

André Monteiro Pais Teixeira Pereira

**DETERMINAÇÃO DE RESÍDUOS DE
FLUOROQUINOLONAS EM AMOSTRAS DE TECIDO
MUSCULAR DE FRANGOS E RESPECTIVO
IMPACTO NA SAÚDE HUMANA**

Coimbra

2009

André Monteiro Pais Teixeira Pereira

**DETERMINAÇÃO DE RESÍDUOS DE
FLUOROQUINOLONAS EM AMOSTRAS DE TECIDO
MUSCULAR DE FRANGOS E RESPECTIVO IMPACTO NA
SAÚDE HUMANA**

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra para obtenção do grau de Mestre em Saúde Pública sob a co-orientação da Doutora Angelina Lopes Simões Pena e da Professora Doutora Celeste de Matos Lino e orientação do Mestre António Manuel Pinto Brochado Moreira Morais

Coimbra

2009

**Dedico este trabalho aos meus avós,
pelo carinho e pela falta que me
fazem.**

AGRADECIMENTOS

A presente dissertação é o resultado de dois anos de trabalho exaustivo, desenvolvido em horário pós-laboral, fins-de-semana, folgas, férias e, muitas vezes, fora de horas, roubando tempo ao descanso e a algumas pessoas cuja colaboração, paciência e generosidade me ajudaram a superar diferentes adversidades. A todas elas, expresso aqui um enorme bem-haja.

À Doutora Angelina Pena, minha orientadora, que desde logo aceitou a orientação deste trabalho, pelo imprescindível e valioso apoio prestado em todas as suas fases de execução, desde a intenção até à redacção, designadamente, na fase experimental, supervisão científica e revisão crítica, pelo estímulo e entusiasmo revelados e pelas críticas e sugestões relevantes feitas durante a orientação.

À Professora Doutora Celeste Lino, a quem coube a co-orientação desta tese, pela cordialidade com que me recebeu, pelo rigor científico e pela utilidade das suas recomendações na revisão crítica desta dissertação.

Ao Mestre António Morais, por ter aceitado orientar este trabalho.

À Sofia, ao João, ao David e ao Jailson, pela companhia nas horas passadas no laboratório, pelo incentivo e ajuda prestada nas dificuldades diárias.

À Dra Ivone Mora Grácio, pelas facilidades concedidas durante todo o mestrado.

Aos meus pais, pela paciência e apoio sempre prestados.

A todos os meus amigos, a quem este trabalho retirou alguma disponibilidade da minha parte.

Ao Ricardo Manique, pela amizade e pela ajuda prestada durante o mestrado.

À Sara, um agradecimento especial, principalmente por me ter apoiado e ter acreditado em mim, pela ajuda imprescindível na correcção deste trabalho como de muitos outros durante o mestrado, e um pedido de desculpa pelo mau feitio em alguns momentos.

A todos os que contribuíram para esta tese de mestrado o meu agradecimento.

ABREVIATURAS

ACN - Acetonitrilo

ADI – Dose Diária Aceitável

ADN – Ácido Desoxirribonucleico

AOAC – Associação de Analistas Químicos Oficiais

CCAA - Comité Científico da Alimentação Animal

CIM - Concentração Inibitória Mínima

CIP – Ciprofloxacina

EMEA – Agência Europeia do Medicamento

ENR – Enrofloxacin

FAO - Organização das Nações Unidas para a Agricultura e Alimentação

FD – Detector de Fluorescência

FDA – Food and Drug Administration

FQ – Fluoroquinolona

FS – Factor de Segurança

Gyr-A – Girase A

Gyr-B – Girase B

IUPAC – União Internacional de Química Pura e Aplicada

LC / HPLC - Cromatografia Líquida de Alta Pressão

LC-MS – Cromatografia Líquida com Espectrometria de Massa

LMR – Limite Máximo de Resíduo

LOQ – Limite de Quantificação

MS – Espectroscopia de Massa

NOEL - Concentração mais Elevada que não Provoca Efeitos Adversos

NOR – Norfloxacin

OIE – Organização Mundial da Saúde Animal

PBS – Tampão Fosfato

r² - Coeficiente de Correlação

SARA - Sarafloxacin

SPE – Extração em Fase Sólida

TBA – Tetrabutylamónio

UE – União Europeia

WHO – Organização Mundial de Saúde

ABSTRACT

Thirty three samples of market-ready chicken muscle, bought in different regions of Portugal, were analysed for residues of Fluoroquinolone (FQ), Enrofloxacin (ENR), Ciprofloxacin (CIP) and Norfloxacin (NOR). Liquid Chromatography with fluorimetric detection was used for separation, detection and quantification. NOR residues were detected on 64% of the samples and ENR residues on 15% of the samples, 79% showed residues of at least one of the two FQs. No CIP residues were detected on the samples. One of the samples showed residues above the Maximum Residue Limits for ENR. The study confirmed widespread misuse of these two FQs, which may pose a major risk to public health, including possible stimulation of bacterial resistance. More prudent use of FQs in food-producing animals is therefore recommended.

RESUMO

Este estudo pretendeu detectar e quantificar Fluoroquinolonas, concretamente de Norfloxacin, Ciprofloxacina e Enrofloxacin em tecido muscular de frango à venda em superfícies comerciais de Portugal continental, verificando a quantidade de amostras contaminadas e se essa contaminação se encontrava dentro dos limites legais.

Foram analisadas 33 amostras correspondendo às cidades de Albufeira (n = 5), Bragança (n = 3), Coimbra (n = 5), Entroncamento (n = 5), Lisboa (n = 5), Porto (n = 5) e Tomar (n = 5).

O método utilizado foi a cromatografia líquida de alta pressão, acoplada a um detector fluorimétrico, desenvolvido com base nas metodologias de Pena et al (2003) e Samanidou et al (2005).

Das 33 amostras analisadas, 79% (26) continham resíduos de, pelo menos, uma destas fluoroquinolonas. Sendo que destas, 76% (25) continham Norfloxacin e 15% (5) acusaram a presença de Enrofloxacin. Também 12% (4) continham Norfloxacin e Enrofloxacin. Suspeitou-se da presença de Ciprofloxacina em algumas amostras que continham Enrofloxacin, apesar do pico cromatográfico da CIP não se distinguir totalmente do ruído de fundo.

Uma das amostras apresentou valores violativos para a presença de Enrofloxacin 102,2 µg/kg, sendo o valor máximo permitido para este resíduo de 100 µg/kg.

Este estudo demonstra o uso deste grupo de antibióticos por diversos produtores de frangos, levantando sérias questões de Saúde Pública relacionadas com resistências em humanos que poderão estar associadas a esta utilização.

ÍNDICE GERAL

AGRADECIMENTOS	I
ABREVIATURAS	III
ABSTRACT	V
RESUMO	VI
ÍNDICE GERAL	VII
ÍNDICE DE FIGURAS, GRÁFICOS E TABELAS	XIII
OBJECTIVOS	XVII

I. Capítulo – Introdução Teórica 1

I. 1. INTRODUÇÃO.....	3
I. 2. PERSPECTIVA HISTÓRICA.....	5
I. 2. 1. ANTIBIÓTICOS.....	5
I. 2. 2. UTILIZAÇÃO DE ANTIBIÓTICOS EM VETERINÁRIA.....	8
I. 2. 2. 1. Uso terapêutico e profilático de antibióticos.....	8
I. 2. 2. 2. Uso como promotores de crescimento.....	9
I. 3. LEGISLAÇÃO GERAL.....	11
I. 4. QUINOLONAS E FLUOROQUINOLONAS.....	12

I. 4. 1. CLASSIFICAÇÃO DAS QUINOLONAS.....	12
I. 4. 2. MECANISMO DE ACÇÃO.....	13
I. 4. 3. FARMACOCINÉTICA.....	14
I. 4. 3. 1. Farmacocinética em frangos.....	14
I. 4. 3. 1. 1. Enrofloxacin.....	14
I. 4. 3. 1. 2. Norfloxacin.....	17
I. 4. 3. 2. Farmacocinética em Humanos.....	17
I. 4. 3. 2. 1. Ciprofloxacina.....	17
I. 4. 4 AVALIAÇÃO DE SEGURANÇA DOS RESÍDUOS (LIMITE MÁXIMO DE RESÍDUO).....	18
I. 4. 4. 1 Norfloxacin.....	19
I. 4. 4. 2 Enrofloxacin.....	19
I. 4. 5. CONSUMOS DE QUINOLONAS E FLUOROQUINOLONAS NA UE.....	22
I. 4. 6. TOXICIDADE RESULTANTE DA UTILIZAÇÃO DE FLUOROQUINOLONAS.....	24
I. 4. 6. 1. Toxicidade aguda.....	24
I. 4. 6. 2. Toxicidade crónica – emergência de resistências bacterianas.....	25
I. 4. 6. 2. 1. Resistências em <i>Campylobacter spp</i>	26
I. 4. 6. 2. 2. Resistências em <i>Salmonella spp</i>	34
I. 4. 6. 2. 3. Resistências em <i>Escherichia coli</i>	36
I. 4. 6. 2. 4. Resistências em outras bactérias.....	39

I. 4. 7. RECOMENDAÇÕES DE DIVERSOS ORGANISMOS	
SOBRE UTILIZAÇÃO DE FQS EM VETERINÁRIA.....	40
I. 4. 7. 1. FAO, WHO e OIE.....	40
I. 4. 7. 2. Agência Europeia do Medicamento.....	42
I. 5. METODOLOGIAS ANALÍTICAS PARA A DETERMINAÇÃO DE	
FQS.....	44
I. 5. 1. CROMATOGRAFIA LÍQUIDA (LC).....	44
I. 5. 1. 1. Extracção/purificação.....	47
I. 5. 1. 1. 1. Extracção líquido-líquido.....	48
I. 5. 1. 1. 2. Extracção em fase sólida (SPE).....	49
I. 5. 1. 1. 3. Outros métodos de purificação.....	51
I. 5. 1. 2. Conservação dos extractos.....	51
I. 5. 2. OUTROS MÉTODOS.....	52
I. 5. 2. 1. Métodos Microbiológicos.....	52
I. 5. 2. 2. Métodos Imunoquímicos.....	52
II. Capítulo – Parte Experimental	55
II. 1. MATERIAIS E MÉTODOS.....	57
II. 1. 1. REAGENTES E SOLUÇÕES.....	57
II. 1. 1. 1. Reagentes.....	57
II. 1. 1. 2. Soluções.....	57

II. 1. 2. MATERIAIS.....	58
II. 1. 3. EQUIPAMENTO.....	59
II. 1. 4. CONDIÇÕES CROMATOGRÁFICAS.....	60
II. 1. 4. 1. Fase móvel.....	60
II. 1. 4. 2. Detecção fluorimétrica.....	60
II. 1. 5. AMOSTRAGEM.....	60
II. 1. 6. PREPARAÇÃO E CONSERVAÇÃO DAS AMOSTRAS.....	62
II. 1. 7. METODOLOGIA ANALÍTICA.....	62
II. 1. 7. 1. Extracção.....	62
II. 1. 7. 2. Purificação.....	64
II. 1. 7. 3. Detecção e quantificação.....	66
II. 2. VALIDAÇÃO DAS METODOLOGIAS ANALÍTICAS.....	66
II. 2. 1. SELECTIVIDADE.....	67
II. 2. 2. LINEARIDADE.....	67
II. 2. 3. ESTUDOS DE RECUPERAÇÃO.....	67
II. 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	68
II. 3. 1. OPTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES CROMATOGRÁFICAS.....	68
II. 3. 2. OPTIMIZAÇÃO DOS PROCEDIMENTOS DE EXTRACÇÃO E PURIFICAÇÃO.....	70
II. 3. 3. VALIDAÇÃO.....	72
II. 3. 3. 1. Selectividade.....	72
II. 3. 3. 2. Linearidade.....	73

II. 3. 3. 3. Exactidão e Precisão.....	78
II. 3. 3. 4. Limites de detecção e limites de quantificação.....	81
II. 3. 4. NÍVEIS DE NOR, CIP E ENR NAS AMOSTRAS	81
II. 4. CONCLUSÕES.....	90
II. 5. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	91
BIBLIOGRAFIA.....	93

