmente associado um maior custo e toxicidade (para os operadores e para o ambiente), possibilidade de automatização, capacidade de aumentar seletivamente a concentração do analito e disponibilidade comercial de vários enchimentos para SPE (Lee *et al.*, 2003; Hernández-Borges *et al.*, 2007).

Apresenta como desvantagens os elevados custos dos cartuchos e a variabilidade nos valores de recuperação obtidos devido à presença de partículas sólidas nos extratos, que podem alterar o fluxo de eluição (Nováková e Vičková, 2009).

Geralmente, os procedimentos de SPE contêm quatro etapas: 1) acondicionamento do enchimento por um processo de solvatação com solventes adequados (normalmente metanol seguido de água); 2) introdução da amostra no topo da coluna, posteriormente aspirada com pequeno vácuo de forma a penetrar na coluna. Ocorre a retenção do analito e por vezes alguns interferentes; 3) lavagem com solvente, purificação ou *clean-up*, com o objetivo de limpar a coluna para retirar os interferentes menos retidos que o analito; 4) eluição do analito com volume apropriado de solvente (normalmente metanol), recuperando as substâncias de interesse sem permitir a eluição dos interferentes que não tenham sido eliminados na etapa anterior, por estarem muito retidos no enchimento. (Queiroz, Collins e Jardim, 2001; Jardim, 2010). Na Figura 9 podem ser visualizadas as principais etapas de SPE.

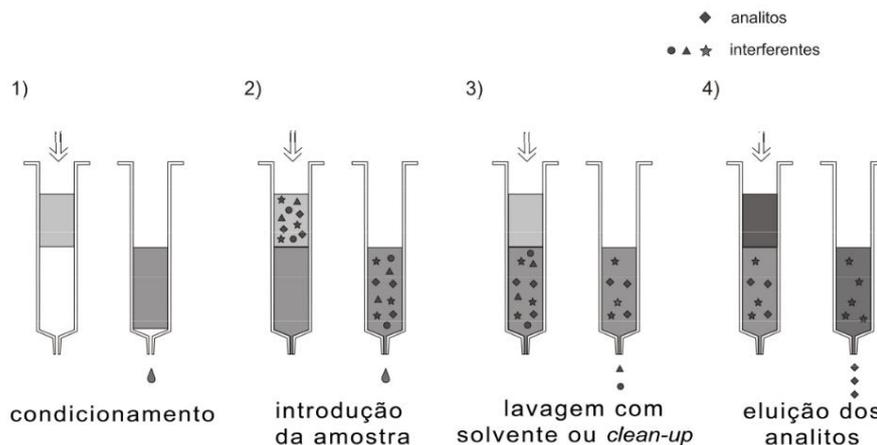


Figura 9. Etapas da SPE no modo de concentração ou isolamento do(s) analito(s) de interesse (adaptado de I. Jardim, 2010).

A solução obtida, de modo evitar a decomposição dos compostos, é evaporada à secura em corrente suave de azoto a temperatura de 40°C e posteriormente redissolvida num solvente apropriado, e filtrada com um microfiltro de 0,45 µm para eliminar as partículas de maiores dimensões que possam ainda estar no extrato da amostra. Posteriormente o extrato da amostra obtido é injetado no equipamento de HPLC (Zhao *et al.*, 2007).

As colunas SPE mais utilizadas na extração em fase sólida são as colunas Oasis HLB, que possuem um adsorvente polimérico universal de fase reversa que foi desenvolvido para uma vasta gama de compostos ácidos, básicos e neutros (Yu *et al.*, 2012).

Na Tabela 7 podem ser visualizados alguns tipos de colunas de SPE utilizadas na determinação de FQs.

Conclui-se que a purificação realizada através das colunas Oasis HLB é a que apresenta percentagens de recuperação mais elevadas, na ordem dos 87% para a CIP e 84% para a ENR. Quando comparadas as colunas Oasis Max e SDB-RPS às colunas Oasis HLB, estas apresentam percentagens de recuperação para a CIP na ordem dos 23% e 70%, respetivamente, enquanto para a ENR apresentam percentagens de recuperação na ordem dos 84% e 91%, respetivamente (Bailac *et al.*, 2004).

Tabela 7. Resultados obtidos num estudo comparativo de 3 colunas de SPE. (adaptado de Bailac *et al.*, 2004).

Quinolonas	LMR ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	Oasis HLB		Oasis Max		SDB-RPS	
		LOD ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	R (%)	LOD ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	R (%)	LOD ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	R (%)
Flumequina	400	10	85	5	96	10	83
Difloxacina	300	10	81	10	79	10	87
Danofloxacina	200	10	61	10	68	10	66
Ácido Oxolínico	100	10	80	10	87	5	86
Ciprofloxacina	100 ^I	5	87	10	23	5	70
Enrofloxacina	100 ^I	5	84	5	84	5	91

LOD – Limite de deteção;

R – Percentagem de recuperação (amostras fortificadas com 240 $\mu\text{g}/\text{Kg}$);

I – LMR para a soma da ENR com CIP (100 $\mu\text{g}/\text{Kg}$).

Samanidou (2005) também concluiu que se obtinham melhores resultados na determinação e quantificação de FQs utilizando colunas Oasis HLB (200 mg/ 3 mL), quando comparadas com DSC-18 (500 mg/mL) e Nexus (30 mg/ 1 mL) (Samanidou, Christodoulou e Papadoyannis, 2005).

Assim, as principais vantagens das colunas Oásis HLB incluem uma análise mais robusta e uma melhor recuperação de compostos polares e não polares em matrizes complexas (Zhu *et al.*, 2001).

2. PARTE EXPERIMENTAL

2.1. Materiais e Metodologias

2.1.1. Reagentes e Soluções

2.1.1.1. Reagentes

- Acetonitrilo para HPLC (Carlo ERBA, Milão, Itália);
- Ácido sulfúrico 90-91% (Carlo ERBA, Milão, Itália);
- Ácido fosfórico 85% RPE-ACS (Merk, Alemanha);
- Água para HPLC obtida através do sistema Millipore (Milli-Q Integral 10, Billerica, E.U.A);
- Metanol para HPLC (Carlo ERBA, Milão, Itália);
- Padrão de NOR com grau de pureza superior a 98% (Sigma Chemicals Co, St. Louis, E.U.A);
- Padrões de CIP e ENR com grau de pureza superior a 98% (Biochemika, Fluka, Suíça);
- Solução de hidróxido de tetrabutílamónio (TBA) (Fluka Analytical, Suíça).

2.1.1.2. Soluções

- Solução de ácido sulfúrico 0,185 M, preparada dissolvendo 10 mL de ácido sulfúrico 90-91% num balão volumétrico de 1 L, perfazendo-o com água destilada;
- Solução de ácido fosfórico 0,025 M, ajustada para pH= 3, recorrendo ao TBA;
- Solução de ácido fosfórico 0,5 M, preparada através da dissolução 33,6 mL de solução de ácido fosfórico num balão volumétrico de 1 L, perfazendo o restante volume com água destilada;
- Solução de ácido sulfúrico 0,005 M, preparada dissolvendo 27 mL da solução de 0,185 M de ácido sulfúrico num balão volumétrico de 1 L, perfazendo-o com água destilada;
- Soluções de NOR, CIP e ENR a 1 mg/mL, preparadas dissolvendo 50 mg do respetivo padrão num balão volumétrico de vidro âmbar de 50 mL com cerca de 30 mL de ácido sulfúrico. Colocar a solução no ultrasons durante 15 min e no fim perfazer os 50 mL com ácido sulfúrico a 0,005 M;
- Soluções padrão de NOR, CIP e ENR na mesma solução e na mesma proporção, ou seja, 0,0075 µg/mL, 0,0125 µg/mL, 0,025 µg/mL, 0,05 µg/mL, 0,1 µg/mL e 0,2 µg/mL para elaboração de curvas padrão e de fortificação, efetuadas através da dissolução das soluções padrão de 2,5 µg/mL em ácido sulfúrico 0,005 M.

É importante referir que todas as soluções padrão preparadas contendo NOR, CIP e ENR foram guardadas em balões volumétricos de cor âmbar, em câmara de refrigeração, entre 0 e 4 °C, para evitar a deterioração dos seus compostos.

2.1.2. Materiais

- Adaptadores de seringa;
- Agulhas;
- Balões volumétricos (20, 25, 50, 100, 1000 mL);
- Bisturi;
- Copos de precipitação (20, 50, 250, 500 mL);
- Espátulas;
- Frascos (250, 500 e 1000 mL);
- Filtro de membrana com poro de 0,2 µm e de diâmetro de 50 mm (Millipore, Alemanha);
- Funis de vidro;
- Filtro de membrana para as amostras com poro de 0,45 µm (Millipore, Dassel, Irlanda);
- Filtro de membrana com poro de 0,2 µm e diâmetro de 50 mm (Whatman, GE Healthcare, Little Chalfon, Inglaterra);
- Parafilm (Pechiney Plastic Packaging, Chicago, E.U.A);
- Pipetas volumétricas (1, 2 mL);
- Pipetas graduadas (5, 10 mL);
- Provetas (10, 25, 100, 500 mL);
- Seringas de plástico de 1 mL;
- Seringas de vidro (100, 250 µL);
- Tubos de centrífuga;
- Tubos de ensaio;
- Varetas de vidro;

2.1.3. Equipamento

- Aparelho de ultrassonificação modelo Sonorex RK 100 (Berlim, Alemanha);
- Concentrador;
- Balança analítica Mettler Toledo modelo AG 285;

- Centrífuga Sigma Modelo 3-16 K (St. Louis, E.U.A);
- Coluna de HPLC Chromolith® Performance RP-18e (10-4.6 mm) da Merck, Alemanha;
- Colunas de extração de fase sólida Oasis HLB, 200 mg (6cc) (Waters, Damstadt, Alemanha);
- Detetor fluorimétrico Inteligente, Jasco FP-2020 Plus (Japão);
- Sistema de HPLC composto por uma bomba Gilson modelo 307 (Gilson Medical Electronics, Villiers-le-Bel, França), um injetor Rheodyne modelo 7125 (Cotati, Califórnia, E.U.A) com loop de 20 µL;
- Sistema de vácuo para extração em fase sólida;
- Sistema de vácuo para filtração de fase móvel Buchi (Suíça);
- Vortex Retsch Mixer (Alemanha).

2.1.4. Amostragem

2.1.4.1. Recolha de amostras

Tratou-se de um estudo exploratório, de base populacional. Desse modo, a recolha de amostras foi realizada durante o período de outubro de 2014 a março de 2015. Foram recolhidas aleatoriamente amostras de carnes de aves que seriam consumidas em cantinas escolares da zona centro de Portugal. As amostras foram obtidas a partir de unidades de confeção que transportam refeições para dezenas de escolas do pré-escolar e 1º ciclo do ensino básico, Instituições Particulares de Solidariedade Social (IPSS) que transportam refeições para algumas escolas do pré-escolar e 1º ciclo do ensino básico e unidades de produção de refeições que distribuem as refeições apenas na escola em que se encontram.

O número de amostras recolhidas consoante a proveniência encontra-se na Tabela 8. As 74 amostras recolhidas eram provenientes de fornecedores portugueses, ingleses e espanhóis e foram adquiridas sob diferentes formas: no caso do frango foram adquiridas sob a forma de “perna de frango”, “peito de frango”, “frango para canja” e “frango do campo”; no caso do peru, foram adquiridos “peitos de peru” e “perna de peru”.

Para os ensaios preliminares e validação da metodologia foram utilizadas amostras de um galo e um frango caseiro cedidos por familiares. Estes eram provenientes de agricultura de subsistência e foram utilizados como brancos, uma vez que não foram utilizados antibióticos nestes animais e a sua alimentação foi feita à base de milho.

As amostras foram todas analisadas entre 23 de março e 8 de maio de 2015.

Tabela 8. Número de amostras recolhidas de acordo com a proveniência.

