



UNIVERSIDADE D
COIMBRA

Rosa Clara de Melo Gonçalves Seara

COCCIDIOSTÁTICOS EM AVES:
UMA REVISÃO GERAL

Dissertação no âmbito do Mestrado em Segurança Alimentar,
orientada pela Professora Doutora Angelina Lopes Simões Pena e
pela Professora Doutora Liliana Silva, e apresentada à Faculdade
de Farmácia da Universidade de Coimbra.

Setembro de 2021



UNIVERSIDADE D
COIMBRA

Rosa Clara de Melo Gonçalves Seara

**COCCIDIOSTÁTICOS EM AVES:
UMA REVISÃO GERAL**

Dissertação no âmbito do Mestrado em Segurança Alimentar, orientada pela Professora Doutora Angelina Lopes Simões Pena e pela Professora Doutora Liliana Silva, e apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra.

Setembro de 2021

Agradecimentos

Em primeiro lugar gostaria de agradecer à Professora Doutora Angelina Lopes Simões Pena, por ter aceitado ser minha orientadora e ter permitido que eu desenvolvesse este trabalho ao longo do último ano.

À minha coorientadora, Professora Doutora Liliana Silva, por constantemente me auxiliar no processo escrito, sempre pronta a tirar-me dúvidas e a dar conselhos.

À minha família por todos os sacrifícios que fizeram para que eu pudesse continuar os meus estudos e ingressar na Universidade de Coimbra, apoiando sempre as minhas decisões.

Aos meus colegas de Biologia, em particular à Ana Rita, por terem feito estes cinco anos passar a voar.

Aos meus padrinhos, Carolina, Luís, Marta, Luís e Dora, por terem sido o meu exemplo de dedicação e empenho, e terem auxiliado em todas as circunstâncias, dando sempre os melhores conselhos.

Aos meus afilhados, Renata, Irene, Rui, Mariana, Jessica e Ana, por terem enchido estes 5 anos de memórias incríveis e terem feito questão de neste ano não me deixarem ficar fechada em casa.

À Quantunna, por me ter dado uma segunda família, por todos os ensaios de segundas e quintas, por todos os convívios, pelo gosto pela música, pelas digressões e por tornar Coimbra verdadeiramente uma casa para mim.

Ao meu melhor amigo e companheiro, Davide Dias, por todas as aventuras, pelas quarentenas juntos, por nunca me deixar desistir e por todos os momentos que ainda estão por vir.

Abreviaturas

AAHs – Aminas aromáticas heterocíclicas

ACN – Acetonitrilo

ADI – Ingestão diária aceitável

ADI_{micro} – ADI que se baseia em dados microbiológicos

ADI_{tox} – ADI que se baseia em dados toxicológicos

ASAE – Autoridade de Segurança Alimentar e Económica

CC α – Limite de decisão

CC β – Capacidade de deteção

CE – Comissão Europeia

CVMP – *Committee for Medicinal Products for Veterinary Use*

DEC – Decoquinato

DGAV – Direção Geral de Alimentação e Veterinária

DIC – Diclazuril

DNC – 4,4'-dinitrocarbanilida

EFSA – Autoridade Europeia para a Segurança dos Alimentos

ELISA – *Enzyme-linked immunosorbent assay*

EM – Estado-membro

EMA – Agência Europeia do Medicamento

ESI – Ionização por eletronebulização

EU – União Europeia

FAO – Organização para a Alimentação e a Agricultura

FEEDAP – *Panel on Additives and Products or Substances Used in Animal Feed*

FS – Fator de segurança

HAL – Halofuginona

HAPs – Hidrocarbonetos aromáticos policíclicos

HDP – 2-hidroxi-4,6 dimetilpirimidina

HILIC-MS/MS – Cromatografia Líquida de Interação Hidrofílica com detecção por Espectrometria de Massa em *Tandem*

INE – Instituto Nacional de Estatística

INE – Instituto Nacional de Estatística

INIAV – Nacional de Investigação Agrária e Veterinária

IS – Intervalo de segurança

LAS – Lasalocida

LC – Cromatografia Líquida

LC-FD – Cromatografia Líquida com detecção por Fluorescência

LC-HRMS – *Liquid chromatography - Orbitrap high resolution mass spectrometry*

LC-MS – Cromatografia Líquida acoplada a Espectrometria de Massa

LC-MS/MS – Cromatografia Líquida Cromatografia Líquida com Detecção por Massa em Tandem

LC-QqLIT-MS/MS – *Liquid chromatography– quadrupole linear ion trap tandem mass spectrometer system*

LC-UV – Cromatografia Líquida com detecção por Ultravioleta

LMRs – Limite Máximo de Resíduos

LOAEL – Nível de efeito observável mais baixo

LOD – Limite de detecção

LOQ – Limite de quantificação

MAD – Maduramicina

MON – Monensina

MUVs – Medicamentos de Uso Veterinário

NAR – Narasina

NIC – Nicarbazina

NOAEL – Nível de efeito adverso não observável

ONU – Organização das Nações Unidas

PNCA – Plano Nacional de Colheita de Amostras

PNCR – Plano Nacional de Controlo de Resíduos

RASFF – Sistema de Alerta Rápido para Alimentos e Rações

ROB – Robenidina

SAL – Salinomicina

SEM – Semduramicina

SLE – Extração Líquida com Suporte Sólido

SPE – Extração em Fase Sólida

USDA – Departamento de Agricultura dos Estados Unidos

Resumo

O aumento exponencial da população mundial, e do consumo de carne nos países desenvolvidos, conduziu à produção intensiva de alimentos de origem animal. Nos últimos anos, em especial, verificou-se um aumento da produção e consumo de carne de aves, por ser uma carne mais saudável e de menor custo.

A produção avícola, particularmente a produção intensiva, é frequentemente afetada pelo aparecimento de coccidioses, causadas por *Eimeria*, um parasita protozoário, que obrigam a uma ampla utilização de coccidiostáticos, sobretudo utilizados como aditivos nas rações para alimentação animal para o combate desta doença parasitária.

Consequentemente, resíduos destes compostos podem ocorrer nos tecidos edíveis dos animais tratados, podendo representar um risco para a saúde do consumidor aquando da sua ingestão. A contaminação dos géneros alimentícios de origem animal com resíduos de coccidiostáticos constitui assim uma preocupação da segurança alimentar e de saúde pública a nível mundial. Para além disso, a utilização generalizada destes compostos pode desencadear resistência aos mesmos.

Deste modo é importante uma correta avaliação do risco, sendo necessária um bom conhecimento destes medicamentos, bem como da forma como eles atuam. Para a identificação e quantificação dos resíduos deve optar-se sempre por métodos sensíveis, exatos e precisos, sendo necessário um bom conhecimento das metodologias existentes. Também é essencial um bom conhecimento do quadro legislativo atual, de modo a identificar géneros alimentícios não conformes que poderão potencialmente pôr em risco a saúde do consumidor. Por outro lado, é importante uma elaboração de planos de mitigação do risco, tentando perceber as medidas que poderão diminuir ou eliminar estes resíduos nos géneros alimentícios, bem como encontrar alternativas ao uso de coccidiostáticos.

Assim, esta monografia tem como objetivo fazer um levantamento de todas as informações relevantes sobre esta temática de forma a consolidar todos os dados a ter em conta para uma correta avaliação de risco.

Palavras-chave: Coccidiose; Coccidiostáticos; Produção intensiva; Géneros alimentícios; Resíduos; Avaliação do risco; Quadro legislativo; Mitigação.

Abstract

The exponential increase in the world population, and the consumption of meat in developed countries, has led to the intensive production of animal foods. In recent years, there has been an increase in the production and consumption of poultry meat, as it is healthier and cheaper.

Poultry production, particularly intensive production, is often affected by coccidiosis, caused by *Eimeria*, a protozoan parasite, which requires a wide use of coccidiostats, especially used as additives in animal feed to combat this parasitic disease.

Consequently, residues of these compounds can occur in the edible tissues of treated animals, which may pose a risk, to the health of the consumer, when ingested. Therefore, contamination of foodstuffs of animal origin with residues of coccidiostats is global food safety and public health concern. Furthermore, the widespread use of coccidiostats can trigger resistance to them.

Therefore, a correct risk assessment is important, requiring a good knowledge of these drugs, as well as how they work. For the identification and quantification of residues, sensitive, exact and precise methods should always be chosen, requiring a good knowledge of existing methodologies. Good knowledge of the current legislative framework is also essential, to identify non-compliant foodstuffs that could potentially endanger the health of the consumer. On the other hand, it is important to draw up risk mitigation plans, trying to understand the measures that can reduce or eliminate these residues in foodstuffs, as well as finding alternatives to the use of coccidiostats.

Thus, this monograph aims to survey all relevant information on this topic to consolidate all data to be taken into account for a correct risk assessment.

Keywords: Coccidiosis; Coccidiostats; Intensive production; Food; Residues; Risk assessment; Legislative framework; Mitigation.

Objetivos

A possível contaminação dos géneros alimentícios com resíduos de coccidiostáticos é motivo de preocupação por parte das organizações competentes e por parte do próprio consumidor, que cada vez mais procura produtos biológicos, mais inócuos, sem a presença de resíduos químicos.

Sendo assim, o controlo destes resíduos nos alimentos, seguindo o quadro legislativo europeu atual, é de extrema importância, de modo a salvaguardar a Saúde Pública, de modo a assegurar a Segurança Alimentar.

A presente monografia tem como objetivo efetuar uma revisão bibliográfica relativa aos coccidiostáticos, nomeadamente, a necessidade e consequências da sua utilização, os métodos alternativos existentes à sua utilização, a legislação europeia atual, os métodos analíticos necessários ao controlo de resíduos, bem como as medidas de mitigação do risco.

Índice

Agradecimentos	i
Abreviaturas.....	ii
Resumo	v
Abstract	vi
Objetivos	vii
Índice	viii
Lista de Figuras.....	x
Lista de Tabelas.....	xi
1- Introdução.....	1
2 - Produção e consumo de carne.....	2
3 - Coccidiose.....	4
3.1- Ciclo de vida de <i>Eimeria</i>	6
3.2- Resistência dos oocistos.....	8
3.3- Prevenção da coccidiose: boas práticas de produção animal.....	8
4 - Coccidiostáticos.....	9
4.1- Caracterização e estrutura química	10
4.2-Mecanismo de ação	14
4.3-Resistência aos coccidiostáticos.....	14
4.3.1- Mitigação do risco de resistência: planos de administração de coccidiostáticos....	15
4.4- Alternativas à utilização de coccidiostáticos como aditivos	16
4.5- Toxicidade dos resíduos de coccidiostáticos.....	18
4.5.1- Toxicidade: coccidiostáticos ionóforos	19
4.5.1.1- Lasalocida	20
4.5.1.2- Maduramicina	21
4.5.1.3- Monensina	22
4.5.1.4- Narasina.....	23
4.5.1.5- Salinomina	24
4.5.1.6- Sempduramicina	25
4.5.2- Toxicidade: coccidiostáticos sintéticos.....	26
4.5.2.1- Decoquinato	26
4.5.2.2- Diclazuril.....	27
4.5.2.3- Halofuginona.....	27
4.5.2.4- Nicarbazina	28
4.5.2.5- Robenidina	28
5- Legislação Europeia	29
5.1- Autorização do uso de coccidiostáticos como aditivos na alimentação animal e como medicamentos veterinários na UE.....	29
5.2- LMRs estabelecidos.....	31
5.3-Incumprimentos: processos para a sua verificação e punições aplicáveis.....	35
6- Ocorrência em amostras de aves	36
7- Possível mitigação do risco de toxicidade para o Homem	40
7.1- Processamentos culinários	40
7.2- Marinadas	42

8- Métodos analíticos para a detecção, quantificação e identificação de resíduos de coccidiostáticos.....	44
8.1- Amostra: preparação e extração.....	45
8.2- Métodos de triagem.....	47
8.3- Métodos de Detecção e Quantificação.....	47
9- Conclusão.....	54
9.1- Considerações Finais.....	54
9.2- Prespetivas para o futuro.....	56
10- Referências.....	57

Lista de Figuras

Figura 1 - Gráfico ilustrativo da produção mundial de carne, entre 1961 e 2019.	2
Figura 2 - Gráfico ilustrativo do consumo total de carne de animais em Portugal, entre 2016 e 2020 [8].....	3
Figura 3 - Gráfico ilustrativo do consumo de carne proveniente de vacas, porcos e aves, em Portugal, entre 2016 e 2020 [8].....	3
Figura 4 - Esquema ilustrativo do ciclo de vida de <i>Eimeria spp.</i> em galinhas [11,15].	7
Figura 5 - Estrutura química dos coccidiostáticos ionóforos (A-F) e sintéticos (G-K) [21].	12
Figura 6 - Esquema ilustrativo da sequência metodológica a seguir para uma correta avaliação de resíduos de coccidiostáticos.	45
Figura 7 - Esquema representativo dos vários fatores envolvidos na redução do uso de coccidiostáticos.	55

Lista de Tabelas

Tabela 1 - Patogenicidade das espécies de <i>Eimeria</i> e local intestinal afetado em frangos.	5
Tabela 2 - Patogenicidade das espécies de <i>Eimeria</i> e local intestinal afetado em perus.	5
Tabela 3 - Propriedades físico-químicas dos coccidiostáticos ionóforos.	13
Tabela 4 - Propriedades físico-químicas dos coccidiostáticos sintéticos.	13
Tabela 5 - LMRs e IS para cada coccidiostático, tendo em conta a espécie alvo e os tecidos edíveis, de acordo com o Regulamento 2377/1990 revogado pelo Regulamento 470/2009 e de acordo com os limites estabelecidos pelos Regulamentos 124/2009 e 610/2012. [63-65]	32
Tabela 6 - ADI para cada coccidiostático ionóforos, de acordo com os pareceres da EFSA. [41]	34
Tabela 7 - ADI para cada coccidiostático sintético, de acordo com os pareceres da EFSA. [41]	34
Tabela 8 - Frequência (%) e níveis (µg/kg) de coccidiostáticos em carnes de aves reportados na literatura científica.....	39
Tabela 9 - Metodologias analíticas reportadas na literatura científica relativas à determinação de coccidiostáticos em aves.	52

I- Introdução

A população mundial tem crescido exponencialmente, sendo que de acordo com a Organização das Nações Unidas (ONU) até 2050 a população mundial será de 9,7 bilhões de pessoas [1]. Deste modo há necessidade de aumentar de forma eficiente a produção de todos os géneros alimentícios, a fim de assegurar as necessidades nutricionais e as exigências dos consumidores [2]. De acordo com a Organização para a Alimentação e a Agricultura (FAO) a produção alimentar deve aumentar 70% até 2050 de modo a acompanhar o crescimento da população [3]. Em suma, a cadeia de abastecimento passou de pequena para uma economia em larga escala, sendo que a utilização de medicamentos de uso veterinário (MUVs), permitiu ao setor pecuário aumentar a produção de géneros alimentícios de origem animal.

A carne é um alimento com elevado valor nutricional, sendo rica em nutrientes, proteínas, vitaminas e minerais, e consumida amplamente a nível mundial. A carne de aves é, neste contexto, um alimento de extrema importância, dado que apresenta, do ponto de vista do consumidor, várias vantagens em relação aos outros tipos de carne. Deste modo, a grande procura deste tipo de carne é responsável pela produção intensiva de aves.

A produção intensiva de aves impulsiona o aparecimento de coccidiose, uma doença parasitária provocada por *Eimeria*, que frequentemente afeta as produções avícolas, que, ao interferir com o intestino das aves, reduz a sua eficiência alimentar.

Para o combate desta doença, são administrados coccidiostáticos, que podem ser usados como aditivos destinados à alimentação animal [4], sendo que alguns podem ser usados como medicamentos veterinários [5]. A sua administração constante, sob forma de aditivos destinados à alimentação animal, pode representar um problema de saúde pública, na medida em que, pode levar ao aparecimento de parasitas resistentes aos coccidiostáticos. Por outro lado, os resíduos dos coccidiostáticos podem estar presentes nos tecidos edíveis, podendo representar um risco para o consumidor.

Atualmente, os coccidiostáticos constituem a solução para o controlo desta enfermidade. Consequentemente, é de primordial importância o controlo da sua presença nos géneros alimentícios e a implementação de medidas de mitigação do risco, enquadradas no quadro legislativo atual, de forma a elaborar uma correta avaliação e posterior gestão do risco associado à ingestão involuntária destas substâncias.

2 - Produção e consumo de carne

A produção de carne nos últimos 50 anos triplicou, tendo apresentado um crescimento mais rápido que o próprio crescimento da população mundial. Contudo, a partir de 2019 a produção de carne a nível mundial tem apresentado uma diminuição considerável [Figura 1] [6].

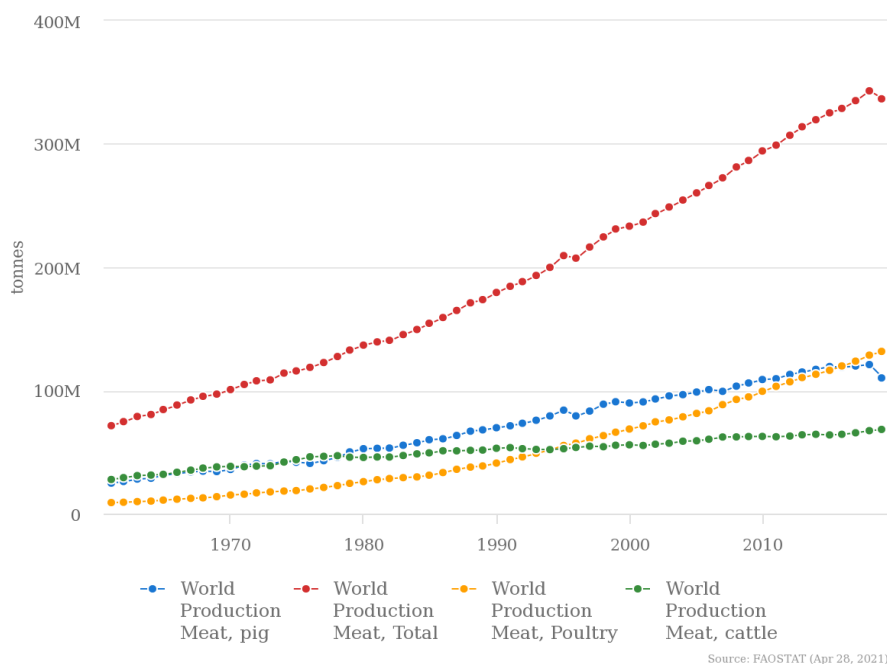


Figura 1 - Gráfico ilustrativo da produção mundial de carne, entre 1961 e 2019. (Total de carne (vermelho), carne de aves (amarelo), carne de porco (azul) e carne de gado (verde).) [6]

Segundo a FAO, previu-se que a produção mundial de carne em 2020 seria de cerca de 337,3 milhões de toneladas. No entanto, observou-se uma diminuição de 0,5%, quando comparado com 2019, o que evidencia uma diminuição significativa na produção de carne de porco [7]. Contudo, a percentagem da produção de carne de frango está a aumentar rapidamente, tendo inclusive, desde 2017, ultrapassado a produção de carne de porco com um aumento consistente até 2019 [6].

De acordo com os dados do Instituto Nacional de Estatística (INE), o consumo de carne em Portugal continua a aumentar, sendo de 119,9 Kg/habitante em 2019, contudo em 2020 verificou-se uma diminuição considerável para 115 Kg/habitante, representando uma diminuição de 4,9 Kg/habitante (4,1%), possivelmente relacionada com a diminuição do turismo e pelo encerramento temporário dos estabelecimentos da restauração, causado pela Pandemia atual [Figura 2] [8].

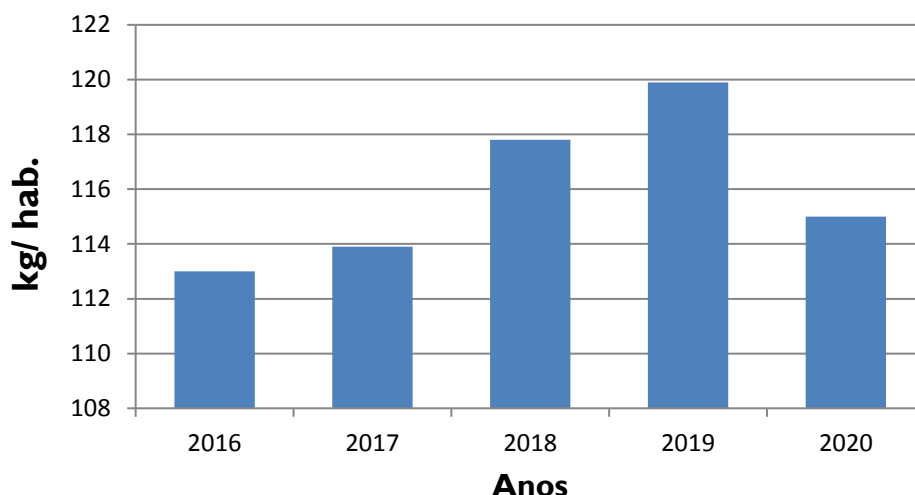


Figura 2 - Gráfico ilustrativo do consumo total de carne de animais em Portugal, entre 2016 e 2020 [8].

De acordo com os dados do INE, o consumo de carne de aves de capoeira em Portugal aumentou ligeiramente de 2016 a 2020, sendo de 41,2 e 44,3 Kg/habitante, respetivamente. Este aumento pode ser justificado devido às características nutricionais e organoléticas da carne de aves, ao seu preço reduzido e competitivo, em comparação com outras carnes, bem como à ausência de obstáculos, culturais ou religiosos, ao seu consumo.

Por outro lado em 2020 o consumo de carne de porco em Portugal sofreu a maior diminuição dos últimos 5 anos, com 41,4 Kg/habitante, uma diminuição de 3,3 Kg/habitante (7,4%) quando comparado com o consumo de carne de porco em 2019 (44,7 Kg/habitante) [Figura 3] [8].

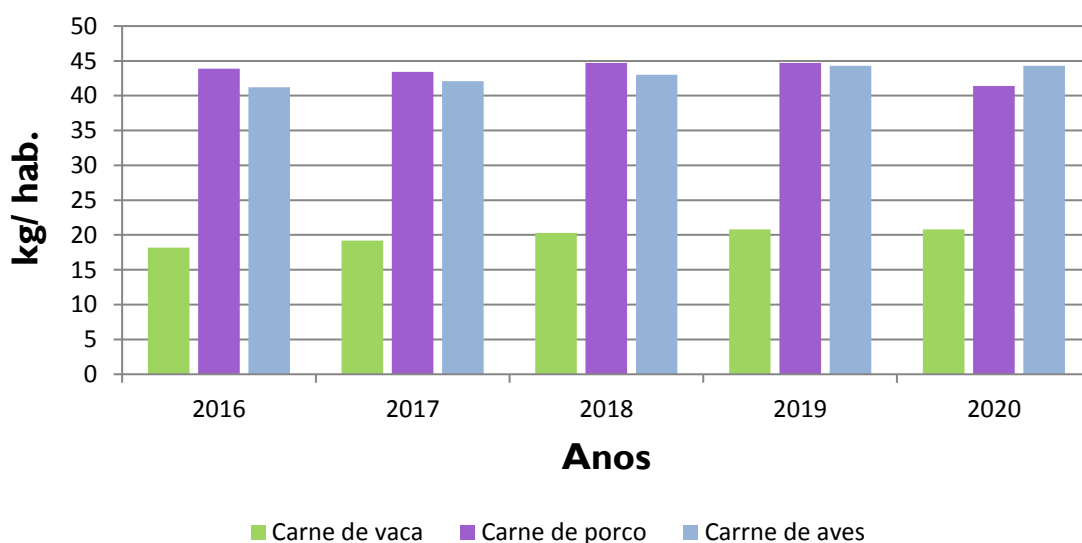


Figura 3 - Gráfico ilustrativo do consumo de carne proveniente de vacas, porcos e aves, em Portugal, entre 2016 e 2020 [8].