ÍNDICE DE FIGURAS, GRÁFICOS E TABELAS

Figura 1. Estrutura do ácido nalidíxico.....	5
Figura 2. Estrutura da norfloxacin.....	6
Figura 3. Estrutura da enrofloxacin.....	6
Figura 4. Estrutura da ciprofloxacina.....	7
Tabela 1. Classificação das Quinolonas utilizadas em medicina humana.	12
Figura 5. Gráfico semilogaritmico que analisa a concentração de enrofloxacin após administração única.....	15
Tabela 2. Concentrações de enrofloxacin em diversos tecidos após administração oral de 10 mg/kg durante 5 dias a frangos.....	16
Tabela 3. Implicação de confecções diferentes dos alimentos na concentração de enrofloxacin.....	21
Tabela 4. Venda de FQs (toneladas de substância activa) e produção de carne em alguns países membros.....	22
Tabela 5. Resistências cruzadas entre antibióticos em <i>Campylobacter spp.</i> isolados de frangos de produção para consumo humano.....	29
Tabela 6. Amostras de fezes de frangos contaminadas com <i>Campylobacter spp.</i> resistentes a quinolonas.....	30
Figura 6. Número de <i>Campylobacter spp.</i> em fezes de frango, antes, durante e depois de tratamento com FQs.....	31
Tabela 7. Percentagem de bactérias resistentes a quinolonas em animais	

para consumo humano.....	36
Tabela 8. Percentagem de resistência a fluoroquinolonas e flumequina ou ácido nalidíxico entre <i>Escherichia coli</i> de porcos e frangos.....	37
Tabela 9. Percentagem de resistência a fluoroquinolonas entre bactérias patogénicas de animais de consumo humano.....	38
Figura 7. Comportamento ácido-base das fluoroquinolonas.....	49
Tabela 10. Eficácia de várias colunas de extracção em fase sólida e da extracção directa aplicadas à análise de diversas quinolonas.....	50
Mapa 1. Distribuição geográfica dos locais de aquisição de amostras.....	61
Figura 8. Esquema de extracção da metodologia analítica utilizada.....	63
Figura 9. Sistema de vácuo.....	64
Figura 10. Esquema de purificação da metodologia analítica utilizada.....	65
Figura 11. Cromatograma obtido a partir de uma solução padrão contendo NOR, CIP e ENR.....	69
Figura 12. Cromatograma de uma amostra sem FQs	72
Gráfico 1. Curva de calibração para a NOR.....	73
Gráfico 2. Curva de calibração para a CIP.....	74
Gráfico 3. Curva de calibração para a ENR.....	74
Gráficos 4, 5 e 6. Curvas de calibração utilizando amostras fortificadas para o dia 1 da validação relativas à NOR, CIP e ENR.....	75
Gráficos 7, 8 e 9. Curvas de calibração utilizando amostras fortificadas para o dia 2 da validação relativas à NOR, CIP e ENR.....	76

Gráficos 10, 11 e 12. Curvas de calibração utilizando amostras fortificadas para o dia 3 da validação relativas à NOR, CIP e ENR.....	77
Figura 13. Cromatograma de uma amostra fortificada com NOR, CIP e ENR.....	78
Tabela 11. Valores relativos à exactidão e precisão da NOR.....	80
Tabela 12. Valores relativos à exactidão e precisão da CIP.....	80
Tabela 13. Valores relativos à exactidão e precisão da ENR.....	81
Gráfico 13. Percentagem de amostras contaminadas com NOR, CIP e ENR em Portugal continental.....	82
Tabela 14. Teores ($\mu\text{g}/\text{kg}$) e frequência de detecção (%) de FQs em amostras de frangos nas diferentes localidades.....	83
Figura 14. Cromatograma de uma amostra contendo ENR (superior ao LMR).....	84
Gráfico 14. Percentagem de amostras contaminadas com NOR, CIP e ENR em Albufeira.....	85
Gráfico 15. Percentagem de amostras contaminadas com NOR, CIP e ENR em Bragança.....	85
Gráfico 16. Percentagem de amostras contaminadas com NOR, CIP e ENR em Coimbra.....	86
Gráfico 17. Percentagem de amostras contaminadas com NOR, CIP e ENR no Entroncamento.....	86
Gráfico 18. Percentagem de amostras contaminadas com NOR, CIP e ENR em Lisboa.....	87

Gráfico 19. Percentagem de amostras contaminadas com NOR, CIP e ENR no Porto.....	87
Gráfico 20. Percentagem de amostras contaminadas com NOR, CIP e ENR em Tomar.....	88

Objectivos

O trabalho desenvolvido nesta tese de mestrado pretendeu detectar e quantificar as Fluoroquinolonas (FQs), Enrofloxacina (ENR), Ciprofloxacina (CIP) e Norfloxacina (NOR) em amostras de tecido muscular de frango à venda em Portugal continental. Os principais objectivos consistiram na avaliação da extensão da utilização destes antibióticos na produção de frangos, de grande consumo em Portugal.

Desta forma, pretendeu-se:

- Desenvolver e validar uma metodologia analítica para a determinação e quantificação de FQs, mais especificamente, para a ENR, CIP e NOR;
- Determinar e quantificar a presença das FQs, ENR, a CIP e a NOR, em amostras de tecido muscular de frango de Portugal continental;
- Verificar se os níveis obtidos se encontram dentro dos limites máximos de resíduo (LMRs) permitidos pela legislação vigente;
- Comparar os resultados obtidos com os existentes em outros países.

I. Capítulo

Introdução Teórica

I. Capítulo – Introdução Teórica

I. 1. Introdução

A população humana registou um crescimento exponencial nos últimos anos, circunstância que se tem reflectido, desde logo, na capacidade económica do planeta, acentuando-se cada vez mais o problema da escassez de recursos.

Não obstante terem-se superado inúmeras barreiras e almejado o fim precípua da multiplicação de recursos, respondendo assim às necessidades da população crescente, nem sempre foram tomadas em linha de conta as possíveis consequências nefastas de algumas dessas medidas. Uma delas, cujos efeitos não foram suficientemente acautelados, foi a introdução de antibióticos e de outros aditivos na alimentação de animais para consumo humano. Com efeito, a necessidade de aumentar a produção de alimentos de origem animal desviou a atenção de certos efeitos colaterais advenientes desses processos (FAO/WHO/OIE, 2007; FDA, 2005).

A utilização de antibióticos, em animais de consumo humano, teve como objectivo inicial a terapêutica e profilaxia de infecções bacterianas, mas também a utilização, em doses subterapêuticas, como promotores de crescimento. Este método ainda é permitido nos Estados Unidos (EUA), pela Food and Drug Administration (FDA), não existindo qualquer recolha de dados, pelas entidades competentes, para controlo do tipo de antibióticos utilizados e das doses administradas. Cerca de 60 a 80% dos antibióticos produzidos nos EUA são administrados em animais saudáveis criados para consumo humano. Os grupos mais utilizados são quinolonas, macrólidos e tetraciclina (Mellon et al, 2001).

Actualmente, na União Europeia (UE), a utilização de antibióticos em veterinária é permitida apenas em medicina veterinária e no tratamento profilático de animais, para prevenir possíveis infecções (EMEA/CVMP/SAGAM/184651/2005, 2007).

Naturalmente que a produção intensiva de galinhas e frangos, pelo facto de ser efectuada em recintos de grande dimensão e com elevado número de animais, leva a que frequentemente seja necessário efectuar tratamentos a populações extensas, advindo desta prática diversos problemas de toxicidade crónica (Griggs et al, 2005).

Um grande problema para a Saúde Pública é a possibilidade de emergência de resistências em estirpes bacterianas patogénicas para o Homem (Endtz et al, 1991; Monirini e Dastehgoli, 2006). Estas resistências podem ser adquiridas directamente

I. Capítulo – Introdução Teórica

pelas bactérias patogênicas presentes nas galinhas, ou através de bactérias comensais e posterior transferência destas resistências a outras estirpes bacterianas patogênicas ao Homem (Harbottle et al, 2006).

As infecções provocadas por estirpes de bactérias resistentes (*Escherichia coli*, *Campylobacter spp.* e *Salmonella spp.*) são maiores nas populações em contacto próximo com explorações de animais, o que comprova a emergência destas resistências por parte dos animais durante a presença neste tipo de explorações e sua posterior transferência ao Homem (FDA, 2005; EMEA/CVMP/SAGAM/184651/2005, 2007).

Em 1998, a Organização Mundial de Saúde (WHO) alertou para o impacto da utilização de quinolonas em medicina veterinária, devido à emergência de resistências em algumas estirpes de bactérias (WHO, 1997). No mesmo ano, também a Bayer®, produtora de CIP para uso humano e da ENR para uso em veterinária, alertou para a possibilidade da emergência de resistências à CIP devido à utilização da ENR em veterinária.

A emergência de resistências por parte de uma estirpe bacteriana abrange o antibiótico que está a ser utilizado, podendo ainda conferir uma resistência ao grupo de antibióticos ao qual aquele pertence e até mesmo a outros grupos diferentes (Griggs et al, 2005; Harbottle et al, 2006).

Este problema, relacionado com a emergência de estirpes bacterianas resistentes a FQs e a outros antibióticos, será mais relevante, consoante a extensão da utilização e a importância dos antibióticos utilizados para tratamentos no Homem (FAO/WHO/OIE, 2007).

Por estes motivos, a detecção e quantificação de resíduos de FQs, nomeadamente ENR, CIP e NOR, em alimentos de origem animal, assume particular importância. Estas pertencem a um grupo de antibióticos largamente utilizado em medicina humana, sendo alguns deles utilizados em medicina veterinária, tendo nos últimos anos emergido estirpes bacterianas (*Escherichia coli*, *Campylobacter spp.* e *Salmonella spp.*) resistentes a FQs (FDA, 2005; EMEA/CVMP/SAGAM/184651/2005, 2007).

I. 2. Perspectiva histórica

I. 2. 1. Antibióticos

A história dos antibióticos tem início com uma observação de Alexander Fleming, em 1921, de meios de cultura antigos esquecidos no seu laboratório. Quando regressou de férias, constatou que estes tinham fungos e que, na sua proximidade, as bactérias não se desenvolviam. Fleming isolou estes fungos (da família do *Penicillium*), de onde nasceu o primeiro antibiótico da História: a penicilina, tendo sido premiado por esta descoberta com o Nobel da Medicina em 1945. Fleming rapidamente se apercebeu que esta substância não era eficaz contra todas as bactérias, tal como se fosse usada em doses baixas ou durante um curto período de tempo, fazia com as bactérias adquirissem resistências. Por esta razão, preconizou o uso da penicilina apenas quando houvesse razão evidente para tal e nunca em baixas quantidades ou num curto período de tempo (Ferreira e Sousa, 1998).

Em 1962, George Leshner descobre o ácido nalidíxico (figura 1), precursor de todas as quinolonas, durante a síntese de cloroquina. Foi inicialmente utilizado para infecções renais, pois a sua forte ligação às proteínas plasmáticas e a fraca distribuição por todos os tecidos impedia-o de ter outras utilizações para além do tratamento de infecções do tracto urinário por bactérias Gram-negativas (Ball, 2000).

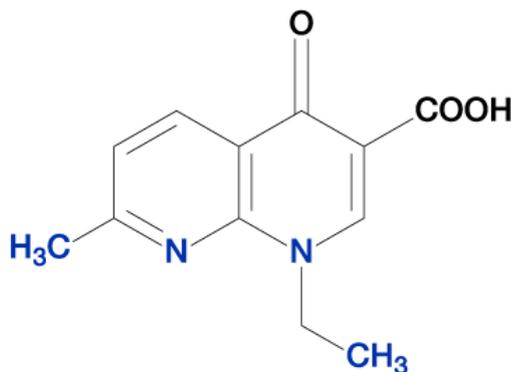


Figura 1. Estrutura do ácido nalidíxico

I. Capítulo – Introdução Teórica

Nos anos 70 são descobertas quatro novas quinolonas, entre elas, o ácido pipemídico, o ácido oxolínico e a cinoxacina e em 1980 surge a primeira FQ: a NOR (figura 2). A sua principal inovação consistiu na introdução de uma molécula de flúor na posição 6 e do grupo piperazil na posição 7, passando a ter mais efeito contra bactérias Gram-positivas, uma das limitações até então. Estas alterações também melhoraram a sua distribuição no organismo, aumentando a capacidade de debelar infecções no tracto respiratório, na pele, ossos, entre outras (Wentland, 1993).

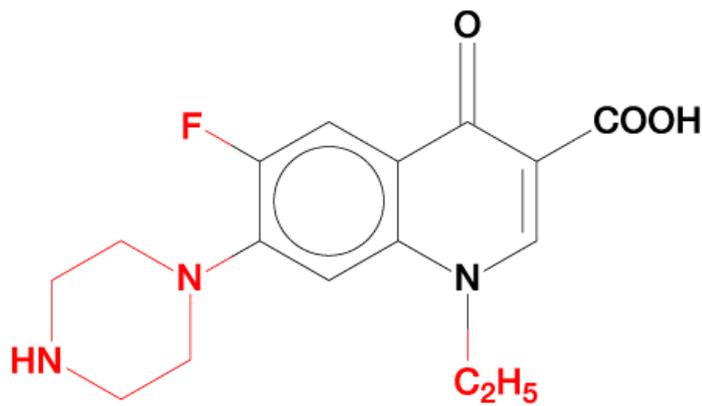


Figura 2. Estrutura da norfloxacina

Ainda em 1980, Grohe e Peterson sintetizam a ENR (figura 3), criada exclusivamente para uso veterinário. Em 1988, é introduzida no mercado pela Bayer®, tornando-se numa das quinolonas mais utilizadas em veterinária (Wentland, 1993; Ball, 2000; Takahashi et al, 2003).