Proveniência das amostras	Nº de amostras	
	Frango	Peru
Portugal	18	6
Espanha	10	-
Inglaterra	40	-
Total	68	6

2.1.4.2. Preparação e conservação das amostras

Foi retirada para uma embalagem etiquetada com data, identificação, local da recolha e produtor, uma quantidade de 20 g de tecido muscular isento de gordura, mantida até então em câmara de conservação de congelados a uma temperatura inferior a -18°C até à análise.

2.1.4.3. Avaliação antropométrica das crianças

Foram efetuadas as medidas antropométricas de crianças entre os 3 e os 10 anos de idade pertencentes às escolas onde foram recolhidas as amostras, com o objetivo de avaliar o seu estado nutricional. Foi avaliado o peso, estatura, a circunferência da cintura e em crianças com idade superior a 5 anos, a percentagem de gordura corporal total e percentagem de gordura do tronco.

Foram efetuadas as medidas antropométricas de 901 crianças com idade média foi de $6,7 \pm 2,02$ anos. Foram avaliadas mais crianças do sexo masculino 459 (50,9%) que do sexo feminino 442 (49,1%). Das crianças avaliadas, 145 (16,1%) apresentavam excesso de peso e 146 (16,2%) obesidade. Foi diagnosticado excesso de peso ou obesidade em 36,1% das crianças do sexo feminino e em 28,5% das crianças do sexo masculino, sendo que foi encontrada uma associação significativa entre o sexo feminino e a prevalência de excesso de peso ou obesidade ($p=0,03$, teste χ^2).

2.1.5. Metodologia analítica

Toda a metodologia aplicada à análise de FQs (NOR, CIP e ENR) em tecido muscular de aves foi baseada na metodologia desenvolvida por Pena *et al.* (2010) (Figura 10 e 11).

2.1.5.1. Extração

O Procedimento utilizado na extração do tecido muscular de aves foi o seguinte:

- 1- Pesar $1,000 \pm 0,001$ g de tecido muscular de carne de aves isento de pele e gordura;
- 2- Colocar a amostra num tubo de centrífuga e adicionar 7 mL de H_3PO_4 (0,5 M);
- 3- Agitar no vortex durante 1 min;
- 4- Adicionar 1 mL de padrões de 50 $\mu g/mL$, 100 $\mu g/mL$ e 200 $\mu g/mL$ a tubos de ensaio em triplicado; deixar repousar durante 15 min ao abrigo da luz (apenas na fortificação);
- 5- Extrair no equipamento de ultrasons durante 15 min;
- 6- Centrifugar durante 10 min a 13 000 g a 4°C;
- 7- Separar o sobrenadante para um tubo *falcon*, seguindo-se uma segunda extração, repetindo o processo de extração anteriormente indicado (exceto o passo aplicado à fortificação, que não volta a ser repetido);
- 8- Adicionar o segundo sobrenadante ao sobrenadante retirado anteriormente;
- 9- Centrifugar o sobrenadante resultante das duas centrifugações anteriores, durante 10 min a 13 000 g a 4 °C (Figura 10).

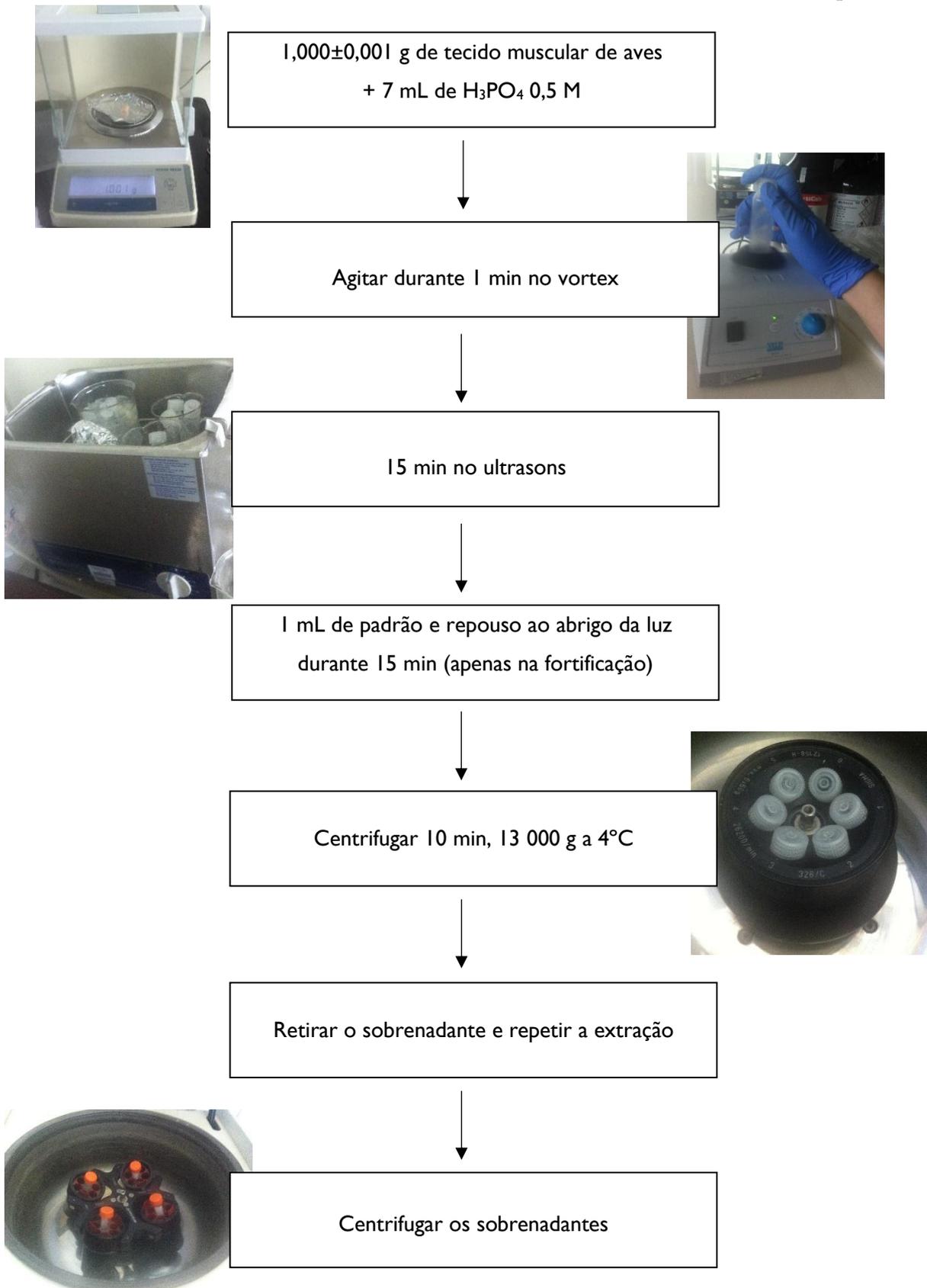


Figura 10. Esquema do procedimento de extração.

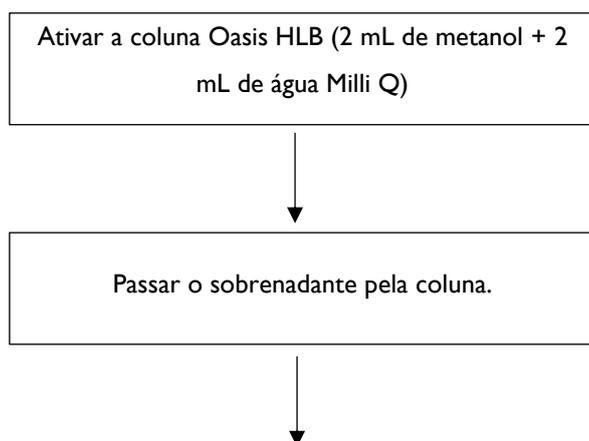
2.1.5.2. Purificação da amostra

Seguidamente ao processo de extração, foi efetuada a purificação do extrato das amostras centrifugadas recorrendo a colunas Oasis HLB, 200 mg (6cc), previamente ativadas.

Esta purificação foi realizada por SPE, recorrendo a um sistema de vácuo, onde ocorre um aumento progressivo da pressão negativa até que o extrato da amostra atravesse a coluna na sua totalidade. É importante que a passagem da amostra por estas colunas seja feita gota a gota de modo a que as FQs fiquem totalmente retidas.

O procedimento da purificação dos extratos foi o seguinte:

- 1- Ativar a coluna utilizando 2 mL de metanol seguidos de 2 mL de água Milli Q;
- 2- Colocar imediatamente o extrato da amostra na coluna, passando através desta, sem deixar secar totalmente a coluna;
- 3- Lavar a coluna com 2 mL da água Milli Q e secar durante 15 min a 10 mm de Hg;
- 4- Eluir as FQs retidas na coluna para um tubo de ensaio, com 2 mL de metanol e secar durante 15 min a uma pressão de 10 mm de Hg;
- 5- Levar o extrato à secura a 40 °C sob uma corrente suave de azoto;
- 6- Dissolver o resíduo seco em 1 mL de H₂SO₄ 0,005 M e agitar a mistura no vortex durante 1 min;
- 7- Colocar a mistura no ultrasons durante 15 min, para total dissolução;
- 8- Filtrar o extrato redissolvido num filtro de membrana de 0,45 µm antes da injeção no sistema de HPLC (Figura 11). O sistema HPLC utilizado encontra-se na Figura 12.



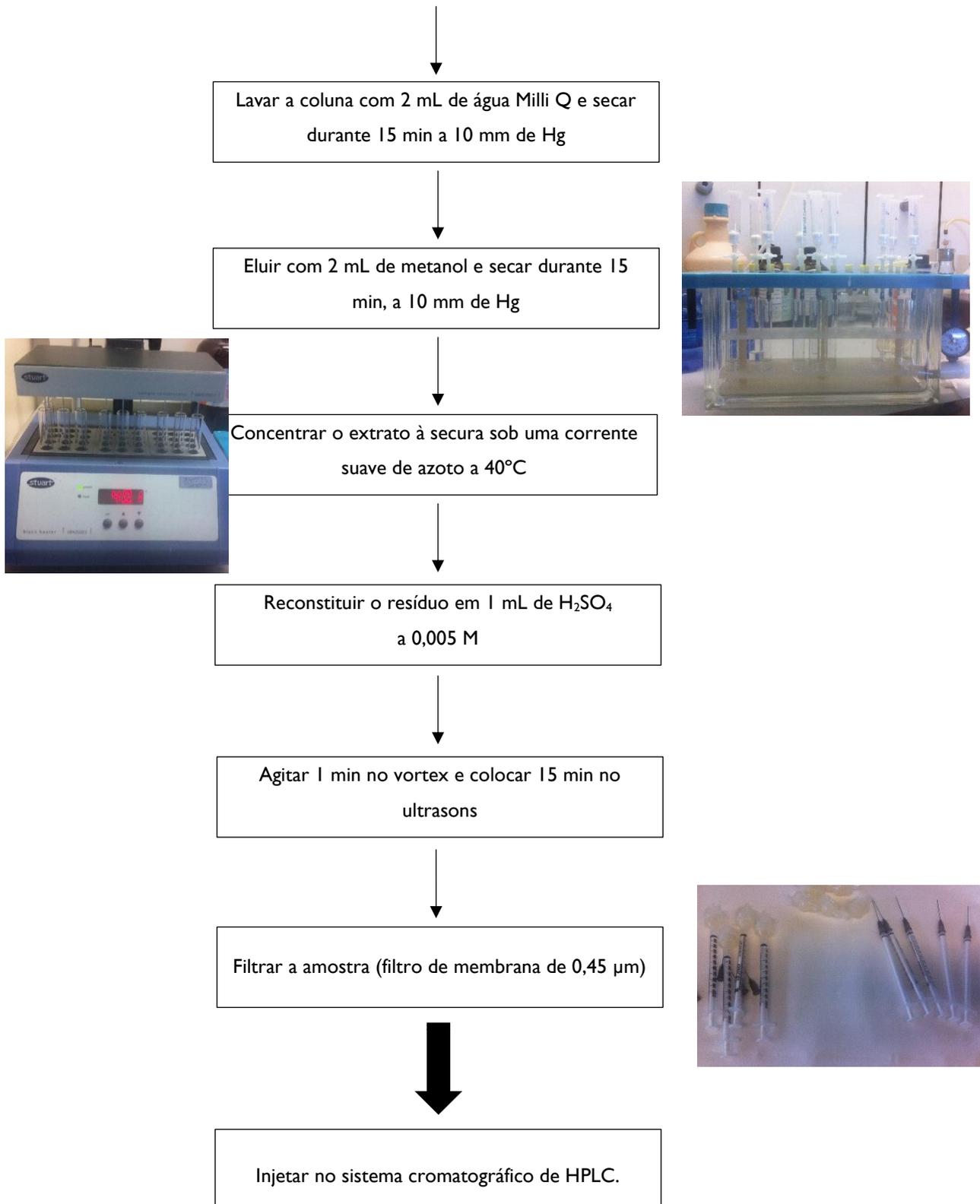


Figura 11. Esquema do procedimento de purificação da amostra.