Em suma, a carne de aves é importante na dieta humana, tendo apresentado o maior crescimento nos últimos anos. Sendo assim, é de extrema relevância estudar como é que o consumo desta carne, em particular, pode impactar a saúde do Homem.

Os animais destinados à produção de carne de aves são geralmente mantidos em produções intensivas. Nestas produções os animais são mantidos em instalações sobrelotadas, com condições de higiene deficitárias e, muitas vezes, sem locais de quarentena para os animais com infeção. Deste modo, a produção intensiva potencia o aparecimento e transmissão de infeções, na medida em que os animais estão em maior contacto entre si, e, caso um animal fique com uma infeção, facilmente transmitirá essa infeção a outro animal [9,10]. Contudo, mesmo os sistemas de produção intensiva de aves, que sigam todas as normas exigidas e recomendadas a nível sanitário, são constantemente afetados pelo aparecimento de doenças.

3 - Coccidiose

Os protozoários parasitas, do género *Eimeria*, pertencentes ao filo Apicomplexa (possuem um complexo apical nos esporozoítos [11]) são capazes de causar, no intestino animal, coccidiose [12]. Esta doença que pode afetar diferentes partes do intestino do animal dependendo da espécie que está envolvida na infeção [13] [Tabela 1 e 2]. Foram já descritas 9 espécies de *Eimeria* capazes de causar coccidiose em galinhas, contudo apenas 7 são universalmente reconhecidas, entre elas *E. acervulina*, *brunetti*, *mitis*, *necatrix*, *praecox*, *tenella* e *maxima*. Outras espécies de *Eimeria* afetam especificamente perus, como a *E. meleagrimitis*. Apesar de hoje em dia existirem técnicas mais sensíveis, as espécies *E. mivati* e *E. hagani*, embora descritas, não foram, até ao momento, isoladas em cultura ou detetadas em pesquisas de campo recentes [11]. Para além disso, há ainda 6 espécies que são capazes de desenvolver esta infeção em coelhos [14].

Ainda que esta doença, geralmente, não seja fatal em animais saudáveis, afeta em grande parte a produtividade animal levando, por exemplo, à diminuição da produção de carne ou de ovos [13]. Apesar da *Eimeria* afetar principalmente aves de capoeira e coelhos, pode também afetar porcos, vacas e ovelhas, sendo potenciada em produções intensivas de animais e em condições de temperatura e humidade elevadas. É de salientar que um mesmo hospedeiro poderá ser infetado com 2 ou mais espécies de *Eimeria* em simultâneo [11].

Tabela 1 - Patogenicidade das espécies de *Eimeria* e local intestinal afetado em frangos.

(A vermelho estão representadas as zonas intestinais que sofrem lesões, os pontos vermelhos representam as zonas intestinais que, ocasionalmente sofrem lesões.) [1, 15]

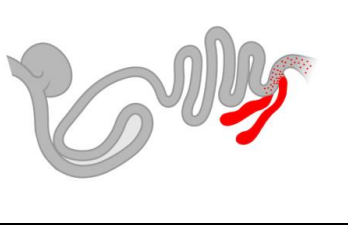
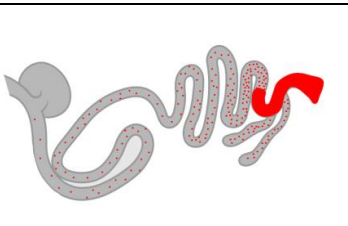
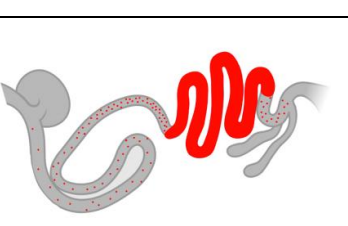
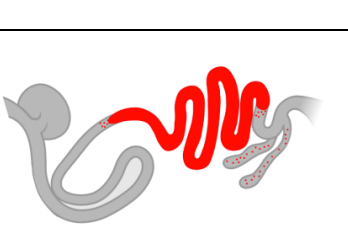
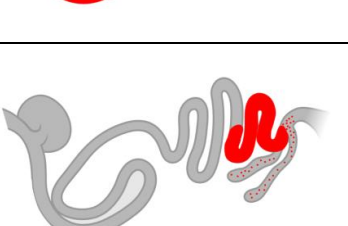
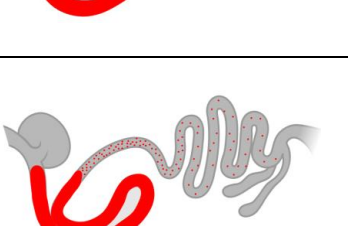
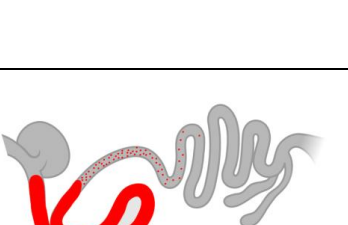
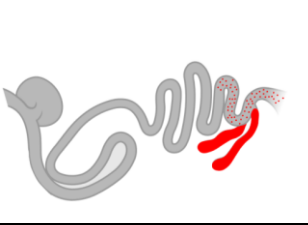
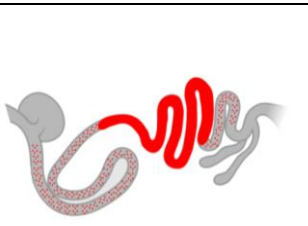
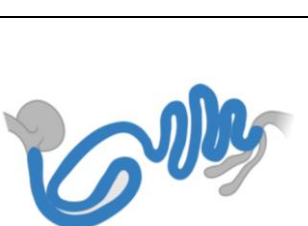
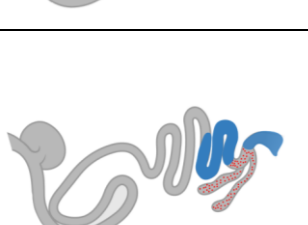
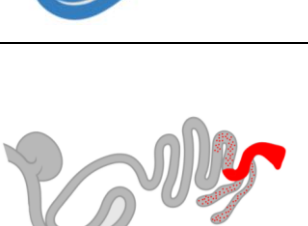


Espécie	<i>E. tenella</i>	<i>E. brunetti</i>	<i>E. maxima</i>	<i>E. necatrix</i>	<i>E. mitis</i>	<i>E. acervulina</i>	<i>E. praecox</i>
Local afetado: a vermelho							

Tabela 2 - Patogenicidade das espécies de *Eimeria* e local intestinal afetado em perus.

(A vermelho estão representadas as zonas intestinais que sofrem lesões, os pontos vermelhos representam as zonas intestinais que, ocasionalmente sofrem lesões e a azul estão representadas as zonas intestinais que mesmo com a presença do parasita não sofrem lesões.) [1, 15]

Espécie	<i>E. adenoides</i>	<i>E. meleagrimitis</i>	<i>E. dispersa</i>	<i>E. meleagridis</i>	<i>E. gallopavonis</i>	<i>E. innocua</i>	<i>E. subrotunda</i>
Local afetado: a vermelho							

3.1- Ciclo de vida de *Eimeria*

O facto deste parasita possuir um ciclo de vida curto, apresentando uma reprodutibilidade elevada, possibilita a sua rápida disseminação dentro de um aviário [11]. A infeção por *Eimeria* é geralmente associada a um ciclo de vida intracelular, sendo que a multiplicação do parasita geralmente ocorre nas células intestinais (enterócitos), sendo posteriormente excretados os oocistos esporulados, que no ambiente vão potencialmente continuar o ciclo contagioso. Estes seres vivos possuem um ciclo de vida complexo [Figura 4], apresentando parte sexuada e parte assexuada, e um processo infecioso que demora 4 a 7 dias.

A infeção começa quando um animal (hospedeiro) ingere oocistos esporulados (cada um com 4 esporocistos, com 2 esporozoítos cada) (1). Depois da ingestão, os oocistos passam pela moela onde ocorre a destruição da sua parede espessa, e, no intestino delgado, devido à ação da quimiotripsina (enzima digestiva que hidrolisa ligações peptídicas) e dos sais biliares, os esporozoítos são libertados [11], penetrando, posteriormente, as células epiteliais (2). Dentro destas ocorre reprodução assexuada (3-5), havendo o amadurecimento dos esquizontes, que, ao romper liberam merozoítos (6). Os merozoítos invadem novas células epiteliais podendo dar continuidade à reprodução assexuada (gerando outra geração de merozoítos, sendo que geralmente há 2 a 4 gerações) (7), ou podendo iniciar a reprodução sexuada, onde microgâmetas (masculinos) (8-9) se unem a macrogâmetas (femininos) (10). Depois da fecundação, forma-se um zigoto que dá origem ao oocisto não esporulado (11), que é excretado para o ambiente por via fecal. Assim, depois de completo este ciclo complexo, novos oocistos estão prontos a serem excretados nas fezes. No ambiente, os oocistos sofrem um processo de esporulação (12-13) (que dura entre 48-72 horas), dando origem aos oocistos esporulados (cada um com 4 esporocistos, com 2 esporozoítos cada) que já possuem capacidade infeciosa, podendo posteriormente ser ingeridos por outros animais (1), causando infeções ou reinfeções, facilitando assim a transmissão de zoonoses entre os vários hospedeiros [10,11,13]. Os oocistos não esporulados podem ser eliminados através das fezes do hospedeiro durante vários dias e semanas [11].

Os oocistos de cada espécie de *Eimeria* são distintos entre si, sendo geralmente utilizados para a identificação e diagnóstico da espécie parasitária específica. Para além dos oocistos, o local e forma das lesões intestinais são também características da espécie parasitária em questão, bem como o período pré-patente, que consiste no período entre a infeção parasitária e a confirmação da presença desse parasita no organismo do hospedeiro, que geralmente ocorre quando se encontram oocistos no sangue ou fezes do animal [11].

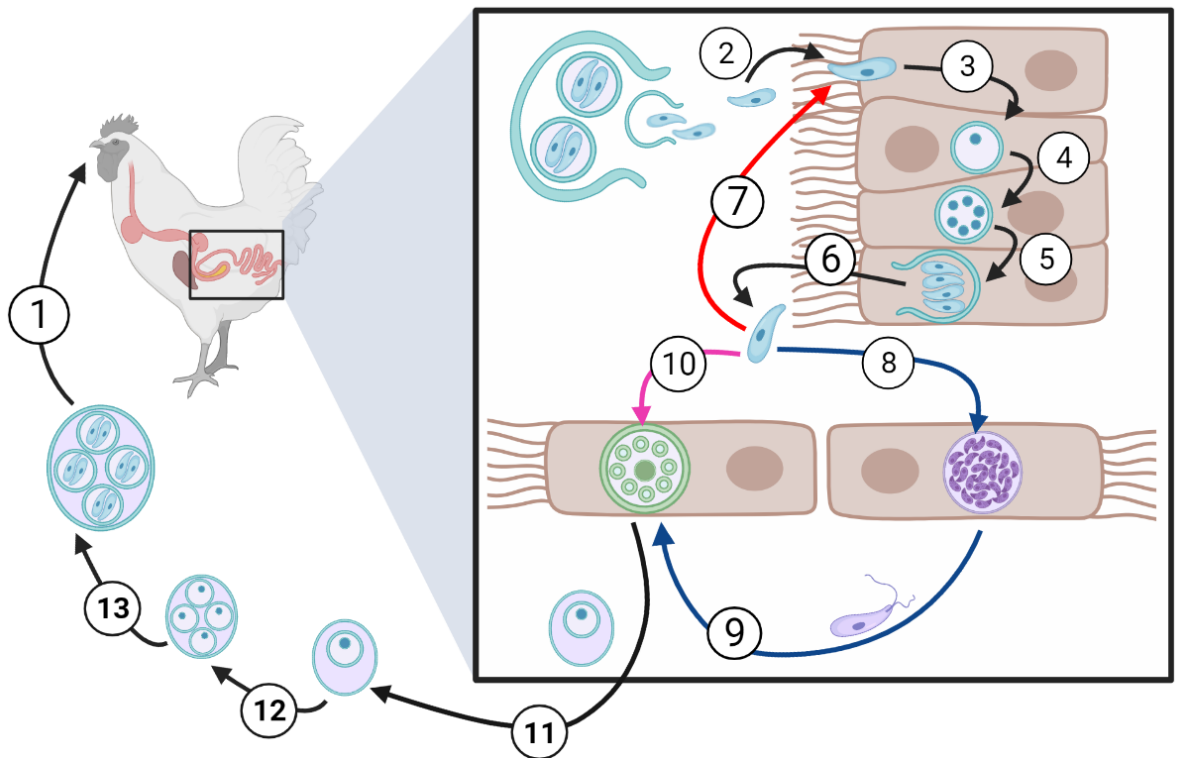


Figura 4 - Esquema ilustrativo do ciclo de vida de *Eimeria* spp. em galinhas [11,15].

Em algumas espécies de *Eimeria*, por tipicamente terem esquizontes relativamente grandes, quando comparados com os de outras espécies, observam-se lesões significativas no tecido intestinal quando os esquizontes se rompem de modo a libertar os merozoítos. Para além disso, há espécies cujos gametócitos desencadeiam reações devido à infiltração na célula, levando à inflamação dos tecidos envolventes [11].

Os indivíduos com coccidiose apresentam carateristicamente lesões no intestino (destruição da barreira da mucosa intestinal e possível perda de sangue), diarreia (que pode levar a desidratação), diminuição do aumento do peso e consequente redução da eficiência alimentar (também devido á redução do apetite), bem como, em alguns casos, morte [14].

Estas consequências dependem da gravidade da inflamação, da quantidade de oocistos esporulados ingeridos, da espécie específica por de trás da infeção e da suscetibilidade do próprio hospedeiro. Quando os animais apresentam apenas uma infeção ligeira, as lesões intestinais, que advém da infeção, podem desencadear o aparecimento de, por exemplo, futuras infeções bacterianas [14].

3.2- Resistência dos oocistos

Este género de protozoários, capaz de causar esta doença muito infecciosa, encontra-se amplamente distribuído pelo ambiente apresentando uma elevada resistência às variações meteorológicas e aos desinfetantes, sendo a sua eliminação de extrema dificuldade, se não praticamente impossível [14].

Para além disso, o aquecimento global proporciona o aumento dos coccídeos, na medida em que estes se multiplicam mais rapidamente [16]. A higiene é também de extrema importância na prevenção desta doença, contudo, por exemplo os sistemas de comedouros e de bebedouros, muito utilizados em produções de animais, são geralmente mais difíceis de higienizar [17].

Por outro lado, o facto da parede espessa dos oocistos apresentar uma elevada resistência, previne a sua destruição, dificultando o efeito dos desinfetantes químicos e assegurando a sua sobrevivência no ambiente durante longos períodos de tempo [18]. Deste modo, estes oocistos são facilmente disseminados pelos vários compartimentos dos aviários devido, por exemplo, aos funcionários, equipamentos, roedores e/ou insetos [17].

Apesar de no solo os oocistos poderem sobreviver durante várias semanas, dentro de um aviário a sua sobrevivência é geralmente de alguns dias. Este facto deve-se ao calor e amoníaco gerados pela compostagem, bem como à ação de fungos e bactérias, observados no *poultry litter* que cobre o chão dos aviários e que consiste numa combinação entre o material utilizado como “cama” para as aves, a ração derramada por estas e as suas fezes e penas [11].

Por outro lado, a exposição a pelo menos 55°C ou a temperaturas muito reduzidas, leva à inviabilidade dos oocistos. Sendo assim, nas épocas extremamente quentes e secas a viabilidade dos oocistos pode facilmente ser comprometida, enquanto que, em épocas húmidas e pouco frias, é favorecida [11].

3.3- Prevenção da coccidiose: boas práticas de produção animal

A morbidade (rácio entre animais infetados e animais existentes) e a mortalidade do hospedeiro estão relacionadas proporcionalmente com o número de oocistos esporulados de *Eimeria* ingeridos, visto que quantos mais oocistos esporulados forem ingeridos mais severa será a infeção. Deste modo, a quarentena de animais infetados bem como a remoção dos corpos dos animais mortos é de extrema importância, na medida em que se reduz o número de organismos infecciosos em contacto com os animais saudáveis [11].

Sendo as aves de capoeira e os coelhos os mais afetados e sensíveis, é importante prevenir o aparecimento desta doença aquando da produção destes animais. Deste modo, é também necessário que o setor pecuário siga as normas recomendadas, desenvolvendo práticas que diminuam a probabilidade de um animal ficar infetado.

Entre as sugestões do Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (USDA) recomenda-se: uma maior e melhor vacinação dos animais; que se melhore as rações administradas aos animais, adequando melhor as dietas, com a utilização, por exemplo, de oligoelementos apropriados, de probióticos e intensificadores da imunidade, aumentando o valor nutricional das rações; averiguar o estado de saúde dos animais, realizando por exemplo testes aquando da sua chegada; a utilização de instalações com o espaço necessário, e estabelecido por lei, para prevenir a rápida transmissão das infeções entre os animais; a existência de instalações específicas para a quarentena, de modo a que quando um animal esteja infetado seja possível separá-lo dos restantes, prevenindo a transmissão da infeção a animais saudáveis; assegurar a boa qualidade das rações e água disponibilizada aos animais [19].

As medidas de higiene, saneamento e desinfecção são insuficientes para impedir a propagação de surtos, uma vez que os oocistos são extremamente resistentes e a esterilização nunca é 100% completa [11].

Por outro lado, o facto de as aves estarem num ambiente completamente estéril, sem contacto com os oocistos, faz com que, quando jovens, estas não desenvolvam qualquer imunidade contra este parasita, estando mais suscetíveis a surtos no futuro [11].

4 - Coccidiostáticos

Como anteriormente referido, a coccidiose é uma infeção que afeta gravemente os animais de produção, prejudicando principalmente as aves, sendo essencial a utilização de coccidiostáticos, administrados como aditivos nos alimentos destinados a animais ou, em alguns casos, como medicamentos veterinários.

Os coccidiostáticos são compostos químicos, que podem ser produzidos sinteticamente ou por microrganismos, que quando administrados a animais de produção têm a capacidade de inibir ou destruir os protozoários parasitas causadores de coccidiose [14].

De acordo com os dados oficiais da Direção Geral de Alimentação e Veterinária (DGAV) foram produzidas em Portugal, durante o ano de 2019, cerca de 28 000 toneladas de pré-

misturas e cerca de 7 000 toneladas de aditivos. De entre os aditivos produzidos em 2018, 201 toneladas foram coccidiostáticos [20].

Uma vez que a coccidiose é uma doença muito comum na produção avícola, a maior parte dos produtores prefere administrar coccidiostáticos na alimentação dos animais, de modo a prevenir a doença, e diminuir a necessidade da sua utilização terapêutica [13].

A vantagem da utilização profilática de coccidiostáticos como aditivos alimentares, consiste no facto de impedir o desenvolvimento desta infeção, mesmo de forma sub-clínica, diminuindo as perdas na taxa de conversão alimentar e garantindo o aumento de peso ponderal [13].

As aves criadas em produções intensivas geralmente recebem ração com coccidiostáticos desde o primeiro dia de vida, de forma a prevenir a coccidiose, o que é particularmente importante para os pintos, visto que demoram algum tempo até desenvolverem alguma imunidade [11].

Depois da exposição à doença, o animal adquire imunidade contra possíveis surtos, contudo a imunidade adquirida apenas oferece proteção contra a espécie com a qual o animal entrou em contacto, podendo desenvolver coccidiose provocada por outras espécies de *Eimeria* específicas para o hospedeiro em questão, já que, em aves, não há imunidade cruzada entre as espécies deste parasita [11].

A “imunidade temporária” conferida pelo consumo de rações com coccidiostáticos está relacionada com vários fatores, como por exemplo a quantidade de alimento ingerido, que pode variar entre aves e, conseqüentemente, a variação da ingestão de coccidiostáticos [11].

Fatores externos também podem influenciar a eficácia dos coccidiostáticos usados como aditivos, como por exemplo a presença de micotoxinas na ração. Já foi demonstrado que a presença de aflotoxina diminui o efeito da monensina na prevenção de *E. tenella* [15].

4.1- Caracterização e estrutura química

Atualmente há 11 coccidiostáticos autorizados como aditivos destinados para alimentação animal [Figura 5], [14], classificados em 2 categorias, os compostos ionóforos e os compostos sintéticos [12].

Os coccidiostáticos ionóforos possuem um grupo poliéter, são produzidos através da fermentação de *Streptomyces spp.* ou *Actinomadura spp.* [11,14]. e enumeram-se: a monensina

de sódio (MON), a lasalocida de sódio (LAS), a maduramicina de amónio (MAD), a narasina (NAR), a salinomicina de sódio (SAL) e a semduramicina de sódio (SEM).

De entre os coccidiostáticos sintéticos enumeram-se: o decoquinato (DEC), um composto que pertence ao grupo químico das quinolonas, o cloridrato de robenidina (ROB) do grupo químico das guanidinas, a halofuginona (HAL) do grupo químico das quinazolinonas, o diclazuril (DIC) do grupo químico dos benzeno-acetonitrilos e a nicarbazina (NIC) [14].