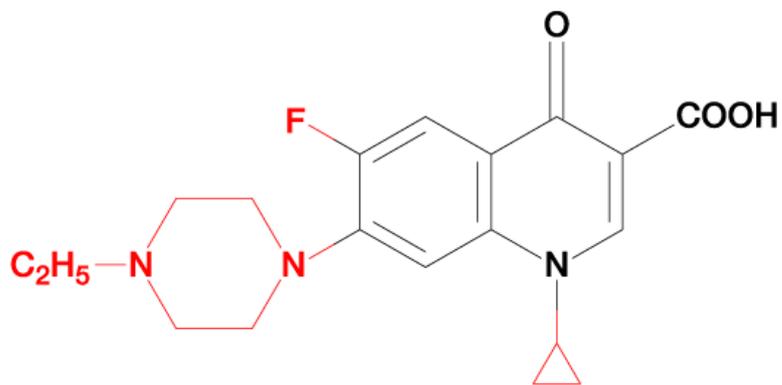


Figura 3. Estrutura da enrofloxacina

I. Capítulo – Introdução Teórica

Em 1983, a CIP (figura 4) é patenteada pela Bayer®, tendo autorização de introdução no mercado em 1987. Esta FQ ainda hoje é muito utilizada em diversas infecções no Homem (Ball, 2000; Takahashi et al, 2003): em pneumonias causadas por *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Proteus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas*, *Haemophilus*, *Branhamella*, *Legionella* e *Staphylococcus*, em infecções do ouvido médio (otite média), dos seios perinasais (sinusite), em especial quando causadas por agentes patogénicos Gram-negativos (incluindo *Pseudomonas* ou *Staphylococcus*), em infecções oftalmológicas, infecções dos rins e/ou do tracto urinário eferente, infecções dos órgãos genitais, incluindo anexite, gonorreia e prostatite, infecções da cavidade abdominal, infecções da pele e tecidos moles e infecções ósseas e articulares (Sweetman, 2004).

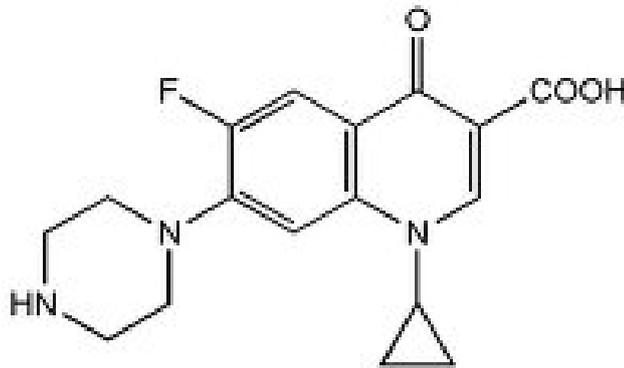


Figura 4. Estrutura da ciprofloxacina

I. 2. 2. Utilização de antibióticos em Veterinária

I. 2. 2. 1. Uso terapêutico e profilático de antibióticos

No início do século XIX, a criação de animais de consumo humano era desenvolvida em quintas de pequena dimensão, normalmente unifamiliares, onde estes eram alimentados sobretudo com pasto e milho. Nos últimos sessenta anos, porém, esta realidade foi profundamente alterada. A produção de animais em pequena escala, no seio de pequenas quintas familiares, foi progressivamente abandonada e substituída pela produção em massa, em locais de grande dimensão (Verhoef-Verhallen e Rijs, 2003).

Actualmente, a Agência Europeia do Medicamento (EMA) possui legislação que estabelece quais os antibióticos que podem ser utilizados e como devem ser utilizados, bem como os que são proibidos.

As FQs ENR, NOR e sarafloxacin (SARA) estão autorizadas em medicina veterinária, apesar de pertencerem a um grupo de antibióticos importante para uso humano. No entanto, as situações mais graves são a da utilização da NOR, visto que esta também é utilizada no Homem, e da ENR que apesar de não ser utilizada no Homem, o seu principal metabolito é a CIP, FQ muito utilizada em medicina humana. Acrescentando a esta situação o facto de as resistências adquiridas, com frequência, se estenderem a todo o grupo de antibióticos e não apenas ao antibiótico que foi utilizado (FAO/WHO/OIE, 2007).

O aumento da utilização em veterinária de FQs, um importante grupo de antibióticos da medicina humana, repercutiu-se na incidência de estirpes resistentes em *Campylobacter spp.*, tendo sido verificado um aumento considerável de estirpes resistentes à CIP, de 1% em 1990, para 80%, em 1996 (Rodriguez, 1998). Uma variação tão espectacular não pode ser explicada exclusivamente em função do uso inadequado na medicina humana. A introdução da ENR na medicina veterinária, contribuiu significativamente para a emergência de estirpes de *Campylobacter spp.* resistentes às quinolonas (Endtz, 1991; WHO, 1997).

Foi também observado um aumento da incidência de resistências às fluoroquinolonas, em estirpes de *E. coli* isoladas em animais, de 13-30% em frangos, 50% em perus e de aproximadamente 30% nos tratadores, relativamente à restante

população. No cômputo geral, a resistência de *E. coli* às FQs aumentou de apenas 0,8% em 1989 para 17% em 1997 (Rodriguez, 1998).

Mais relevante foi a emergência, na Europa, da *Salmonella typhimurium* DT104 resistente às FQs (Levy, 1998).

A utilização de ENR em veterinária foi proibida nos EUA, em 2005, na sequência de um estudo desenvolvido pela FDA, que concluiu que a sua utilização em veterinária era prejudicial à Saúde Pública, apesar da oposição da Bayer®, para quem não se justificava a sua retirada do mercado (FDA, 2004; FDA, 2005).

I. 2. 2. 2. Uso como promotores de crescimento

Esta prática consiste na administração diária de doses subterapêuticas para promover o crescimento dos animais, melhorando a eficiência da alimentação, através da eliminação de bactérias patogénicas que existem naturalmente em proporções subclínicas e alteração da flora não patogénica intestinal. Desta forma, a digestão é optimizada, não ocorrendo fenómenos de fermentação dos nutrientes. As bactérias intestinais inibem as enzimas pancreáticas e metabolizam as proteínas com a produção de amoníaco e aminas. A destruição destas bactérias conduz a uma melhor digestibilidade das proteínas (Sapkota et al, 2007). Calcula-se que também haja alterações ao nível metabólico, uma vez que se detectaram níveis mais elevados de insulina em porcos com este tipo de tratamento. Um valor aumentado de insulina permite uma mais fácil utilização da glicose circulante no sangue por parte as células, melhorando a utilização de energia pelas células (Tollefson e Karp, 2004).

Naturalmente que esta utilização também contribui para o tratamento profilático, contribuindo para que não haja perdas de peso por doenças infecciosas, debilitantes dos animais (Sapkota et al, 2007; Tollefson e Karp, 2004).

A utilização de antibióticos como promotores de crescimento foi proibida inicialmente nos países escandinavos: em 1986 na Suécia, 1995 na Noruega e em 1998/1999 na Dinamarca (Bengtsson e Wierup, 2006).

No decorrer destes últimos anos, assistimos a uma progressiva revogação da autorização de vários antibióticos utilizados como promotores de crescimento. Neste sentido, a Comunidade Europeia revogou a autorização da avoparcina em Janeiro de

I. Capítulo – Introdução Teórica

1997, através da Directiva 97/6/CE da Comissão de 30/1/97, da ampicilina em Janeiro de 1998 (Directiva 97/72/CE da Comissão de 15/12/97) e da bacitracina-zinco, espiramicina, tilosina e virginiamicina em Janeiro de 1999 (Regulamento CE nº 2821 do Conselho de 17/12/98; EMEA/CVMP/SAGAM/184651/2005, 2007).

Os motivos alegados para a revogação são vários:

- No caso da avoparcina, devido a resistência cruzada com vancomicina, um glicopeptídeo muito importante na medicina humana, e com a teicoplanina em *Enterococcus faecium*, último recurso contra as infecções enterocócicas resistentes à vancomicina (Feinman, 1998);
- No que respeita à tilosina e espiramicina, o Comité Científico da Alimentação Animal (CCAA) constatou que existe resistência cruzada da tilosina com a eritromicina, antibiótico da família dos macrólidos muito importante na medicina humana, nomeadamente no tratamento de infecções respiratórias. A resistência dos *Enterococcus* aos macrólidos é frequentemente codificada por vários genes que conferem igualmente resistência às lincosaminas e à estreptogramina B. Se os *Enterococcus* resistentes aos macrólidos apresentarem igualmente resistência à estreptogramina B, tal facto constitui um problema clínico em termos de medicina humana (Maravic e Flogel, 1998);
- Com a virginiamicina ocorre resistência cruzada com a associação quinupristina/dalfopristina, que são clinicamente importantes na medicina humana, no tratamento dos *Enterococcus* resistentes à vancomicina (Levy, 1998; Rodriguez, 1998).

Em 1 de Janeiro de 2006, a UE proíbe a utilização de antibióticos como promotores de crescimento na produção de animais. Mas a sua utilização continua a ser permitida nos EUA.

Desde 2006 que apenas é permitida a utilização de antibióticos em veterinária como terapêutica individual de animais doentes e como prevenção de infecções nos que estiveram em contacto com animais doentes.

I. 3. Legislação geral

O diploma legal que regula a prescrição e presença de resíduos de antibióticos em carne para consumo humano é o Decreto-Lei nº 151/2005 de 30 de Agosto.

Este estabelece a obrigatoriedade da prescrição médica veterinária para qualquer antibiótico administrado a animais destinados ao consumo humano. As receitas são emitidas em quadruplicado, destinando-se o original e duplicado ao fabricante ou distribuidor autorizado, o triplicado ao detentor dos animais e o quadruplicado ao médico veterinário prescriptor. Cada receita é válida apenas para um único tratamento e para um período nunca superior a um mês.

O citado diploma estipula igualmente a necessidade de um intervalo de segurança entre a utilização de um antibiótico num animal para consumo humano e o seu abate. Este intervalo visa permitir a eliminação do princípio activo administrado e respectivos metabolitos para que a carne que vier a ser consumida pelo Homem não tenha resíduos prejudiciais à sua saúde.

A fiscalização do cumprimento das normas de utilização de antibióticos em medicina veterinária cabe à Direcção Geral de Veterinária, às Direcções Regionais de Agricultura e à Inspeção-Geral das Actividades Económicas.

É estabelecido o Laboratório Nacional de Investigação Veterinária como o laboratório de referência para as análises necessárias, ou outro acreditado por este para os ensaios a efectuar.

I. 4. Quinolonas e Fluoroquinolonas

I. 4. 1. Classificação das Quinolonas

As Quinolonas de uso Humano dividem-se em 1ª, 2ª, 3ª e 4ª geração (Tabela 1) (Ball, 2002):

Tabela 1. Classificação das quinolonas utilizadas em medicina humana

<u>Quinolonas</u>	1ª Geração	Cinoxacina · <u>Flumequina</u> · <u>Ácido Nalidíxico</u> · <u>Ácido Oxolínico</u> · <u>Ácido Pipemídico</u> · <u>Ácido Piromídico</u> · <u>Rosoxacina</u>
	2ª Geração	<u>Ciprofloxacina</u> · <u>Enoxacina</u> · <u>Fleroxacina</u> · <u>Lomefloxacina</u> · <u>Nadifloxacina</u> · <u>Ofloxacina</u> · <u>Norfloxacina</u> · <u>Pefloxacina</u> · <u>Rufloxacina</u>
	3ª Geração	<u>Balofloxacina</u> · <u>Grepafoxacina</u> · <u>Levofloxacina</u> · <u>Pazufloxacina</u> · <u>Sparfloxacina</u> · <u>Temafloxacina</u> · <u>Tosufloxacina</u>
Fluoroquinolonas	4ª Geração	<u>Clinafloxacina</u> · <u>Garenoxacina</u> · <u>Gemifloxacina</u> · <u>Moxifloxacina</u> · <u>Gatifloxacina</u> · <u>Sitafoxacina</u> · <u>Trovafoxacina/Alatrofloxacina</u> · <u>Prulifloxacina</u>

A ENR não entra nesta classificação por ser de uso exclusivo em veterinária (Wentland, 1993).

I. 4. 2. Mecanismo de acção

As quinolonas actuam inibindo duas enzimas indispensáveis à replicação do ADN: as topoisomerase II (ADN girase) e IV. Estes mecanismos diferem consoante as bactérias em causa. Tanto a topoisomerase II como a IV têm estruturas semelhantes, possuindo duas subunidades, a girase A (Gyr-A) e a girase B (Gyr-B), daí resultando a inibição destas duas estruturas (Hooper et al, 1993).