Figura 12. Sistema HPLC.

2.1.6. Detecção e quantificação de FQs

Foi utilizado um equipamento de HPLC com detetor fluorimétrico para identificação e quantificação das três FQs estudadas.

2.1.6.1. Método cromatográfico

Fase móvel

A fase móvel foi uma solução tampão para a qual, constituída por ácido fosfórico 0,025 M a pH=3 (ajustado com TBA), metanol e acetonitrilo numa proporção de 885:90:25, respetivamente (Pena *et al.*, 2010). Depois de terem sido adicionados todos os reagentes, a fase móvel foi filtrada com recurso a um filtro de membrana com porosidade de 0,2 μm sob vácuo e posteriormente foi colocada a desgaseificar no ultrasons durante 15 min. Após ter sido testada, foi concluído que era possível observar uma boa resolução dos picos cromatográficos.

O sistema HPLC funcionou à temperatura ambiente, com fluxo de 1,5 mL/min.

Fluorimetria

A detecção fluorimétrica utiliza a fluorescência nativa das FQs. Os comprimentos de onda de excitação e de emissão referidos na literatura científica variam entre 275-280 nm e 440-450 nm, respetivamente. Foram utilizados os comprimentos de onda de emissão e de excitação otimizados no trabalho Pena *et al.* (2010): 278 nm e 450 nm, respetivamente (Pena *et al.*, 2010).

A fluorescência depende fortemente do pH do meio, sendo a maior intensidade obtida a baixo pH, de 2,5 a 4,5. Assim, a separação foi feita com fase móvel a pH=3, o que permitiu maximizar a intensidade da fluorescência.

2.2. Validação da metodologia analítica

A validação e revalidação de metodologia analítica são necessárias para demonstrar que um determinado método, desenvolvido para identificar e quantificar um ou mais analitos numa determinada matriz, é suficientemente fiável para que sejam obtidos resultados com elevado grau de confiança. Os parâmetros de validação de métodos analíticos envolvem seletividade, linearidade, limites analíticos (detecção e quantificação), exatidão e precisão (Relacre, 2000; Brito *et al.*, 2003; Ribani *et al.*, 2004).

Os procedimentos laboratoriais para a detecção de resíduos em amostras devem respeitar um conjunto de critérios de desempenho descritos na Decisão da Comissão 2002/657/CE.

2.2.1. Seletividade

A seletividade é a capacidade de um método detetar um analito em particular numa mistura complexa, avaliando o grau de interferentes, impurezas, produtos de degradação, bem como outros componentes que possam estar presentes na matriz (Bressolle, Bromet-Petit e Audran, 1996).

Para avaliar as interferências foram analisadas duas amostras de produção caseira, através da metodologia referida anteriormente, com o intuito verificar se a matriz músculo de aves possuía ou não interferentes com o mesmo tempo de retenção dos analitos de interesse (NOR, CIP e ENR), que comprometessem a identificação dos antibióticos em estudo.

2.2.2. Linearidade

A linearidade designa-se pela capacidade de um método fornecer resultados diretamente proporcionais à concentração dos analitos na amostra, dentro de um determinado intervalo de concentrações. A linearidade demonstra a proporcionalidade entre as áreas obtidas dos picos e as concentrações que estão presentes nas amostras. Esta relação é tanto maior, quanto mais próximo for o valor do coeficiente de correlação r^2 da unidade, sendo que, quando $r^2=1$, indica que todos os pontos se encontram exatamente sobre uma linha de declive positivo (Bressolle, Bromet-Petit e Audran, 1996, Hubert *et al.*, 1999).

Neste trabalho, a avaliação da linearidade do método instrumental e do método analítico foi realizada em 6 níveis de fortificação para a NOR, CIP e ENR: 7,5 ng/mL, 12,5 ng/mL, 25 ng/mL, 50 ng/mL, 100 ng/mL e 200 ng/mL, utilizando soluções padrão e 7,5 µg/kg, 12,5 µg/kg, 25 µg/kg, 50 µg/kg, 100 µg/kg e 200 µg/kg através de amostras fortificadas, respetivamente.

2.2.3. Limite de deteção

O limite de deteção (LOD) define-se como a menor concentração de analito numa amostra que pode ser detetada, embora não necessariamente quantificada. O limite de quantificação (LOQ) representa a menor concentração de substância em análise que pode ser quantificada na amostra, com exatidão e precisão aceitáveis (Currie, 1999, Hubert *et al.*, 1999).

Os LODs e LOQs foram calculados através do método baseado em parâmetros da curva analítica. Para o LOD foi utilizada a seguinte fórmula: $LOD = 3 \times \frac{s}{S}$ em que s é o desvio padrão das amostras consideradas como brancos e S é a média da inclinação das curvas analíticas dos três dias de amostras fortificadas. O LOQ foi calculado de forma semelhante, $LOQ = 10 \times \frac{s}{S}$, em que o s e o S são os mesmos valores que foram utilizados para calcular o LOD.

2.2.4. Exatidão e precisão

Entende-se por exatidão a concordância entre o resultado de um ensaio e o valor de referência aceite como real. A exatidão de um método analítico está relacionada com

percentagens de recuperação, tendo em conta a matriz e a concentração de analito (Bressolle, Bromet-Petit e Audran, 1996; Hubert *et al.*, 1999).

A precisão é o parâmetro que avalia o grau de concordância entre vários ensaios efetuados na mesma amostra homogênea, sendo normalmente expressa através do desvio padrão relativo (Bressolle, Bromet-Petit e Audran, 1996; Hubert *et al.*, 1999).

Devem ser tidos em conta dois aspetos bastante importantes, a precisão intra-dia e a precisão inter-dia. A precisão intra-dia foi calculada através da média dos desvios padrão relativos (DPR) das percentagens de recuperação de cada antibiótico analisado em cada dia; a precisão inter-dia foi calculada através da média dos desvios padrão das percentagens de recuperação dos antibióticos em estudo, para três dias consecutivos.

A avaliação da exatidão e da precisão da metodologia utilizada foi realizada através dos ensaios de fortificação. Estes foram realizados na amostra de frango considerado branco e foram efetuados para 3 níveis de fortificação, 50 µg/Kg; 100 µg/Kg e 200 µg/Kg, em triplicado durante 3 dias.

2.3. Resultados e discussão

2.3.1. Condições cromatográficas

A fase móvel utilizada era constituída por uma solução tampão (pH=3), metanol e acetonitrilo na proporção de 885:90:25 com o fluxo de 1,5 mL/min, de acordo com Pena *et al.* (2010). Observando-se o cromatograma (Figura 13), pode-se verificar que os picos apresentavam uma boa resolução e que os tempos de retenção eram relativamente curtos.

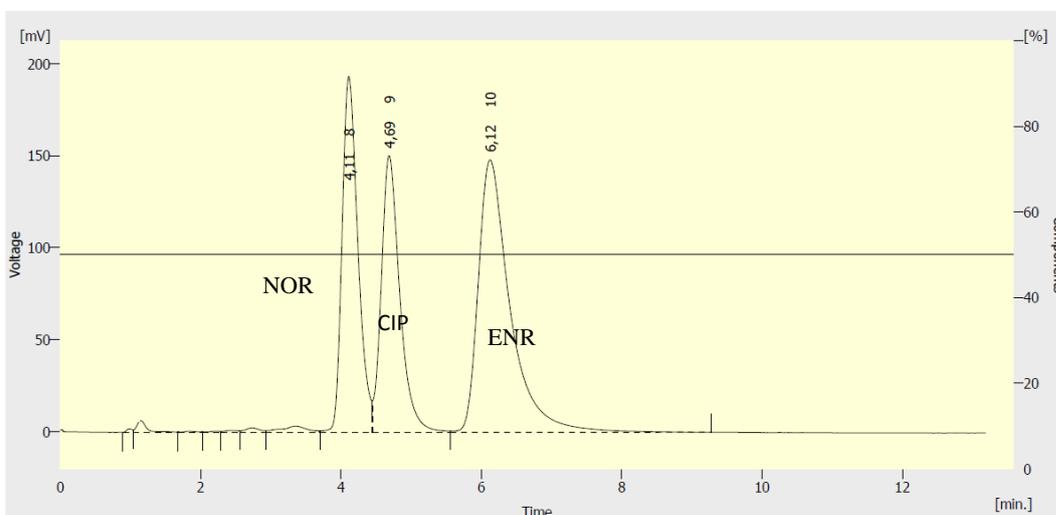


Figura 13. Cromatograma obtido a partir de um padrão de 100 ng/mL contendo NOR, CIP e ENR.

2.3.2. Validação

2.3.2.1. Seletividade da amostra

Em todos os brancos extraídos das amostras analisadas não foram observadas interferências na zona do tempo de eluição das FQs em estudo, como pode ser observado através da Figura 14.

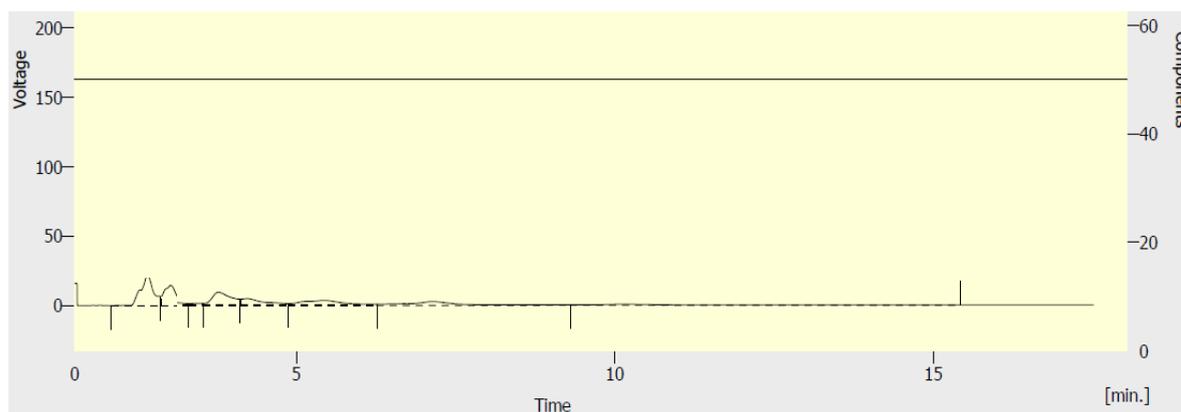


Figura 14. Cromatograma de um ensaio branco.

2.3.2.2. Linearidade

A avaliação da linearidade foi efetuada para as soluções padrão e para as amostras fortificadas.

Na primeira situação foram usadas soluções padrão com concentrações de 7,5 ng/mL, 12,5 ng/mL, 25 ng/mL, 50 ng/mL, 100 ng/mL e 200 ng/mL, de modo a possibilitar a detecção das concentrações de FQs em estudo abaixo e acima do LMR estabelecido (100 µg/Kg para a soma da ENR com a CIP).