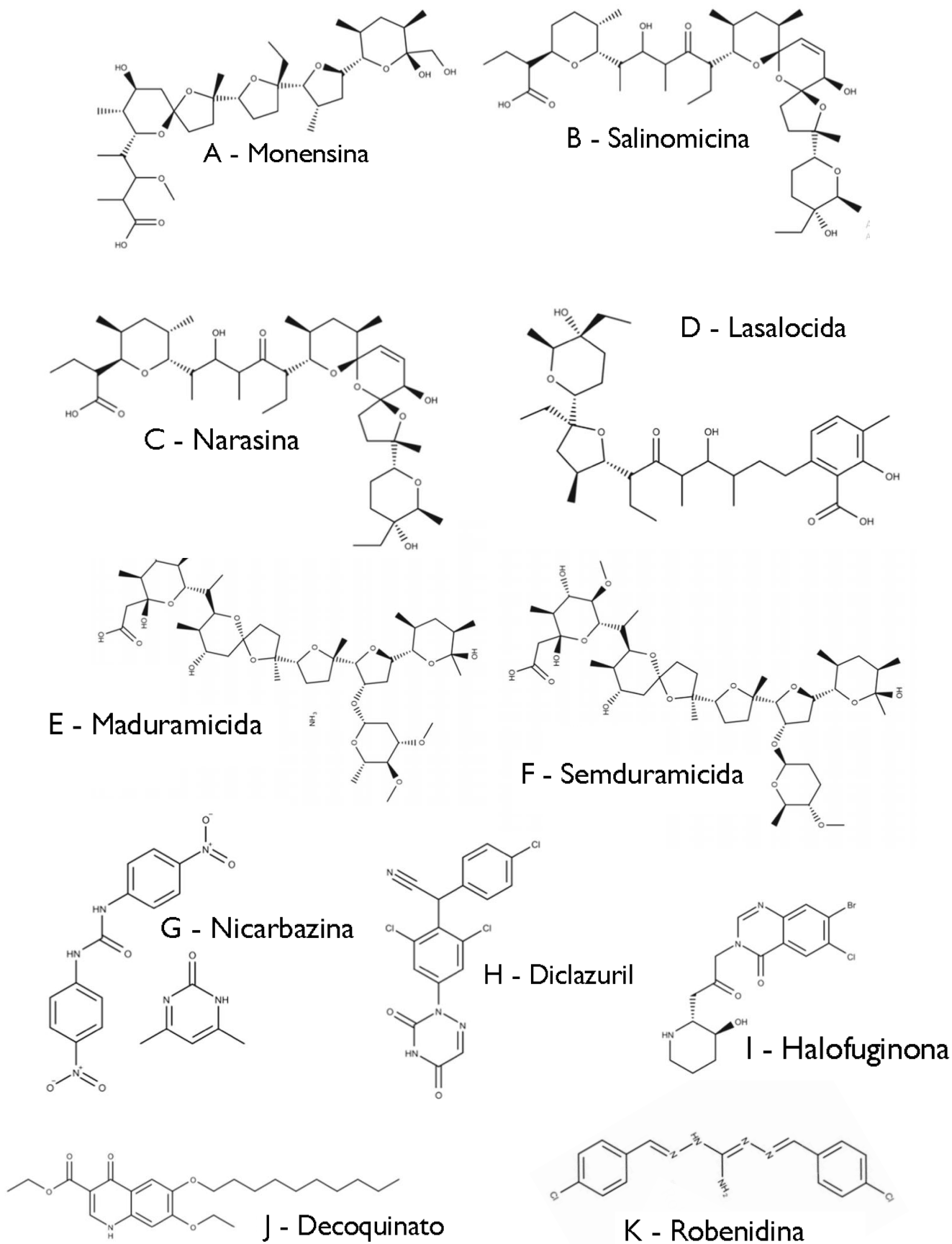


Figura 5 - Estrutura química dos coccidiostáticos ionóforos (A-F) e sintéticos (G-K) [21].

Para a correta compreensão dos efeitos e ocorrência dos coccidiostáticos nos tecidos edíveis, é essencial ter em consideração as propriedades físico-químicas específicas de cada um destes compostos [Tabela 3 e 4].

Tabela 3 - Propriedades físico-químicas dos coccidiostáticos ionóforos.

Propriedades	LAS [22]	MON [23]	NAR [24]	SAL [25]	SEM [26]
Coeficiente de partição da octanol/água (log K _{ow} 25°C)	2,3	4,24 pH 5 2,75-2,87 pH 7 3,79 pH 9	4,79 (pH 5) 4,85 (pH 7) 5,06 (pH 9)	5,12 pH 7,4	4,49 pH 4 2,63 pH 7 2,21 pH 9
Solubilidade da água (mg/L)	1060	4,809 pH 7 8,912 pH 9	102 a pH 7 e 681 a pH 9	<5 (pH 4) 622,3 (pH 7) 1371,2 (pH 9)	163 pH 4 1240 pH 7 1020 pH 9
Valor de pressão (Pa)	-	3×10 ²⁸	6,2×10 ⁻²⁴	<5×10 ⁵	6,67×10 ²⁸
Constante de dissociação pKa	5,66	6,6	7,9	-	5,39

Tabela 4 - Propriedades físico-químicas dos coccidiostáticos sintéticos.

Propriedades	DEC [27]	DIC [28]	HAL [29]	NIC (DNC) [30]	NIC (HDP) [30]	ROB [31]
Coeficiente de partição octanol/água (log K _{ow} 25°C)	≥ 5,7 pH 5,7,9	3,6	1,06 pH 5 1,27 pH 7 2,58 pH 9	3,97 (pH 7)	- 0,93 (pH 7)	3,3
Solubilidade da água (mg/L)	0,06	2,63 × 10 ³ (pH 5) 2,33 × 10 ² (pH 7) 1,43 (pH 9)	6630 (pH 5) 1830 (pH 7) 1,52 × 10 ⁵ (pH 9)	0,04	71200 pH 7	118
Valor de pressão	3×10 ⁻⁹ Pa (25°C)	1,21× 10 ²² (20°C) 7,94× 10 ²² (25°C)	6,2 × 10 ⁻²⁴	1,6×10 ⁻⁸ a 25°C	5,3×10 ⁻⁵ a 25°	-
Constante de dissociação pKa	-	5,89	8,07	-	pKa1 3,55 pKa2 10,26	3,5

A Nicarbazina é o complexo equimolar de 4,4-dinitrocarbanilida (DNC) e 2-hidroxi-4,6-dimetilpirimidina (HDP), sendo que para a verificação dos seus resíduos nos alimentos, quantifica-se as concentrações de DNC e HDP [12].

Quando o valor de pressão é baixo, o composto apresenta pouca volatilidade, como no caso do decoquinato. Compostos com valores de coeficiente de partição octanol/água >5, apresentam baixa solubilidade em água (hidrofóbicos) [32].

4.2-Mecanismo de ação

Os coccidiostáticos que se enquadram na categoria de ionóforos são capazes de inibir o crescimento na medida em que interferem em algum estágio do ciclo de vida do parasita. Controlam e alteram a permeabilidade da membrana celular devido à sua interferência na passagem de iões, como por exemplo K^+ , Na^+ e Ca^{2+} , perturbando assim o seu equilíbrio osmótico [21]. Estes compostos formam complexos catiónicos reversíveis e solúveis em lípidos capazes de transportar catiões pela membrana [33].

Por outro lado, os coccidiostáticos sintéticos, produzidos através de síntese química, têm a capacidade de inibir os processos metabólicos dos parasitas [14]. O decoquinato atua por inibição da respiração mitocondrial do parasita, enquanto que, em relação aos restantes coccidiostáticos sintéticos, ainda não é conhecido o modo de ação. [21].

Os coccidiostáticos podem atuar em diferentes estágios do ciclo de vida do parasita, no entanto pode haver dois ou mais coccidiostáticos que atuem no mesmo estágio do desenvolvimento parasitário. Por exemplo, a nicarbazina e a robenidina, ambos sintéticos, atuam nos esquizontes de primeira ou segunda geração, destruindo-os, e impedindo assim a reprodução do parasita por interrupção do seu ciclo de vida [11].

4.3-Resistência aos coccidiostáticos

Visto que os coccidiostáticos inibem a reprodução, interrompendo o ciclo reprodutivo do parasita, nunca há uma erradicação deste no intestino dos animais infetados e, caso haja uma interrupção na toma dos coccidiostáticos, potencialmente haverá a conclusão do ciclo reprodutivo e conseqüentemente o reaparecimento dos sintomas característicos. Deste modo, a toma constante destes aditivos, apesar dos oocistos estarem constantemente presentes nestas produções animais, previne o risco de reinfeção [14].

Por consequência, um uso elevado destes compostos na produção de aves, pode refletir-se em consequências negativas, levantando preocupações ao nível da saúde pública. A utilização intensiva de um coccidiostático, por um longo período de tempo, pode levar ao aparecimento de parasitas com baixa sensibilidade para essa substância, desencadeando, mecanismos de resistência e possibilitando a sua propagação [11].

Os processos de aquisição de resistência estão associados a processos genéticos, estando relacionadas com mutações, e seleção de fenótipos resistentes [15]. Quando adquirida

resistência total, não havendo qualquer sensibilidade ao coccidiostático, pode demorar anos até que o parasita volte a ser suscetível ao composto em questão [11].

Deste modo, a diminuição da sensibilidade aos coccidiostáticos é a maior limitação para a sua utilização eficaz contra a coccidiose, sendo essencial assegurar a continuidade da sua eficiência.

4.3.1- Mitigação do risco de resistência: planos de administração de coccidiostáticos

Antes dos anos 70 o controlo da coccidiose era feito recorrendo à administração de coccidiostáticos não ionóforos, e, visto que o parasita rapidamente adquiria resistência a estes compostos, o controlo desta doença era extremamente difícil. Todavia, devido ao aparecimento dos coccidiostáticos ionóforos, nomeadamente com o desenvolvimento da monensina, o seu tratamento foi largamente melhorado. A existência de coccidiostáticos ionóforos e não ionóforos permitiram que se desenvolvessem planos de rotação, de substituição ou de “vai-vem”, sempre com uma perspectiva de utilização responsável [14].

Os coccidiostáticos ionóforos são muitas vezes selecionados, uma vez que o desenvolvimento de resistência por parte dos parasitas é lenta, quando comparado com os coccidiostáticos não ionóforos. Para além disso, o facto de não eliminarem por completo a reprodução do parasita, permite ao hospedeiro, após contacto com o mesmo, o desenvolvimento de alguma imunidade [21].

O desenvolvimento de resistência cruzada, entre coccidiostáticos com modo de ação idêntico, também é possível. Assim a seleção de compostos com modos de ação diferentes é essencial para a eficácia dos planos de mitigação de resistências [15].

Os programas “vai-vem” consistem, caracteristicamente, na administração de pelo menos dois aditivos durante o crescimento das galinhas: um coccidiostático na ração administrada aos pintos e outro coccidiostático na ração administrada durante a fase de crescimento/engorda dos frangos, podendo também ser administrado um terceiro coccidiostático na ração dada na parte final do crescimento do frango [11].

Os sistemas de rotação consistem numa mudança periódica do coccidiostático administrado, que geralmente ocorre na primavera e outono. Aquando da mudança do coccidiostático, há uma diminuição drástica no número de parasitas resistentes, que se formaram devido à longa utilização do coccidiostático anteriormente usado, aumentando-se novamente a produtividade. Esta rotação sazonal deve sempre ter em conta as propriedades

do composto, sendo que, por exemplo, em estações onde a coccidiose é mais frequente, se deve optar por coccidiostáticos mais eficazes, enquanto que, em estações onde a coccidiose ocorre com menor frequência, se podem selecionar outros [11]. A fim de obter programas de rotação mais eficazes, e assegurar a sensibilidade do parasita a estes compostos, cada coccidiostático só deve ser usado no máximo durante dois meses ou dois períodos de engorda [15].

4.4- Alternativas à utilização de coccidiostáticos como aditivos

Devido à elevada utilização dos coccidiostáticos, principalmente em produções intensivas, onde o aparecimento de coccidiose é extremamente frequente, tem aumentado cada vez mais a resistência do parasita a estes compostos. Deste modo, a busca por alternativas, ao uso de coccidiostáticos como aditivos na alimentação animal, capazes de prevenir e tratar a coccidiose tem aumentado. Sendo assim, foram desenvolvidas e melhoradas várias alternativas ao tratamento por coccidiostáticos, que podem substituir a utilização destas substâncias.

A vacinação é um dos principais métodos de prevenção de coccidiose, alternativos à utilização de coccidiostáticos, sendo que a sua administração previne o aparecimento de resistência aos coccidiostáticos. As vacinas são constituídas por oocistos precoces do parasita [14]. As vacinas podem ainda ser atenuadas sendo que o parasita presente na vacina pode ser manipulado em laboratórios de modo a apresentar menor virulência [15].

A utilização de vacinas contendo os oocistos vivos é um possível método de combate à resistência aos coccidiostáticos, visto que se argumenta que os oocistos contidos nas vacinas, com sensibilidade aos coccidiostáticos, poderão substituir aqueles que se encontram na natureza, sem sensibilidade aos coccidiostáticos. Contudo não há ainda um consenso sobre a sua utilização, apesar de se ter demonstrado que os produtores, que incorporam estas vacinas nos programas de rotação, obtiveram bons resultados, na medida em que houve um aumento da sensibilidade aos coccidiostáticos [11].

A administração a pintos de vacinas com oocistos vivos, desencadeia o desenvolvimento de imunidade contra o parasita contido na vacina. Existem vacinas que contêm oocistos vivos atenuados que foram geneticamente modificados, de forma a por exemplo apresentarem ciclos de vida mais curtos [11].

Como referido, as vacinas são específicas para cada espécie, ou seja as aves apenas desenvolvem imunidade contra as espécies de *Eimeria* presentes nas vacinas administradas.

Contudo há várias espécies deste parasita que podem causar coccidiose, não sendo a administração de uma única vacina por si só uma técnica eficaz [11,14].

Atualmente há apenas duas vacinas aprovadas pela Agência Europeia do Medicamento (EMA), para administração em frangos, para controlar o aparecimento de coccidiose nestes animais. A vacina Evant[®] contém oocistos vivos enfraquecidos (que não podem causar a doença) de *E. acervulina*, *E. maxima*, *E. mitis*, *E. praecox* e *E. tenella*. A proteção dada por esta vacina começa 2 semanas após a vacinação e dura até 9 semanas depois da vacinação. A administração desta vacina reduz os problemas intestinais, bem como os oocistos nas fezes [34]. A vacina Evalon[®] contém oocistos vivos enfraquecidos de *E. acervulina*, *E. brunetti*, *E. maxima*, *E. necatrix* e *E. tenella*. A proteção dada por esta vacina começa 3 semanas após a vacinação e dura até 50 semanas depois da vacinação, oferecendo um período de imunidade superior à Evant[®] [35]. Ambas as vacinas só podem ser adquiridas com uma prescrição, não apresentam contraindicações e a sua utilização não obriga a um intervalo de segurança entre a administração e o abate dos frangos ou o consumo dos ovos [34,35].

Foram também identificadas, a partir de genes clonais, algumas proteínas coccidiais que, quando inoculadas em pintos, desencadeiam o desenvolvimento de alguma imunidade. O gene que codifica essas proteínas pode ser clonado numa célula bacteriana, onde poderá ser replicado em grande quantidade. Contudo a aplicabilidade desta metodologia ainda está em estudo [11].

A fitoterapia é também uma alternativa à administração de coccidiostáticos, consistindo na utilização de preparações constituídas por estratos vegetais e óleos essenciais [14].

Estudos recentes mostraram que a utilização de estratos vegetais e óleos essenciais pode efetivamente contribuir para o controlo da coccidiose. Por exemplo, em 2021, Lahlou *et al.*, descreveram que o uso de tomilho e alecrim ajuda na prevenção da coccidiose, visto que são ricos em fitoquímicos que atuam contra esta doença. Em resumo, estas plantas podem prevenir e tratar a coccidiose, devido às atividades farmacológicas dos seus constituintes “regulando o ciclo de vida de *Eimeria* sp., a imunidade do hospedeiro, o estado antioxidante e a microflora intestinal”, podendo ser utilizadas como aditivos para rações [36].

De acordo com Abdel-Tawab, *et al.*, em 2020, os extratos das folhas de *Moringa oleifera*, também conhecida como Acácia branca, possuem capacidade antioxidante, antiapoptótica e anticoccidiana. Os ratos infetados com *E. papillata*, quando tratados com extratos desta planta, apresentaram uma excreção de oocistos nas fezes 50,5% inferior à excreção antes da administração do tratamento, tendo aparentemente havido uma redução nos estágios

parasitários intracelulares, bem como um aumento na quantidade de células caliciformes [37]. Sendo assim, a utilização desta planta pode ajudar no controlo da coccidiose, indo de encontro ao descrito por Ola-Fadunsin, *et al.*, em 2013, que concluíram que estes extratos podem ser usados no tratamento de coccidiose em aves de capoeira [38].

Há também alguns MUVs que podem ser prescritos para o tratamento de coccidiose. O toltrazuril, o amprolium e algumas sulfamidas, são eficazes contra aparecimentos esporádicos de coccidiose. Os MUVs são administrados só aos animais com sintomas, não assegurando o bem-estar animal, já que os sintomas provocados pela coccidiose só aparecem em fases mais avançadas da doença quando a maior parte dos oocistos já terão sido excretados [13,14]. Podem levar também ao aparecimento de resistências a estes compostos.

A utilização de acidificantes e enzimas ou microrganismos prebióticos (ingredientes não digeríveis que estimulam o crescimento/atividade das bactérias normais da flora intestinal) ou probióticos (microrganismos vivos que ajudam na digestão e protegem contra microrganismos nocivos) pode também ser uma alternativa, na medida em que, ao criar uma barreira à entrada do trato digestivo, impossibilitam a infeção [14,15].

Contudo, o desenvolvimento de novos e melhores métodos alternativos à utilização de coccidiostáticos, de modo a prevenir a coccidiose, continua a ser fulcral.

4.5- Toxicidade dos resíduos de coccidiostáticos

A exposição do ser humano aos coccidiostáticos pode dever-se ao contacto direto, por inalação ou toque, com as rações com coccidiostáticos, como por exemplo no caso das pessoas que trabalham com animais produtores de géneros alimentícios. Por outro lado, os consumidores também podem entrar em contacto, por via oral, com os resíduos dos coccidiostáticos presentes nos géneros alimentícios. Os resíduos podem advir de má administração dos coccidiostáticos ou de contaminação não intencional [33].

Como referido anteriormente, a presença de resíduos em concentrações elevadas em alimentos para animais, podem ser prejudicial para a saúde das espécies animais principalmente as não alvo, uma vez que podem desencadear uma reação tóxica, especialmente em indivíduos sensíveis [39,40].

No decorrer da produção de rações com adição de coccidiostáticos é possível uma contaminação cruzada destas substâncias com as rações que não levam este aditivo. Deste modo, é possível, um animal não alvo, ingerir uma ração acidentalmente contaminada com coccidiostáticos. Os efeitos desta ingestão podem ser adversos no animal, caso este possua

alguma sensibilidade específica. Por exemplo, no caso de cavalos, caso se verifique uma contaminação cruzada de salinomicina e monensina de 2 ou 5%, respetivamente, um valor que geralmente é negligenciável, pode ocorrer toxicidade, visto que, estes apresentam uma sensibilidade particular para estes coccidiostáticos. Para além disso, a possibilidade de animais não alvo ingerirem coccidiostáticos pode levar ao aparecimento de resíduos inesperados destes nos alimentos destinados ao consumo humano, podendo representar um perigo de segurança alimentar [41].

Contudo, de acordo com Dorne *et al.*, que em 2013 avaliaram a ocorrência de resíduos de cada coccidiostático presente nos tecidos edíveis, concluíram que as concentrações encontradas eram baixas, e que a exposição dos consumidores era inferior à Ingestão Diária Aceitável (ADI). Estes autores concluíram que contaminação acidental das rações para animais não teria um impacto negativo na saúde dos consumidores [41].

Segundo o Regulamento (CE) N.º 178/2002 do Parlamento Europeu e do Conselho, de 28 de Janeiro de 2002, os géneros alimentícios considerados não seguros, sendo prejudiciais para a saúde e/ou impróprios para consumo, não podem ser colocados no mercado. De modo a determinar se um género alimentício pode ou não ser prejudicial para a saúde tem de se considerar os efeitos provenientes do seu consumo, a curto e longo prazo, os potenciais efeitos tóxicos cumulativos, bem como as possíveis sensibilidades dos consumidores [42].

Sendo assim, de forma a compreender se uma substância pode representar algum risco para a saúde pública é essencial a avaliação da sua toxicidade. Para avaliar a toxicidade dos coccidiostáticos tem-se em conta os, já referidos, mecanismos de ação [41].

Se os coccidiostáticos forem prescritos de forma adequada, de acordo com a legislação em vigor na União Europeia (EU), se forem cumpridos os intervalos de segurança, e se não ocorrer contaminação cruzada, provavelmente as concentrações de resíduos não ultrapassarão os limites máximos de resíduos (LMRs) estabelecidos pela legislação [13].

4.5.1- Toxicidade: coccidiostáticos ionóforos

Como referido os coccidiostáticos ionóforos interferem na passagem de iões pelas membranas. Sendo assim, estes compostos também podem prejudicar a saúde dos seres humanos e animais, na medida em que, também podem interferir com a passagem de iões nas células dos mamíferos, cujo sistema nervoso, músculos e sistema cardiovascular apresentam uma vulnerabilidade à alteração do movimento normal dos iões [33].

Estes coccidiostáticos diferem entre si na seletividade de ações e podem apresentar diferentes polaridades. Deste modo, estes compostos podem interferir com as membranas de formas distintas e apresentar efeitos toxicológicos diferentes.

Contudo, é possível que alguns coccidiostáticos ionóforos apresentem mecanismos de ação semelhantes, sendo que nestes casos é de esperar que ao haver exposição a mais do que um destes compostos a toxicidade seja aditiva. Por outro lado é pouco provável que os coccidiostáticos não ionóforos possuam mecanismos em comum, sendo assim quando há exposição a mais do que um coccidiostático não ionóforo não se considera que a toxicidade seja aditiva [33].

Alguns coccidiostáticos ionóforos são capazes de desencadear inotropia positiva, que consiste no aumento da força de contração do coração, originando maior fluxo sanguíneo no coração. A possibilidade dos resíduos destes compostos causarem este efeito é especialmente preocupante para pessoas com problemas vasculares [43].

Quando, por exemplo, uma artéria coronária está parcialmente obstruída devido a alguma doença, o fluxo do sangue é reduzido e os tecidos não são adequadamente oxigenados originando hipoxia na zona que é irrigada a partir desse vaso sanguíneo. Nestas circunstâncias, devido a processos autorregulatórios, há dilatação do vaso sanguíneo em questão. Quando exposto a um composto ionóforo, o vaso sanguíneo também dilata. Deste modo, quando um vaso sanguíneo parcialmente obstruído é exposto a ionóforos, se já se encontrar perto do seu limite máximo de dilatação, terá a sua capacidade de dilatação comprometida, sendo menor que a de vasos sanguíneos saudáveis. Deste modo, o sangue será direcionado para os vasos sanguíneos saudáveis que em contacto com os ionóforos dilatam mais, agravando a hipoxia no miocárdio abastecido pelo vaso sanguíneo parcialmente obstruído. Posteriormente, quando perpetuado este processo o indivíduo pode desenvolver doenças como por exemplo angina [43,44].

4.5.1.1- Lasalocida

A lasalocida é um coccidiostático ionóforo cujo perfil metabólico em galinhas, perus e ratos é semelhante. Esta substância é excretada na biliar, principal via de eliminação, sob forma inalterada, contudo há uma pequena fração que, antes de ser excretada pelos rins, passa por hidroxilação [33,45].

Não há evidências da carcinogenicidade da lasalocida, sendo que esta também não é genotóxica [45].

Em coelhos a lasalocida desencadeia toxicidade para os fetos, na medida em que afeta o desenvolvimento, enquanto que, em ratos não demonstrou ter algum efeito teratogénico [45].

De acordo com o *Committee for Medicinal Products for Veterinary Use (CVMP)*, doses elevadas de lasalocida podem desencadear neuropatia periférica em aves. Para além disso, em cães sujeitos à administração de uma dose intravenosa de 1mg/kg de peso corporal, observou-se inotropia positiva e conseqüente aumento do fluxo sanguíneo no coração e nos rins [46].

Bactérias Gram-negativas apresentam resistência à lasalocida [45].

O pó da lasalocida de sódio pode desencadear toxicidade local, no trato respiratório e pulmões, e toxicidade sistémica, noutros órgãos, e, apesar de causar irritação ocular a lasalocida apresenta toxicidade aguda dérmica baixa, não desencadeando irritação nem sensibilização cutânea. Contudo de acordo com o parecer do *Panel on Additives and Products or Substances Used in Animal Feed (FEEDAP)*, a exposição das pessoas que trabalham diretamente com este composto deve ser a mínima possível, tomando-se medidas adequadas [45].