A topoisomerase II tem a função de separar as duas cadeias de ADN, possibilitando a sua replicação. As quinolonas ligam-se aos pares na Gyr-A, através de forças electrostáticas, no local que seria destinado ao ADN, impedindo este de se ligar. No entanto, as quinolonas com grupos amina na posição 7 têm a capacidade de se ligar à Gyr-B, formando um complexo Quinolona-Topoisomerase II mais estável (Hooper e Wolfson, 1993; Morais et al, 1997).

A topoisomerase IV intervém após a replicação, uma vez que as duas cadeias de ADN replicadas criam ligações entre elas que necessitam de ser removidas para a criação de um novo cromossoma e integração na nova célula a ser formada. Esta topoisomerase também ajuda ao desenrolamento do ADN quando este apresenta carga positiva (Deibler et al, 2001). O mecanismo de ligação das quinolonas é idêntico ao da topoisomerase II.

Nas bactérias Gram-negativas, o principal mecanismo é o da inibição da topoisomerase II, enquanto nas Gram-positivas a inibição da topoisomerase IV é mais importante.

Existem também outros mecanismos de acção, alguns deles ainda desconhecidos, sendo um dos mais prováveis, uma ligação directa ao ADN, dificultando a sua replicação (Song et al, 1999).

I. 4. 3. Farmacocinética

Como foi referido anteriormente, um dos primeiros antibióticos do grupo das quinolonas é o ácido nalidíxico, que apenas tem aplicação em infecções do tracto urinário devido à sua má absorção sistémica. Com a introdução das fluoroquinolonas obteve-se uma boa penetração tissular e um aumento do seu espectro de acção. Essa melhoria de absorção e penetração foi decisiva para a sua eficácia em tecidos onde anteriormente as suas concentrações eram inferiores às necessárias para debelar a infecção.

I. 4. 3. 1. Farmacocinética em frangos

I. 4. 3. 1. 1. Enrofloxacina

A ENR pode ser administrada por via intravenosa, intramuscular, subcutânea e oral. Por uma questão pragmática, a via mais utilizada é a oral, apesar de criar dificuldades na determinação da quantidade que cada frango ingere (El-Aziz et al, 1997).

Pela via intravenosa, a concentração máxima é obtida cinco minutos após a administração (5mg/kg), sendo detectável até quarenta e oito horas depois desta. Pela via intramuscular, a ENR atinge a concentração máxima uma hora após a administração, só deixando de ser detectável quarenta e oito horas mais tarde. No que respeita à via subcutânea, os parâmetros são idênticos aos da via intramuscular (El-Aziz et al, 1997).

Pela via oral, são necessárias duas horas e meia para se atingir a concentração máxima, sendo também detectável até quarenta e oito horas após a administração. No entanto, a biodisponibilidade é inferior na administração oral (59,6%), sendo de 87,5% e 80,8% na administração intramuscular e subcutânea, respectivamente. Naturalmente, a intravenosa, por ter uma absorção mais rápida, é também a primeira a ser excretada. Portanto, apesar de a ENR ser detectável por esta via durante quarenta e oito horas, à semelhança do que sucede com a administração pelas outras vias, a curva da sua

I. Capítulo – Introdução Teórica

concentração começa a diminuir mais cedo que as restantes (figura 5) (El-Aziz et al, 1997).

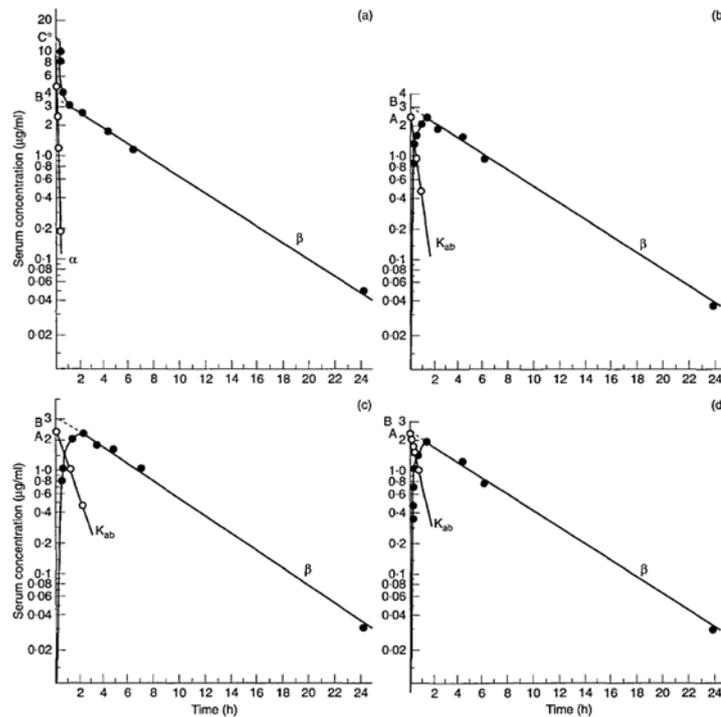


Figura 5. Gráfico semilogarítmico que analisa a concentração de enrofloxacina após administração única intravenosa (a); intramuscular (b); oral (c) e subcutânea (d) de 10mg/kg em frangos. (El-Aziz et al, 1997)

Visto que os valores de pK (constantes de dissociação) da ENR são a pH 6 e pH 8, e dada sua lipossolubilidade, em ambiente fisiológico, esta molécula terá maior afinidade para tecidos com maior percentagem em lípidos do que para meios aquosos (Bugyei et al, 1999). Este mecanismo não será o principal para explicar a sua distribuição, pois existirão provavelmente locais específicos de ligação, mas ajuda a explicar a boa distribuição tissular das FQs.

A eliminação da ENR processa-se directamente por via renal e hepática e, principalmente, pela metabolização a CIP, a qual, por sua vez, é também eliminada por via renal e hepática.

A concentração de ENR em tecidos após administração oral de 10 mg/kg, durante 5 dias (tabela 2) a frangos, revela que o fígado, o rim e a gordura são os locais de maior

I. Capítulo – Introdução Teórica

acumulação. Os dois primeiros, por serem locais de excreção, o último devido à sua grande lipossolubilidade a pH 7 (El-Aziz et al 1997).

Tabela 2. Concentrações de enrofloxacin em diversos tecidos após administração oral de 10 mg/kg durante 5 dias a frangos. Adaptado de El-Aziz et al (1997)

Amostras	Tempo até ao abate depois de administrada a ultima dose (horas)				
	2	24	48	72	96
Soro	2,01 ± 0,27	0,36 ± 0,07	0,047 ± 0,01	-	-
Cérebro	0,11 ± 0,01	0,035 ± 0,005	-	-	-
Coração	0,28 ± 0,04	0,091 ± 0,01	-	-	-
Pulmão	0,56 ± 0,06	0,037 ± 0,01	0,013 ± 0,001	-	-
Fígado	0,70 ± 0,12	0,22 ± 0,07	0,025 ± 0,003	0,013 ± 0,001	-
Rim	0,51 ± 0,06	0,26 ± 0,06	0,032 ± 0,004	0,015 ± 0,001	-
Baço	0,46 ± 0,11	0,042 ± 0,008	-	-	-
Músculo do peito	0,30 ± 0,04	0,060 ± 0,008	-	-	-
Músculo da coxa	0,13 ± 0,03	0,037 ± 0,004	-	-	-
Pele	0,36 ± 0,06	0,16 ± 0,043	0,025 ± 0,01	-	-
Gordura	0,70 ± 0,12	0,05 ± 0,013	0,022 ± 0,001	0,013 ± 0,002	-

Soro (µg/ml) e tecidos e órgãos (µg/g)

Para além dos já referidos, há ainda factores relacionados com a água na qual é dissolvida e administrada a ENR que podem interferir com a biodisponibilidade desta.

Para um tratamento eficaz, a concentração no soro do sangue dos frangos deve ser o dobro da concentração inibitória mínima (concentração de antibiótico mínima necessária para que não haja desenvolvimento bacteriano – CIM) e deve ser atingida o

I. Capítulo – Introdução Teórica

mais rapidamente possível. Em ordem a satisfazer estes pré-requisitos, deve ter-se em conta que quanto maior for a dureza da água, menor será a biodisponibilidade da ENR. Acresce que a utilização de tubagem galvanizada também diminui a biodisponibilidade, tal como a exposição à luz solar de água, devido ao efeito de fotodegradação. A diminuição da biodisponibilidade devido à dureza da água deve-se à formação de complexos, como o cálcio ou o magnésio, que dificultam a sua absorção no tracto gastrointestinal (Sumano et al, 2004).

No sentido de otimizar a administração, deve ser retirada a água uma hora antes e a dispensa de água com ENR deve ser medida para calcular a quantidade que foi administrada (Sumano et al, 2004).

I. 4. 3. 1. 2. Norfloxacin

A NOR apresenta um comportamento similar ao da ENR, e é também administrada dissolvida na água, embora seja também possível injectá-la em animais de grande porte.

Após a administração de 18 mg/kg de NOR, durante 5 dias consecutivos, verificou-se que os seus resíduos persistem até seis dias no rim e fígado, enquanto que no músculo perduraram 96 horas. No plasma, após 24 horas, não foram detectados quaisquer resíduos de NOR (Diaz et al, 2001).

I. 4. 3. 2. Farmacocinética em Humanos

I. 4. 3. 2. 1. Ciprofloxacina

Dada a sua utilização exclusiva em medicina humana, os dados disponíveis sobre farmacocinética da CIP respeitam apenas a medicamentos de uso humano. Uma vez que esta pertence ao mesmo grupo e atento o facto de ser o principal metabolito da ENR, considerámos que seria relevante analisar a sua farmacocinética no Homem.

A CIP, à semelhança da ENR, é bem absorvida pela via oral, através do tracto gastrointestinal, com uma absorção de 70% e atingindo a concentração máxima uma a

duas horas depois de uma administração de 500mg. No entanto, a absorção sofre oscilações, consoante haja ou não presença de alimentos no estômago. Esta provoca um atraso na absorção. A ligação às proteínas plasmáticas é de 20 a 40% e, tal como a ENR, possui uma boa penetração e boa distribuição tissular, atravessando inclusive a barreira placentar e hemato-encefálica (Sweetman, 2004).

O seu principal meio de excreção é a via urinária, mas pode também ser metabolizada no fígado, excretada pela via biliar ou por secreção transluminal na mucosa intestinal. Após a administração oral, 40 a 50% daquela dose é excretada, nas vinte e quatro horas seguintes, por via urinária, sem sofrer alterações, sendo 15% excretada como metabolitos. A excreção fecal nos cinco dias seguintes é de 20 a 35% (Sweetman, 2004).

A CIP possui ainda metabolitos activos, que são excretados por via urinária e fecal (Sweetman, 2004).

I. 4. 4. Avaliação de segurança dos resíduos (Limite máximo de resíduo (LMR))

O Limite Máximo de Resíduo (LMR) é a concentração máxima do resíduo de um medicamento estabelecido pela União Europeia (EU) num alimento (EMEA, 2005).

Para a determinação deste valor, estabelece-se a dose diária aceitável (ADI), sendo esta a quantidade que um ser humano pode consumir diariamente, durante toda a sua vida, sem que haja algum risco desta exposição (EMEA, 2005). Esta ADI é calculada com base no valor de concentração mais elevado que não provoca efeitos adversos (NOEL) ou no valor da concentração mais baixa que provoca efeitos adversos, multiplicado por factor de segurança (FS), também denominado factor de incerteza, sendo este variável, consoante a toxicidade do composto e os dados disponíveis sobre o mesmo (EMEA, 2005).

Para determinar a ADI, considera-se que o peso médio de um ser humano é de 60kg. Sendo os valores de ADI dados em $\mu\text{g}/\text{kg}$ ou mg/kg , este valor precisa de ser multiplicado por 60 para se encontrar a quantidade de resíduo admitida diariamente. Neste cálculo, estima-se que o consumo diário de carne é de 500g, sendo desta 300g de músculo, 100g de fígado, 50g de rim e 50g de gordura (EMEA, 2005). Com base nesta

proporção estipulam-se diferentes valores de LMRs para os diferentes tecidos enunciados.

O LMR para cada tecido edível é determinado com a observância de concentrações de resíduo da mesma ordem de grandeza da ADI, nos diferentes produtos animais (tecido muscular, fígado, rim, gordura, leite, ovos e mel) (Brynes e Yong, 1993; Brynes et al, 1996).

No que se refere aos antibióticos, os estudos de toxicidade consideram que os resíduos de antibióticos, ainda microbiologicamente activos, são potencialmente capazes de modificar a microflora intestinal do consumidor e, é com frequência este risco microbiológico que se impõe no estabelecimento dos LMRs mais baixos.

Nem todos os compostos utilizados têm um LMR definido. Alguns não são considerados perigosos, não tendo LMRs, outros têm LMRs provisórios e outros ainda são proibidos para uso animal.