Foram realizadas três injeções de cada solução e obtida a média de áreas correspondente a cada concentração, utilizadas para construir os gráficos. Os valores de r^2 obtidos para a NOR, CIP e ENR foram 0,9997, 0,9999 e 1,0000, respectivamente, evidenciando uma boa correlação dentro das concentrações pretendidas, como se pode verificar através dos gráficos que ilustram os testes da linearidade para as soluções padrão (Figura 15 a 17).

Norfloxacina

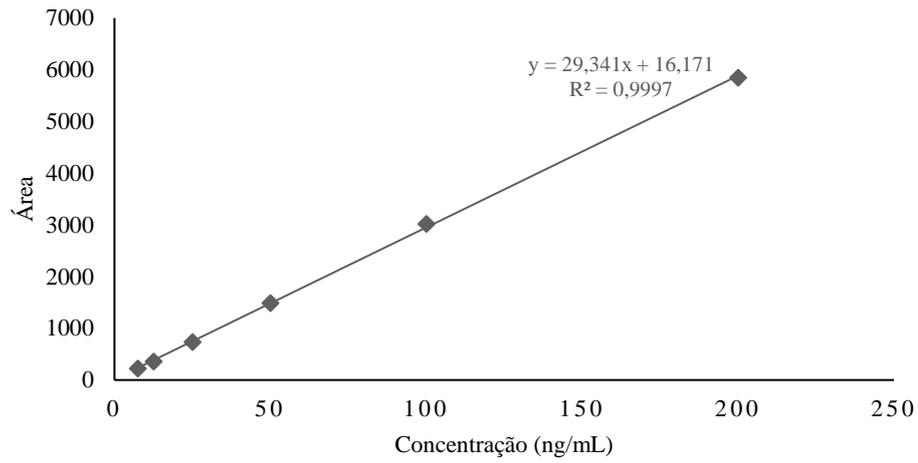


Figura 15. Curva de calibração para a norfloxacina.

Ciprofloxacina

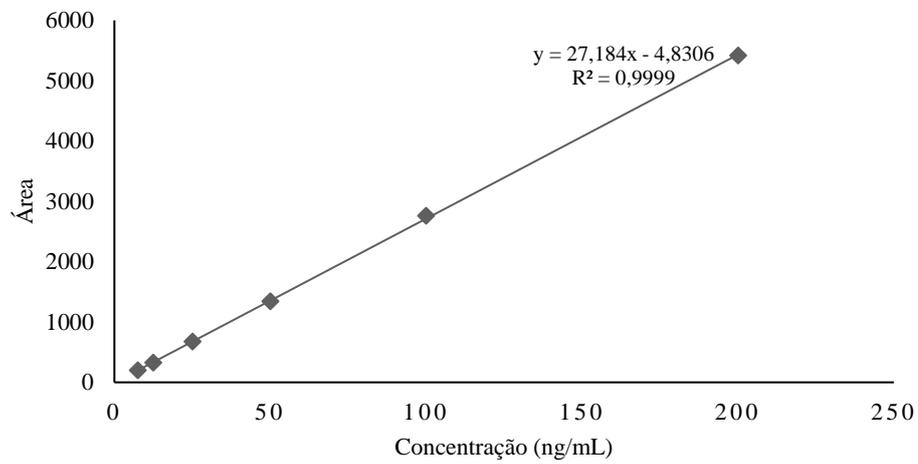


Figura 16. Curva de calibração para a ciprofloxacina.

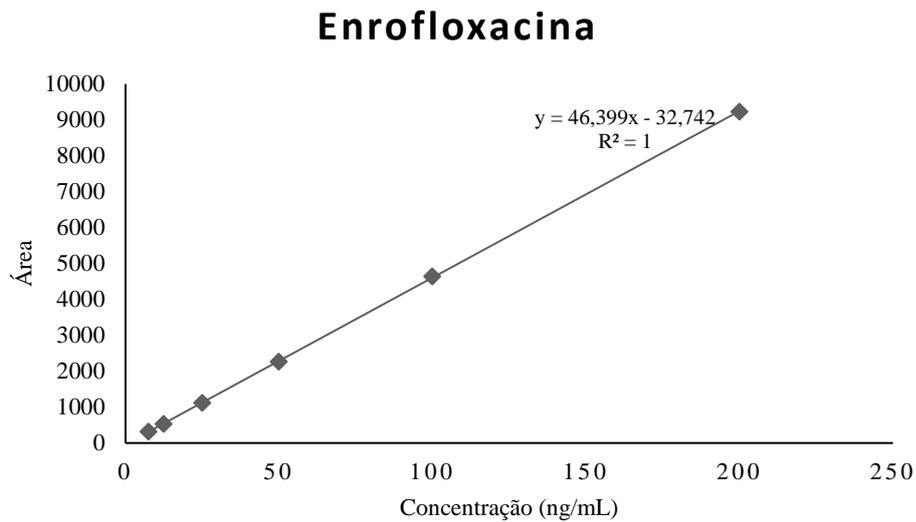


Figura 17. Curva de calibração para a enrofloxacin.

Foi também estudada a linearidade em amostras fortificadas utilizando seis níveis de concentração, de acordo com a metodologia descrita anteriormente para amostras fortificadas.

Como se pode observar nos gráficos que ilustram a linearidade para amostras fortificadas, os valores de r^2 obtidos para a NOR, CIP e ENR foram 0,9973, 0,998 e 0,9975, respectivamente, evidenciando uma boa correlação dentro das concentrações pretendidas (Figura 18-20).

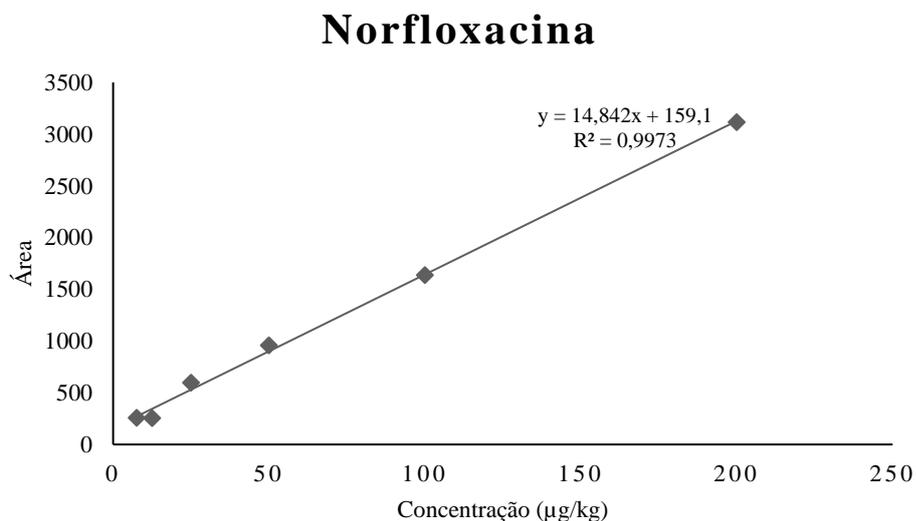


Figura 18. Curva de calibração de amostras fortificadas para a norfloxacin.

Ciprofloxacina

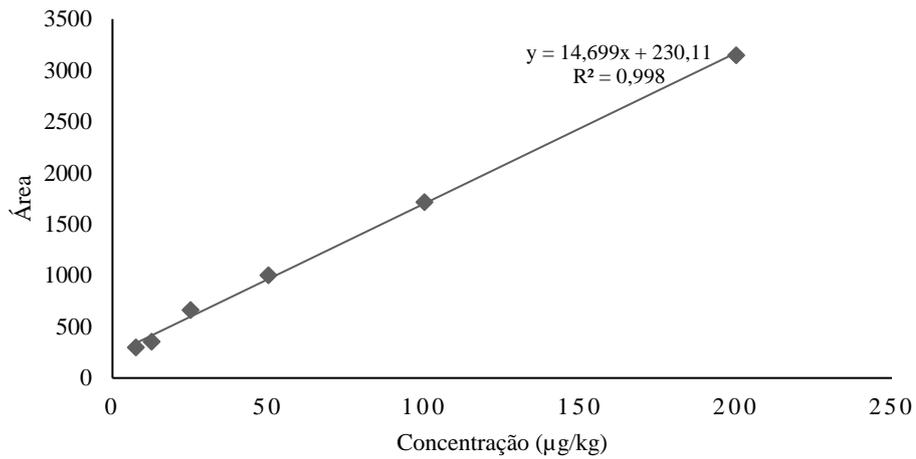


Figura 19. Curva de calibração de amostras fortificadas para a ciprofloxacina.

Enrofloxacin

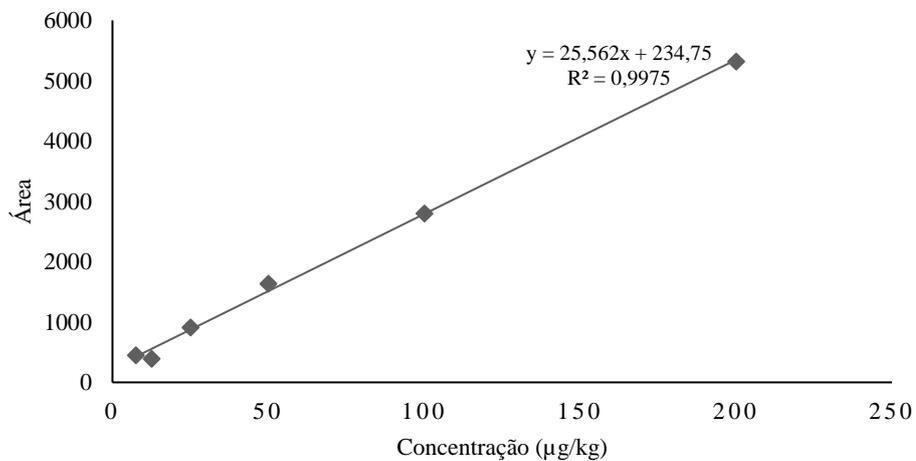


Figura 20. Curva de calibração de amostras fortificadas para a enrofloxacin.

Pela análise dos gráficos e dos valores de r^2 para a NOR, CIP e ENR em soluções padrão e amostras fortificadas, conclui-se que o método analítico apresenta boa correlação.

2.3.2.3. Limites de detecção e quantificação de FQs

Os limites de detecção e quantificação, calculados conforme referido no ponto 2.2.3., encontram-se na Tabela 9. O valor de LOD mais baixo foi obtido para a ENR (1,54 $\mu\text{g}/\text{kg}$), seguindo-se da NOR (3,28 $\mu\text{g}/\text{kg}$) e da CIP (3,98 $\mu\text{g}/\text{kg}$). O mesmo ocorreu para os valores de LOD, sendo 5,15 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 10,94 $\mu\text{g}/\text{kg}$ e 13,26 $\mu\text{g}/\text{kg}$, respetivamente.

Os valores encontrados vão de encontro aos descritos na literatura, sendo que os limites de detecção para a NOR, CIP e ENR variam entre os 0,2 $\mu\text{g}/\text{kg}$ e 8 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (Garcia *et al.*, 2005, Kowalski *et al.*, 2005, Samanidou, Christodoulou e Papadoyannis, 2005). Os limites de quantificação descritos variam entre os 5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ e os 25 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (Brito *et al.*, 2003; Garcia *et al.*, 2005).

Tabela 9. Valores de LOD e LOQ para as FQs em estudo.

Limites	Norfloxacina ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	Ciprofloxacina ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	Enrofloxacina ($\mu\text{g}/\text{kg}$)
Identificação (LOD)	3,28	3,98	1,54
Quantificação (LOQ)	10,94	13,26	5,15

2.3.2.4. Exatidão e precisão

A exatidão e a precisão foram avaliadas através de três níveis de fortificação: 50 $\mu\text{g}/\text{Kg}$; 100 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ e 200 $\mu\text{g}/\text{Kg}$, em triplicado durante três dias. A Figura 21 ilustra um cromatograma de uma amostra fortificada com NOR, CIP e ENR para o nível de 50 $\mu\text{g}/\text{Kg}$.