4.5.1.2- Maduramicina

A maduramicina é o coccidiostático autorizado mais tóxico [33].

Ao administrar oralmente a ratos a maduramicina de amónio alfa, o principal composto excretado é um metabolito O-desmetilado, um derivado da maduramicina- α (64%), seguido da maduramicina- α inalterada (36%), ambos encontrados no fígado do rato. Quando se interrompe o tratamento, os níveis de resíduos rapidamente diminuem. Sendo assim, de acordo com o FEEDAP, uma percentagem da maduramicina ingerida é absorvida e a excreção é rápida [47].

A maduramicina não é mutagénica nem carcinogénica e apresenta atividade antibacteriana em bactérias gram-positivas [47].

De acordo com Sharma et al., 2005, houve um envenenamento por maduramicina, na Índia, de um grupo de 7 pessoas, que ingeriu 450 g de maduramicina (cerca de 65 g/pessoa), sendo que a ADI para a maduramicina é 0,001 mg/kg de peso corporal/dia. Duas horas após a ingestão as 7 pessoas começam a ter fraqueza nos 4 membros e músculos do tronco, bem como vômitos. Dois dias após a ingestão 2 das pessoas morreram com insuficiência respiratória e hipercalemia, tendo verificado tetraplegia precoce. 8 dias depois da exposição os 5 sobreviventes apresentavam polineuropatia com rbdomiólise. 8 a 10 dias depois da exposição, 4 dos sobreviventes desenvolveu insuficiência renal aguda, sendo que alguns

necessitaram de ventilação mecânica durante vários dias e a dor muscular só diminuiu 3 semanas após a exposição [33,48].

A maduramicina- α apresenta elevada toxicidade sistémica quando há exposição dérmica deste composto, sendo que de acordo com o FEEDAP é tóxica para ratos e ratinhos [47].

Quando administrado o Cygro 10G, o aditivo com 10 g de maduramicina/kg, autorizado para rações animais, o principal composto excretado é a maduramicina- α , sendo que é o resíduo marcador para pele/gordura e fígado [47].

Cygro 10G não é irritante para os olhos ou pele, nem causa sensibilização da pele, sendo que também não produz muita poeira. Contudo o contacto direto deve ser evitado visto que quando inalado apresenta elevada toxicidade sistémica. Para além disso, de acordo com o FEEDAP, se for inalado por seres humanos é potencialmente nocivo, sendo aconselhado a menor exposição possível deste aditivo pelos trabalhadores que administram as rações animais [47].

4.5.1.3- Monensina

As vias metabólicas da absorção da monensina em galinhas e perus são semelhantes às dos ratos. Em galinhas, uma percentagem da monensina ingerida é absorvida e a excreção é rápida, sendo que a principal via de excreção é as fezes, seguida da excreção biliar [49]. Grande parte da monensina ingerida é metabolizada, e origina diversos metabolitos desmetilados, oxidados e descarboxilados, sendo que a monensina inalterada corresponde a menos de 10% dos resíduos de monensina detetados. Alguns metabolitos da monensina são capazes de diminuir a atividade antibacteriana, anticoccidiana e cardíaca [50].

Após 8 horas da ingestão de monensina por galinhas e perus há excreção de 95% e 63%, respetivamente, de monensina inalterada. Nestes animais, a pele e gordura são os locais onde se encontram maiores concentrações de resíduos de monensina, seguindo-se o fígado. Estes resíduos são excretados maioritariamente em 24 horas, com a exceção da pele e gordura onde a excreção demora pelo menos até 5 dias [49].

A monensina apresenta toxicidade aguda quando administrada oralmente a ratos, ratinhos e coelhos. Quando em concentrações tóxicas, este composto pode causar hipoatividade, ataxia, fraqueza muscular e dispneia [50]. Este composto não apresenta carcinogenicidade nem genotoxicidade, e em ratinhos não apresenta efeitos reprodutivos ou teratogénicos

quando administrada em doses inferiores às tóxicas para as mães [33]. A monensina é eficaz contra bactérias gram-positivas [50].

No Homem, quando ingeridos 500 mg de monensina, desencadeia-se o aparecimento de rabdomiólise, insuficiência renal e cardíaca, com morte dentro de 11 dias após a ingestão. A intoxicação por monensina afeta principalmente os músculos esqueléticos e cardíacos, levando também à diminuição de leucócitos [50].

A monensina não é irritante para a pele nem causa sensibilização da pele, contudo a fórmula atual do aditivo Coxidin é irritante para os olhos. 50% da poeira presente neste aditivo consiste em partículas respiráveis, sendo que 24% da poeira é monensina de sódio. Sendo assim, o FEEDAP concluiu que há risco para a saúde das pessoas que trabalham diretamente com a administração deste composto, devido à exposição ocupacional por inalação, sugerindo que o uso deste composto nas quintas/produções seja em formato diluído, e que o uso do composto não diluído seja restrito às instalações onde são produzidas as rações [51].

4.5.1.4- Narasina

A narasina é metabolizada no fígado, onde se originam metabolitos polares. Para além disso é no fígado que se encontra a maior concentração dos resíduos deste composto, seguindo-se a gordura, os rins e os músculos. Em galinhas a eliminação deste composto do plasma e dos tecidos é rápida. A principal via de excreção é através das fezes, sendo que a eliminação total demora até 3-4 dias [50].

Os metabolitos da narasina são 20 vezes menos ativos que a monensina inalterada e esta apenas representa 5% dos resíduos totais encontrados no fígado [50,52].

A narasina não apresenta carcinogenicidade nem genotoxicidade [50,52], e em ratinhos não apresentou efeitos reprodutivos ou teratogénicos quando administrada às mães em doses inferiores às tóxicas [33].

A toxicidade oral aguda deste composto varia de acordo com a espécie. Quando administrada a cavalos a narasina é extremamente tóxica, enquanto que para ratinhos, ratos, porcos e coelhos é altamente tóxica e para galinhas é moderadamente tóxica. Quanto aos sinais de toxicidade, quando administrada oralmente, pode haver hipoatividade, ataxia, paresia dos membros, tremores e irritação ocular [50,53].

Contrariamente aos seus metabolitos, a narasina apresenta atividade antibacteriana, nomeadamente as bactérias gram-positivas [50,52].

A narasina é comercializada como agente coccidiostático único do aditivo Monteban, e em conjunto com nicarbazina no aditivo Maxiban (com 80g/kg de cada um desses coccidiostáticos) [52].

A administração simultânea de narasina e nicarbazina, em igual proporção, leva a uma maior quantidade de resíduos derivados de DNC no fígado, rim, músculo, gordura e pele/gordura em 20%, 35%, 42%, 21% e 4% (não significativo), respetivamente [52].

Depois de analisados os efeitos do uso de narasina em conjunto com nicarbazina, o FEEDAP concluiu que esta combinação não evidenciou nenhum aumento da toxicidade das duas substâncias, nem o aparecimento de efeitos teratogénicos. Contudo a administração simultânea destes dois compostos possibilita uma maior atividade coccidiostática quando comparado com o efeito proporcionado pelos dois compostos isoladamente [52].

A administração de Monteban a cavalos, perus e coelhos pode ser perigosa para a saúde dessas espécies, visto que a narasina é tóxica para esses animais, mesmo quando administrada em doses inferiores às utilizadas na prevenção de coccidiose nas galinhas. Para além disso, a administração simultânea de Monteban ou Maxiban (ou outros aditivos de coccidiostáticos ionóforos) com por exemplo a tiamulina, ou com certas substâncias medicinais (particularmente os macrólidos), pode ser uma contra-indicação [52,53].

A narasina é irritante para os olhos e é um sensibilizador da pele. Para além disso, o Maxiban é considerado um ligeiro irritante para a pele, um irritante para os olhos e um sensibilizador da pele. Cerca de 50% das partículas de poeira presentes no Maxiban são de dimensões respiráveis. Deste modo, as pessoas que trabalham diretamente com este composto devem reduzir a exposição ao mínimo possível e utilizar material de proteção adequado, como por exemplo máscaras [52].

4.5.1.5- Salinomicina

Uma percentagem da salinomicina ingerida é absorvida e a excreção é rápida. Para além disso, este coccidiostático é muito metabolizado. Estima-se que a salinomicina inalterada represente apenas uma pequena percentagem dos compostos excretados e dos compostos bioacumulados nos tecidos, cerca de 1% e 2% respetivamente. A restante parte corresponde aos diversos metabolitos da salinomicina. Nos tecidos os resíduos de salinomicina inalterada desaparecem em 24 horas após a ingestão [54]. Os metabolitos da salinomicina apresentam uma atividade reduzida, quando comparados com a salinomicina [55].

A salinomicina foi considerada não genotóxica, não mutagénica e não carcinogénica, sendo que também não apresenta efeitos teratogénicos, nem toxicidade para o embrião. Este composto apresenta atividade antibacteriana contra bactérias gram-positivas [54-56].

A salinomicina é tóxica para cavalos, outros equinos e perus, mesmo quando administrada em doses inferiores às utilizadas para o tratamento da coccidiose em galinhas. O aditivo Sacox, constituído por uma percentagem de salinomicina, apresenta toxicidade moderada [54].

A administração de salinomicina em simultâneo com certos antibióticos, como por exemplo a tiamulina pode ser uma contra-indicação [55].

A formulação do aditivo Sacox leva à redução da formação de poeira, contudo ainda apresenta a possibilidade de formação de alguma poeira. Para além disso, cerca de 10% das partículas apresentam tamanho entre 0,5 e 45 μm e 3% apresenta comprimento com menos de 5 μm (partículas respiráveis <10 μm). Contudo, é pouco provável que a poeira originada seja um perigo para a saúde das pessoas que trabalham diretamente com a produção deste aditivo. Todavia a exposição dos trabalhadores deve ser o mínimo possível [54].

Sacox é um possível irritante para a pele e olhos de coelhos, sendo que também pode causar sensibilização da pele e do trato respiratório. Contudo, não foi encontrado nenhum perigo tóxico por inalação deste aditivo [54,55].

4.5.1.6- Sempuramicina

As vias metabólicas da absorção da sempuramicina em galinhas e cães são semelhantes às dos ratos. Uma grande percentagem da sempuramicina ingerida é absorvida e muito metabolizada, sendo que as principais vias de excreção são as fezes e a bÍlis. No fÍgado, a sempuramicina inalterada é o principal resÍduo, representando 45% dos resÍduos totais, sendo que cada um dos 19 metabolitos representa menos de 10%. Por outro lado, nas fezes a sempuramicina inalterada representa apenas 16% dos resÍduos totais [26].

A sempuramicina não apresenta efeitos genotóxicos, mutagénicos ou carcinogénicos [26,33]. Contudo, este composto apresenta atividade antibacteriana contra bactérias gram-positivas [26].

Quando administrada em doses elevadas (1 mg / kg de peso corporal/dia), a sempuramicina pode levar a aumento da pressão arterial sistólica. Contudo, visto que o valor mais baixo identificado do nível de efeito adverso não observável (NOAEL) (0,125 mg / kg de

peso corporal/dia) é inferior aos das doses administradas, não há risco para o consumidor [26].

A administração de semduramicina em simultâneo com o antibiótico tiamulina pode ser uma contra-indicação. Todavia, a utilização simultânea destes dois compostos apenas origina efeitos negativos no desempenho, efeitos menos graves que os observados no uso simultâneo doutros coccidiostáticos com a tiamulina [26].

Não se consegue concluir se o aditivo Aviax, constituído por uma percentagem de semduramicina, é ou não irritante para os olhos e a pele, nem se pode causar sensibilização da pele. Porém considera-se que a exposição por inalação pode representar um risco grave para as pessoas que trabalham diretamente com este aditivo. Sendo assim a exposição deve ser o mínimo possível e deve utilizar-se máscaras de proteção [26,33].

4.5.2- Toxicidade: coccidiostáticos sintéticos

4.5.2.1- Decoquinato

O decoquinato é um coccidiostático cuja excreção ocorre maioritariamente pelas fezes, sendo que 82-87% do decoquinato administrado é excretado nas fezes, sob a forma de decoquinato inalterado. O decoquinato inalterado também é o maior resíduo encontrado nos tecidos, sendo que se observa no fígado e rim, no músculo, na pele e na gordura na ordem dos 19,6%, 23,9%, 31,2% e 76,5%, respetivamente [27].

O decoquinato não é carcinogénico nem genotóxico [57], sendo que também não apresenta efeitos teratogénicos, nem toxicidade para o embrião. Para além disso, este composto não apresenta atividade antibacteriana [27]. Quando administrado de acordo com as recomendações e nas concentrações estipuladas, não apresenta nenhum risco para o consumidor [27].

A administração deste aditivo em simultâneo com outros aditivos ou medicamentos não apresenta nenhuma incompatibilidade ou algum tipo de interação entre os compostos, com exceção da bentonite [27].

O Deccox é um aditivo das rações das galinhas, que contém 60 g/kg de decoquinato como substância ativa, que ajuda na prevenção da coccidiose [27]. O Deccox não é irritante para a pele e olhos, bem como não é um possível sensibilizador da pele. Para além disso, visto que a toxicidade e a exposição por inalação são relativamente baixas, não há grande risco para as pessoas que trabalham diretamente com este aditivo [27].

4.5.2.2- Diclazuril

Uma percentagem do diclazuril ingerido é absorvido. Contudo, apenas uma pequena parte do diclazuril absorvido é metabolizado. Deste modo o diclazuril inalterado é o principal resíduo presente nos tecidos, representando 70 a 90% dos resíduos totais [58].

O diclazuril possui uma toxicidade aguda muito baixa. Este composto não é genotóxico, carcinogénico nem mutagénico. Em doses não tóxicas para a mãe, o diclazuril não causa nenhum efeito tóxico, não afetando a reprodução ou o desenvolvimento embrionário [58].

O Clinacox é um aditivo para rações animais, com 0,5% de composição em diclazuril, que atua como substância ativa, na prevenção da coccidiose [59]. Este aditivo não tem ação antibacteriana e não deve ser usado em simultâneo com outro coccidiostático [58].

O diclazuril não causa praticamente nenhuma irritação nos olhos e pele, tem a capacidade de causar sensibilização da pele. Deste modo, não há risco para as pessoas que trabalham diretamente com este composto, se a devidas medidas de proteção forem seguidas [58].

4.5.2.3- Halofuginona

Apesar de ser absorvida, grande parte da halofuginona é excretada, na forma de halofuginona inalterada, nas fezes de galinhas e perus [29]. Após 48 horas do tratamento, a halofuginona inalterada corresponde a 60% dos resíduos totais presentes nos tecidos do músculo, gordura e rim, e 52,6% no tecido do fígado [60]. De acordo com o painel do FEEDAP, a metabolização da halofuginona é provavelmente muito idêntica em perus, galinhas e ratos. Do mesmo modo, a quantidade de resíduos deste composto nos tecidos e órgãos de galinhas e perus são praticamente iguais [29].

A utilização simultânea deste composto com outros aditivos ou medicamentos não provoca efeitos indesejados ou incompatibilidade [29].

O FEEDAP não conseguiu concluir se a utilização da halofuginona como aditivo de rações pode constituir um risco para a saúde do consumidor, visto que não conseguiu concluir sobre o potencial genotóxico e mutagénico deste composto [29].

Nas maiores doses administradas, a halofuginona não tem atividade antibacteriana [29].

O Stenorol é um aditivo para rações animais, com 0,6% de composição em halofuginona, que atua como substância ativa, na prevenção da coccidiose. Aquando da exposição por inalação, via cutânea ou ocular, este composto apresenta toxicidade, sendo que é também muito irritante para os olhos e pele, bem como um sensibilizador da pele. Deste modo, e visto

que não se provou que a halofuginona não possui potencial genotóxico, a exposição por inalação é um risco para as pessoas que trabalham diretamente com esta substância [29].

4.5.2.4- Nicarbazina

Quando ingerida, a nicarbazina divide-se em dois componentes, HDP e DNC, cujo percurso metabólico é distinto. Deste modo não existe nicarbazina inalterada como resíduos da ingestão de nicarbazina [61].

Os resíduos de HDP são em menor quantidade que os de DNC [61]. A DNC é muito metabolizada, sendo a DNC inalterada excretada principalmente através das fezes, em valores de cerca de 46%. Por outro lado, a HDP é excretada principalmente através da urina, sob a forma de HDP inalterada, em cerca de 90% [52].

Assim que se termina o tratamento, há uma rápida diminuição de DNC nos tecidos. O fígado é o tecido alvo e em perus, galinhas e ratos a metabolização é idêntica [61].

Após a ingestão, o equilíbrio metabólico é alcançado em 6 dias, e o fígado é o tecido alvo [52].

A nicarbazina não é genotóxica, não apresenta atividade antibacteriana e, quando administrada nas doses recomendadas, não constitui um risco para a saúde do consumidor. A utilização simultânea deste composto com outros aditivos não provoca efeitos indesejados ou incompatibilidade [61].

A nicarbazina não é irritante para a pele e olhos nem apresenta potencial de sensibilização da pele. Para além disso a toxicidade por inalação é baixa e devido ao baixo potencial de formação de poeiras, o risco para as pessoas que trabalham diretamente com este composto é insignificante [61].

Contudo o consumidor será exposto principalmente à DNC e, em pequena percentagem, à HDP, ao invés de ser exposto à nicarbazina. Deste modo o cálculo da ADI destes dois compostos é importante, particularmente no caso da DNC, visto que é o principal resíduo proveniente do uso da nicarbazina como aditivo nas rações animais [52].

4.5.2.5- Robenidina

A robenidina é absorvida e rapidamente excretada, sendo que 80% é excretada nas fezes e 20% na urina, até cerca de 24 horas. A robenidina inalterada é o principal composto excretado nas fezes, cerca de 70-80%. Na urina a robenidina inalterada não é detetada [31].

A robenidina não é genotóxica [31] e apresenta atividade antibacteriana contra as bactérias gram-positivas [62].

O Cycostat é um aditivo para rações animais, com 66 g de robenidina/kg, usado na prevenção da coccidiose [31]. Quando administrado nas doses recomendadas, a utilização de robenidina como aditivo nas rações animais não representa nenhum risco para a saúde dos consumidores. A utilização simultânea deste composto com outros aditivos ou medicamentos não provoca efeitos indesejados ou incompatibilidade [62].

Visto que este aditivo possui somente uma pequena percentagem de partículas com dimensões inaláveis, e pouco potencial para criar poeiras, sendo que é um produto granular, a exposição, das pessoas que trabalham diretamente com este composto, deverá ser reduzida. A robenidina não é irritante para a pele e olhos e não apresenta potencial de sensibilização da pele. Deste modo, devido à baixa exposição e toxicidade por inalação, o risco para as pessoas que trabalham diretamente com este composto é insignificante [62].

5- Legislação Europeia

5.1- Autorização do uso de coccidiostáticos como aditivos na alimentação animal e como medicamentos veterinários na UE

O uso de coccidiostáticos como aditivos alimentares destinados à alimentação de animais produtores de géneros alimentícios, foi autorizado na EU a partir de 1970, com a entrada em vigor da Diretiva N.º 70/524/CEE, de 23 de Novembro de 1970, relativa aos aditivos na alimentação para animais, que posteriormente foi revista e reestruturada com a entrada em vigor do Regulamento (CE) N.º 1831/2003 do Parlamento Europeu e do Conselho de 22 de Setembro de 2003 relativo aos aditivos destinados à alimentação animal [14]. De acordo com este último regulamento, somente os antibióticos com efeitos coccidiostáticos ou histomonostáticos poderão ser autorizados como aditivos para animais produtores de géneros alimentícios [4] e somente os coccidiostáticos não autorizados para alimentação animal é que poderão ser usados em humanos [14].

Segundo o estipulado no Regulamento (UE) N.º 37/2010, relativo a substâncias farmacologicamente ativas e a respetiva classificação no que respeita aos limites máximos de resíduos nos alimentos de origem animal, para além dos 11 coccidiostáticos autorizados como aditivos, o uso de alguns medicamentos com efeito coccidiostático, para fins terapêuticos, ou seja, como medicamentos veterinários, também é regulado e permitido. Sendo assim, de modo

a tratar formas clínicas de coccidiose, quer em espécies frequentemente afetadas por esta infeção, quer nas restantes espécies (com exceção das aves poedeiras) é autorizado o uso de amprolium, decoquinato, diclazuril, halofuginona, toltrazuril [5,12].

Para além disso, de acordo com esse regulamento, os coccidiostáticos podem ser administrados como MUVs a espécies em que o seu uso não é autorizado como aditivo, espécies onde a coccidiose não é frequente.

O cloropidol, capaz de inibir a respiração mitocondrial do parasita, e as sulfonaminas, capazes de inibir a via do ácido fólico, são dois exemplos de compostos com efeito coccidiostático utilizados como MUVs [5,21].

A entidade responsável pela avaliação científica dos aditivos utilizados na alimentação de animais é a Autoridade Europeia para a Segurança dos Alimentos (EFSA), sendo responsável pela análise da segurança do aditivo para os animais, para o ser humano e para o ambiente.

Na EU, para se poder proceder a um pedido de autorização de aditivos alimentares para alimentos para animais, o requerente tem de pertencer à EU e o pedido tem de ser entregue à Comissão Europeia (CE), que informa os estados-membros e direciona o pedido para a EFSA. Aquando da formalização do pedido, o requerente deve disponibilizar à EFSA todos os dados referidos no Artigo 7.º do Regulamento (CE) N.º 1831/2003, como por exemplo, a identificação do aditivo e a respetiva explicação do processo de fabrico, a metodologia para o estudo dos resíduos, a forma e as condições em que serão utilizados, a esquematização de como poderá ser feita a posterior monitorização, bem como, todos os estudos efetuados acerca da utilização do aditivo e dos impactos que podem advir da mesma. Caso o parecer da EFSA seja positivo, permitindo a autorização, este deve ainda incluir a sugestão, caso aplicável, dos LMRs do aditivo, nos géneros alimentícios de origem animal a impor, de forma a assegurar a segurança e saúde dos consumidores [4].

Qualquer tipo de autorização de colocação no mercado terá um período máximo correspondente a 10 anos. De forma a poder renovar a autorização concedida, referente à comercialização e utilização dos aditivos, o requerente deve enviar uma cópia da autorização inicial, bem como um documento com todos os resultados referentes à pós-comercialização e todos os novos dados sobre o aditivo, sugerindo, se aplicável, alterações ou complementos à utilização desse aditivo.

Posteriormente, poderão ser impostas regras de execução do artigo citado que devem, caso seja necessário, estabelecer as normas aplicáveis aos aditivos destinados à alimentação

de animais produtores de alimentos, diferenciando-as das normas aplicáveis aos aditivos destinados aos restantes tipos de animais.

Qualquer produtor, com intenção de administrar rações com coccidiostáticos como aditivos aos seus animais, terá de os comprar aos fabricantes de alimentos compostos autorizados para esse fim, facilitando a rastreabilidade e o controlo do uso destes compostos por parte das autoridades competentes.

5.2- LMRs estabelecidos

De forma a assegurar que a utilização de coccidiostáticos na produção animal não constitui um risco para a saúde pública, é necessária uma correta avaliação do risco, que passa pela realização de estudos farmacocinéticos e toxicológicos em animais de laboratório cujos resultados devem acompanhar o pedido de autorização de introdução de um coccidiostático no mercado, bem como o estabelecimento de LMRs adequados.