I. 4. 4. 1. Norfloxacin

Relativamente à NOR, não está estabelecido qualquer LMR, o que significa que os produtores de animais para consumo humano podem utilizar este antibiótico sem qualquer restrição, pois não há fiscalização ou sanção que lhes possa ser aplicada.

I. 4. 4. 2. Enrofloxacin

Em relação à ENR, o valor de ADI foi calculado, tendo em conta que a CIM da *Escherichia coli* é de 0,015 µg/ml e utilizando um factor de segurança de 10, obtendo-se assim um valor de LMR de 30 µg/kg para suínos, bovinos e frangos. Para cálculo do LMR, é usada a soma dos resíduos de ENR e CIP (EMEA, 1998).

Posteriormente, surgiu a primeira alteração através de novos estudos de toxicidade e de sensibilidade de bactérias, passando os LMRs, no caso dos frangos, para 100 µg/kg para músculo, gordura e pele, para 200 µg/kg para o fígado e para 300 µg/kg para o rim, não sendo permitida a sua utilização em animais que produzam ovos para consumo

I. Capítulo – Introdução Teórica

humano (EMEA, 1998). Os LMRs mais elevados permitidos para fígado e rim coincidem com a farmacocinética das FQs, cuja maior concentração de resíduos será nestes órgãos.

A última revisão deste documento é de 2002, onde já constam todas as espécies de animais de consumo humano e seus LMRs, mantendo-se inalterados os LMRs para os frangos (EMEA, 2002).

Os estudos sobre LMRs não têm em linha de conta os efeitos decorrentes do processamento culinário dos alimentos.

Um estudo (Lolo et al, 2006) analisou o efeito da cozedura, da fritura, da cocção em forno, em microondas e grelhar, nas concentrações de ENR em carne de frango. A primeira conclusão é que a temperatura utilizada para confeccionar os alimentos não degrada a ENR, no entanto, verifica-se que a cozedura, a fritura e a utilização do microondas diminui a concentração de ENR no produto final, pois esta é transferida para o líquido que é utilizado para cozinhar ou no exsudado libertado pela carne.

Desta maneira, nos métodos de grelhar ou cozinhar no forno, uma vez que diminuem a percentagem de água da carne e uma vez que não há transferência para líquidos exteriores, a concentração da ENR, após a confecção, aumenta, podendo este aumento ser de 42% a 310% no músculo de frango (tabela 3) (Lolo et al, 2006).

I. Capítulo – Introdução Teórica

Tabela 3. Implicação de confecções diferentes dos alimentos na concentração de enrofloxacina. Adaptado de Lolo et al (2006).

Amostras	Efeitos dos diferentes tipos de preparação de alimentos na concentração de ENR (ng/g)					
		Frango 1	Frango 2	Frango 3	Frango 4	% de variação da concentração
Perna	Cru	29,00	10,45	50,24	25,52	
	Cozido	16,00	<LQ	26,07	14,40	<u>-48.11 a -43.57</u>
	Frito	14,00	9,00	25,62	8,60	<u>-66.30 a -13.88</u>
	Assado no forno	41,80	22,78	102,91	64,19	<u>44.14 a 151.53</u>
	Micro-ondas	17,00	<LQ	22,50	5,86	<u>-77.04 a -41.38</u>
	Grelhado	42,13	14,80	75,00	51,50	<u>41.63 a 101.80</u>
Peito	Cru	28,30	5,25	17,86	15,05	
	Cozido	12,30	<LQ	7,94	5,60	<u>-62.79 a -55.54</u>
	Frito	16,00	<LQ	12,22	5,28	<u>-64.92 a -31.58</u>
	Assado no forno	45,01	12,46	32,06	61,69	<u>59.05 a 309.90</u>
	Micro-ondas	10,74	<LQ	9,43	5,20	<u>-65.45 a -47.20</u>
	Grelhado	45,20	8,50	28,33	24,20	<u>58.62 a 61.90</u>
Fígado	Cru	10,03	29,64	32,61	65,71	
	Frito	8,00	19,00	29,25	25,71	<u>-61.50 a -10.30</u>
	Assado no forno	13,36	30,01	41,96	91,71	<u>28.67 a 39.57</u>

LQ- limite de quantificação

Pode então inferir-se que a ADI é correctamente determinada através da carne crua, pois a percentagem de ENR na carne, tanto aumenta, como diminui, consoante o processo culinário à qual foi sujeita, o mesmo se podendo prever para outras FQs.

I. 4. 5. Consumos de Quinolonas e Fluoroquinolonas na UE

Importa agora analisar os níveis de consumo nacionais, confrontando-os com os dos restantes países, no sentido de caracterizar o modelo português.

Recentemente, verificou-se um aumento do consumo de carne de frango, não apenas devido ao seu baixo preço, comparativamente com outro tipo de carnes, mas também devido ao aumento de problemas de saúde associados a níveis elevados de colesterol (mais abundante nas carnes vermelhas) e ao excesso de lípidos na alimentação.

Da análise da tabela 4, podemos, desde já, concluir, não obstante os consumos não discriminarem as espécies animais a que respeitam, que Portugal tem um consumo de FQs e quinolonas claramente exagerado, face aos seus níveis de produção de carne.

Tabela 4. Venda de FQs (toneladas de substância activa) e produção de carne em alguns países membros. Adaptado de EMEA/CVMP/SAGAM/184651/2005 (2007).

País	Venda de antimicrobianos (toneladas)		Produção de carne (toneladas abatidas)			
	FQs	Todas as quinolonas	Vaca e veado	Porco	Frango	Soma
Rep. Checa	0,8	1	103 775	409 102	215 802	728 679
Dinamarca	0,1	0,1	147 600	1 762 000	199 994	2 109 594
Finlândia	<0,1 (a)	<0,1	95 830	193 222	83 730	372 782
França	3,6 (a)	20,7	1 631 000	2 231 000	2 010 700	5 962 700
Holanda	0,3 (b)	5,0 (a)	364 000	1 250 000	564 000	2 178 000
Portugal	3,0	3,8	118 524	315 141	229 335	663 000
Suécia	0,2 (a)	0,2	136 300	287 500	99 850	523 650
Reino Unido	1,4	1,4	687 000	690 000	1 569 987	2 946 987

Dados de 2003, excepto vendas da França que são de 2002

(a) - Inclui gatos e cães

(b) - Apenas frangos

I. Capítulo – Introdução Teórica

Em Portugal o consumo de quinolonas (3,8 ton) é quase exclusivamente de FQs (3 ton) (EMEA/CVMP/SAGAM/184651/2005, 2007). Para uma produção de carne dez vezes superior a Portugal, a França, apesar de consumir cinco vezes mais quinolonas, mantém consumos de FQs idênticos aos nossos.

Confrontando estes valores com os dados publicados pela EMEA (tabela 8), percebe-se claramente porque é que 76% das estirpes de *Escherichia coli* analisadas em porcos para consumo humano em Portugal eram resistentes a FQs. Este valor, aparentemente descabido, está de acordo com os elevados níveis de consumo de FQs, que justificam a presença de resistências nesta ordem (EMEA/CVMP/SAGAM/184651/2005, 2007).

Em regra, quando surgem dúvidas relativamente a estados patológicos dos frangos, a primeira opção de tratamento é a ENR, graças à sua eficácia em diversas patologias. Grande parte dos utilizadores destas substâncias não está sensibilizada para os problemas que podem advir do seu mau uso, pelo que, naturalmente, não têm a preocupação de encontrar alternativas, já que esta solução lhes resolve o problema.

Lamentavelmente, não existem, além dos já mencionados (tabelas 4 e 8), mais dados que dêem conta da emergência de estirpes bacterianas resistentes a FQs em Portugal ou que discriminem os consumos de FQs por espécie. Seria, por isso, importante criar um grupo de trabalho que estudasse e quantificasse este problema, como, aliás, recomenda a EMEA, para melhor compreender e, conseqüentemente, minimizar os riscos da utilização de FQs em animais de consumo humano.

Importa sublinhar que a imposição de uma utilização muito reduzida de FQs na Dinamarca, Suécia e Noruega, não causou a diminuição do crescimento dos animais nem, tão pouco, da sua produção (WHO, 2003). Em contrapartida, foram implementados espaços de tamanho adequado, arejados e melhores condições de higiene, e medidas naturais promotoras de crescimento. Estas promovem o desenvolvimento de uma flora digestiva adequada, uma estabilização da digestão, o aumento do crescimento, a estimulação do sistema imunitário, a diminuição da incidência de diarreia, o aumento da eficácia da alimentação, a baixa dos níveis de mortalidade e conseqüentemente o aumento o lucro (Doyle, 2001; Bengtsson e Wierup 2006).

Curiosamente, e ao contrário da tendência geral, na Dinamarca, o controlo rigoroso das quantidades de antibióticos administradas em animais doentes (tabela 4) foi

uma medida implementada pela própria indústria, voluntariamente, e não imposta por qualquer legislação.

Os produtores quiseram conquistar mais confiança dos compradores, uma vez que estes começaram a levantar questões de Saúde Pública relativamente à elevada utilização de antibióticos na produção de animais para consumo humano. Deste modo, mesmo que houvesse um ligeiro aumento dos preços, os consumidores não se importariam de pagar um pouco mais por uma maior qualidade (WHO, 2003).

A questão principal da diminuição da utilização de antibióticos reside num investimento nas instalações de produção aviária com melhores condições sanitárias. Esta diminuição é possível, desde que as instalações tenham métodos eficientes de limpeza e desinfecção para minimizar o aparecimento de doenças infecciosas e evitar a sua disseminação. É necessário manter uma ventilação adequada para evitar disseminação por via aérea, criar zonas de isolamento, manter temperaturas ambientes apropriadas, não ter um número de animais superior à capacidade que o espaço comporta e guardar registos de infecções e áreas afectadas, para futura análise de risco (Doyle, 2001; WHO, 2003).

I. 4. 6. Toxicidade resultante da utilização de Fluoroquinolonas

I. 4. 6. 1. Toxicidade aguda

Segundo um estudo da Bayer® feito em frangos, o consumo de uma dose de ENR até 10 vezes superior à dose terapêutica, durante 5 dias, não resultou em nenhum sinal clínico e não houve efeitos adversos (Baytril®, 2005). Existem, no entanto, outros estudos que relatam, noutras espécies, fragilidade e ruptura de tendões (El-Aziz et al, 1997).

As concentrações de FQs existentes na carne para consumo humano não apresentam qualquer risco de toxicidade aguda (EMEA/CVMP/SAGAM/184651/2005, 2007).

I. 4. 6. 2. Toxicidade crónica - Emergência de resistências bacterianas

O maior risco da utilização de FQs e, neste caso em particular, da ENR (e CIP, pois é seu metabolito), é a emergência de estirpes bacterianas resistentes no tracto digestivo dos frangos. A sua utilização excessiva nestes animais faz com que as bactérias do tracto digestivo destes estejam em contacto permanente com o antibiótico, aumentando a probabilidade de emergirem resistências bacterianas a este grupo de antibiótico, formando um reservatório de estirpes de bactérias resistentes às FQs. Acresce que, a maior parte das vezes, estas estirpes de bactérias adquirem resistência a todo o grupo das FQs e não apenas às que foram administradas (FAO/WHO/OIE, 2007).

Algumas bactérias conseguem duplicar o seu número em apenas vinte minutos, estando esta rapidez relacionada com a sua rápida adaptação ao meio ambiente, através de mutações frequentes. As bactérias também partilham uma série de genes que podem ser transferidos de uma bactéria para outra, podendo disseminar uma determinada característica, rapidamente, numa população inteira. Este processo é realizado por plasmídeos, por elementos transponíveis entre bactérias, entre outros (resistência adquirida) (Harbottle et al, 2006).

As resistências adquiridas podem ocorrer por mutação ou por aquisição de novo material genético que contenha essa informação. Os mecanismos mais comuns são a inactivação do antibiótico por produção de uma enzima que o vai alterar, alteração do receptor do antibiótico, alterações das vias metabólicas, diminuição da permeabilidade e aumento de excreção. A transferência de material genético pode ocorrer por conjugação, onde um plasmídeo é transferido de uma bactéria para outra, dentro da mesma espécie ou por transdução, onde o material genético é adquirido por uma infecção por um vírus que infectou outras bactérias (bacteriófago), incorporando ADN destas no seu (Harbottle et al, 2006).

A resistência aos antibióticos também pode ser intrínseca, uma vez que há bactérias que são resistentes a antibióticos devido à incapacidade destes penetrarem na célula ou à falta de afinidade para com o receptor da bactéria ou mesmo à ausência deste (Harbottle et al, 2006).

I. Capítulo – Introdução Teórica

A resistência de uma bactéria a um antibiótico aumenta a probabilidade de ela se tornar resistente a outro antibiótico, uma vez que as porções de ADN que são transferidas entre bactérias costumam transportar informação para resistência a vários antibióticos (Harbottle et al, 2006).