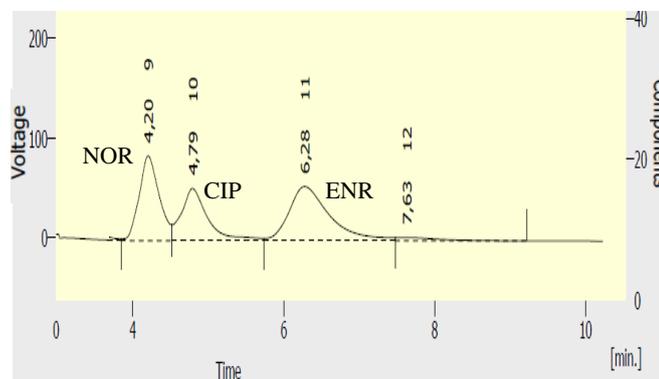


Figura 21. Cromatograma de uma amostra fortificada com NOR, CIP e ENR para um nível de 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$.

Através da análise da Tabela 10 pode verificar-se que foram obtidas boas percentagens de recuperação, sendo a percentagem de recuperação mais baixa de 76,6% para a NOR, 75,1% para a CIP e 77,5% para a ENR. A média das percentagens de recuperação variou entre 75,1% e 89,9%. Estes valores vão ao encontro dos referidos na bibliografia, em que os valores das percentagens de recuperação variam entre 63% e 111% (Samanidou, Christodoulou e Papadoyannis, 2005; Schneider *et al.*, 2007; Zhao *et al.*, 2007; Marni, Mustafa e Marzura, 2011).

Conforme se pode observar na Tabela 10, para a precisão intra-dia o DPR mais elevado foi de 20,8%, sendo relativo à ENR e obtido para o nível de fortificação mais baixo, 50 µg/kg, tendo a NOR e a CIP apresentado valores de 11,1% e de 7,7%, respetivamente, para o mesmo nível de concentração. Para os restantes níveis de fortificação, 100 µg/kg e 200 µg/kg, no caso da NOR foram obtidos respetivamente os valores 3,8% e 2,9%, para a CIP os valores 5,7% e 0,9% e para a ENR os valores de 14,6% e 16,2%.

Os níveis de fortificação mais elevados apresentaram geralmente valores de precisão intra-dia mais baixos do que os níveis de fortificação mais baixos.

Relativamente à precisão inter-dia, para os níveis de fortificação 50 µg/kg, 100 µg/kg e 200 µg/kg, foram obtidos para a ENR os valores de DPR mais elevados, de 9,6%, 10,7% e 8,7%. Para a NOR foram obtidos os valores de 8,5%, 9,2% e 8,4% e para a CIP, foram obtidos os valores de 4,4%, 6,0% e 7,5%, respetivamente para os níveis de fortificação de 50 µg/kg, 100 µg/kg e 200 µg/kg.

Tabela 10. Exatidão e precisão relativas à NOR, CIP e ENR.

Nível de fortificação (µg/kg)	Média de recuperação (%)	Precisão intra-dia DPR (%)	Precisão inter-dia DPR (%)
Norfloxacina			
50	89,9	11,1	8,5
100	78,3	3,8	9,2
200	76,6	2,9	8,4
Ciprofloxacina			
50	82,8	7,7	4,4
100	75,1	5,7	6,0
200	75,1	0,9	7,5
Enrofloxacina			
50	85,3	20,8	9,6
100	77,6	14,6	10,7
200	77,5	16,2	8,7

n=3

Os valores de exatidão e precisão encontrados são adequados à pesquisa de FQs em tecido muscular de aves, indo de encontro aos parâmetros internacionais preconizados pela AOAC/FAO/IUPAC e pelo Comité da UE para a análise de resíduos (Jenke, 1996).

2.3.3. Níveis de NOR, CIP e ENR nas amostras de aves analisadas

2.3.3.1. Contaminação de FQs em amostras de aves

Foram analisadas 74 amostras de aves fornecidas em cantinas escolares a crianças do pré-escolar e 1º ciclo do ensino básico na zona centro de Portugal. Das amostras estudadas, 24 (32,4%) eram provenientes de Portugal, 40 (54,1%) eram provenientes de Espanha e 10 (13,5%) eram provenientes de Inglaterra.

Na Tabela II encontra-se o número e frequências de amostras contaminadas por país, bem como o somatório total.

Das 74 amostras de aves, 46 (62,2%) estavam contaminadas com FQs, 9 (12,2%) com NOR, 41 (55,4%) com CIP e 7 (9,5%) com ENR. Todas as amostras contaminadas com ENR também continham CIP, o seu principal metabolito.

As amostras contaminadas com norfloxacin são violativas uma vez que a sua administração para uso se veterinário não se encontra autorizada, não existindo LMR definido.

Foi encontrada uma amostra portuguesa contaminada com NOR, CIP e ENR, cuja soma de CIP e ENR foi de 84,9 µg/kg, próximo do LMR estabelecido para a ENR.

Tabela II. Resultados obtidos para as amostras analisadas.

	Norfloxacin		Ciprofloxacina		Enrofloxacin	
	n	%	n	%	n	%
Portugal (n=24)						
Amostras positivas	2	5,9	10	29,4	2	5,9
Espanha (n=40)						
Amostras positivas	4	10,0	27	67,5	1	2,5
Inglaterra (n=10)						
Amostras positivas	3	30,0	4	40,0	4	40,0
Total (n=74)						
Amostras positivas	9	12,2	41	55,4	7	9,5

Uma das amostras provenientes de Inglaterra, cujo cromatograma se encontra representado na Figura 22, continha teores acima do LMR de 100 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ para a soma da CIP e ENR (111,9 $\mu\text{g}/\text{kg}$).

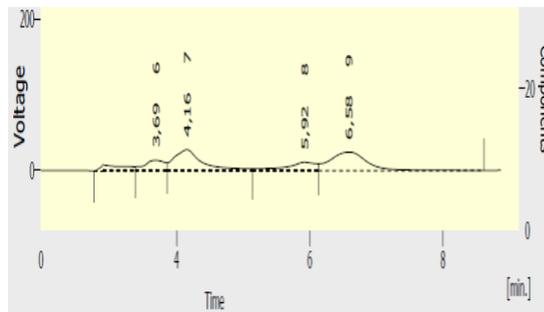


Figura 22. Amostra inglesa violativa.

A Tabela 12 apresenta as médias de concentrações de FQs encontradas nas amostras analisadas provenientes de Portugal, Espanha e Inglaterra. Os valores de concentrações mais elevados foram obtidos para a ENR, sendo a sua média total de 24,9 $\mu\text{g}/\text{kg}$, embora a frequência de contaminação seja notoriamente mais baixa que a da CIP. Os resultados observados demonstram que o IS não está a ser respeitado.

Para além disso, todas as amostras contaminadas com ENR também estavam contaminadas com CIP, o que corresponde ao esperado uma vez que a CIP é o principal metabolito da ENR. Daqui advém um importante problema de saúde pública, uma vez que a CIP é um antibiótico de grande importância na medicina humana, não se encontrando autorizado em medicina veterinária.

Tabela 12. Média das concentrações de FQs obtidas nas amostras analisadas.

Proveniência	Média de concentrações ($\mu\text{g}/\text{kg}$)		
	Norfloxacina	Ciprofloxacina	Enrofloxacina
Portugal	13,2	14,5	30,1
Espanha	9,2	14,0	7,2
Inglaterra	6,1	21,7	26,6
Total	9,1	14,9	24,9

2.3.3.2. Contaminações por amostras de frango e peru

Do total de amostras analisadas, 68 eram de frango e 6 de peru. De salientar que observando o número reduzido de amostras de peru analisadas, os resultados poderão não ser representativos da realidade a que a população está exposta, mas representam valores preliminares.

As Figuras 23 e 24 apresentam a distribuição da percentagem de contaminação por FQs em frango e peru, respetivamente.

Das amostras de frango analisadas, 43 (63,2%) estavam contaminadas e 25 (36,8%) não se encontravam contaminadas. Com NOR estavam contaminadas 9 (13,2%) amostras, 28 (41,1%) estavam contaminadas com CIP, 6 (8,8%) estavam contaminadas com CIP+ENR.

Todas as amostras de peru eram provenientes de Portugal e 3 (50,0%) estavam contaminadas e 3 (50,0%) não se encontravam contaminadas. Não foi encontrada contaminação com NOR, 2 (33,3%) estavam contaminadas com CIP, 1 (16,7%) estava contaminada com CIP+ENR.

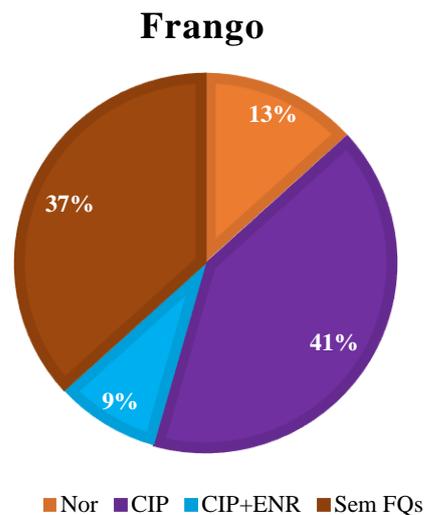


Figura 23. Percentagem de amostras de frangos contaminadas.

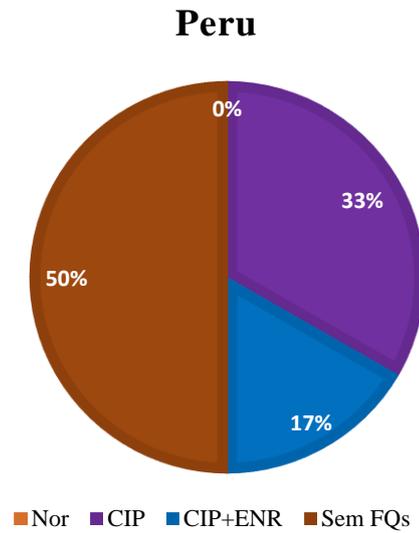


Figura 24. Percentagem de amostras de peru contaminadas.

2.3.3.3. Contaminações por país

As Figuras 25 a 27 ilustram o nível de contaminações de FQs das amostras por países de que proveniência.

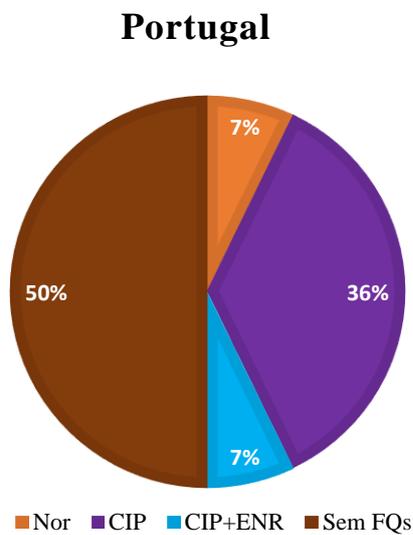


Figura 25. Distribuição das amostras provenientes de Portugal segundo a contaminação com FQs.

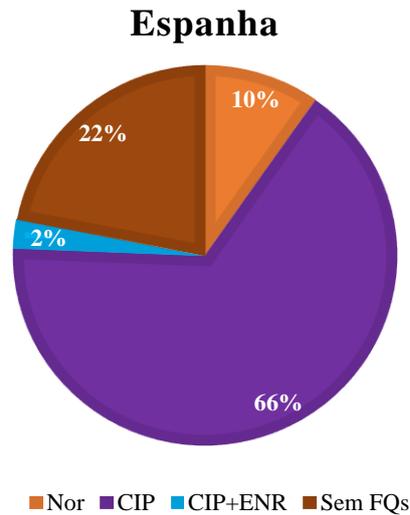


Figura 26. Distribuição das amostras provenientes de Espanha segundo a contaminação com FQs.