O estabelecimento de LMRs visa assegurar que os resíduos presentes no produto final, pronto a ingerir, não provocam risco de toxicidade para o consumidor. Os LMRs estabelecidos para os coccidiostáticos, bem como os intervalos de segurança (IS), estão devidamente legislados pela EU (Tabela 5).

O estabelecimento dos LMRs é calculado através dos valores da ADI que se baseia em dados toxicológicos (ADI_{tox}) ou microbiológicos (ADI_{micro}). A ADI representa a quantidade de resíduos nos tecidos edíveis, cujo consumo diário, durante toda a vida, não provoca risco para a saúde humana, e é expressa em $\mu\text{g}/\text{kg}$ peso corporal/dia ou mg/kg peso corporal/dia [66].

Tabela 5 - LMRs e IS para cada coccidiostático, tendo em conta a espécie alvo e os tecidos edíveis, de acordo com o Regulamento 2377/1990 revogado pelo Regulamento 470/2009 e de acordo com os limites estabelecidos pelos Regulamentos 124/2009 e 610/2012. [63-65]

Coccidiostáticos	Espécie Alvo	LMR	IS
Monensina	Frango de engorda	25 µg/kg de pele + gordura; 8 µg/kg de fígado, rim e músculo.	1 dia
	Perus (máx. 16 semanas)		1 dia
	Galinhas de Postura	2 µg/kg de pele + gordura, rim e músculo; 8 µg/kg de fígado.	1 dia
	Ovos	2 µg/kg.	-
Salinomicina	Frango de engorda	150 µg/kg de fígado; 40 µg/kg de rim; 15 µg/kg de músculo, 150 µg/kg de pele/gordura.	0 dias
	Galinhas de Postura	5 µg/kg de fígado; 2 µg/kg de rim; 2 µg/kg de músculo, 2 µg/kg de pele/gordura.	0 dias
	Ovos	3 µg/kg.	-
Narasina	Frango de engorda	50 µg/kg para todos os tecidos.	1 dias
	Ovos	2 µg/kg.	-
Lasalocida	Frango de engorda	20 µg/kg de músculo; 100 µg/kg de pele e tecido adiposo, fígado; 50 µg/kg de rim.	5 dias
	Perus (máx. 12 semanas)		5 dias
	Galinhas de Postura	-	5 dias
	Faisões, galinhas-pintadas, codornizes e perdizes, exceto a criação de aves	-	5 dias
	Ovos	5 µg/kg.	-
Maduramicina	Frango de engorda	150 µg/kg de fígado, pele e gordura; 100 µg/kg de rim; 30 µg/kg de músculo.	3 dias
	Perus (máx. 16 semanas)	-	5 dias
	Ovos	12 µg/kg.	-
Semduramicina	Frango de engorda	-	5 dias
Robenidina	Frango de engorda	800 µg/kg de fígado; 350 µg/kg de rim; 200 µg/kg de músculo; 1300 µg/kg de pele/gordura.	5 dias
	Perus	400 µg/kg de pele/gordura; 400 µg/kg de fígado; 200 µg/kg de rim; 200 µg/kg de músculo.	5 dias
	Coelhos de criação	200 µg/kg para fígado e rim;	5 dias

Coccidiostáticos	Espécie Alvo	LMR	IS
	Coelhos de engorda	100 µg/kg para todos os outros tecidos.	5 dias
	Ovos	25 µg/kg.	-
Halofuginona	Frango de engorda	Não aplicável	5 dias
	Perus (máx. 12 semanas)	Não aplicável	5 dias
	Ovos	6 µg/kg.	-
Diclazoril	Frango de engorda	1500 µg/kg de fígado; 1000 µg/kg de rim; 500 µg/kg de músculo; 500 µg/kg de pele/gordura.	-
	Perus		-
	Galinhas-pintadas		-
	Galinhas de postura	-	-
	Ovos	2 µg/kg.	-
Decoquinato	Frango de engorda	10000 µg/kg de fígado e pele + gordura; 800 µg/kg de rim; 500 µg/kg de músculo.	-
Nicarbazina	Frango de engorda	15000 µg de DNC/kg de fígado; 6000 µg de DNC/kg de rim; 4000 µg de DNC/kg para músculo e pele/gordura.	1 dia
	Ovos	300 µg/kg.	-

Contudo, há substâncias que “*podem exercer efeitos farmacológicos em humanos em níveis de exposição abaixo dos necessários para produzir efeitos toxicológicos / microbiológicos*”. Neste caso, a ADI é calculada com base no valor da concentração mais elevada, que não provoca efeitos negativos observáveis, o nível sem efeitos adversos observáveis (NOAEL), obtendo-se uma ADI farmacológica.

Todavia, o estabelecimento da ADI farmacológica só deve ser obrigatório quando forem identificados efeitos farmacológicos. A ADI geral para a substância deve ser definida como a ADI mais baixa calculada, de entre a ADI farmacológica, toxicológica e microbiológica [66].

Pode ainda calcular-se a ADI recorrendo à concentração mais baixa que provoca efeitos adversos multiplicando por um fator de segurança (FS) ou por um fator de incerteza adequado. Para este cálculo, tem-se em conta que o peso médio de uma pessoa é 60 kg.

Em animais não alvo, geralmente usa-se o nível de efeito observável mais baixo (LOAEL), recorrendo-se a dados clínicos, visto que geralmente não há dados que permitam o correto cálculo do NOAEL.

Nas Tabelas 6 e 7 encontram-se especificados os valores da ADI para cada coccidiostático ionóforos e sintético, respetivamente, expressos em mg/kg de peso corporal/dia [41].

Tabela 6 - ADI para cada coccidiostático ionóforos, de acordo com os pareceres da EFSA. [41]

Ionóforos	SEM	MAD	MON	LAS	NAR	SAL
ADI (mg/kg de peso corporal/dia)	0,00125	0,001	0,003	0,005	0,005	0,005

Tabela 7 - ADI para cada coccidiostático sintético, de acordo com os pareceres da EFSA. [41]

Sintéticos	DEC	DIC	HAL	NIC	ROB
ADI (mg/kg de peso corporal/dia)	0,075	0,029	0,00003	0,02	0,0375

Na Diretiva 2009/8/CE foi legislado quais as condições de utilização e os animais alvo para cada tipo de coccidiostático. Deste modo, nesta diretiva enumeram-se as limitações do seu uso (restringindo o uso a uma faixa etária ou a uma categoria específica do animal), bem como, os respetivos limites máximos (em mg/kg de alimento, para um teor de humidade de 12%). São também mencionados os LMRs que podem estar presentes em alimentos para animais para os quais a sua utilização não foi autorizada, cujo aparecimento pode derivar por exemplo de contaminação cruzada numa fábrica que produza vários tipos de rações, não podendo ultrapassar 50% dos limites máximos estabelecidos para os alimentos para animais [67].

No Regulamento (CE) N.º 124/2009, alterado pelo Regulamento (UE) N.º 610/2012, encontram-se os LMRs de coccidiostáticos em géneros alimentícios resultantes da contaminação cruzada inevitável destas substâncias em alimentos não visados para animais [64,65].

No Anexo I do relatório da Comissão ao Conselho e ao Parlamento Europeu, de 2008, sobre a utilização de coccidiostáticos e histomonostáticos como aditivos destinados à alimentação animal, constam, especificadamente, todas as informações necessárias para cada aditivo autorizado, destinado à alimentação animal: os LMRs, quando aplicáveis, e o Intervalo de segurança (Intervalo obrigatório entre a administração de um medicamento a um animal e o seu abate para consumo humano), bem como as espécies alvo. O incumprimento do IS conduz ao aparecimento de resíduos nos géneros alimentícios, podendo representar um problema para a saúde do consumidor [14].

5.3-Incumprimentos: processos para a sua verificação e punições aplicáveis

Sendo os coccidiostáticos antimicrobianos por excelência, e devido à grande produção avícola a nível mundial e nacional, é essencial fazer um controlo e monitorização regular dos resíduos de coccidiostáticos em géneros alimentícios, em particular em carne de aves.

De acordo com a Diretiva 96/23/CE, cada Estado-membro (EM) tem de assegurar a existência de um plano de controlo dos resíduos, de modo a que a nível interno se assegure a produção e/ou comercialização de produtos alimentícios de qualidade e seguros para os consumidores. Estes controlos servem para garantir que as normas regulamentadas estão a ser cumpridas, assegurando a segurança e saúde pública. Deste modo, cada EM, tem de ter um único plano nacional de controlo plurianual integrado, sendo que em Portugal o Plano Nacional de Controlo de Resíduos (PNCR), coordenado pela DGAV, desempenha essa função, garantindo o cumprimento do Regulamento (CE) N.º 178/2002, que determina os princípios e normas gerais da legislação alimentar, cria a Autoridade Europeia para a Segurança dos Alimentos e estabelece procedimentos em matéria de segurança dos géneros alimentícios [68]. O Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária (INIAV) é o laboratório nacional de referência.

A Autoridade de Segurança Alimentar e Económica (ASAE) é, em Portugal, a autoridade nacional encarregada de fiscalizar os produtos, de setores alimentares e não alimentares, de forma a assegurar que cumprem os requisitos impostos na legislação comunitária, bem como, de avaliar e comunicar os riscos, para a saúde pública, que podem advir da cadeia alimentar, estando as suas funções descritas no Decreto-Lei N. 194/2012 [69,70]. Deste modo, é a entidade que estabelece ligação com as entidades análogas dos restantes estados-membros, bem como, com a EFSA, a nível europeu e internacional.

Para além disso, a ASAE, também desempenha um papel fulcral, na medida em que é a entidade responsável pela realização de alguns controlos, como, por exemplo, o Plano Nacional de Colheita de Amostras (PNCA), que averiguam a conformidade dos produtos, avaliando, por exemplo, os LMRs, que têm iguais ou inferiores aos máximos estipulados.

Para assegurar que os controlos elaborados por cada EM são efetivamente corretos, e que estão de acordo com os planos nacionais de controlos plurianuais, deve ser realizada, pelos peritos da Comissão Europeia (CE) em conjunto com os peritos dos EM, uma auditoria geral que pode ser complementada com auditorias e inspeções específicas.

Caso sejam encontradas ilegalidades relacionadas, por exemplo, com a venda e uso de antimicrobianos, e desrespeito dos LMRs ou do intervalo de segurança, o Decreto-Lei N. 151/2005 prevê a aplicação de coimas ou sanções acessórias tendo em conta a gravidade de cada contraordenação [71].

6- Ocorrência em amostras de aves

Encontra-se descrita na literatura científica a presença de resíduos de coccidiostáticos em géneros alimentícios, tendo inclusive alguns detetado coccidiostáticos em valores violativos, ou seja em concentrações superiores aos LMRs estabelecidos (Tabela 8).

Entre 2007 e 2010, na Polónia, no âmbito do PNCR para o controlo de resíduos de coccidiostáticos, de entre 3718 amostras analisadas, foram detetadas em 64 amostras de aves (frango, peru e ovos) violativas. Estas continham resíduos de nicarbazina, lasalocida, maduramicina, salinomicina, semduramicina e robenidina em concentrações superiores aos LMRs, com uma frequência de 2,4% em fígado de frango e 4,5% em ovos. A nicarbazina foi o coccidiostático encontrado em maiores concentrações, ultrapassando 2000 µg/kg no fígado de frango, contudo a lasalocida foi o composto detetado com maior frequência, e em valores relativamente elevados. Os restantes coccidiostáticos detetados apresentavam concentrações inferiores a 100 µg/kg, em fígado de frango e ovos, com exceção de uma amostra de ovo detetada com semduramicina a 180 µg/kg [72].

Num estudo realizado em 2016 na China foram testadas mais de 100 amostras, tendo sido detetado a maduramicina em 6 amostras de frango e 2 amostras de ovos, em concentrações de 0,67-5 µg/kg e 0,55-0,87 µg/kg, respetivamente. Verificou-se a ocorrência de salinomicina em 5 amostras de ovos, em concentrações que variaram entre 0,35 e 1,17 µg/kg. A frequência de deteção destes coccidiostáticos foi inferior a 7% para ovos e inferior a 6% para frango [73].

Num estudo piloto realizado em 2016 no Canadá, foram analisadas 127 amostras de tecido muscular, fígado e rim de animais, entre elas 41 amostras de músculo de frango. Nas 41 amostras de frango foram detetadas monensina, decoquinato, lasalocida, narasina e DNC (nicarbazina), em concentrações de 2 µg/kg, 150 µg/kg, 1,5-14 µg/kg, 4 µg/kg e 190 µg/kg, respetivamente. A frequência de amostras de músculo de frango detetadas com coccidiostáticos foi de 14,6% [74].

Yoshikawa *et al.*, em 2017, detetaram, no Japão, resíduos de 37 MUVs, entre eles os coccidiostáticos nicarbazina, diclazuril, salinomicina, maduramicina e lasalocida. A

maduramicina e o diclazuril foram detetados em 3 amostras, de entre 26 amostras de frango frito, em concentrações que variaram entre 0,5 e 3 µg/kg. A lasalocida foi detetada em 5 amostras, de entre 20 costeletas de frango não frito, em concentrações que variaram entre 0,8 e 2,1 µg/kg. Nicarbazina, diclazuril, salinomicina, maduramicina e lasalocida foram detetados em 17 amostras de entre 39 músculo de frango, em concentrações que oscilaram entre 0,4 e 35,0 µg/kg. A frequência de deteção dos compostos analisados variou entre 11,5 e 43,6% [75].

Na Grécia, em 2019, no âmbito do PNCR para o controlo de resíduos de coccidiostáticos, foram analisadas, 82 amostras, entre elas 29 amostras de tecido de aves. Apenas uma amostra apresentou resíduos em concentrações superiores aos LMRs, tendo sido detetada a salinomicina, em concentrações de a 53,5 µg/kg, o que representa uma frequência de não conformidade de 3,4%. O decoquinato, a salinomicina e a maduramicina foram os coccidiostáticos encontrados com maior frequência, em 13 amostras. Foram identificadas amostras com mais do que um coccidiostático, sendo que o decoquinato e a salinomicina foram a combinação de coccidiostáticos mais vezes detetada [76].

Num estudo realizado entre 2012 a 2017, em 202 amostras, 189 amostras de músculo de frango e 151 amostras de ovos, verificou-se uma frequência de contaminação que variou entre 14,7% a 48,7%. Sendo que no músculo de frango e nos ovos a frequência foi de 24,8% e 15,9%, respetivamente. A lasalocida e a narasina foram os coccidiostáticos ionóforos mais frequentes. Os coccidiostáticos sintéticos foram os detetados com maior frequência, destacando-se a nicarbazina e o diclazuril. Contrariamente a outros estudos, onde se detetaram vários coccidiostáticos na mesma amostra, neste estudo nenhuma amostra de carne apresentou mais do que um coccidiostático, bem como nenhum dos resíduos detetados ultrapassou os LMRs estabelecidos [77].

Em 2006, Rokka *et al.*, detetaram resíduos de lasalocida, em concentrações de 3,0 µg/kg, e narasina, em concentrações de 1,4 µg/kg, apenas numa amostra de ovo [78].

De acordo com o Relatório de 2018 sobre os resultados da monitorização de resíduos de medicamentos veterinários e outras substâncias em animais vivos e produtos de origem animal, 0,16% das amostras analisadas de coccidiostáticos eram não conformes, sendo detetadas em vaca (0,03%), porco (0,01%), aves (0,17%) e ovos (0,65%). Estes resultados denotaram uma diminuição na quantidade de amostras de aves não conformes para coccidiostáticos, diminuição que se tem verificado desde 2009. Estes resultados, podem estar relacionados pela implementação da Diretiva 2009/8 / CE da Comissão, que estabelece níveis máximos de transferência inevitável de coccidiostáticos em alimentos não visados [79]

De acordo com o Regulamento (CE) N.º 178/2002 de 28 de janeiro, é necessário um sistema de alerta rápido que inclua os géneros alimentícios e os alimentos para animais. Neste sentido, foi criado o Sistema de Alerta Rápido para Alimentos e Rações (RASFF), que é um sistema que permite um rápido fluxo de informação entre os EM, a CE e a EFSA, reportando notificações relativas a alimentos que possam causar riscos para a saúde, sendo a CE a responsável pela gestão desta rede [80].

Em 2020, foram registadas 2 notificações relacionadas com coccidiostáticos no RASFF. Uma das notificações é referente a uma pré-mistura de ração de peru contaminada com narasina e nicarbazina, sendo que as amostras continham 10000 mg/kg e 23000 mg/kg, respetivamente, quando os LMR são de 50 mg/Kg para cada composto.

Tabela 8 - Frequência (%) e níveis (µg/kg) de coccidiostáticos em carnes de aves reportados na literatura científica.

País	Coccidiostáticos analisados	Metodologia analítica	Amostra analisada	N.º de amostras analisadas	Frequência (%)	Teores Min-Máx (µg/kg)	Referência
Polónia	NIC, LAS, MAD, SAL, SEM, ROB	LC-MS/MS	Fígado de frango	2011	2,4	8,3-2800	Olejnik et al., 2011 [72]
Polónia	NIC	LC-MS/MS	Fígado de peru	307	0,3	580	Olejnik et al., 2011 [72]
Polónia	NIC, LAS, MAD, SAL, SEM	LC-MS/MS	Ovos	312	4,5	6,3-320	Olejnik et al., 2011 [72]
China	MAD, SAL	LC-MS/MS	Ovos	> 100	<7	0,35-1,17	Ha et al., 2016 [73]
China	MAD	LC-MS/MS	Frango	> 100	<6	0,67-5	Ha et al., 2016 [73]
Canadá	MON, DEC, LAS, NAR, DNC	LC-MS/MS	Músculo de frango	41	14,6	1,5-190	Matus et al., 2016 [74]
Japão	MAD, DIC	LC-MS/MS	Frango frito	26	11,5	0,5 - 3	Yoshikawa et al., 2017 [75]
Japão	LAS	LC-MS/MS	Costeletas de frango não frito	20	25	0,8 - 2,1	Yoshikawa et al., 2017 [75]
Japão	NIC, DIC, SAL, MAD e LAS	LC-MS/MS	Músculo de frango	39	43,6	0,4 - 35,0	Yoshikawa et al., 2017 [75]
Grécia	SAL	LC-MS/MS	Tecido de aves	29	3,4	53,5	Dasenaki e Thomaidis et al., 2019 [76]
Itália	NIC, LAS, DIC, ROB, NAR, DEC	LC-MS/MS	Músculo de frango	189	24,8	1,0 - 516	Rolla et al., 2019 [77]
Itália	NIC, MAD, ROB, MON DIC, SAL, DEC	LC-MS/MS	Ovos	151	15,9	1,0 - 1002	Rolla et al., 2019 [77]

7- Possível mitigação do risco de toxicidade para o Homem

7.1- Processamentos culinários

As formas como se confeccionam os alimentos, bem como o tempo de confecção, podem influenciar as substâncias neles presentes, bem como a maneira como estas estão disponíveis para a absorção intestinal humana, alterando o próprio alimento, na medida em que por exemplo aumenta a biodisponibilidade de certos nutrientes. Os processos de cocção funcionam como fatores inibitórios do crescimento de microrganismos, como por exemplo bactérias. No caso particular da carne, os processos de confecção permitem que esta apresente uma textura mais macia, sendo mais fácil de mastigar e processar pelo organismo humano, visto que, por exemplo, o processamento recorrendo a calor desencadeia a desnaturação das proteínas, melhorando também as propriedades organolépticas de acordo com o método selecionado [81]. Dentro do conceito “cozinhar o alimento” estão contidos vários tipos de processamento dos alimentos, como por exemplo, ferver, cozer a vapor, assar, grelhar ou fumar.

Outro método de processamento bastante selecionado, atualmente, pelos consumidores, é a cocção ou aquecimento dos alimentos recorrendo a um micro-ondas. O micro-ondas permite um rápido e fácil aquecimento, quando comparado com outros métodos. Estes aparelhos operam através de um magnetron capaz de originar ondas eletromagnéticas na faixa de micro-ondas, que, ao ser transferidas para um alimentos, provocam vibração das suas moléculas de água, de forma muito eficiente, o que gera calor capaz de aquecer o alimento. Contudo, esse calor não se dissemina de forma igual por todo o alimento, havendo variações no quanto cada parte do alimento é aquecida, visto que há vários fatores intervenientes no processo, como por exemplo as propriedades elétrico-químicas e a espessura e forma dos alimentos. A utilização de micro-ondas pode originar vários problemas a nível da saúde do consumidor, visto que vai haver zonas do alimento que podem não atingir uma temperatura ideal para a correta confecção. Quando se fala em confecção de carne através deste método, este problema torna-se particularmente importante na medida em que o facto de haver partes do alimento que não atingem uma temperatura elevada o suficiente para a sua confecção pode desencadear o desenvolvimento bacteriano nestes produtos que serão depois consumidos [82].

De acordo com Sobral *et al.*, 2018, os processos de cocção dos alimentos afetam comprovadamente os nutrientes neles presentes, sendo que a fritura, de entre os processamentos estudados, apresentou maior influência nesse efeito. Concluíram que os

alimentos cozinhados apresentaram uma menor concentração de resíduos de pesticidas e de resíduos da maioria dos antibióticos, sendo que as tetraciclinas foram as que apresentaram uma maior redução. Contudo, durante o processamento esses resíduos possivelmente são degradados podendo originar metabolitos secundários indesejados cujo efeito no consumidor ainda é pouco conhecido, podendo haver algum nível de toxicidade [81].

De modo a evitar a formação de possíveis contaminantes provenientes dos processos de cocção, deve controlar-se a temperatura e tempo do processamento, usar marinadas com elevada concentração de antioxidantes e, especificamente ao grelhar recorrendo ao carvão, deve-se evitar, durante a cocção, a formação e queda no carvão de gotas de gordura que potencialmente contribuem para a formação de compostos nocivos como aminas aromáticas heterocíclicas (AAHs) e hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (HAPs) [81].

Alguns antimicrobianos já demonstraram tolerância ao calor, subsistindo nos alimentos mesmo quando sob o efeito de temperatura, como por exemplo a neomicina que já foi encontrada em ovos após a cocção, levantando mais preocupações visto que poderão possivelmente continuar a exercer algum efeito, mesmo depois do processo térmico [83].

Rose, *et al.*, em 1997, verificaram que a lasalocida em condições neutras e ácidas se mantinha estável quando sujeita ao calor, mas em condições básicas se mantinha instável. Relativamente ao processamento dos alimentos com resíduos de lasalocida, observou-se uma perda de 59%, 27% e <5% em omelete, ovos mexidos e músculo de frango, respetivamente, concluindo que, no músculo de frango, os processos culinários avaliados não interferiram significativamente na quantidade de lasalocida presente [84].

Tarbin, *et al.*, em 2005, analisaram a presença de resíduos de nicarbazina, particularmente a DNC, em músculo de frango e ovos, em soluções aquosas e em soluções lipídicas (óleo), de modo a avaliar o efeito dos processos culinários nestes resíduos. Observaram que, quando submetida a tratamento térmico em soluções aquosas a concentração de DNC diminuía rapidamente. A carne de frango grelhada ou frita apresentou uma redução na quantidade de DNC entre 22% e 31%. Contudo ao analisar o óleo, depois da fritura, os vestígios de DNC contidos não eram significativos. Estes resultados apoiam a hipótese de que a libertação de líquidos da carne, durante a confeção da carne, não é acompanhada pela libertação de resíduos de nicarbazina e que esta poderá ser pouco solúvel em gordura (relacionar com as propriedades físico-químicas). A nicarbazina pode originar p-nitroanilina, quando sujeita a tratamento térmico, e a diminuição observada para este coccidiostático pode dever-se à formação deste composto mutagénico [85].