Mas o risco não passa apenas pelo facto de as bactérias patogénicas adquirirem resistências, ele passa ainda pela circunstância de aquelas que não são patogénicas para o Homem - comuns no tracto gastrointestinal dos animais - poderem transferir a resistência a bactérias patogénicas.

Para determinar se uma bactéria é resistente a um dado antibiótico, é calculada a CIM, havendo parâmetros pré-definidos para cada bactéria e antibiótico. Quando este valor se encontra aumentado significa que a bactéria pode ter sensibilidade reduzida ou ser resistente ao antibiótico testado. O valor encontrado pode ser uma ajuda para determinar qual a alteração que a bactéria sofreu para ter a sua resistência alterada, visto que se agrupam em valores diferentes de CIM consoante a alteração existente (FAO/WHO/OIE, 2007).

As bactérias, antes de contactarem com os antibióticos e adquirirem resistências, têm uma CIM, sendo este valor considerado para comparações. Existem, no entanto, algumas bactérias que possuem resistências intrínsecas a alguns antibióticos, e outras que possuem subgrupos que também têm susceptibilidade alterada, não havendo nenhum destes casos nas situações referenciadas no presente estudo.

Apesar de alguns grupos de bactérias terem uma CIM superior às susceptíveis, não significa que a terapêutica não funcione com esse antibiótico, mas diminui a probabilidade de isso acontecer.

Há mutações que provocam diminuição de sensibilidade às FQs. Para testar esta alteração deve ser utilizado o ácido nalidíxico, atendendo a que, nestas situações, apresenta valores de CIM superiores (FAO/WHO/OIE, 2007).

I. 4. 6. 2. 1. Resistências em *Campylobacter spp.*

Estas bactérias, em caso de infecção do ser humano, provocam cefaleias, dor abdominal, gastroenterites e diarreias. O tratamento com antibiótico (utilizado em cerca de 10% dos infectados) normalmente é apenas utilizado em doentes vulneráveis, tais como idosos, crianças, doentes crónicos e imunodeprimidos. Esta infecção também

I. Capítulo – Introdução Teórica

pode provocar complicações secundárias como artrite reactiva e síndrome de Guillian-Barré (paralisia progressiva que pode levar à morte), sendo ainda possível, embora mais raro, provocar infecções extra intestinais como meningite e peritonite (Griggs et al, 2005).

O antibiótico de primeira escolha para estas situações é a eritromicina (macrólido) e, em caso de resistência a este, são utilizadas as FQs (WHO, 2008).

No Reino Unido e País de Gales, desde 1997, foram registadas cinquenta a sessenta mil infecções por *Campylobacter*, sendo que o número real deve rondar o meio milhão por ano, devido à não identificação do agente patogénico e poucas notificações (Endtz et al, 1991).

A principal fonte de contaminações é de origem animal, através da manipulação de carne crua e ingestão de carne mal cozinhada (Endtz et al, 1991).

As resistências de estirpes de *Campylobacter* às FQs começaram a surgir nos anos 90 e coincidem com a utilização em grande escala da ENR (Endtz et al, 1991; Griggs et al, 2005). Actualmente, já se reconhece que a percentagem de estirpes de *Campylobacter* resistentes a FQs é muito elevada (FDA, 2004; EMEA/CVMP/SAGAM/184651/2005, 2007; WHO, 2008).

Os frangos são frequentemente colonizados com *Campylobacter* às duas semanas de vida, devido à sua exposição a outros animais, tais como outros frangos, aves selvagens, roedores e insectos e a águas contaminadas. Quando contaminados, todas as aves do local onde se encontram ficam contaminadas (apesar de ficarem assintomáticas), excretando através das fezes largas quantidades de *Campylobacter*. Naturalmente que, havendo poucas condições de higiene, há transmissão durante o transporte, no abate, através da água, etc. Significa isto que a transmissão destas bactérias é comum e simples. As bactérias resistentes podem contaminar outros animais, não sendo necessário sequer que estes tenham ingerido antibióticos e desenvolvido estirpes bacterianas resistentes no seu organismo (FDA, 2005; Griggs et al, 2005).

Estas bactérias encontram-se na flora intestinal de 50% dos frangos, estando apenas no intestino humano durante infecções (não há portadores assintomáticos). Uma vez que não há necessidade de tratar com frequência e que é rara a transmissão humano-humano, a probabilidade das resistências provirem do consumo de FQs pelo homem parece muito baixa. Para o comprovar, temos exemplos de países que utilizam FQs no Homem, onde as resistências são inexistentes se não houver introdução de FQs no tratamento de frangos. Este tipo de resistência a FQs não existia na Holanda antes da

I. Capítulo – Introdução Teórica

introdução no tratamento de frangos deste antibiótico. Após a sua introdução, as resistências aumentaram, não só em estirpes de *Campylobacter* dos frangos, como ainda nas infecções no Homem. Na Austrália, onde nunca foram autorizadas FQs para tratamento de frangos, as estirpes de *Campylobacter* continuam a ser sensíveis aos tratamentos com FQs no Homem. Apesar de na Austrália terem sido detectados alguns casos de infecção em humanos, por estirpes resistentes de *Campylobacter* a FQs (12 casos em 370 analisados), 10 destes 12 casos estavam relacionados com a aquisição da infecção fora do país (Endtz et al, 1991).

Um estudo nos EUA mostra que as infecções por estirpes de *Campylobacter* resistentes a CIP na população humana da região estudada eram provenientes das explorações de frangos da mesma região (Smith et al, 1999).

No Reino Unido, em 2000, 13% dos *Campylobacter jejuni* e 15% dos *Campylobacter coli* analisados em carne à venda para consumo humano era resistente à CIP, enquanto 18% dos *C. jejuni* e 26% dos *C. coli* isolados de infecções humanas eram resistentes. Estes números são ilustrativos da dimensão dos riscos causados pela utilização contínua e excessiva de FQs em frangos de consumo humano e que têm vindo a aumentar de ano para ano (FDA, 2005).

Os mecanismos pelos quais esta bactéria se torna resistente são vários. Um deles resulta de uma mutação no gene que codifica a subunidade Gyr-A. No *Campylobacter jejuni* esta alteração provoca uma troca de um aminoácido que é suficiente para conferir uma elevada resistência às FQs (Hakanen et al, 2002). Também foram relatadas situações de polimorfismo e de uma mutação que confere ao *Campylobacter jejuni*, resistência não só de FQs, mas também a outros antibióticos. Porém, a inativação desta mutação confere novamente ao *Campylobacter jejuni* sensibilidade às FQs (Lin et al, 2002; Pumbwe e Piddock, 2002).

Esta última mutação vem provar que não há só o perigo de as bactérias desenvolverem resistências aos antibióticos a que são expostos, mas também, a outros antibacterianos, pois alguns mecanismos de resistência são inespecíficos. Este problema de Saúde Pública alarga assim a discussão da utilização de FQs não apenas às resistências criadas a estas, mas também a outros antibióticos (FDA, 2004).

A referida mutação na Gyr-A dá-se entre uma e cinco bactérias em 100 milhões de *Campylobacter*, dado o grande número destas bactérias que coloniza o intestino dos frangos. Ao administrar ENR, vai-se criar um ambiente favorável ao desenvolvimento de estirpes com esta mutação, pois esta vai deixar de ter concorrência e pode

I. Capítulo – Introdução Teórica

multiplicar-se livremente. Pode assim ocorrer disseminação da estirpe através dos mecanismos anteriormente referidos: água de consumo, contágio dentro dos pavilhões, etc. (EMEA/CVMP/SAGAM/184651/2005, 2007).

Na presença de FQs, as estirpes de *Campylobacter* tornam-se, como foi referido, resistentes a outros antibióticos. É o que demonstra um estudo efectuado em 6 populações de frangos para consumo humano (tabela 5), que foram tratados com ENR devido a infecção clinicamente relevante, segundo instruções do veterinário (Griggs et al, 2005).

Tabela 5. Resistências cruzadas entre antibióticos em *Campylobacter spp.* isolados de frangos de produção para consumo humano. Adaptado de Griggs et al (2005)

Agente	Concentração (≥µg/ml) utilizada para determinar resistências	% de resistências entre CIP(1) isolados (número por grupo)					% de resistências entre CIP(2) isolados (número por grupo)				
		1	3	4	5	6	1	3	4	5	6
ERY	4	2(1)	5(2)	24(6)	26(10)	7(2)	29(23)	2(1)	29(12)	3(2)	
CHL	8	2(1)	2(1)	16(4)	0(0)	4(1)	5(4)	0(0)	20(8)	0(0)	2(1)
TET	8	9(4)	0(0)	36(9)	0(0)	78(21)	51(40)	0(0)	68(28)	19(13)	61(37)
KAN	16	13(6)	10(4)	56(14)	10(4)	7(2)	10(8)	19(8)	49(20)	13(9)	3(2)
AMO	16	28(13)	71(30)	20(5)	13(5)	59(16)	83(65)	74(31)	80(33)	25(17)	36(22)
EtBr	8	15(7)	17(7)	40(10)	18(7)	59(16)	41(32)	2(1)	20(8)	54(37)	77(47)
MDR		4(2)	5(2)	24(6)	5(2)	4(12)	32(25)	0(0)	46(19)	9(6)	38(23)
Total		46	42	25	39	27	78	42	41	68	61

CIP(1): CIM ≤ 1 µg/ml; CIP(2): CIM ≥ 2 µg/ml. MDR indica resistência a três ou mais dos agentes seguintes eritromicina (ERY), cloranfenicol (CHL), tetraciclina (TET), canamicina (KAN), ampicilina (AMP) ou brometo de etídio (EtBr)

Neste estudo, em que foram analisados 6 grupos de frangos tratados com ENR, a percentagem de estirpes de *Campylobacter* resistentes durante o tratamento era de quase 100% e manteve-se durante algumas semanas (tabela 6). Apesar de uma semana depois não serem detectados no músculo vestígios de ENR nem de CIP, os seus efeitos na resistência de estirpes de *Campylobacter* à CIP continuam patentes, deixando assim

I. Capítulo – Introdução Teórica

claro que a simples determinação da existência de resíduos do antibiótico nos frangos não é suficiente para determinar a influência na Saúde Pública da utilização de ENR nestes animais (Humphrey et al, 2005).

Tabela 6. Amostras de fezes de frangos contaminadas com *Campylobacter spp.* resistentes a quinolonas. Adaptado de Humphrey et al (2005)

Grupo	Número de amostras resistentes isoladas/total de amostras (% resistência a quinolonas)					
	Antes do tratamento	Durante o tratamento	Semanas após o tratamento			
			1	2	3	4
1	2/14(12)	14/14(95)	11/14(64)	11/13(69)	A	-
3	1/14(1,4)	1/12(4,6)	14/14(70)	10/12(71)	1/13(2,6)	-
4	0/13(<2)	13/13(100)	12/14(75)	10/14(56)	-	-
5	4/14(2,4)	12/12(97)	14/14(95)	13/13(64)	13/14(8,3)	9/14(25)
6	4/11(<2)	14/14(96)	11/14(<1,5)	8/14(5,2)	2/13(<1,4)	4/11(3,5)

a-não foram colhidas amostras

No Grupo 5 deste estudo, os resultados foram ainda mais reveladores: registou-se uma prevalência inicial muito baixa que passou para uma resistência de praticamente 100% durante o tratamento (figura 6). Durante as quatro semanas seguintes, as resistências pouco diminuíram, sendo ao fim de quatro semanas ainda muito elevadas (Humphrey et al, 2005).