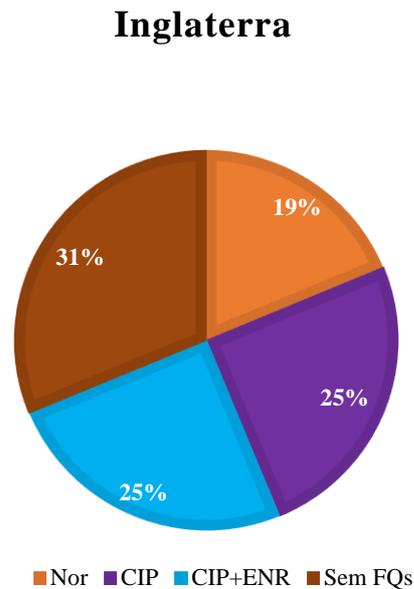


Figura 27. Distribuição das amostras provenientes de Inglaterra segundo a contaminação com FQs.

A frequência de contaminação com CIP+ENR foi superior na Inglaterra onde 4 das 10 amostras estavam contaminadas. Em Portugal, 2 amostras estavam contaminadas com CIP+ENR e em Espanha, apenas 1 amostra estava contaminada com CIP+ENR, o que denota uma maior observância dos intervalos de espera.

A frequência de contaminação com NOR foi maior na Inglaterra, em que 3 de 10 amostras estavam contaminadas. Tanto em Espanha como em Portugal foram encontradas 4 amostras contaminadas com NOR.

Espanha foi o país que apresentou maior número de amostras contaminadas (n=31), seguindo-se Inglaterra (n=5) e Portugal (n=10).

2.3.4. Discussão de resultados

Dada a escassez de resultados publicados na literatura científica a nível internacional, a comparação entre os resultados do presente estudo e os outros países é difícil.

Verificou-se que 62,2% das amostras se encontravam contaminadas, o que está de acordo com a literatura científica que refere que as FQs constituem um dos maiores grupos de agentes antimicrobianos, utilizados em medicina veterinária (Van Bambeke et al., 2005; Cattoir e Nordmann, 2009; Mérens e Servonnet, 2010). Através da Figura 28 pode ser visualizado que as quinolonas são o segundo grupo de antibióticos mais utilizado na medicina veterinária (19% de amostras contaminadas) (Cháfer-Pericás et al., 2010).

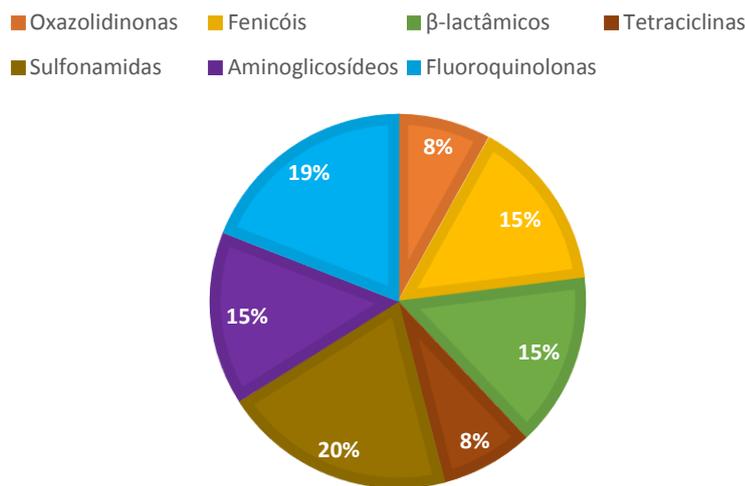


Figura 28. Distribuição dos grupos de antibióticos encontrados em alimentos (adaptado de Cháfer-Pericás, Maquieira e Puchades, 2010).

Num estudo realizado por Omotoso et al. (2015), na Nigéria, foram analisadas 80 amostras de frango por HPLC com deteção UV. A frequência de contaminação com CIP acima do LMR foi de 15%, e 35% das amostras excediam a concentração de 100 µg/kg de NOR (Omotoso e Omojola, 2015). Um estudo anterior realizado em 2014 no mesmo local e pelos mesmos autores reportou uma concentração média de CIP de $354,83 \pm 716,43$ µg/kg em frangos importados, sendo significativamente mais elevada que a concentração média de CIP encontrada em frangos produzidos localmente ($4,63 \pm 120,77$ µg/kg) (Omotoso e Omojola, 2014). Embora na presente dissertação as médias de concentração de antibióticos não sejam

tão elevadas, foi encontrada uma maior média de concentração de CIP em frangos importados de Inglaterra.

Outro estudo realizado por Er *et al.* (2013), na Turquia em 127 amostras de frango, utilizando o método ELISA, verificou que 45,5% das amostras se encontravam contaminadas com FQs, sendo a média de concentração de $30,81 \pm 0,44 \mu\text{g/kg}$ (Er *et al.*, 2013). Ainda outro estudo realizado por Moema *et al.* (2012) na África do Sul, verificou que em 8 amostras de fígado de frango analisadas por HPLC, as concentrações médias de 4 FQs, entre as quais CIP, ENR e NOR variaram entre 8,8 - 35,3 $\mu\text{g/kg}$ (Moema, Nindi e Dube, 2012). Estas concentrações são semelhantes aos encontrados no presente estudo.

Em Portugal continental o estudo realizado por Gomes *et al.* (2013) em 88 amostras de frango, procedentes de 13 distritos, revelou que 81,8% apresentavam contaminação com FQs, sendo que 33,3% continham CIP, 22,3% continham ENR e 24,4% amostras estavam contaminadas com CIP e ENR (Gomes *et al.*, 2013). No presente estudo, embora a frequência de contaminação em amostras de frango tenha reduzido substancialmente, este mesmo valor continua elevado (63,2%), tendo sido também encontrada uma elevada contaminação com CIP (41,1%). Por outro lado, foi encontrada uma contaminação com NOR de 13,2%, o que contrasta com o estudo realizado em 2013, no qual não foram encontradas amostras contaminadas com NOR, antibiótico não autorizado em medicina veterinária.

Das 12 amostras de peru analisadas no estudo realizado por Gomes *et al.* (2013) realizado em 2013, 91,6% estavam contaminadas: 54,5% continham CIP, 18,1% continham ENR e 27,3% continham CIP e ENR (Gomes *et al.*, 2013). No presente estudo, foi encontrada uma frequência de contaminação em amostras de peru mais baixa (50,0%). Não foi encontrada contaminação com NOR, e foi encontrada uma elevada frequência de contaminação com CIP (33,3%), à semelhança do estudo realizado em 2013.

Segundo um estudo da EFSA (2015) estima-se que em 2012 em Portugal, Espanha e Reino Unido, foram utilizadas, respetivamente, 9,2, 49 e 2,3 toneladas de FQs na produção de 199, 728 e 1040 mil toneladas de carne de aves. Pode concluir-se que estes dados corroboram a elevada presença de FQs encontradas no presente estudo. Analisando o rácio entre a quantidade de FQs administrada e aves produzidas, Espanha foi o país da EU cujo rácio foi maior (67,30 mg de FQs/Kg de ave produzidas), o que está de acordo com o encontrado no presente estudo, em que as amostras provenientes de Espanha foram as que se obteve maior frequência de contaminação (77,5% de amostras contaminadas). O rácio encontrado para Portugal (46,23 mg de FQs/Kg de aves produzidas) também foi bastante elevado, comparativamente com o encontrado para o Reino Unido (22,12 mg de FQs/ Kg de aves produzidas) (EFSA, 2015).

Perante estes resultados é possível inferir a extensa utilização da ENR, que também pode promover a emergência de resistências bacterianas cruzadas, neste caso à CIP, um importante antibiótico utilizado em medicina humana.

No presente estudo, em 74 amostras de aves analisadas, apenas 28 não se encontravam contaminadas. O que pode propiciar um meio de aquisição de resistências por parte de bactérias colonizadoras de aves e a possível infeção destas bactérias resistentes no homem.

Um relatório publicado pela EFSA refere que grandes proporções de *Salmonella spp.* e *Campylobacter* apresentam elevada resistência à CIP em 2013 (EFSA, 2015). Ainda segundo um estudo da OMS, foram reportadas resistências às FQs em *Escherichia coli* acima dos 50%. Sendo as FQs, provavelmente, um dos grupos mais utilizados de medicamentos antibacterianos para o tratamento de infeções do trato urinário, de que *Escherichia coli* é a causa mais comum, este fenómeno pode ser indicativo de resistência a uma das últimas opções terapêuticas orais disponíveis (WHO, 2014).

Sendo este o cenário encontrado na alimentação de crianças entre os 3 e os 10 anos de idade, revela-se uma grande problemática de emergência de estirpes bacterianas resistentes, o que alerta para a necessidade de planeamento e implementação de estratégias a fim de desenvolver intervenções eficazes, que promovam a consciencialização dos produtores europeus para a diminuição da administração deste importante grupo de antibióticos em animais produtores de alimentos, prevenindo resistências por parte de bactérias colonizadoras da carne de aves e a sua disseminação aos consumidores, levando a uma diminuição do efeito destes antibióticos em medicina humana. Pode ainda proteger-se os consumidores de risco, nomeadamente as crianças, por assegurar uma triagem mais apertada de resíduos de antibióticos antes do abate dos animais bem como nos animais importados.

A importância deste trabalho incidiu ainda no facto de não existirem estudos em Portugal acerca da presença de resíduos de medicamentos na alimentação pré-escolar e do 1º ciclo do ensino básico. Como é sabido, as crianças apresentam um padrão único de vulnerabilidade a componentes tóxicos em relação à sua massa corporal e consumo de alimentos propensos a contaminação, o que as leva a ter maior exposição a substâncias tóxicas.

2.3.4.1. Exposição das crianças a alimentos contaminados com FQs

Em Portugal, a proporção de proteína de origem animal ainda está acima do desejável, sendo a disponibilidade do grupo de produtos alimentares “carne, peixe e ovos” o que tem um desvio mais acentuado acima do consumo recomendado (INE, 2014).

A avaliação da exposição define-se como a estimativa qualitativa e/ou quantitativa da ingestão provável de agentes biológicos, químicos ou físicos através de alimentos. Para estimar a exposição humana às substâncias químicas presentes nos alimentos são necessários três dados essenciais: a concentração da substância no alimento (mg/kg), o consumo do alimento (kg) e o peso corporal (kg) (individual ou da população em estudo). A estimativa da exposição, dada em mg/kg peso corporal, pode ser definida de uma maneira geral pela seguinte equação (Jardim e Caldas, 2009).

$$Exposição = \frac{\text{Concentração da substância} \times \text{consumo do alimento}}{\text{Peso corporal (kg)}}$$

Fazendo uma estimativa da exposição à ENR para o pior cenário possível, considerou-se as crianças com idade de 3 anos, tendo sido avaliadas 81 crianças com um peso médio de $16,3 \pm 1,8$ kg, utilizando a concentração mais elevada encontrada de CIP+ENR, de $111 \mu\text{g}/\text{kg}$ e considerando um consumo diário de uma porção de carne de aves de 49g de peso edível (Gomes *et al.*, 2015). O resultado da estimativa de exposição foi de $0,34 \mu\text{g}$ por cada kg de peso corporal.

O valor da IDA, definido pela JECFA (1998) para a ENR foi de $0,002 \text{ mg}/\text{kg}$, pelo que comparando com a estimativa de exposição ($0,34 \mu\text{g}/\text{kg}$) se pode concluir que as crianças não se encontram em risco (WHO, 1998). Assim sendo, para a concentração mais elevada encontrada neste estudo de CIP+ENR, apenas existe risco para a saúde se as crianças de 3 anos ingerirem mais de 294g de carne de aves por dia.

No entanto, é de salientar que os antibióticos não são encontrados apenas em carnes de aves, mas podem ser encontrados em todos os tipos de carnes e peixes de aquicultura. Para além disso, apesar de a NOR estar proibida em medicina veterinária, neste estudo foram encontradas 9 amostras contaminadas (12,2%), sendo que a concentração mais elevada encontrada foi de $20,3 \mu\text{g}/\text{kg}$, o que pode promover a resistência a este importante grupo de antibióticos.