Bacila *et al.*, em 2018, procederam à avaliação dos processamentos térmicos, nomeadamente cozer, grelhar, cozinhar em micro-ondas, fritar e assar, na concentração de DNC em peito de frango pronto a consumir. Observaram a degradação de DNC aos 10, 30 e 2 minutos quando a carne era cozida, grelhada e cozinhada no micro-ondas, respetivamente. O método mais eficiente foi a cozedura tendo a concentração de DNC diminuído 69%, enquanto que, para os restantes processamentos, a degradação de DNC foi de cerca de 55%. Segundo este artigo, a diminuição da concentração de DNC poderá ser justificada por degradação hidrolítica deste composto [86].

Num estudo mais recente, Bacila *et al.*, em 2019, comprovou-se que a temperaturas perto de 200°C a DNC se mantém estável, contudo ao atingir 252°C este decompõem-se em 4-nitrofenil isocianato e 4-nitroanilina (também designada de p-nitroanilina [88]), apresentando grande termolabilidade para as temperaturas mais elevadas [87].

De acordo com Sobral *et al.*, 2020, as concentrações dos resíduos de narasina em carne de frango diminuem 23% e 62%, quando cozinhada em micro-ondas e forno, respetivamente. Os resíduos de DNC diminuem 29% e 28% quando a carne de frango é cozinhada em micro-ondas e forno, respetivamente [89].

Os processos culinários a que os alimentos são sujeitos, além de terem impacto na sua componente nutricional, podem promover a degradação ou remoção de alguns contaminantes químicos, nomeadamente dos coccidiostáticos. Deste modo, para além dos benefícios comprovados da cocção dos alimentos, como por exemplo na redução do conteúdo microbiano presente nestes, há ainda muitas variáveis, acerca desta temática, pouco estudadas, particularmente quando se fala nos coccidiostáticos e nos seus resíduos presentes nos alimentos prontos para consumo humano. Deste modo é essencial compreender qual o efeito dos processamentos culinários nas concentrações destes medicamentos no produto final.

7.2- Marinadas

A marinada é uma técnica utilizada antigamente com a finalidade de conservar os alimentos mas que hoje em dia se usa particularmente para melhorar e intensificar os sabores e texturas destes, sendo, regra geral, utilizada para as carnes. Consiste em deixar o alimento, por um período de tempo variável, consoante o tipo e tamanho deste, envolvido num conjunto de temperos. De entre dos vários compostos que se podem usar, geralmente utiliza-se sempre um que seja ácido, normalmente vinho, vinagre ou limão, acompanhado com ervas aromáticas e especiarias podendo também utilizar-se vegetais, como cebola, alho, aipo. Para além disso,

quando se usa esta técnica culinária é típico a adição de sal. Deste modo, uma marinada poder ter infinitas conjugações de constituintes, podendo apresentar uma composição variável e podendo inclusive, consoante os ingredientes selecionados, interferir com a capacidade de retenção da água do alimento [90].

Para além de melhorar as propriedades organoléticas, a utilização de marinadas pode inibir a produção de HAPs e AAHs [81], compostos com potencial cancerígeno produzidos involuntariamente durante a confeção de carne. De acordo com Neves *et al.*, 2021, a adição de especiarias particularmente a pimenta e outras com compostos fenólicos, bem como a adição de cebola e alho à carne antes desta ser confeccionada, fritar, grelhar ou assar, reduz significativamente a formação de HAPs e AAHs, visto que estes compostos possuem capacidade antioxidante e permitem a transferência de eletrões [91].

De entre as várias ervas aromáticas utilizadas para a preparação de marinadas, há algumas que se destacam, pela elevada frequência de utilização na dieta Mediterrânea, como por exemplo a folha de louro e a salsa que, para além de melhorarem as propriedades organoléticas dos alimentos, a nível de sabor e cheiro, possuem propriedades capazes de, por exemplo, desempenhar um papel antimicrobiano e antioxidante.

O louro (*Laurus nobilis* L.), nomeadamente a sua folha, é uma erva aromática que para além dos vários usos a nível medicinal, é utilizada numa diversidade de pratos culinários, tendo especial importância no tempero de carnes. Já alguns estudos demonstraram que, os extratos e óleos essenciais desta planta, possuem atividade antioxidante e antimicrobiana [92], devido em parte à sua composição em compostos fenólicos [93]. Os óleos essenciais de *Laurus nobilis* L. são compostos maioritariamente por 1,8-cineole e a sua utilização já provou ser responsável pela redução de populações de *Campylobacter jejuni* em carne de frango fresca [94], bem como no controlo do crescimento de *Listeria monocytogenes* e *Escherichia coli* em carne picada de frango [95]. Para além de 1,8-cineole, os óleos essenciais do loureiro apresentam maioritariamente sabineno, α e β -pinenos e compostos de linalol, que podem prevenir a contaminação de alimentos, apresentando atividade antifúngica moderada a alta [96].

A salsa (*Petroselinum crispum*) é uma erva aromática que, para além dos vários usos clínicos devido, por exemplo, à sua capacidade hepatoprotetora, antidiabética, antibacteriana, antifúngica, analgésica, diurética, hipotensora e gastro protetora [97], é também muito utilizada na dieta mediterrânea, rica em compostos biologicamente ativos, como os minerais e as vitaminas [98]. Na composição destas folhas há também um elevado teor em compostos fenólicos [99]. Também apresenta uma boa bioatividade contra algumas bactérias [98] e fungos

[99]. Os óleos essenciais provenientes das folhas destas plantas são ricos em apiol e miristicina, que também estão relacionados com a capacidade antioxidante desta planta [98].

Em resumo, estas ervas aromáticas, quando ingeridas, interferem de forma positiva com o organismo humano, possibilitando o auxílio no tratamento de várias doenças, estando extensamente descritos todos os seus componentes e propriedades.

De acordo com Sobral *et al.*, 2020, a adição de ervas aromáticas e cerveja a hambúrgueres de carne de frango leva a uma influência negativa na diminuição dos resíduos de narasina. Ao adicionar ervas/cerveja não ocorre degradação de DNC, e conseqüentemente não há formação e exposição do consumidor a p-nitroanilina (um composto tóxico e potencialmente nocivo), contudo a exposição do consumidor à DNC é possível, podendo igualmente representar um risco [89].

Deste modo, é importante percebermos, neste contexto de resíduos de coccidiostáticos em carne de frango e peru, se a utilização de marinadas, compostas pelas ervas aromáticas mencionadas, antes da cocção, terá algum efeito significativo na redução ou não das concentrações destes compostos na carne.

8- Métodos analíticos para a detecção, quantificação e identificação de resíduos de coccidiostáticos

Para se elaborar uma correta avaliação dos resíduos de coccidiostáticos é necessário, aquando da seleção das metodologias analíticas, seguir-se a Decisão da Comissão 2002/657/CE de 12 de Agosto de 2002, relativamente ao desempenho de métodos analíticos e à interpretação de resultados. Deste modo, para que haja qualidade e comparabilidade entre os vários estudos acerca deste tema, deve optar-se sempre por métodos validados, de acordo com os critérios de desempenho [100].

Visto que, os resíduos destes compostos normalmente se encontram em quantidades residuais, sendo também necessário geralmente analisar um número elevado de amostras, utilizam-se dois tipos de metodologias analíticas diferentes. Numa primeira fase, é realizada a triagem das amostras através de metodologias analíticas, que permite detetar rapidamente a presença ou ausência de uma substância ou classe de substâncias, sendo metodologias simples, rápidas, sensíveis, relativamente baratas e que permitem a análise simultânea de um grande número de amostras. Deste modo, são selecionadas as amostras que potencialmente apresentam não conformidades e que posteriormente são analisadas por uma segunda metodologia analítica para a sua identificação e quantificação [100].

As amostras potencialmente não conformes são depois analisadas recorrendo a um método de confirmação, que possibilita, com elevada, sensibilidade exatidão e precisão para os níveis dos LMRs legislados, a correta identificação da(s) substância(s) alvo, bem como a sua quantificação [100] [Figura 6].

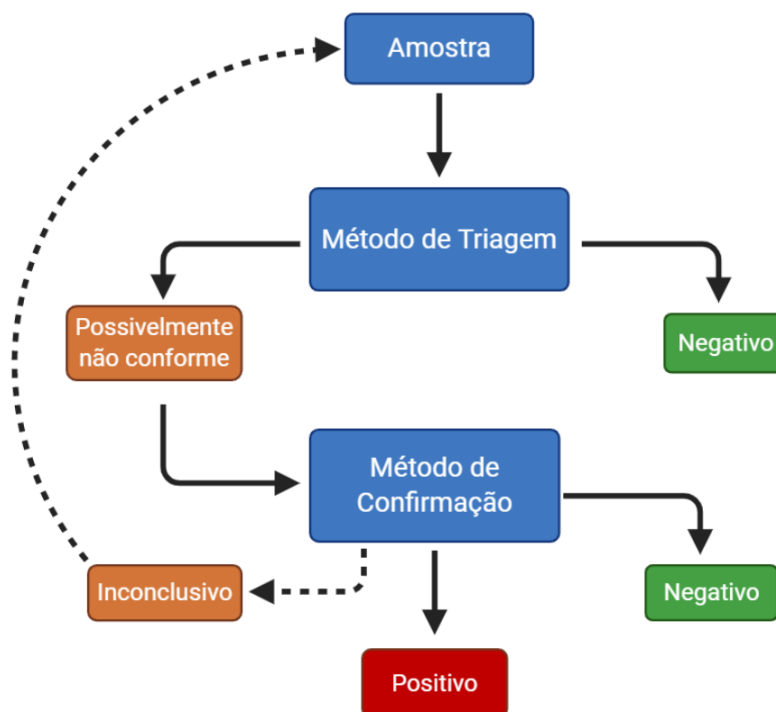


Figura 6 - Esquema ilustrativo da sequência metodológica a seguir para uma correta avaliação de resíduos de coccidiostáticos.

8.1 - Amostra: preparação e extração

A Decisão 98/179/CE de 23 de Fevereiro de 1998, estabelece regras para a colheita das amostras oficiais a utilizar na pesquisa de determinadas substâncias e seus resíduos nos animais vivos, e respetivos produtos. A forma como é efetuada a colheita das amostras e o seu transporte tem influência nas substâncias químicas, que potencialmente estarão presentes, alterando o resultado final [101]. Para além da colheita das amostras, também a sua preparação é de extrema importância, estando diretamente ligada com a qualidade do resultado analítico.

A extração e as metodologias analíticas aplicadas devem sempre ser adequadas aos compostos que se pretendem analisar, tendo em consideração a concentração a que o analito se encontra no alimento a analisar, bem como as suas propriedades. Para a extração de coccidiostáticos geralmente recorre-se à adição de solventes orgânicos ou misturas hidro-orgânicas, com, por exemplo, acetonitrilo, metanol e acetona. Este processo de extração permite uma elevada recuperação, minimizando as perdas que podem ocorrer nesta fase [13].

Contudo, quando da extração do analito pretendido, geralmente há outras substâncias indesejadas que podem ser co-extraídas, podendo dificultar ou mesmo impedir a correta análise, sendo necessário a sua exclusão. Deste modo, há a necessidade de proceder à um procedimento de purificação das amostras, depois da extração, sendo uma das técnicas mais utilizadas a extração em fase sólida (SPE) [13]. Esta metodologia permite a separação líquido-sólido, em que especificamente o analito fica absorvido na fase sólida para a qual tem mais afinidade, quando comparado com a afinidade que tem com a matriz, possibilitando a eliminação das substâncias não desejadas [102]. Apesar de alguns autores referirem que, por a SPE, poder apresentar potencialmente maior oscilação dos valores de recuperação relativamente à extração líquido-líquido [102], apresenta várias vantagens. É uma técnica seletiva, sensível e robusta, permitindo baixos limites de detecção e quantificação, e pode, em algumas situações, ser automatizada, diminuindo o tempo de análise [103].

Visto que, por vezes, as substâncias que se pretendem analisar estão presentes em quantidades muito reduzidas, podendo estar perto ou abaixo do limite de detecção, é comumente realizada uma etapa na qual se procede evaporação do extrato sob fluxo de azoto, de modo a concentrar o extrato e alcançar a sensibilidade necessária para este tipo de análise [13].

Barreto *et al.*, em 2017, desenvolveram um método multi-resíduo para a determinação de 14 resíduos de coccidiostáticos em músculo de aves e ovos, utilizando cromatografia líquida com detecção por massa em *tandem* através de um quadrupolo linear e armadilha de iões (LC-QqLIT-MS/MS). Este método mostrou ser rápido e simples, quantitativo e confirmatório. Neste estudo utilizaram-se 3 padrões internos marcados com isótopos estáveis (DNC-D8, DECQ-D5 e ROBE-D8), de modo diminuir os efeitos da matriz. Sendo que as matrizes utilizadas neste estudo, músculo e ovos de aves, são ricas em proteínas e lípidos e portanto complexas, foi necessário realizar várias etapas de extração e purificação de modo a obter extratos adequados para serem injetados no sistema cromatográfico. Contudo quando a purificação é realizada a baixas temperaturas, o tempo de preparação da amostra é significativamente reduzido, simplificando o método. Sendo assim, neste estudo optou-se por fazer uma extração líquido-líquido a baixas temperaturas, sendo uma metodologia mais fácil e rápida que o SPE convencional, bem como mais barata. A metodologia descrita obteve bons resultados, apresentando uma exatidão de 73-115% e uma precisão de 0,4-21%. Deste modo Barreto *et al.*, 2017 realçam a importância de encontrar o equilíbrio entre custos, rapidez e qualidade analítica [104].

Chang *et al.*, em 2019, desenvolveram um método analítico capaz de identificar simultaneamente 20 coccidiostáticos, em 8 matrizes distintas, incluindo músculo de frango e ovos, recorrendo a cromatografia líquida com detecção por massa em *tandem* (LC-MS/MS). Realizaram uma extração com acetonitrilo/metanol (95: 5, v / v) contendo ácido fórmico a 1%, 5 g de acetato de sódio e 6,0 g de sulfato de magnésio anidro, seguida de uma purificação usando n -hexano saturado com acetonitrilo (ACN), de modo a facilitar a eliminação compostos lipídicos. A metodologia descrita mostrou ser eficaz na detecção dos compostos analisados, apresentando elevada precisão e exatidão para várias matrizes [10].

8.2- Métodos de triagem

De entre as técnicas de triagem existentes são comumente selecionados as técnicas imunológicas, visto que, contrariamente aos métodos microbiológicos, possuem uma elevada seletividade e rapidez na obtenção dos resultados pretendidos [100]. As técnicas imunológicas, com recurso a anticorpos específicos, funcionam tendo em conta as interações antígeno-anticorpo, inerentes a cada analito [105]. As técnicas imunoenzimáticas *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (ELISA) podem ser aplicadas de várias formas como por exemplo em ensaios imunocompetitivos diretos, apresentando um desempenho variável de acordo com a quantidade de anticorpo e antígeno marcado, bem como o tempo de incubação de cada fase [105]. Apesar de possibilitar a análise simultânea de muitas amostras, sendo também um processo rápido, não é aconselhada como método de triagem em estudos multi-resíduo, dado que não é capaz de apresentar uma resposta igual para um conjunto de compostos da mesma família, apresentando sensibilidades muito diferentes para cada tipo de composto [100].

Resumidamente, as técnicas imunoenzimáticas são rápidas, simples, seletivas e sensíveis (podendo apresentar limites de detecção inferiores aos LMRs) e possibilitam a análise simultânea de várias amostras, identificando as possíveis não conformidades, sendo, por isso, amplamente utilizadas, no entanto apresentam algumas desvantagens acima elencadas.

8.3- Métodos de Detecção e Quantificação

De modo a obter a correta confirmação e quantificação existem vários métodos cromatográficos que podem ser selecionados de acordo com a substância a analisar, como por exemplo a cromatografia líquida (LC), seguindo-se sempre as indicações da Decisão da Comissão 2002/657/CE, de 12 de Agosto de 2002 [100].

A LC é muito utilizada devido à capacidade de separar, identificar, quantificar e isolar substâncias químicas específicas e muito semelhantes entre si. A LC é composta por uma fase estacionária através da qual as partículas vão passar, devido à ação de uma fase móvel, líquida, onde são solúveis. Para identificar/diferenciar cada composto tem-se em conta a forma como estes se distribuem entre as duas fases, considerando a velocidade de migração na fase móvel como fator chave [100].

Metodologias analíticas como a cromatografia líquida com deteção por ultravioleta (LC-UV), fluorimétrica (FD) ou eletroquímica, e principalmente cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massa (LC-MS) têm sido amplamente utilizadas [100].

Sendo que grande parte dos coccidiostáticos apresentam um cromóforo UV nativo, a técnica LC-UV é muitas vezes a selecionada, apesar de que para a análise dos coccidiostáticos ionóforos haja a necessidade de se executar um passo extra de derivatização química.

Os métodos multi-resíduo permitem a identificação exata de vários coccidiostáticos ao mesmo tempo, sendo ideais para estudos que pretendem reconhecer e quantificar coccidiostáticos presentes em matrizes complexas. Contudo, o desenvolvimento destas técnicas pode ser bastante difícil na medida em que apresentam uma grande variedade química, e que são necessários métodos extremamente sensíveis e com reduzido limite de deteção (LODs) e de quantificação (LOQs).

A utilização de LC-MS/MS na determinação de MUVs de elevado peso molecular e/ou termosensíveis, só foi possível com o aparecimento de técnicas de ionização à pressão atmosférica, nomeadamente a ionização por eletronebulização (ESI). Deste modo, utilizando a ESI, facilmente se analisa qualquer tipo de moléculas, sejam elas pequenas ou grandes, hidrofóbicas ou hidrofílicas, ajustando-se às necessidades da análise de resíduos de MUVs [105]. A LC-MS/MS apresenta grande multifuncionalidade, sensibilidade e especificidade, na medida em que, permite a deteção de substâncias em quantidades inferiores aos LMRs legislados, apresentando-se como uma metodologia analítica de referência para a deteção e identificação dos resíduos de coccidiostáticos em alimentos ou rações, sendo o método mais selecionado [76].

De acordo com a Decisão da Comissão 2002/657/CE, de 12 de Agosto de 2002, “o tempo de retenção relativo da substância a analisar, deve corresponder ao da solução de calibração com uma tolerância de $\pm 2,5\%$ para a LC” [100]. Para além disso, a decisão citada menciona que sempre que a medição não seja efetuada com o recurso à técnica de varrimento total, a confirmação dos compostos mencionados no grupo B do anexo I da Directiva 96/23/CE, de

entre os quais consta os anticoccídeos, pode ser realizada com base num sistema de pontos, sendo necessário, pelo menos, 3 pontos de identificação. É recomendado também a utilização de limite de decisão ($CC\alpha$) e da capacidade de deteção ($CC\beta$) de forma a determinar a aplicabilidade do método para o controlo de resíduos. O limite de decisão corresponde ao limite no qual se pode decidir que uma amostra não está em conformidade, com uma probabilidade de erro de α . Por outro lado, a capacidade de deteção corresponde à menor concentração de um analito em que este pode ser detetado, identificado e quantificado, numa amostra com uma probabilidade de erro de β [78,100].

O Regulamento de Execução (UE) 2021/808 da Comissão de 22 de março de 2021, relativo ao desempenho dos métodos analíticos para os resíduos de substâncias farmacologicamente ativas utilizadas em animais produtores de géneros alimentícios e à interpretação dos resultados, bem como aos métodos a utilizar na amostragem, revoga as Decisões 2002/657/CE e 98/179/CE.

No artigo 5, no capítulo I do anexo 1, no capítulo 2 do anexo 1 e no anexo 2, desse mesmo regulamento, com data de efeito a 10/06/2021, está, respetivamente, especificada como deve ser realizada a interpretação dos resultados, quais são os critérios de desempenho e outros requisitos para os métodos analíticos, como proceder à validação de uma metodologia, depois da entrada em vigor deste regulamento, e, quais os procedimentos de amostragem e tratamento oficial das amostras [106].

A tabela 9 agrupa algumas metodologias analíticas presentes na literatura científica, publicadas entre 2017 e 2019, e relativas ao controlo de resíduos de coccidiostáticos em matrizes alimentares, apresentando como fator comum a utilização de LC para a deteção e quantificação dessas substâncias, facultando a obtenção da estrutura do analito de modo a possibilitar a correta identificação do mesmo. As metodologias apresentadas foram validadas de acordo com o descrito na Decisão da Comissão 2002/657/CE, de 12 de Agosto de 2002 [100].

Buiarelli *et al.*, 2017, desenvolveram um método LC-MS/MS sensível, rápido e robusto, para deteção simultânea de 7 analitos (5 compostos e dois metabolitos) em ovos. Deste modo, foram examinados os possíveis fatores críticos e foram testadas diferentes métodos de purificação, de modo a averiguar quais as melhores condições e parâmetros para uma correta e precisa extração e purificação, para uma boa triagem e confirmação. A composição da fase móvel também foi relevante, na medida em que influencia a resolução do pico cromatográfico e o comportamento de retenção do analito na coluna cromatográfica, sendo que o melhor desempenho, em termos de fase móvel, ocorreu com 0,1%- ácido fórmico em acetonitrilo,

em eluição gradiente, com adição de hidróxido de amónio (0,08%). Inicialmente, utilizou-se LC-UV, mas uma vez que os LOQs eram superiores aos LMRs, teve-se de recorrer à LC-MS/MS, um método capaz de proporcionar limites de quantificação mais baixos [12].

No estudo de Yoshikawa *et al.*, em 2017, foi desenvolvida uma metodologia por LC-MS, para a determinação de 37 compostos, incluído alguns coccidiostáticos como a lasalocida, maduramicina, diclazuril e a nicarbazina em frango processado. Uma correta otimização da metodologia analítica é fundamental quando se pretende elaborar métodos multi-resíduos, já que os vários compostos podem apresentar propriedades físico-químicas muito distintas. Para além dos compostos a analisar, o facto das matrizes serem complexas, como no caso de alimentos processados (que para além do alimento em si pode apresentar outras substâncias provenientes do processamento, como por exemplo gordura), faz com que possam interferir com a extração dos analitos. Deste modo, neste estudo fez-se uma extração com acetato de etilo seguido de acetonitrilo, visto que realizar a extração em duas fases permitiu a extração de analitos em amostras com elevado teor em lípidos. Segundo o autor a metodologia desenvolvida em que os valores de quantificação foram de 0,2-1,0 µg/kg e os valores de precisão oscilaram entre 1 e 15%, é eficaz [75].

Dasenaki e Thomaidis *et al.*, em 2019, desenvolveram um método de confirmação, simples, sensível e eficaz, para a determinação de 16 coccidiostáticos em tecido animal e ovos, através de cromatografia líquida de interação hidrofílica com deteção por espectrometria de massa em *tandem* (HILIC-MS/MS). Previamente foi realizada uma extração sólido-líquido com acetonitrilo seguida de purificação por SPE dispersivo, que permitiu extratos mais limpos e melhores recuperações. Ao utilizar HILIC, verificou-se uma maior sensibilidade e melhor eficiência de ionização, possibilitando tempos de retenção curtos. Esta metodologia apresentou elevada sensibilidade, apresentando LOQs e LODs entre 0,004 – 0,560 µg/kg para todos os analitos analisados (sendo que os LMRs legislados mais baixos para as matrizes em estudo são de 2 µg/kg), proporcionando resultados confiáveis e robustos [76].