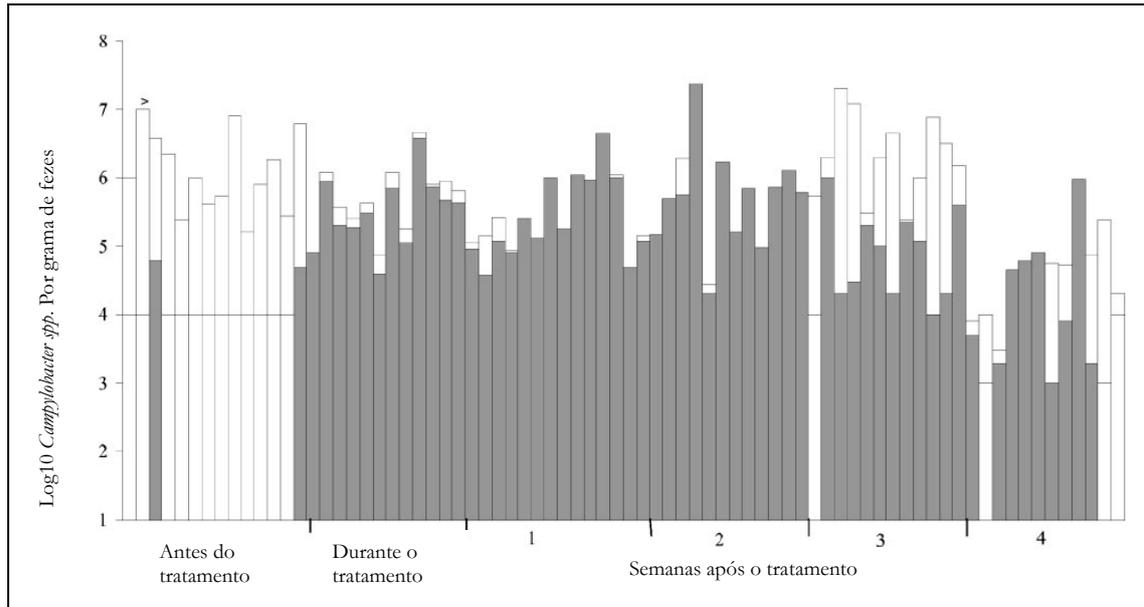


Figura 6. Número de *Campylobacter spp.* em fezes de frango, antes, durante e depois de tratamento com FQs. Cada coluna representa as amostras correspondentes aos frangos de cada grupo e a parte a sombreado as amostras contendo *Campylobacter spp.* resistentes à CIP. Adaptado de Humphrey et al (2005)

Demonstra-se que o tratamento com FQs em frangos provoca um desenvolvimento rápido de estirpes resistentes de *Campylobacter*, não apenas às FQs, mas também a outros antibióticos, mantendo-se a resistência às FQs durante várias semanas.

Uma vez que o tempo de administração recomendado pelo fabricante é de uma semana, passado este tempo e neste grupo continuamos com uma percentagem de perto de 100% de estirpes de *Campylobacter* resistentes (Humphrey et al, 2005). Em caso de infecção do Homem com este tipo de bactérias, e haver necessidade de tratamento, a administração de CIP não é eficaz, originando um prolongamento de sintomas e uma possível progressão da doença.

As estirpes de *Campylobacter*, sobretudo oriundas de frangos, constituem a principal contaminação de origem alimentar. Foi com base nestes dados que, em 2005, a FDA retirou do mercado a ENR para qualquer uso veterinário (FDA, 2005).

Estima-se que em 1999 cerca de 2,4 milhões de pessoas, nos EUA, foram infectadas com *Campylobacter*, sendo que 80% dessas infecções foram causadas por

I. Capítulo – Introdução Teórica

alimentos. 14,2% das infecções bacterianas provocadas por alimentos são infecções por *Campylobacter*, esta é a principal infecção bacteriana com origem em alimentos. Nos países desenvolvidos, os frangos são considerados o seu maior reservatório (Barza e Travers, 2002).

Nos EUA, as infecções por estirpes de *Campylobacter* sensíveis e resistentes a FQs têm a sua principal origem em frangos. Entre Junho de 1999 e Julho de 2000, análises a carcaças de frangos concluíram que 70,7% estavam contaminadas com *Campylobacter*, sendo que 41% eram estirpes resistentes ao ácido nalidíxico e 35% à CIP. Em 2002, uma análise a 365 peitos de frango concluiu que 58% estavam contaminados com *Campylobacter* (FDA, 2004; FDA, 2005).

Um estudo efectuado nos EUA em 1996 determinou que 88% dos produtos de frango analisados estavam contaminados com *Campylobacter* e que 20% destes eram estirpes resistentes à CIP (FDA, 2004; FDA, 2005).

A contaminação pode ter lugar por intermédio de material de cozinha, através da manipulação de carne seguida de outros alimentos, com recurso aos mesmos utensílios, e ainda por intermédio de alimentos mal cozinhados. Por esta razão, o consumo de carne de frango em restaurantes é, segundo diversos estudos, um dos mais importantes factores de risco de contaminação por *Campylobacter* (FDA, 2005).

Há, na maioria dos países, uma clara relação entre a introdução da ENR no mercado e o aumento de estirpes de *Campylobacter* resistentes. Nos EUA a resistência aumentou de 1,3%, em 1992, para 10,2%, em 1998 - dois anos depois da introdução da ENR. De salientar que este estudo excluiu pessoas que viajaram, no sentido de evitar erros resultantes de infecções que não foram adquiridas localmente. Um outro estudo, noutra região dos EUA, concluiu que, em 1996, 8,3% dos *Campylobacter* analisados eram estirpes resistentes à CIP, ao passo que em 2001 ascendiam já aos 40,5% (FDA, 2004; FDA 2005).

Em Espanha, a introdução da ENR teve lugar em 1990. Antes desta data, apenas 0 a 3% dos *Campylobacter* que infectavam o Homem eram resistentes à CIP; em 1990, 9% eram resistentes e em 1991 ascendiam aos 39%. Em pediatria, registou-se um aumento de 2,3%, em 1988, para 48,8%, em 1993 (FDA, 2005).

No Reino Unido, a introdução de CIP, para uso humano, no mercado aconteceu em 1987 e a da ENR em 1993. A resistência do *Campylobacter*, no início dos anos noventa, oscilava entre 1,9% e 4,1%, numa altura em que a utilização da ENR ainda não tinha sido autorizada. Mais um dado a demonstrar que não é a utilização no Homem que

I. Capítulo – Introdução Teórica

aumenta as resistências, pois trata-se de uma utilização individual, pontual e, portanto, reduzida. A reforçar este argumento temos a Austrália que, como já referimos, faz um uso das FQs em exclusivo para terapêutica humana e as resistências são praticamente inexistentes (FDA, 2005).

Trabalhos efectuados no âmbito da sequenciação genética das estirpes de *Campylobacter* revelam a semelhança entre estirpes de *Campylobacter* isolada em frangos resistentes à CIP e as detectadas em humanos. Conclui-se que os frangos são a principal fonte de contágio de *Campylobacter*, tanto de estirpes sensíveis como resistentes à CIP e ácido nalidíxico (FDA, 2005).

A infecção por estirpes de *Campylobacter* resistente provoca um aumento da duração da doença e, por outro lado, aumenta os riscos de complicações secundárias (FDA, 2005).

Outra questão levantada pela FDA é que, muitas vezes, o tempo necessário para detectar a bactéria que está a provocar a gastroenterite e executar um teste de resistência não se compadece com a necessidade de intervir rapidamente, antes de conhecer os resultados. Assim torna-se necessário alterar normas de procedimento e retirar as FQs do tratamento destas afecções, visto que o número de resistências é elevado e a probabilidade de falha terapêutica também (FDA, 2005).

Após esta data, outros estudos levantaram suspeitas sobre resistências em relação a outras bactérias. No entanto, o *Campylobacter* continua a ser a mais documentada e a que reúne maior conformidade na comunidade científica (Wassenaar, 2005).

A FDA, enquanto uma das maiores entidades reguladoras de medicamentos em todo o mundo, sofre enormes pressões para introdução e manutenção de medicamentos no mercado. Para retirar a ENR do mercado, cujo principal produtor é a Bayer®, foi necessário reunir provas concludentes e qualificadas (FDA, 2005).

Quando há aumento de infecções, de sintomas, de complicações e de mortalidade associados à utilização de um medicamento veterinário, a sua comercialização deixa de fazer sentido, tornando-se imperioso retirá-lo do mercado. E isto, sem haver quebra de rentabilidade, tal como provam os países nórdicos que retiraram todos os promotores de crescimento e diminuíram drasticamente o consumo de antibióticos e conseqüentemente o consumo de FQs (WHO, 2003).

I. 4. 6. 2. 2. Resistências em *Salmonella spp.*

A *Salmonella spp.*, à semelhança da *Campylobacter*, pode provocar diarreia prolongada, febre, náuseas, dor abdominal e vômitos. Os sintomas surgem de 6 a 72 horas após a contaminação e persistem, em regra, entre 4 e 7 dias e desaparecem, a maioria das vezes, sem necessidade de tratamento com antibióticos. Não obstante, há casos que exigem o recurso a este tipo de tratamento, o que acontece com grupos de risco, diarreias prolongadas ou disseminação da infecção para fora do intestino. A *Salmonella* e a *Campylobacter* são responsáveis pelas infecções mais comuns adquiridas através de alimentos (EMEA, 2005).

A *Salmonella* encontra-se no intestino das aves e de outros animais que podem ser portadores sem apresentarem sintomas. Transmite-se normalmente ao ser humano através de alimentos que estiveram em contacto com fezes contaminadas, tais como, ovos, leite, carne de frango e carne de vaca. Além destes, quaisquer outros produtos podem ser contaminados, bastando, para tanto, que entrem em contacto com fezes contaminadas ou mesmo com outros produtos contaminados, como por exemplo, vegetais preparados na mesma bancada em que foi manipulada carne contaminada. As aves podem ser portadoras desta bactéria sem apresentarem sintomas (WHO, 2008).

Tal como sucede com a *Campylobacter*, a transmissão humano-humano não é comum. Os antibióticos mais utilizados no tratamento desta infecção são as cefalosporinas de terceira geração e as FQs.

Segundo a WHO (2008), em regra, o comum das pessoas que contactam com a bactéria tendem a contrair estirpes de *Salmonella* sensíveis, ao passo que aquelas que visitaram, viveram ou vivem em quintas de criação de animais têm maior probabilidade de terem sido infectadas por estirpes resistentes de *Salmonella*.

As pessoas infectadas com estirpes de *Salmonella* resistentes ao ácido nalidíxico têm uma maior duração dos sintomas. Um estudo realizado pelas autoridades dinamarquesas verificou que, em pessoas infectadas com estirpes de *Salmonella* resistente ao ácido nalidíxico, a probabilidade de haver uma disseminação da infecção era maior, aumentando também a mortalidade (WHO, 2008).

Segundo Barza e Travers (2002), estima-se que, nos EUA, ocorram, anualmente, mais de 29 379 infecções por *Salmonella spp.*

I. Capítulo – Introdução Teórica

Na Alemanha, em Espanha e no Reino Unido, o aumento de estirpes de *Salmonella* resistentes está directamente ligado à introdução da ENR em veterinária. Em Espanha, a percentagem de estirpes de *Salmonella* resistentes ao ácido nalidíxico que infectou seres humanos era de 0,5% antes de 1991, e de 38,5% em 2003. Outros estudos relacionam a presença de estirpes de *Salmonella* em animais de consumo humano com a emergência de estirpes resistentes de *Salmonella* (Threlfall, 2002; White et al, 2002)

Estima-se que 95% das 1,4 milhões de infecções por *Salmonella* que ocorrem anualmente nos EUA tenham origem em alimentos (Meng e Doyle, 1997).

Analisando a tabela 7, verifica-se que grande parte dos países mencionados não possuem dados, e Portugal não consta sequer da tabela. Ainda assim, os valores de *Salmonella enteritidis* em frangos são demasiado elevados, tal como os de *Campylobacter jejuni*, o que permite antever um grande reservatório de estirpes resistentes que poderão provocar danos acrescidos na Saúde Pública.

De salientar que as percentagens de 0% de *Campylobacter jejuni* resistentes em frangos se verificam nos países onde os promotores de crescimento foram proibidos mais cedo e onde há um controlo elevado sobre a utilização de antibióticos, a saber, Suécia, Dinamarca e Noruega (EMEA, 2005).

Tabela 7. Percentagem de bactérias resistentes a quinolonas em animais para consumo humano em 2004 (EMEA/CVMP/SAGAM/184651/2005, 2007)

País	Bactérias e suas resistências a quinolonas				
	<i>Salmonella</i>		<i>C. coli</i>	<i>C. jejuni</i>	
	<i>S. Thyphimurium</i> Porcos	<i>S. Enteritidis</i> Frangos	Porcos	Gado	Frangos
Áustria	0	2			
Bélgica	6	0			
Dinamarca	<1	23	8	11	0
Inglaterra e País de Gales	8	0	17	0	
França	0		20		36
Alemanha	4	14			8
Grécia		44			
Holanda	3	3	11		38
Noruega					0
Polónia		8			
Suécia			18	2	0
Suíça	0		26	5	12

I. 4. 6. 2. 3. Resistências em *Escherichia coli*

Apesar de não haver tanta documentação, nem unanimidade na comunidade científica, há quem defenda que também estirpes de *Escherichia coli* desenvolvem resistências às FQs durante o seu uso em veterinária. Este microrganismo é a primeira causa de infecções do tracto urinário no Homem e a mais frequentemente adquirida em meio hospitalar (Moniri et al, 2005).

Segundo Moniri e Dastehgoli (2006), após o tratamento de um grupo de frangos, comparando-o com outro grupo não tratado, a diferença de percentagem de *Escherichia coli* resistentes é de 49,5% para 33,7%. Em Espanha, há estudos que detectaram 90% de *E. coli* resistentes à CIP em frangos.

Apesar de a EMEA referir que a maior parte das estirpes de *Escherichia coli* que está presente nos animais não infecta seres humanos, há estudos que provam que

I. Capítulo – Introdução Teórica

resistências que surgiram em estirpes presentes em animais acabaram por infectar seres humanos (EMEA/CVMP/SAGAM/184651/2005, 2007).