2.4. Conclusões e considerações finais

Após a análise dos dados obtidos, é possível afirmar que o cenário de administração de FQs em aves vendidas em Portugal pode ter melhorado relativamente ao último estudo realizado, uma vez que apenas 63,2% das amostras de frango se encontravam contaminadas, comparando com as 81,8% de amostras contaminadas anteriormente encontradas. De forma isolada é a CIP que apresenta maior frequência (33,3% das amostras de frango contaminadas).

A elevada percentagem total de amostras contaminadas (62,2%) denota que as boas práticas de administração de antibióticos podem não estar a ser cumpridas, uma vez que parece haver um uso generalizado destes agentes antimicrobianos.

Uma das amostras analisadas possuía concentrações superiores ao LMR, ou seja, superior a 100 µg/Kg para a soma da CIP com a ENR. Destaca-se ainda a elevada contaminação com NOR (12,2% das amostras contaminadas), sendo um antibiótico que não se encontra autorizado para administração animal.

As crianças apresentam um padrão único de vulnerabilidade a substâncias tóxicas, tendo maior probabilidade de virem a apresentar consequências tardias a exposições cumulativas e prolongadas, pelo que os LMRs atualmente legislados para a população adulta têm uma aplicabilidade limitada neste grupo de risco.

Estudos como este são de enorme importância para a saúde pública, pois os dados recolhidos ao longo de um determinado período de tempo podem fornecer base para legislações futuras que reduzam o risco dos consumidores.

Assim, a estimativa da exposição das crianças a resíduos de FQs poderá ajudar a entender as necessidades e levar à implementação de programas/estratégias que promovam o sinergismo entre o bem-estar animal e a segurança alimentar, protegendo a saúde pública contra os efeitos adversos dos antibióticos utilizados em animais produtores de alimentos.

O resultado da estimativa de exposição à ENR para crianças de 3 anos foi de 0,34 µg/kg, o que é substancialmente inferior à IDA.

BIBLIOGRAFIA

Almeida, Duarte, Nunes, Rocha, Pena e Meisel (2014). Human and veterinary antibiotics used in Portugal—a ranking for ecosurveillance. *Toxics* 2(2): 188-225.

AVEC (2014). 2014 annual report. 1-52.

Bailac, Ballesteros, Jiménez-Lozano, Barrón, Sanz-Nebot, Navalón, Vilchez e Barbosa (2004). Determination of quinolones in chicken tissues by liquid chromatography with ultraviolet absorbance detection. *Journal of Chromatography A* 1029(1): 145-151.

Ball (2000). Quinolone generations: natural history or natural selection? *Journal of antimicrobial Chemotherapy* 46(suppl 3): 17-24.

Bengtsson e Wierup (2006). Antimicrobial resistance in Scandinavia after a ban of antimicrobial growth promoters. *Animal biotechnology* 17(2): 147-156.

Bressolle, Bromet-Petit e Audran (1996). Validation of liquid chromatographic and gas chromatographic methods Applications to pharmacokinetics. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications* 686(1): 3-10.

Brito, JUNIOR, Polese e Ribeiro (2003). Validação de métodos analíticos: estratégia e discussão. *Pesticidas: Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente* 13.

Butaye, Michael, Schwarz, Barrett, Brisabois e White (2006). The clonal spread of multidrug-resistant non-typhi Salmonella serotypes. *Microbes and Infection* 8(7): 1891-1897.

Cattoir e Nordmann (2009). Plasmid-mediated quinolone resistance in gram-negative bacterial species: an update. *Current medicinal chemistry* 16(8): 1028-1046.

Céspedes (2008). *Implicación de diversos mecanismos de resistencia a quinolonas en bacilos Gram-negativos: Diseño de una nueva fluoroquinolona*, Universitat de Barcelona.

Cháfer-Pericás, Maquieira e Puchades (2010). Fast screening methods to detect antibiotic residues in food samples. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 29(9): 1038-1049.

Chen, Guo, Wang e Qiu (2008). Sample preparation. *Journal of Chromatography A* 1184(1): 191-219.

Colpaart, Trist e Folliard (2011). White Paper on Antibiotic Use in Food Systems: Critical Findings For Registered Dietitians.

Companyó, Granados, Guiteras e Prat (2009). Antibiotics in food: legislation and validation of analytical methodologies. *Analytical and bioanalytical chemistry* 395(4): 877-891.

Costa (2002). *Resistance to antibacterians in poultry*. Veterinary Sciences Congress, Oeiras (Portugal), 10-12 Oct 2002, SPCV.

Currie (1999). Detection and quantification limits: origins and historical overview. *Analytica Chimica Acta* 391(2): 127-134.

Decisão 2002/657/CE, de 12 de Agosto de 2002, que dá execução ao disposto na Directiva 96/23/CE do Conselho relativamente ao desempenho de métodos analíticos e à interpretação de resultados.

Decreto-Lei n.º 151/2005, de 30 de Agosto, transpõe para a ordem jurídica interna a Directiva n.º 90/167/CEE, do Conselho, de 26 de Março, que estabelece o regime jurídico do fabrico, colocação no mercado e utilização de alimentos medicamentosos para animais.

Decreto-Lei n.º 314/2009 de 28 de Outubro, que transpõe para a ordem jurídica interna a Directiva n.º 2009/9/CE, da Comissão, de 10 de Fevereiro, que altera a Directiva n.º 2001/82/CE, que estabelece um código comunitário relativo aos medicamentos veterinários.

DGAV (2014). Plano nacional para a redução do uso de antibióticos nos animais. 1-27.

DGS (2014). Portugal Alimentação Saudável em números – 2014. . *Programa Nacional para a Promoção da Alimentação Saudável*: 1-82.

Díaz, Picco, Encinas, Rubio, Litterio e Boggio (2001). Resíduos tisulares de nicotinato de norfloxacin administrado por vía oral en cerdos. *Archivos de medicina veterinaria* 33(1): 37-42.

Diretiva n.º 96/22/CE do Conselho, de 29 de Abril de 1996, que prevê procedimentos comunitários para o estabelecimento de limites máximos de resíduos de substâncias farmacologicamente ativas nos alimentos de origem animal.

Diretiva n.º 96/23/CE do Conselho, de 29 de Abril de 1996, relativa às medidas de controlo a aplicar a certas substâncias e aos seus resíduos nos animais vivos e respetivos produtos.

Diretiva n.º 2001/82/CE do Parlamento Europeu e do Conselho, de 6 de Novembro de 2001, que estabelece um código comunitário relativo aos medicamentos veterinários.

Diretiva n.º 2004/28/CE de 31 de Março de 2004, que altera a Diretiva 2001/82/CE que estabelece um código comunitário relativo aos medicamentos veterinários.

Donkor, Newman, Tay, Dayie, Bannerman e Olu-Taiwo (2011). Investigation into the risk of exposure to antibiotic residues contaminating meat and egg in Ghana. *Food Control* 22(6): 869-873.

Dougherty, Beaulieu e Barrett (2001). New quinolones and the impact on resistance. *Drug discovery today* 6(10): 529-536.

EFSA (2015). EU Summary Report on antimicrobial resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in 2013. *EFSA journal* 13(2): 1-178.

El-Aziz, Aziz, Soliman e Afify (1997). Pharmacokinetic evaluation of enrofloxacin in chickens. *British poultry science* 38(2): 164-168.

EMA (2001). Note for Guidance on the Risk Analysis Approach for Residues of Veterinary Medicinal Products in Food of Animal Origin. *Committee For Veterinary Medicinal Products*: 1-11.

EMA (2002). Enrofloxacin (Extension to all food producing species). *Committee for Veterinary Medicinal Products*: 1-2.

EMA (2005). Establishment of maximum residue limits (MRLs) for residues of veterinary medicinal products in foodstuffs of animal origin *The rules governing medicinal products in the European Union* (8): 1-78.

EMEA/CVMP/SAGAM/184651/2005 (2007). Public statement on the use of (fluoro)quinolones in food-producing animals in the European Union: development of resistance and impact on human and animal health 1-24.

Emmerson e Jones (2003). The quinolones: decades of development and use. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 51(suppl 1): 13-20.

Er, Onurdağ, Demirhan, Özgacar, Öktem e Abbasoğlu (2013). Screening of quinolone antibiotic residues in chicken meat and beef sold in the markets of Ankara, Turkey. *Poultry science* 92(8): 2212-2215.

ESVAC (2014). Sales of veterinary antimicrobial agents in 26 EU/EEA countries in 2012. *Fourth ESVAC report*: 1-128.

European Food Safety Authority (2015). Report for 2013 on the results from the monitoring of veterinary medicinal product residues and other substances in live animals and animal products. *Technical Report*.

FAO/WHO/OIE (2007). Joint FAO/WHO/OIE Expert Meeting on Critically Important Antimicrobials.: 1-67.

FDA (2004). Proposal to withdraw approval of the new animal drug application for enrofloxacin for poultry.: 1-71.

Forshell e Wierup (2006). Salmonella contamination: a significant challenge to the global marketing of animal food products. *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz* 25(2): 541-554.

Garcia, Solans, Calvo, Hernandez, Rey, Bregante e Puig (2005). Determination of enrofloxacin and its primary metabolite, ciprofloxacin, in pig tissues. Application to residue studies. *Biomedical Chromatography* 19(1): 27-31.

Gaudin, Hedou, Rault e Verdon (2010). Validation of a Five Plate Test, the STAR protocol, for the screening of antibiotic residues in muscle from different animal species according to European Decision 2002/657/EC. *Food Additives and Contaminants* 27(7): 935-952.

Giraud, Baucheron e Cloeckaert (2006). Resistance to fluoroquinolones in Salmonella: emerging mechanisms and resistance prevention strategies. *Microbes and Infection* 8(7): 1937-1944.

Gomes (2013). Determinação de fluoroquinolonas em tecido muscular de aves. *Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra*. Tese de Mestrado.

Gomes, Ávila, Oliveira e Franchini (2015). Captações de géneros alimentícios para refeições em meio escolar: fundamentos, consensos e reflexões. *Associação Portuguesa dos Nutricionistas; Faculdade de Ciências da Nutrição e Alimentação da Universidade do Porto; Programa Nacional para Promoção da Alimentação Saudável da Direção-Geral da Saúde*.

Guimarães, Momesso e Pupo (2010). Antibióticos: importância terapêutica e perspectivas para a descoberta e desenvolvimento de novos agentes. *Quim. Nova* 33(3): 667-679.

Hakanen, Jalava, Kotilainen, Jousimies-Somer, Siitonen e Huovinen (2002). *gyrA* polymorphism in *Campylobacter jejuni*: detection of *gyrA* mutations in 162 *C. jejuni* isolates by single-strand conformation polymorphism and DNA sequencing. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 46(8): 2644-2647.

Hermo, Barrón e Barbosa (2006). Development of analytical methods for multiresidue determination of quinolones in pig muscle samples by liquid chromatography with ultraviolet detection, liquid chromatography–mass spectrometry and liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 1104(1): 132-139.

Hernández-Borges, Borges-Miquel, Rodríguez-Delgado e Cifuentes (2007). Sample treatments prior to capillary electrophoresis–mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 1153(1): 214-226.

Herrera-Herrera, Hernández-Borges e Rodríguez-Delgado (2009). Fluoroquinolone antibiotic determination in bovine, ovine and caprine milk using solid-phase extraction and high-performance liquid chromatography–fluorescence detection with ionic liquids as mobile phase additives. *Journal of Chromatography A* 1216(43): 7281-7287.

Herrera-Herrera, Hernández-Borges, Rodríguez-Delgado, Herrero e Cifuentes (2011). Determination of quinolone residues in infant and young children powdered milk combining solid-phase extraction and ultra-performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 1218(42): 7608-7614.

Hooper (2001). Emerging mechanisms of fluoroquinolone resistance. *Emerging infectious diseases* 7(2): 337.

Hopkins, Davies e Threlfall (2005). Mechanisms of quinolone resistance in *Escherichia coli* and *Salmonella*: recent developments. *International journal of antimicrobial agents* 25(5): 358-373.