Rusko *et al.*, em 2019, desenvolveram um método multi-resíduo sensível e seletivo, recorrendo a cromatografia líquida com deteção por espectrometria de massa de alta resolução Orbitrap (LC-Orbitrap-HRMS), de modo a determinar 17 coccidiostáticos em aves e ovos. Procedeu à extração com acetonitrilo, seguida de purificação a temperaturas moderadamente baixas (0°C), pré-concentração, reconstituição e filtração [107].

Apesar de serem necessários vários passos extensivos de purificação em algumas amostras alimentares, como descrito pelos trabalhos acima referidos, a utilização da LC-MS/MS tem várias vantagens que compensam. Resumidamente, os estudos apresentados na

Tabela 9 satisfazem os critérios de exatidão, sensibilidade, precisão e especificidade necessários para as metodologias a utilizar para os controlos de rotina destes resíduos nos géneros alimentícios.

Tabela 9 - Metodologias analíticas reportadas na literatura científica relativas à determinação de coccidiostáticos em aves.

Tipo de matriz	Coccidiostáticos	Extração/Purificação	Deteção e Quantificação	LOD (µg/kg)	LOQ (µg/kg)	Exatidão	Precisão	Autor
Ovos	clazuril, DIC, ROB, NIC, toltrazuril (e os seus 2 metabólitos)	Extração sólido-líquido e purificação	LC-MS/MS <u>Coluna:</u> Phenomenex C ₁₈ (5 µm, 150 mm x 2,1 mm) <u>Fase móvel:</u> ácido fórmico aquoso a 0,1% (A) e Hidróxido de amónio (0,08%) (B)	CCα: 2,2 – 320,0 µg / kg	CCβ: 2,6 – 350,0 µg / kg	Recuperação: 80% (62% foi o mínimo para a robenidina e 95% foi o máximo para o toltrazuril)	2,9 – 14,7% Repetibilidade: 4,1 – 13,0% Reprodutibilidade intralaboratorial: 6,4 – 14,1%	[12]
Frango frito, costeleta de frango não frito e músculo de frango	37 compostos pertencem, incluindo LAS, MAS, MON, NAR, SAL, SEM, DEC, DIC, NIC	Extração ácida (SLE com acetato de etilo e acetoneitrilo)	LC-MS/MS <u>Coluna:</u> InertSustainSwift C ₁₈ (2,1 mm i.d. x 150 mm, 5 µm; GL Sciences) <u>Fase móvel:</u> 0,1% de ácido fórmico em 10 mmol / L de acetato de amónio (A) e metanol (B)	Não aplicável	0,2 – 1,0 µg / kg	Recuperação: 70 – 105%	Repetibilidade: 1 – 11% Reprodutibilidade intralaboratorial: 1 – 15%	[75]
Músculo de frango e ovos	LAS, MAD, MON, NAR, SAL, SEM, ROB, DIC, toltrazuril, trimetoprima, clopidol, amprólio, diaveridina e NIC	Extração líquido-líquido com acetoneitrilo	LC-QqLIT-MS/MS <u>Coluna:</u> Poroshell 120 EC-C ₁₈ acoplada a uma coluna C ₁₈ <u>Fase móvel:</u> gradiente de água e acetoneitrilo	10% do LMR	25% do LMR	73 – 115%	0,4 – 21%	[104]
Músculo de animais (frango, porco, bovino, coelho) e ovos	LAS, amprólio, MON, NAR, MAD, ROB, DEC, NIC, clopidol, HAL, etopabato, diaveridina, arprinocida, DIC, SEM e nigericina.	Extração sólido-líquido com acetoneitrilo e SPE dispersivo	HILIC-MS/MS <u>Coluna:</u> ACQUITY UPLC BEH HILIC <u>Fase móvel:</u> acetoneitrilo (A) e formato de amónio com ácido fórmico (B)	0,004 – 0,560	0,004 – 0,560	79,1% – 118%	Músculo: 5,3 – 20% Ovos: 6,4 – 17%	[76]
Músculos de frango, porco, vaca e peixe;	20 compostos, entre eles o buquinolato, clopidol, closantel, DEC,	Acetoneitrilo / metanol	LC-MS/MS	Não aplicável	2 – 5 µg / kg	Recuperação no músculo	Músculo de frango:	[10]

Tipo de matriz	Cocciostáticos	Extração/ Purificação	Detecção e Quantificação	LOD (µg/kg)	LOQ (µg/kg)	Exatidão	Precisão	Autor
ovos de galinha; leite de vaca; vísceras de porco.	diaveridina, DIC, dimetridazol, etopabato, HAL, imidocarbe, isometamidio, levamisol, metronidazol, NIC		<u>Coluna:</u> Agilent Poroshell 120SB C ₁₈ (2,7 mm, 3,0 mm x 150 mm) <u>Fase móvel:</u> metanol (com 0,1% de ácido fórmico) e formato de amônio 5 mM			de frango: 75,1 – 118,9%	Precisão intra dia: 1,7 – 40,5% Precisão interdia: 3,4-43,3%	
Músculo de frango e ovos	Amprolium, clopidol, DEC, MON, nequinato, toltrazuril, toltrazuril sulfona, e toltrazuril sulfóxido, DIC, LAS, SAL, HAL, MAD, NAR, NIC, ROB e SEM	Extração com 20 ml de acetoneitrilo	LC-HRMS <u>Coluna:</u> Kinetex C ₁₈ <u>Fase móvel:</u> água, acetoneitrilo e metanol	Ovos: CCα: 2,2 – 336 µg/kg Músculo de frango: CCα: 2,64 – 589 µg/kg	Ovos: CCβ: 2,58 – 401 µg/kg Músculo de frango: CCβ: 3,74 – 749 µg/kg	Ovos: 94,1 – 105,8% Músculo de frango: 91,6 – 105,7%	Ovos: 5,2 – 21,3% Músculo de frango: 5,2 – 20,4%	[107]

9- Conclusão

9.1- Considerações Finais

A coccidiose é uma zoonose de extrema importância no contexto mundial e nacional visto que, como referido, a carne de aves, frango e peru, representa uma grande parcela do consumo de carne quer mundial, quer em Portugal.

Sendo assim, os coccidiostáticos são sem dúvida de extrema relevância neste contexto, pelos vários fatores apontados, como por exemplo, devido ao aparecimento constante de coccidiose nas produções intensivas de aves, sendo imprescindível o seu uso de modo a garantir a saúde animal e a produtividade económica.

Todavia, a sua utilização pode trazer consequências negativas, nomeadamente devido ao desenvolvimento de resistência aos coccidiostáticos e à possibilidade de ocorrerem resíduos destes compostos nos géneros alimentícios. Neste sentido, é essencial existirem programas de vigilância contínuos, que permitam a recolha de dados sobre o uso de coccidiostáticos, bem como da presença dos seus resíduos nos géneros alimentícios. Sendo assim, o desenvolvimento de novas e melhores metodologias analíticas para a sua deteção e quantificação tem uma relevância que não deve ser subestimada.

A comunicação do risco sobre a utilização destes compostos é essencial, sendo importante falar na prevenção e na utilização racional dos coccidiostáticos pelo setor pecuário.

Para além disso, compreender como esses resíduos, em diferentes circunstâncias, podem impactar o ser humano, os animais e o ecossistema é neste momento uma questão de saúde pública.

Para que se possa reduzir o uso de coccidiostáticos pelo setor pecuário, de forma a melhorar a sustentabilidade e qualidade dos alimentos, tem de se ter em consideração o fator económico bem como a saúde pública e a segurança alimentar.

Deste modo, a redução da quantidade de coccidiostáticos administrados como aditivos nas rações, que pode levar a perdas económicas no setor pecuário, vai desencadear o aumento dos preços dos géneros alimentícios finais e, se o preço dos alimentos for muito elevado, muitos consumidores não os poderão comprar. Contudo, esta redução pode assegurar a segurança alimentar e por consequência a saúde pública. Todos estes fatores, quando ponderados em conjunto, numa perspetiva de risco-benefício, possibilitarão a redução do uso de coccidiostáticos em animais produtores de géneros alimentícios, de forma a não pôr em causa a saúde da população, assegurando sempre o bem-estar animal.

Este tipo de esforço coletivo irá garantir a proteção da saúde pública e assegurar a eficácia futura destes aditivos/medicamentos utilizados em medicina veterinária [Figura 7].

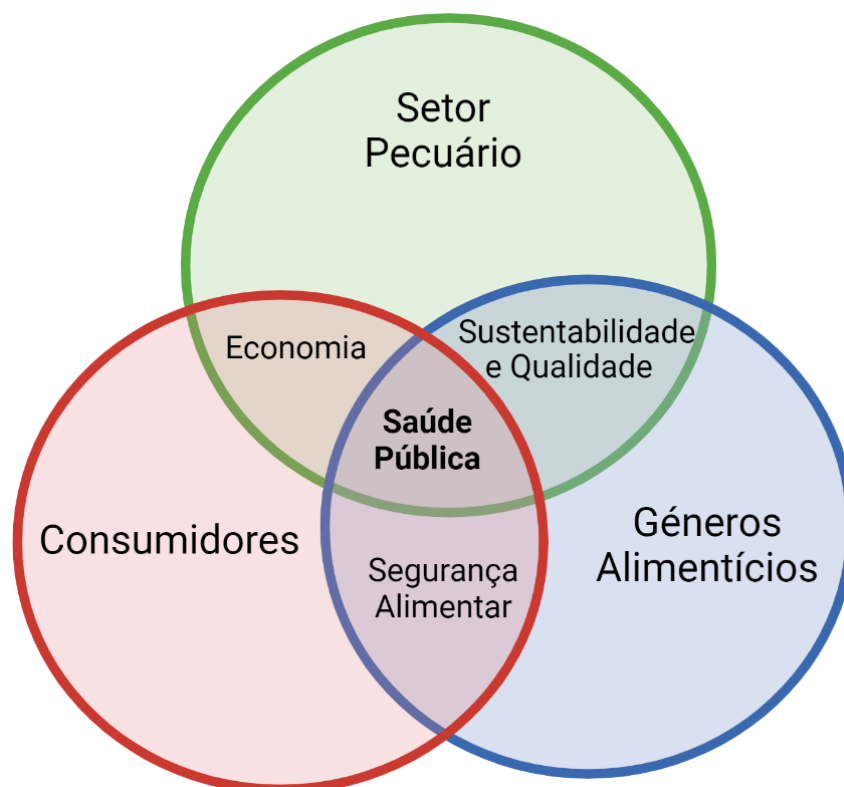


Figura 7 - Esquema representativo dos vários fatores envolvidos na redução do uso de coccidiostáticos.

Este trabalho demarca a importância de uma procura constante de novas evidências científicas acerca dos coccidiostáticos, visto que o seu uso tem um impacto direto na saúde, sendo essencial uma utilização consciente e adequada destas substâncias na produção animal, em particular na produção de aves.

Para além disso, este trabalho realça a importância de controlos periódicos visto que, com os conhecimentos atuais, não podemos eliminar completamente a utilização dos coccidiostáticos pois traria sérias implicações para saúde humana e poria em risco o fornecimento de alimentos para a população. Deste modo, desenvolver novas e melhores metodologias alternativas à utilização dos coccidiostáticos, para prevenção da coccidiose em aves, parece ser imperativo.

Concluindo, esta temática é extremamente relevante num contexto atual, sendo importante no conceito de uma só saúde e imprescindível para a saúde pública, visto que para assegurar a saúde humana é também essencial assegurar a saúde ambiental e animal.

9.2- Perspetivas para o futuro

A pouca informação disponível na literatura científica sobre alguns aspetos relacionados com o uso dos coccidiostáticos em aves, no controlo de coccidiose, demonstra que ainda é uma área emergente, e que é premente a realização de mais estudos.

Sendo a resistência aos coccidiostáticos um dos principais problemas sobre o seu uso, a procura por novas técnicas alternativas capazes de prevenir a coccidiose é de primordial importância, de modo a podermos reduzir a sua utilização em aves.

O risco de toxicidade deve ser sempre gerido tendo em conta os LMRs legislados, que devem ser atualizados de acordo com as novas evidências científicas. Para além da monitorização dos resíduos de coccidiostáticos presentes nos géneros alimentícios, obrigatória a nível da EU, por forma a garantir a defesa da saúde humana, é também importante a monitorização da quantidade de rações medicamentosas administradas aos animais.

Devem ser desenvolvidos mais estudos sobre possíveis medidas de mitigação do risco, a serem implementadas. Nomeadamente, como é que processos de cocção e das marinadas, podem interferir com a ocorrência de resíduos de coccidiostáticos em carnes de aves, uma temática ainda pouco descrita na literatura científica. Deste modo, estudos sobre a termolabilidade dos coccidiostáticos podem ser úteis, na medida em que, permitem uma melhor compreensão sobre a forma como o calor influencia as propriedades químicas dos coccidiostáticos, a sua degradação, e conseqüentemente a sua presença nos géneros alimentícios.

Por outro lado, apesar dos processos de cocção poderem degradar determinados compostos antimicrobianos, esta aparente degradação, e conseqüente diminuição de concentração dos compostos no alimento final confeccionado, pode na verdade resultar na formação de produtos de degradação [81]. Deste modo, a avaliação da presença de produtos de degradação é essencial para a correta caracterização do risco dos coccidiostáticos. Como foi referido, a DNC quando exposta a tratamentos térmicos, é degradada formando entre outros compostos a p-nitroanilina, um composto tóxico e potencialmente nocivo para o consumidor [87].

Em suma, é relevante, no futuro, elaborarem-se mais estudos que colmatem estas lacunas presentes no conhecimento científico atual.

10- Referências

- [1] ONU News. (2019, April 1). *População mundial deve aumentar para 9,7 bilhões em 2050*. <https://news.un.org/pt/story/2019/04/1666621>
- [2] Aarestrup, F. (2005). Veterinary Drug Usage and Antimicrobial Resistance in Bacteria of Animal Origin. *Basic & clinical pharmacology & toxicology*. 96. 271-81. Doi:10.1111/j.1742-7843.2005.pto960401.x.
- [3] ONU News. (2009, September 23). *FAO pede aumento de 70% na produção alimentar até 2050*. <https://news.un.org/pt/story/2009/09/1317451-fao-pede-aumento-de-70-na-producao-alimentar-ate-2050>
- [4] Regulamento (CE) N.º 1831/2003 - Relativo aos aditivos destinados à alimentação animal. *Jornal Oficial da União Europeia*. 268:2003) 29–43.
- [5] Regulamento (UE) N.º 37/2010 da Comissão de 22 de Dezembro de 2009 relativo a substâncias farmacologicamente activas e respectiva classificação no que respeita aos limites máximos de resíduos nos alimentos de origem animal. *Jornal Oficial da União Europeia*. 2010) 11–36.
- [6] FAO. (n.d.). *FAOSTAT*. Retrieved April 29, 2021, from <http://www.fao.org/faostat/en/#compare>
- [7] FAO. (2020). *MEAT MARKET REVIEW*. <http://www.fao.org/3/cb2423en/CB2423EN.pdf>
- [8] INE (Instituto Nacional de Estatística-Statistics Portugal). (2021, May 28). Base de dados do portal do INE. https://www.ine.pt/xportal/xmain?xpid=INE&xpgid=ine_indicadores&indOcorrCod=0000210&contexto=bd&selTab=tab2
- [9] Mclver, K. S., Amoako, D. G., Abia, A. L. K., Bester, L. A., Chenia, H. Y., & Essack, S. Y. (2020). Molecular Epidemiology of Antibiotic-Resistant *Escherichia coli* from Farm-to-Fork in Intensive Poultry Production in KwaZulu-Natal, South Africa. *Antibiotics-Basel*, 9(12), 16. doi:10.3390/antibiotics9120850
- [10] Chang, S. H., Lai, Y. H., Huang, C. N., Peng, G. J., Liao, C. D., Kao, Y. M., . . . Wang, D. Y. (2019). Multi-residue analysis using liquid chromatography tandem mass spectrometry for detection of 20 coccidiostats in poultry, livestock, and aquatic tissues. *Journal of Food and Drug Analysis*, 27(3), 703-716. doi:10.1016/j.jfda.2019.02.004

- [11] McMullin, P. F. (2020). Diseases of poultry 14th edition. *Avian Pathology*, 49(5), 526-526. doi:10.1080/03079457.2020.1794237
- [12] Buiarelli, F., Di Filippo, P., Riccardi, C., Pomata, D., Giannetti, L., Neri, B., & Rago, D. (2017). Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry Analysis of Synthetic Coccidiostats in Eggs. *Separations*, 4(2), 12. doi:10.3390/separations4020015
- [13] Huet, A. C., Bienenmann-Ploum, M., Vincent, U., & Delahaut, P. (2013). Screening methods and recent developments in the detection of anticoccidials. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 405(24), 7733-7751. doi:10.1007/s00216-013-7035-6
- [14] *Relatório da Comissão ao Conselho e ao Parlamento Europeu sobre a utilização de coccidiostáticos e histomonostáticos como aditivos destinados à alimentação animal apresentado ao abrigo do artigo 11.º do Regulamento (CE) N.º 1831/2003 do. (2008).*
- [15] Peek, H. (2010). Resistance to anticoccidial drugs: alternative strategies to control coccidiosis in broilers. In Univerisiteit Utrecht.
- [16] Barbour, E. K., Ayyash, D. B., Iyer, A., Harakeh, S., & Kumosani, T. (2015). A Review of Approaches Targeting the Replacement of Coccidiostat Application in Poultry Production. *Brazilian Journal of Poultry Science*, 17(4), 405-418. doi:10.1590/1516-635x1704405-418
- [17] Graat, E. A. M., van der Kooij, E., Frankena, K., Henken, A. M., Smeets, J. F. M., & Hekerman, M. T. J. (1998). Quantifying risk factors of coccidiosis in broilers using on-farm data based on a veterinary practice. *Preventive Veterinary Medicine*, 33(1-4), 297-308. doi:10.1016/s0167-5877(97)00008-1
- [18] Belli, S. I., Smith, N. C., & Ferguson, D. J. P. (2006). The coccidian oocyst: a tough nut to crack! *Trends in Parasitology*, 22(9), 416-423. doi:10.1016/j.pt.2006.07.004
- [19] Friedman, D. B., Kanwat, C. P., Headrick, M. L., Patterson, N. J., Neely, J. C., & Smith, L. U. (2007). Importance of prudent antibiotic use on dairy farms in South Carolina: A pilot project on farmers' knowledge, attitudes and practices. *Zoonoses and Public Health*, 54(9-10), 366-375. Doi:10.1111/j.1863-2378.2007.01077.x
- [20] IACA. (2020). *ANUÁRIO IACA (Associação Portuguesa dos Industriais de Alimentos Compostos para Animais)*. www.enigmaprevisiveled.wix.pt/editores
- [21] Noack, S., Chapman, H. D., & Selzer, P. M. (2019). Anticoccidial drugs of the livestock industry. *Parasitology Research*, 118(7), 2009-2026. doi:10.1007/s00436-019-06343-5

- [22] Rychen, G., Aquilina, G., Azimonti, G., Bampidis, V., Bastos, M. de L., Bories, G., ... Gropp, J. (2017). Safety and efficacy of Avatec[®] 150G (lasalocid A sodium) for chickens for fattening and chickens reared for laying, and modification of the terms of authorisation for chickens for fattening, chickens reared for laying, turkeys for fattening, minor avian species (pheasants, guinea fowl, quails and partridges) except laying birds. EFSA Journal, 15(8). <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2017.4857>
- [23] Bampidis, V., Azimonti, G., Bastos, M. de L., Christensen, H., Dusemund, B., Kos Durjava, M., ... Kouba, M. (2019). Safety and efficacy of Elancoban[®] G200 (monensin sodium) for chickens for fattening, chickens reared for laying and turkeys. EFSA Journal, 17(12). <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2019.5891>
- [24] Bampidis, V., Azimonti, G., Bastos, M. de L., Christensen, H., Dusemund, B., Kouba, M., ... Gropp, J. (2018). Safety and efficacy of Monteban[®] G100 (narasin) for chickens for fattening. EFSA Journal, 16(11). <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2018.5460>
- [25] Rychen, G., Aquilina, G., Azimonti, G., Bampidis, V., Bastos, M. de L., Bories, G., ... Gropp, J. (2018). Safety and efficacy of Sacox[®] microGranulate (salinomycin sodium) for rabbits for fattening. EFSA Journal, 16(3). <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2018.5209>
- [26] Rychen, G., Aquilina, G., Azimonti, G., Bampidis, V., Bastos, M. de L., Bories, G., Chesson, A., Cocconcelli, P. S., Flachowsky, G., Kolar, B., Kouba, M., López-Alonso, M., López Puente, S., Mantovani, A., Mayo, B., Ramos, F., Saarela, M., Villa, R. E., Wallace, R. J., ... Gropp, J. (2018). Scientific Opinion on the safety and efficacy of Aviax 5% (semduramicin sodium) for chickens for fattening. EFSA Journal, 16(7). <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2018.5341>
- [27] Bampidis, V., Azimonti, G., Bastos, M. de L., Christensen, H., Dusemund, B., Kouba, M., ... Gropp, J. (2019). Safety and efficacy of Deccox[®] (decoquinate) for chickens for fattening. EFSA Journal, 17(1). <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2019.5541>
- [28] Rychen, G., Aquilina, G., Azimonti, G., Bampidis, V., Bastos, M. de L., Bories, G., ... Gropp, J. (2018). Safety and efficacy of Coxiril[®] (diclazuril) for chickens reared for laying. EFSA Journal, 16(3). <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2018.5195>
- [29] Bampidis, V., Azimonti, G., Bastos, M. de L., Christensen, H., Dusemund, B., Fašmon Durjava, M., ... Vettori, M. V. (2020). Safety and efficacy of STENOROL[®] (halofuginone hydrobromide) as a feed additive for chickens for fattening and turkeys. EFSA Journal, 18(11). <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2020.6169>

- [30] Bampidis, V., Azimonti, G., Bastos, M. de L., Christensen, H., Dusemund, B., Durjava, M. F., Kouba, M., López-Alonso, M., López Puente, S., Marcon, F., Mayo, B., Pechová, A., Petkova, M., Ramos, F., Sanz, Y., Villa, R. E., Woutersen, R., Aquilina, G., Bories, G., ... Vettori, M. V. (2021). Safety and efficacy of a feed additive consisting of lasalocid A sodium and nicarbazin (Nilablend™ 200G) for chickens for fattening (Zoetis Belgium SA). *EFSA Journal*, 19(3). <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2021.6466>
- [31] Aquilina, G., Bories, G., Chesson, A., Cocconcelli, P. S., de Knecht, J., Dierick, N. A., ... Enzyme, E. P. F. C. M. (2011). Scientific Opinion on safety and efficacy of Cycostat (R) 66G (robenidine hydrochloride) for rabbits for breeding and fattening EFSA Panel on Additives and Products or Substances used in Animal Feed (FEEDAP). *Efsa Journal*, 9(3). doi:10.2903/j.efsa.2011.2102
- [32] EFSA (2003). Opinion of the Scientific Panel on Additives and Products or Substances used in Animal Feed on a request from the Commission on the coccidiostat DECCOX in accordance with article 9G of Council Directive 70/524/EEC. (Question No EFSA-Q-2003-044). *The EFSA Journal* (2003) 17, 1-40.
- [33] Renshaw, D. W. (2013). Human Safety of Coccidiostats: A European Perspective. *Toxicological Effects of Veterinary Medicinal Products in Humans, Vol 2*, 15, 1-32. doi:10.1039/9781849736832-00001
- [34] European Medicines Agency. (2019, March 1). Evant. <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/veterinary/EPAR/evant>
- [35] European Medicines Agency. (2021, February 26). Evalon . <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/veterinary/EPAR/evalon>
- [36] Lahlou, R. A., Bounechada, M., Mohammedi, A., Silva, L. R., & Alves, G. (2021). Dietary use of *Rosmarinus officinalis* and *Thymus vulgaris* as anticoccidial alternatives in poultry. *Animal Feed Science and Technology*, 273, 25. doi:10.1016/j.anifeedsci.2021.114826
- [37] Abdel-Tawab, H., Abdel-Haleem, H. M., Abdel-Baki, A. A. S., Al-Quraishy, S., & El-Mallah, A. M. (2020). Anticoccidial and Antioxidant Activities of *Moringa oleifera* Leaf Extract on Murine Intestinal Eimeriosis. *Acta Parasitologica*, 65(4), 823-830. doi:10.2478/s11686-020-00219-w
- [38] Ola-Fadunsin, S. D., & Ademola, I. O. (2013). Direct effects of *Moringa oleifera* Lam (Moringaceae) acetone leaf extract on broiler chickens naturally infected with *Eimeria*

species. *Tropical Animal Health and Production*, 45(6), 1423-1428. doi:10.1007/s11250-013-0380-9

- [39] Story, P., & Doube, A. (2004). A case of human poisoning by salinomycin, an agricultural antibiotic. *THE NEW ZEALAND MEDICAL JOURNAL*, 117(1190).
- [40] França, Ticiania N., Nogueira, Vivian A., Yamasaki, Elise M., Caldas, Saulo A., Tokarnia, Carlos H., & Peixoto, Paulo V.. (2009). Intoxicação acidental por monensina em ovinos no Estado do Rio de Janeiro. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, 29(9), 743-746. <https://doi.org/10.1590/S0100-736X2009000900011>
- [41] Dorne, J., Fernandez-Cruz, M. L., Bertelsen, U., Renshaw, D. W., Peltonen, K., Anadon, A., . . . Fink-Gremmels, J. (2013). Risk assessment of coccidostatics during feed cross-contamination: Animal and human health aspects. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 270(3), 196-208. doi:10.1016/j.taap.2010.12.014
- [42] Regulamento (CE) N.º 178/2002 do Parlamento Europeu e do Conselho de 28 de Janeiro de 2002 que determina os princípios e normas gerais da legislação alimentar, cria a Autoridade Europeia para a Segurança dos Alimentos e estabelece procedimentos em matéria de segurança dos géneros alimentícios. (2002). *Jornal Oficial Das Comunidades Europeias*.
- [43] Pressman, B. C., & Fahim, M. (1983). CARDIOVASCULAR TOXICITY OF IONOPHORES USED AS FEED ADDITIVES. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 161, 543-561.
- [44] Seiler, C. (2009). Collateral Circulation of the Heart. *Collateral Circulation of the Heart*, 1-418. doi:10.1007/978-1-84882-342-6
- [45] EFSA. (2004). Opinion of the Scientific Panel on additives and products or substances used in animal feed (FEEDAP) on the reevaluation of coccidiostat Avatec in accordance with article 9G of Council Directive 70/524/EEC. In *EFSA Journal* (Vol. 2, Issue 7). Wiley-Blackwell Publishing Ltd. <https://doi.org/10.2903/J.EFSA.2004.77>
- [46] Committee For Veterinary Medicinal Products. (2004). Lasalocid Sodium. <http://www.emea.eu.int>
- [47] Aquilina, G., Bampidis, V., Bastos, M. D., Costa, L. G., Flachowsky, G., Gralak, M. A., . . . Sub, E. P. A. P. (2015). Scientific Opinion on the safety and efficacy of Cygro (R) 10G (maduramicin ammonium-alpha) for turkeys. *Efsa Journal*, 13(2). doi:10.2903/j.efs.2015.4013

- [48] Sharma, N., Bhalla, A., Varma, S., Jain, S., & Singh, S. (2005). Toxicity of maduramicin. *Emergency Medicine Journal*, 22(12), 880-882. doi:10.1136/emj.2004.020883
- [49] Bories, G., Brantom, P., de Barbera, J. B., Chesson, A., Cocconcelli, P. S., Dierick, N., . . . Sci Panel, M. (2006). Opinion of the Scientific Panel on Additives and Products or Substances used in Animal Feed on the safety of Coxidin((R)) (monensin sodium) (Question N° EFSA-Q-2006-005) Adopted on 12 July 2006. *Efsa Journal*, 4(7). doi:10.2903/j.efsa.2006.381
- [50] Who. (2016). Evaluation of Certain Veterinary Drug Residues in Food. *Evaluation of Certain Veterinary Drug Residues in Food*, 997, 1-110.
- [51] Prod, E. P. A. (2011). Scientific Opinion on the modification of the authorisation of the feed additive Coxidin (R) (monensin sodium) for chickens and turkeys for fattening. *Efsa Journal*, 9(2). doi:10.2903/j.efsa.2011.2009
- [52] Aquilina, G., Holies, G., Brantom, P., Chesson, A., Cocconcelli, P. S., de Knecht, J., . . . Subst, E. P. A. P. (2010). Scientific Opinion on the safety and efficacy of Maxiban (R) G160 (narasin and nicarbazin) for chickens for fattening. *Efsa Journal*, 8(4). doi:10.2903/j.efsa.2010.1574
- [53] Aquilina, G., Bories, G., Chesson, A., Cocconcelli, P. S., de Knecht, J., Dierick, N. A., . . . Ani, E. P. A. P. S. (2010). Scientific Opinion on the modification of authorisation of the feed additive Monteban (R) G100 (narasin) for chickens for fattening. *Efsa Journal*, 8(3). doi:10.2903/j.efsa.2010.1549
- [54] Anadón, A., Arzo, M. A., Bories, G., Brantom, P., Barbera, J. B., Chesson, A., Cocconcelli, P. S., Knecht, J., Dierick, N., Flachowsky, G., Franklin, A., Gropp, J., Haldorsen, A.-K., Halle, I., Mantovani, A., Peltonen, K., Rychen, G., Sanders, P., & Wester, P. (2004). Opinion of the Scientific Panel on additives and products or substances used in animal feed (FEEDAP) on the re-evaluation of coccidiostat Sacox[®] 120 microGranulate in accordance with article 9G of Council Directive 70/524/EEC. *EFSA Journal*, 2(7). <https://doi.org/10.2903/J.EFSA.2004.76>
- [55] Rychen, G., Aquilina, G., Azimonti, G., Bampidis, V., Bastos, M. D., Bories, G., . . . Sub, E. P. A. P. (2017). Safety and efficacy of Sacox((R)) microGranulate (salinomycin sodium) for chickens for fattening and chickens reared for laying. *Efsa Journal*, 15(1). doi:10.2903/j.efsa.2017.4670

- [56] EFSA. (2004). Opinion of the Scientific Panel on additives and products or substances used in animal feed (FEEDAP) on the safety and the efficacy of product “BIO-COX 120G” as feed additive in accordance with Council Directive 70/524/EEC. In EFSA Journal (Vol. 2, Issue 7). Wiley-Blackwell Publishing Ltd. <https://doi.org/10.2903/J.EFSA.2004.75>
- [57] Aquilina, G., Bampidis, V., Bastos, M. D., Costa, L. G., Flachowsky, G., Gralak, M. A., . . . Subs, E. P. A. P. (2013). Scientific opinion on the modification of authorisation of Deccox (R) (decoquinate) as feed additive for chickens for fattening. Efsa Journal, 11(10). doi:10.2903/j.efsa.2013.3370
- [58] Aquilina, G., Bories, G., Brantom, P., Chesson, A., Cocconcelli, P. S., de Knecht, J., . . . Us, E. P. A. P. S. (2010). Scientific Opinion on safety and efficacy of Clinacox (R) 0.5% (diclazuril) for chickens for fattening EFSA Panel on Additives and Products or Substances used in Animal Feed (FEEDAP). Efsa Journal, 8(7). doi:10.2903/j.efsa.2010.1663
- [59] Aquilina, G., Bach, A., Bampidis, V., Bastos, M. D., Flachowsky, G., Gasa-Gaso, J., . . . Sub, E. P. A. P. (2013). Scientific Opinion on the safety and efficacy of diclazuril (Clinacox (R) 0.5 %) as feed additive for chickens reared for laying. Efsa Journal, 11(3). doi:10.2903/j.efsa.2013.3106
- [60] European Medicines Agency. (1999). Halofuginone Summary Report (I) of the Committee for Veterinary Medicinal Products. https://www.ema.europa.eu/en/documents/mrl-report/halofuginone-summary-report-i-committee-veterinary-medicinal-products_en.pdf
- [61] Rychen, G., Aquilina, G., Azimonti, G., Bampidis, V., Bastos, M. D., Bories, G., . . . Subst, E. P. A. P. (2018). Safety and efficacy of Coxar (R) (nicarbazin) for turkeys for fattening. Efsa Journal, 16(4). doi:10.2903/j.efsa.2018.5214
- [62] Bampidis, V., Azimonti, G., Bastos, M. D., Christensen, H., Dusemund, B., Kouba, M., . . . Us, E. P. A. P. S. (2019). Safety and efficacy of Robenz((R)) 66G (robenidine hydrochloride) for chickens for fattening and turkeys for fattening. Efsa Journal, 17(3). doi:10.2903/j.efsa.2019.5613
- [63] Regulamento (CE) N.º 470/2009 do Parlamento Europeu e do Conselho de 6 de Maio de 2009 que prevê procedimentos comunitários para o estabelecimento de limites máximos de resíduos de substâncias farmacologicamente activas nos alimentos de origem animal, que r. Jornal Oficial da União Europeia. 2009) 11–22.

- [64] Regulamento (CE) N.º 124/2009 da Comissão de 10 de Fevereiro de 2009 que define limites máximos para a presença de coccidiostáticos ou histomonostáticos em géneros alimentícios resultante da contaminação cruzada inevitável destas substâncias em alimentos . *Jornal Oficial da União Europeia*. 2009) 7–11.
- [65] Regulamento (UE) N.º 610/2012 da comissão de 9 de julho de 2012 que altera o Regulamento (CE) N.º 124/2009, de 10 de fevereiro de 2009, que define limites máximos para a presença de coccidiostáticos ou histomonostáticos em géneros alimentícios resultant. *Jornal Oficial da União Europeia*. 2012) 3.
- [66] European Medicines Agency. (2012). Guideline on the approach to establish a pharmacological ADI . www.ema.europa.eu
- [67] Directiva 2009/8/CE da Comissão de 10 de Fevereiro de 2009 que altera o anexo I da Directiva 2002/32/CE do Parlamento Europeu e do Conselho no que se refere aos limites máximos da contaminação cruzada inevitável por coccidiostáticos e histomonostáticos. *Jornal Oficial da União Europeia*. 2009) 19–25.
- [68] Directiva 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 respectivos produtos e que revoga as Directivas 85/358/CEE e 85/358/CEE e 86/469/CEE e as Decisões. *Jornal Oficial das Comunidades Europeias Europeias*. 1996) 1–23
- [69] Ministério da Economia e da Inovação. (2005). *Decreto-Lei 237/2005 de 30 de Dezembro, que cria a Autoridade de Segurança Alimentar e Económica e extingue a Inspeção-Geral das Actividades Económicas, a Agência Portuguesa de Segurança Alimentar, I. P., e a Direcção-Geral de Fiscalização e Controlo da Qualidade Alimentar* . <https://dre.pt/pesquisa/-/search/473500/details/maximized>
- [70] Ministério da Economia e do Emprego. (2012). *Decreto-Lei 194/2012, Decreto-Lei n.º 194/2012 de 23 de agosto, que aprova a orgânica da Autoridade de Segurança Alimentar e Económica*. <https://dre.pt/pesquisa/-/search/175336/details/maximized>
- [71] Ministério da Agricultura, do Desenvolvimento Rural e das Pescas. (2005). *Decreto-Lei N. 151/2005 de 30 de Agosto*. 5176–5183.
- [72] Olejnik, M., Szprengier-Juskiewicz, T., Jedziniak, P., Sledzinska, E., Szymanek-Bany, I., Korycinska, B., . . . Zmudzki, J. (2011). Residue control of coccidiostats in food of animal origin in Poland during 2007-2010. *Food Additives & Contaminants Part B-Surveillance*, 4(4), 259-267. doi:10.1080/19393210.2011.637238

- [73] Ha, J., Song, G., Ai, L. F., & Li, J. C. (2016). Determination of six polyether antibiotic residues in foods of animal origin by solid phase extraction combined with liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 1017, 187-194. doi:10.1016/j.jchromb.2016.01.057
- [74] Matus, J. L., & Boison, J. O. (2016). A multi-residue method for 17 anticoccidial drugs and ractopamine in animal tissues by liquid chromatography-tandem mass spectrometry and time-of-flight mass spectrometry. *Drug Testing and Analysis*, 8(5-6), 465-476. doi:10.1002/dta.2019
- [75] Yoshikawa, S., Nagano, C., Kanda, M., Hayashi, H., Matsushima, Y., Nakajima, T., . . . Shindo, T. (2017). Simultaneous determination of multi-class veterinary drugs in chicken processed foods and muscle using solid-supported liquid extraction clean-up. *Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 1057, 15-23. doi:10.1016/j.jchromb.2017.04.041
- [76] Dasenaki, M. E., & Thomaidis, N. S. (2019). Multi-residue methodology for the determination of 16 coccidiostats in animal tissues and eggs by hydrophilic interaction liquid chromatography - Tandem mass spectrometry. *Food Chemistry*, 275, 668-680. doi:10.1016/j.foodchem.2018.09.138
- [77] Roila, R., Branciarri, R., Pecorelli, I., Cristofani, E., Carloni, C., Ranucci, D., & Fioroni, L. (2019). Occurrence and Residue Concentration of Coccidiostats in Feed and Food of Animal Origin; Human Exposure Assessment. *Foods*, 8(10). doi:10.3390/foods8100477
- [78] Rokka, M., & Peltonen, K. (2006). Simultaneous determination of four coccidiostats in eggs and broiler meat: Validation of an LC-MS/MS method. *Food Additives and Contaminants*, 23(5), 470-478. doi:10.1080/02652030600573251
- [79] EFSA (2020). Report for 2018 on the results from the monitoring of veterinary medicinal product residues and other substances in live animals and animal products. EFSA Support. Publ. 17. doi:10.2903/sp.efsa.2020.EN-1775
- [80] ASAE. (n.d.). RASFF (Rapid Alert System for Food and Feed). Retrieved April 28, 2021, from <https://www.asae.gov.pt/inspecao-fiscalizacao/sistemas-de-alerta-e-troca-de-informacao/rasff.aspx>

- [81] Sobral, M. M. C., Cunha, S. C., Faria, M. A., & Ferreira, I. (2018). Domestic Cooking of Muscle Foods: Impact on Composition of Nutrients and Contaminants. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 17(2), 309-333. doi:10.1111/1541-4337.12327
- [82] Vadivambal, R., & Jayas, D. S. (2010). Non-uniform Temperature Distribution During Microwave Heating of Food Materials-A Review. *Food and Bioprocess Technology*, 3(2), 161-171. doi:10.1007/s11947-008-0136-0
- [83] Barbosa, T. M., & Levy, S. B. (2000). The impact of antibiotic use on resistance development and persistence. *Drug Resistance Updates*, 3(5), 303-311. Doi:10.1054/drup.2000.0167
- [84] Rose, M. D., Rowley, L., Shearer, G., & Farrington, W. H. H. (1997). Effect of cooking on veterinary drug residues in food .6. Lasalocid. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45(3), 927-930. doi:10.1021/jf960562v
- [85] Tarbin, J. A., Bygrave, J., Bigwood, T., Hardy, D., Rose, M., & Sharman, M. (2005). The effect of cooking on veterinary drug residues in food: Nicarbazin (Dinitrocarbanilide component). *Food Additives and Contaminants Part a-Chemistry Analysis Control Exposure & Risk Assessment*, 22(11), 1126-1131. doi:10.1080/02652030500357193
- [86] Bacila, D. M., Cunha, A., Weber, I. F., Scheuermann, G. N., Coldebella, A., Caron, L., . . . Feddern, V. (2018). Degradation of 4,4 '-Dinitrocarbanilide in Chicken Breast by Thermal Processing. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 66(31), 8391-8397. doi:10.1021/acs.jafc.8b02370
- [87] Bacila, D. M., Lazzarotto, M., Hansel, F. A., Scheuermann, G. N., Feddern, V., Cunha, A., & Igarashi-Mafra, L. (2019). Thermal profile of 4,4 '-dinitrocarbanilide determined by thermogravimetry-differential scanning calorimetry-mass spectrometry (TG-DSC-MS) and pyrolysis-gas chromatography-mass spectrometry (Py-GC-MS). *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, 138(1), 697-701. doi:10.1007/s10973-019-08194-9
- [88] PubChem. (n.d.). 4-Nitroaniline. Retrieved July 2, 2021, from <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/4-Nitroaniline>
- [89] Sobral, M. M. C., Romero-Gonzalez, R., Faria, M. A., Cunha, S. C., Ferreira, I., & Garrido-Frenich, A. (2020). Stability of antibacterial and coccidiostat drugs on chicken meat burgers upon cooking and in vitro digestion. *Food Chemistry*, 316, 12. doi:10.1016/j.foodchem.2020.126367

- [90] Cornet, S. H. V., Snel, S. J. E., Lesschen, J., van der Goot, A. J., & van der Sman, R. G. M. (2021). Enhancing the water holding capacity of model meat analogues through marinade composition. *Journal of Food Engineering*, 290, 9. doi:10.1016/j.jfoodeng.2020.110283
- [91] Neves, T. D., da Cunha, D. T., de Rosso, V. V., & Domene, S. M. A. (2021). Effects of seasoning on the formation of heterocyclic amines and polycyclic aromatic hydrocarbons in meats: A meta-analysis. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 20(1), 526-541. doi:10.1111/1541-4337.12650
- [92] Ozcan, B., Esen, M., Sangun, M. K., Coleri, A., & Caliskan, M. (2010). Effective antibacterial and antioxidant properties of methanolic extract of *Laurus nobilis* seed oil. *Journal of Environmental Biology*, 31(5), 637-641.
- [93] Batool, S., Khera, R. A., Hanif, M. A., & Ayub, M. A. (2020). Bay Leaf. In M. A. Hanif, H. Nawaz, M. M. Khan, & H. J. Byrne (Eds.), *Medicinal Plants of South Asia: Novel Sources for Drug Discovery* (pp. 63-74). Amsterdam: Elsevier Science Bv.
- [94] Djenane, D., Yanguela, J., Gomez, D., & Roncales, P. (2012). PERSPECTIVES ON THE USE OF ESSENTIAL OILS AS ANTIMICROBIALS AGAINST *CAMPYLOBACTER JEJUNI* CECT 7572 IN RETAIL CHICKEN MEATS PACKAGED IN MICROAEROBIC ATMOSPHERE. *Journal of Food Safety*, 32(1), 37-47. doi:10.1111/j.1745-4565.2011.00342.x
- [95] Irkin, R., & Esmer, O. K. (2010). Control of *Listeria monocytogenes* in Ground Chicken Breast Meat under Aerobic, Vacuum and Modified Atmosphere Packaging Conditions with or without the Presence of Bay Essential Oil at 4 degrees C. *Food Science and Technology Research*, 16(4), 285-290. doi:10.3136/fstr.16.285
- [96] Simic, A., Sokovic, M. D., Ristic, M., Grujic-Jovanovic, S., Vukojevic, J., & Marin, P. D. (2004). The chemical composition of some Lauraceae essential oils and their antifungal activities. *Phytotherapy Research*, 18(9), 713-717. doi:10.1002/ptr.1516
- [97] Farzaei, M. H., Abbasabadi, Z., Ardekani, M. R. S., Rahimi, R., & Farzaei, F. (2013). Parsley: a review of ethnopharmacology, phytochemistry and biological activities. *Journal of Traditional Chinese Medicine*, 33(6), 815-826. doi:10.1016/s0254-6272(14)60018-2
- [98] Agyare, C., Appiah, T., Boakye, Y. D., & Apenteng, J. A. (2017). *Petroselinum crispum*: a Review. *Medicinal Spices and Vegetables from Africa: Therapeutic Potential against Metabolic, Inflammatory, Infectious and Systemic Diseases*, 527-547. doi:10.1016/b978-0-12-809286-6.00025-x

- [99] Liberal, A., Fernandes, A., Polyzos, N., Petropoulos, S. A., Dias, M. I., Pinela, J., . . . Barros, L. (2020). Bioactive Properties and Phenolic Compound Profiles of Turnip-Rooted, Plain-Leafed and Curly-Leafed Parsley Cultivars. *Molecules*, 25(23), 17. doi:10.3390/molecules25235606
- [100] 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.
- [101] Decisão 98/179/CE, 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 vivos e respetivos produtos
- [102] Novakova, L., & Vlckova, H. (2009). A review of current trends and advances in modern bio-analytical methods: Chromatography and sample preparation. *Analytica Chimica Acta*, 656(1-2), 8-35. doi:10.1016/j.aca.2009.10.004
- [103] Hernandez-Borges, J., Borges-Miquel, T. M., Rodriguez-Delgado, M. A., & Cifuentes, A. (2007). Sample treatments prior to capillary electrophoresis-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1153(1-2), 214-226. doi:10.1016/j.chroma.2006.10.070.
- [104] Barreto, F., Ribeiro, C., Hoff, R. B., & Dalla Costa, T. (2017). A simple and high-throughput method for determination and confirmation of 14 coccidiostats in poultry muscle and eggs using liquid chromatography - quadrupole linear ion trap - tandem mass spectrometry (HPLC-QqLIT-MS/MS): Validation according to European Union 2002/657/EC. *Talanta*, 168, 43-51. doi:10.1016/j.talanta.2017.02.007
- [105] Reig, M., & Toldra, F. (2008). Veterinary drug residues in meat: Concerns and rapid methods for detection. *Meat Science*, 78(1-2), 60-67. doi:10.1016/j.meatsci.2007.07.029
- [106] Regulamento de Execução (UE) 2021/808 da Comissão de 22 de março de 2021 relativo ao desempenho dos métodos analíticos para os resíduos de substâncias farmacologicamente ativas utilizadas em animais produtores de géneros alimentícios e à interpretação dos resultados, bem como aos métodos a utilizar na amostragem, e que revoga as Decisões 2002/657/CE e 98/179/CE . <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/PT/TXT/?uri=CELEX%3A32021R0808&qid=1622119042876>
- [107] Rusko, J., Jansons, M., Pugajeva, I., Zacs, D., & Bartkevics, V. (2019). Development and optimization of confirmatory liquid chromatography-Orbitrap mass spectrometry method for the determination of 17 anticoccidials in poultry and eggs. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 164, 402-412. doi:10.1016/j.jpba.2018.10.056