Hubert, Chiap, Crommen, Boulanger, Chapuzet, Mercier, Bervoas-Martin, Chevalier, Grandjean e Lagorce (1999). The SFSTP guide on the validation of chromatographic methods for drug bioanalysis: from the Washington Conference to the laboratory. *Analytica Chimica Acta* 391(2): 135-148.

Huet, Charlier, Tittlemier, Singh, Benrejeb e Delahaut (2006). Simultaneous determination of (fluoro) quinolone antibiotics in kidney, marine products, eggs, and muscle by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Journal of agricultural and food chemistry* 54(8): 2822-2827.

INE (2014). Estatísticas Agrícolas 2013. 1-168.

Jardim (2010). Extração em Fase Sólida: Fundamentos Teóricos e Novas Estratégias para Preparação de Fases Sólidas. *Scientia Chromatographica* 2(1): 13-25.

Jardim e Caldas (2009). Chemical dietary exposure and the risks to human health. *Química Nova* 32(7): 1898-1909.

Jenke (1996). Chromatographic Method Validation: A Review of Current Practices and Procedures. II. Guidelines for Primary Validation Parameters. *Journal of liquid chromatography & related technologies* 19(5): 737-757.

Kalter, Gilman, Moulton, Cullotta, Cabrera e Velapatiño (2010). Risk factors for antibiotic-resistant *Escherichia coli* carriage in young children in Peru: community-based cross-sectional prevalence study. *The American journal of tropical medicine and hygiene* 82(5): 879-888.

Kowalski, Roliński, Sławik e Głód (2005). Determination of norfloxacin in chicken tissues by HPLC with fluorescence detection. *Journal of liquid chromatography & related technologies* 28(1): 121-135.

Lee, Aizawa, Barefoot e Murphy (2003). *Handbook of residue analytical methods for agrochemicals*, Wiley Chichester, UK.

Luzzaro (2008). Fluoroquinolones and Gram-negative bacteria: antimicrobial activity and mechanisms of resistance. *Infez. Med* 16(Suppl 2): 5-11.

MacNeil e Ellis (1995). Regulatory overview of antibiotic use in food-producing animals in North America and current methods of detection and analysis. *Oka, H.; Nakazawa, H.; Harada, K*: 2-29.

Manie, Khan, Brözel, Veith e Gouws (1998). Antimicrobial resistance of bacteria isolated from slaughtered and retail chickens in South Africa. *Letters in applied microbiology* 26(4): 253-258.

Marín Carrillo (2008). Aplicación de fluoroquinolonas en Medicina Veterinaria: criterios farmacocinéticos y farmacodinámicos/farmacodinámicos (PK/PD).

Marni, Mustafa e Marzura (2011). Analysis of quinolones in poultry muscles using liquid chromatography–tandem mass spectrometry.

Mérens e Servonnet (2010). Mécanismes et épidémiologie de la résistance aux fluoroquinolones en 2010. *Revue Francophone des Laboratoires* 2010(422): 33-41.

Meyer (2013). *Practical high-performance liquid chromatography*, John Wiley & Sons.

Moema, Nindi e Dube (2012). Development of a dispersive liquid–liquid microextraction method for the determination of fluoroquinolones in chicken liver by high performance liquid chromatography. *Analytica chimica acta* 730: 80-86.

Mota, da Silva, de Freitas, Porto e da Silva (2005). Utilização indiscriminada de antimicrobianos e sua contribuição a multirresistência bacteriana. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science* 42(6): 465-470.

Nacano (2012). Avaliação da concentração de elementos químicos tóxicos na merenda escolar de crianças da cidade de Ribeirão Preto e estimativa de suas ingestões diárias, Universidade de São Paulo.

Nováková e Vičková (2009). A review of current trends and advances in modern bio-analytical methods: chromatography and sample preparation.

Analytica Chimica Acta 656(1): 8-35.

Oliveira, Flores, dos Santos e Brandelli (2005). Antimicrobial resistance in *Salmonella enteritidis* strains isolated from broiler carcasses, food, human and poultry-related samples. *International journal of food microbiology* 97(3): 297-305.

Omotoso e Omojola (2014). Screening of fluoroquinolone residues in imported and locally produced broiler chicken meat in Ibadan, Nigeria. *International Journal of Health, Animal Science and Food Safety* 1(2).

Omotoso e Omojola (2015). Fluoroquinolone residues in fresh meat. *International Journal of Health, Animal Science and Food Safety* 2(1).

Otero, Mestorino e Errecalde (2001). Enrofloxacin: una fluorquinolona de uso exclusivo en veterinaria. *Analecta veterinaria* 21.

Ovando, Gorla, Weyers, Ugnia e Magnoli (2004). Simultaneous quantification of ciprofloxacin, enrofloxacin and balofloxacin in broiler chicken muscle. *Arch Med Vet* 1: 93-98.

Pacheco-Silva, Souza e Caldas (2014). Veterinary drug residues in milk and eggs. *Química Nova* 37(1): 111-122.

Pena, Silva, Pereira, Meisel e Lino (2010). Determination of fluoroquinolone residues in poultry muscle in Portugal. *Analytical and bioanalytical chemistry* 397(6): 2615-2621.

Pereira e Pita (2005). Alexander Fleming (1881-1955), Da descoberta da penicilina (1928) ao Prémio Nobel (1945). *Revista da Faculdade de Letras: História Porto* 6: 129-151.

Pignatelli, Leal, Lito, Dâmaso, Rodrigues e Cunha (2014). Gastroenterite Aguda por *Salmonella* não Tifóide em Crianças: revisão de dez anos.

Pikkemaat (2009). Microbial screening methods for detection of antibiotic residues in slaughter animals. *Analytical and bioanalytical chemistry* 395(4): 893-905.

Pikkemaat, Rapallini, Zuidema, Elferink, Oostra-van Dijk e Driessen-Van Lankveld (2011). Screening methods for the detection of antibiotic residues in slaughter animals: comparison of the European Union Four-Plate Test, the Nouws Antibiotic Test and the

Premi® Test (applied to muscle and kidney). *Food Additives and Contaminants* 28(1): 26-34.

Prestes, Friggi, Adaime e Zanella (2009). Quechers—Um método moderno de preparo de amostra para determinação multirresíduo de pesticidas em alimentos por métodos cromatográficos acoplados à espectrometria de massas. *Química Nova* 32(6): 1620-1634.

Queiroz, Collins e Jardim (2001). Métodos de extração e/ou concentração de compostos encontrados em fluidos biológicos para posterior determinação cromatográfica. *Química Nova* 24(1): 68-76.

Regulamento (CE) n.º 2377/90 do Conselho, de 26 de Junho de 1990, que prevê um processo comunitário para o estabelecimento de limites máximos de resíduos de medicamentos veterinários nos alimentos de origem animal.

Regulamento (CE) n.º 470/2009, de 6 de Maio de 2009, que prevê procedimentos comunitários para o estabelecimento de limites máximos de resíduos de substâncias farmacologicamente ativas nos alimentos de origem animal.

Regulamento (CE) n.º 37/2010 do Conselho, de 22 de Dezembro de 2009, relativo a substâncias farmacologicamente ativas e respetiva classificação no que respeita aos limites máximos de resíduos nos alimentos de origem animal.

Relacre (2000). 13—Validação de métodos internos de ensaio em análise química. *Associação de Laboratórios Acreditados de Portugal*.

Ribani, Bottoli, Collins, Jardim e Melo (2004). Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. *Química Nova* 27: 771-780.

Ribeiro, Kellermann, Santos, Bessa e Nascimento (2007). Salmonella spp. in raw broiler parts: occurrence, antimicrobial resistance profile and phage typing of the Salmonella Enteritidis isolates. *Brazilian Journal of Microbiology* 38(2): 296-299.

Rocha, Santos, da Silva, Augusti e Faria (2015). Multiresidue determination of fluoroquinolones in poultry muscle and kidney according to the regulation 2002/657/EC. A systematic comparison of two different approaches: Liquid chromatography coupled to high-resolution mass spectrometry or tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 1379: 83-91.

Samanidou, Christodoulou e Papadoyannis (2005). Determination of fluoroquinolones in edible animal tissue samples by high performance liquid chromatography after solid phase extraction. *Journal of separation science* 28(6): 555-565.

Santos, Rodrigues, Correia, Saraiva e Oleastro (2013). *Campylobacter* em géneros alimentícios: resistências aos antimicrobianos e diversidade genética.

Schneider, Braden, Reyes-Herrera e Donoghue (2007). Simultaneous determination of fluoroquinolones and tetracyclines in chicken muscle using HPLC with fluorescence detection. *Journal of Chromatography B* 846(1): 8-13.

Sharma, Jain e Jain (2009). Fluoroquinolone antibacterials: a review on chemistry, microbiology and therapeutic prospects. *Acta Pol Pharm* 66(6): 587-604.

Shim, Shen, Kim, Lee e Kim (2003). Determination of the fluoroquinolone enrofloxacin in edible chicken muscle by supercritical fluid extraction and liquid chromatography with fluorescence detection. *Journal of agricultural and food chemistry* 51(26): 7528-7532.

Silva, Leite, Fernandes, Mena, Gibbs e Teixeira (2011). *Campylobacter* spp. as a foodborne pathogen: a review. *Frontiers in microbiology* 2.

Stoilova e Petkova (2010). Developing and validation of method for detection of quinolone residues in poultry meat. *Trakia Journal of Sciences* 8(1): 64-69.

Tajik, Malekinejad, Razavi-Rouhani, Pajouhi, Mahmoudi e Haghazari (2010). Chloramphenicol residues in chicken liver, kidney and muscle: A comparison among the antibacterial residues monitoring methods of Four Plate Test, ELISA and HPLC. *Food and chemical toxicology* 48(8): 2464-2468.

Takahashi, Hayakawa e Akimoto (2002). The history of the development and changes of quinolone antibacterial agents. *Yakushigaku zasshi. The Journal of Japanese history of pharmacy* 38(2): 161-179.

Team (2012). The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2010. *Euro surveillance: bulletin Européen sur les maladies transmissibles= European communicable disease bulletin* 17(10).

Theodoridis, Gika, Want e Wilson (2012). Liquid chromatography–mass spectrometry based global metabolite profiling: a review. *Analytica chimica acta* 711: 7-16.

Toldrá e Reig (2006). Methods for rapid detection of chemical and veterinary drug residues in animal foods. *Trends in Food Science & Technology* 17(9): 482-489.

Urraca, Castellari, Barrios e Moreno-Bondi (2014). Multiresidue analysis of fluoroquinolone antimicrobials in chicken meat by molecularly imprinted solid-phase extraction and high performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A* 1343: 1-9.

Van Bambeke, Michot, Van Eldere e Tulkens (2005). Quinolones in 2005: an update. *Clinical Microbiology and infection* 11(4): 256-280.

Veloso, Teixeira, Ferreira e Ferreira (2002). Detection of adulterations in food products containing milk and/or milk proteins. *Química Nova* 25(4): 609-615.

WHO (1998). Evaluations of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA).

WHO (2014). *Antimicrobial resistance: global report on surveillance*, World Health Organization.

Yaktine, Nesheim e James (2008). Nutrient and contaminant tradeoffs: exchanging meat, poultry, or seafood for dietary protein. *Nutrition reviews* 66(3): 113-122.

Young (1994). Do nonclinical uses of antibiotics make a difference? *Infection Control* 15(07): 484-487.

Yu, Tao, Chen, Pan, Liu, Wang, Huang, Dai, Peng e Wang (2012). Simultaneous determination of fluoroquinolones in foods of animal origin by a high performance liquid chromatography and a liquid chromatography tandem mass spectrometry with accelerated solvent extraction. *Journal of Chromatography B* 885: 150-159.

Zhao, Jiang, Ding, Li, Wang, Li e Shen (2007). A reliable LC method with fluorescence detection for quantification of (fluoro) quinolone residues in chicken muscle. *Chromatographia* 65(9-10): 539-544.

Zhu, Snow, Cassada, Monson e Spalding (2001). Analysis of oxytetracycline, tetracycline, and chlortetracycline in water using solid-phase extraction and liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 928(2): 177-186.