A elevada semelhança genética entre as estirpes de *Escherichia coli* causadoras de infecções em humanos e outros animais sugere que as resistências possam ser adquiridas em animais e posteriormente transmitidas ao Homem (EMEA/CVMP/SAGAM/184651/2005, 2007).

Os dados recolhidos entre 2000 e 2004 revelam uma maior prevalência de *Escherichia coli* resistentes em frangos do que em porcos. Estando a Áustria, Itália, França e Holanda com percentagens de *Escherichia coli* resistentes bastante elevadas (tabela 8) (EMEA, 2005).

Tabela 8. Percentagem de resistência a fluoroquinolonas e flumequina ou ácido nalidíxico entre *Escherichia coli* de porcos e frangos. Dados de 2000 a 2004 (EMEA/CVMP/SAGAM/184651/2005, 2007)

Origem e quinolona	Break-point (mg/l)	Número de amostras e percentagem de resistência em diferentes países							
		Áustria	Dinamarca	Finlândia	França	Itália	Holanda	Noruega	Suécia
Porcos		n=134	n=317	-	n=304	n=255	n=155	n=187	n=303
FQs (%)	>2	2	0	-	0	<1	0	0	0
Ácido nalidíxico ou flumequina (%)	>16 ou >4	8	2	-	3	9	0	<1	1
Frangos		n=140	n=138	n=300	n=308	n=258	n=165	n=141	n=306
FQs (%)	>2	3	0	0	3	11	3	0	0
Ácido nalidíxico ou flumequina (%)	>16 ou >4	54	10	2	28	50	35	1	5

I. Capítulo – Introdução Teórica

Como se pode observar na tabela 9, existe, até ao momento, um único dado publicado pela EMEA relativo a Portugal, relacionado com as resistências a FQs: a resistência de estirpes de *E. coli* em porcos, que é, ainda assim, o valor mais elevado da tabela (76%), sendo assim provável que, para outras espécies e microrganismos, os valores sejam igualmente elevados. Este valor parece muito fora do normal, mas coincidem com consumos de FQs em Portugal.

Tabela 9. Percentagem de resistência a fluoroquinolonas entre bactérias patogénicas de animais de consumo humano, dados de 2004 (EMEA/CVMP/SAGAM/184651/2005, 2007)

País	Bactérias e suas resistências a FQs					
	A. <i>pleuropneumoniae</i>	<i>E. coli</i>			P. <i>multocida</i>	M. <i>haemolytica</i>
		Porcos	Gado	Frangos		
Bélgica		35			3	
Dinamarca	0	1	0	0	0	
Inglaterra e País de Gales	4	<1	3	8	0	0
Finlândia				11		
França	0	31	5	5	5	5
Alemanha		2			1	2
Itália		22	4			
Letónia				44		
Holanda					0-1	2-6
Noruega			2	0		
Polónia	1					0
Portugal				76		
Espanha		12		16		
Suécia	0	1		3	<1	
Suíça						

Relativamente à NOR, existem poucos estudos que estabeleçam a relação entre a sua utilização e as respectivas resistências. Na Arábia Saudita, foram detectadas *Escherichia coli* e *Pseudomonas* resistentes à NOR em frangos após a sua utilização. As percentagens foram de 45,9% e 70,6%, respectivamente. Comparativamente, as resistências nas estirpes *E. coli* e *Pseudomonas* sem intervenção da NOR foram de 10,5% e 18,2%, respectivamente (Al-Mustafa e Al-Ghamdi, 2000).

I. 4. 6. 2. 4. Resistências em outras bactérias

Também na *Klebsiella pneumoniae* foram descobertas resistências a quinolonas, transmitidas por plasmídeos, tornando esta bactéria resistente à CIP (Harbottle et al, 2006).

Existe um estudo efectuado em Portugal que analisou a presença de *Enterococcus* em águas eliminadas dos matadouros de frangos (Costa et al, 2006). Verifica-se que a percentagem destas bactérias resistentes a tetraciclina é bastante elevada (85,7%), sendo a percentagem de resistências a FQs de 10%. Estas bactérias não são normalmente patogénicas para os animais, no entanto, estão frequentemente implicadas em infecções nosocomiais. Outra das conclusões deste estudo é que os tratamentos dos desperdícios dos matadouros não são suficientemente eficientes para eliminar bactérias, não tendo capacidade para extinguir contaminações ambientais com bactérias resistentes susceptíveis de provocar infecções no Homem. Com efeito, deparamo-nos com dois problemas essenciais: de um lado, o da selecção de estirpes resistentes provocada pelos tratamentos em animais de consumo humano, que tornam o Homem vulnerável a infecções, através da ingestão de alimentos mal cozinhados ou da manipulação de carne contaminada, por outro, o da contaminação do ambiente com estas bactérias resistentes, potenciando a possibilidade de aquisição de infecções provocadas por estas (Costa et al, 2006).

I. 4. 7. Recomendações de diversos organismos sobre utilização de FQs em veterinária

I. 4. 7. 1. FAO, WHO e OIE

Reunidas em Novembro de 2007, a FAO (Organização das Nações Unidas para a Agricultura e Alimentação), a WHO e a OIE (Organização Mundial da Saúde Animal) avaliaram a importância dos antibióticos, tanto para uso humano como para uso animal (FAO/WHO/OIE, 2007).

A WHO, através de vários critérios, classificou as quinolonas, tal como os macrólidos e cefalosporinas de 3^a e 4^a geração, como os antibióticos que mais importa proteger a nível de medicina humana, devido ao aumento de estirpes bacterianas resistentes aos mesmos, principalmente com origem em animais.

Recomenda-se que a sua utilização deva ser controlada e analisada para evitar propagação de estirpes bacterianas resistentes.

A OIE classificou como muito crítica a sua utilização em medicina veterinária.

Para encontrar um ponto de equilíbrio entre estas questões, aquelas entidades enunciaram diversas recomendações que urge cumprir, no sentido de minimizar os problemas advindos da utilização de antibióticos em animais:

- Criação de um programa nacional de controlo do consumo de antibióticos em veterinária;
- Criação de um programa nacional de controlo de resistências em estirpes bacterianas;
- Implementação de estratégias que impeçam a transmissão de bactérias resistentes de animais para pessoas através da cadeia alimentar;
- Implementação dos princípios propugnados pela WHO para contenção das resistências em animais de consumo humano e cumprimento das normas da OIE para uso responsável de antibióticos;
- Promoção da capacidade dos países, especialmente daqueles que se encontram em vias de desenvolvimento, para o incremento de programas de vigilância de utilização de antibióticos e de emergência de resistências em estirpes de bactérias adquiridas em animais de consumo humano.

I. Capítulo – Introdução Teórica

Estas recomendações deveriam ser implementadas à escala global, na medida em que, como foi referido anteriormente, as infecções transmitidas através de viajantes são cada vez mais comuns. Com efeito, ainda que um dado país esteja alertado e preparado para estas situações, com todos os programas de vigilância activos, podem ocorrer infecções transmitidas por viajantes oriundos de outros países, provocando uma disseminação de bactérias resistentes com consequências nefastas.

No que respeita especificamente às FQs, aquelas três entidades, já em 2003, consideraram provadas as resistências adquiridas em animais pelo uso deste grupo de antibióticos. Concluem, com base em todos os estudos existentes, que existe evidência clara que estirpes de *Campylobacter* e *Salmonella* adquirem resistências a FQs em animais tratados com este grupo de antibióticos e que também existe uma relação, embora não tão evidente, com a emergência de resistências em estirpes de *Escherichia coli* e *Enterococci spp.* (FAO/WHO/OIE, 2007).

Apesar de não recomendarem directamente a não utilização das FQs em veterinária, recomendam o controlo dos consumos e a vigilância da emergência de estirpes bacterianas resistentes a este grupo de antibióticos, salientando que a higiene é um factor de elevada importância na prevenção de infecções e propagação de infecções, no sentido de diminuir a necessidade de utilização de antibióticos (FAO/WHO/OIE, 2007).

Alertam para a necessidade de adopção de medidas específicas de prevenção e controlo de surtos de *Salmonella* e *Campylobacter*, uma vez que adquirem rapidamente resistências e que têm por base estudos científicos que evidenciam a emergência de estirpes resistentes (FAO/WHO/OIE, 2007).

Salientam a necessidade de evitar o tratamento de animais em larga escala, pois este aumenta a probabilidade de surgirem resistências, devendo-se evitar o tratamento através da água e dos alimentos, privilegiando-se o tratamento individual. Na utilização de FQs, é importante a imposição de prescrição veterinária, como medida de controlo (FAO/WHO/OIE, 2007).

Por outro lado, a utilização de antibióticos em veterinária obriga a uma cultura microbiológica no sentido de determinar qual a estirpe bacteriana implicada na infecção e qual(ais) o(s) antibiótico(s) mais indicado(s) para o tratamento, diminuindo assim a possibilidade de emergência de estirpes resistentes e diminuindo, em simultâneo, os custos dos tratamentos (FAO/WHO/OIE, 2007).

I. 4. 7. 2. Agência Europeia do Medicamento

Em Fevereiro de 2007, a EMEA emitiu um comunicado sobre FQs através do Comité para Produtos Medicinais para uso em Veterinária, na sequência da classificação das FQs como um grupo de antibióticos muito importantes na medicina humana (EMEA/CVMP/SAGAM/184651/2005, 2007).

Neste comunicado são referidos alguns estudos, que comprovam a relação causal entre a utilização em veterinária de FQs e o aumento dos dias de internamento e mortes relacionados com infecções com estirpes de bactérias resistentes a FQs, adquiridas em animais sujeitos a administração de FQs. A EMEA sugere que as doses indicadas para tratamento podem não ser as mais correctas e que este pode ser um dos motivos que provocaram o aumento das resistências.

A EMEA reconhece, no entanto, haver falta de dados sobre os níveis de consumo de FQs na maioria dos países da UE e das resistências provenientes do seu uso. O comunicado da EMEA acaba por concluir que:

1. O uso de FQs em animais selecciona bactérias resistentes que podem infectar o Homem através dos alimentos, afectando negativamente o tratamento destas infecções;
2. As FQs são consideradas muito importantes para o Homem, mas as infecções mais graves não são provocadas por bactérias relacionadas com animais;
3. O tratamento de gastroenterites provocadas por *Salmonella* ou *Campylobacter* não necessita, grande parte das vezes, de tratamento com antibiótico e existem alternativas às FQs, os macrólidos;
4. As infecções por estirpes de *Salmonella spp.* e *Campylobacter spp.* resistentes ao ácido nalidíxico aumentam o risco de hospitalização, complicações e mortalidade;
5. As FQs são de extrema importância para uso animal e se perderem a sua eficiência ou forem retiradas haverá problemas de saúde para os animais, problemas de Saúde Pública e perdas económicas;
6. Não só se deve ter atenção ao desenvolvimento e transferência de resistências dentro da UE, mas também a uma escala global, tendo em

I. Capítulo – Introdução Teórica

conta que o transporte de animais, produtos animais e pessoas podem também ser um meio de disseminação de resistências;

7. Para a *Salmonella*, não só o ácido nalidíxico deve ser usado, mas também devem ser tidos em consideração os valores de CIM da CIP, uma vez que existem diversas alterações responsáveis pelas resistências;
8. Para o *Campylobacter*, é suficiente analisar a resistência ao ácido nalidíxico;
9. Os dados sobre as resistências têm vindo a aumentar, mas seria necessário harmonizar estes dados para ser mais fácil a sua comparação;
10. É necessária uma análise de risco em relação à utilização de FQs em animais e humanos.

As FQs são eficazes no tratamento de infeções nos animais, algumas delas com poucas alternativas terapêuticas, como é o caso da septicemia por *Escherichia coli* em frangos, visto que esta bactéria já adquiriu resistências aos outros antibióticos a que era sensível. Por conseguinte, é de todo o interesse que as FQs mantenham o seu efeito terapêutico durante o maior período de tempo possível. Mas para tanto, é fundamental que os governos mundiais imponham normas rigorosas e as façam cumprir, vigiando a sua observância pelos respectivos destinatários e sancionando a sua violação. É uma ingenuidade esperar que sejam os próprios produtores, com prejuízo dos seus lucros, por mais reprovável que seja o seu comportamento, a ter preocupações com a Saúde Pública (EMEA/CVMP/SAGAM/184651/2005, 2007).

I. 5. Metodologias analíticas para a determinação de FQs

Numa perspectiva de segurança, devido ao risco para o Homem, a monitorização de resíduos de FQs em alimentos deve constituir um programa de vigilância constante com metodologias analíticas adequadas, de acordo com a regulamentação da UE.

Um programa de controlo de resíduos de antibióticos engloba métodos de *screening*, quantificação e de confirmação.

Uma vez que a concentração dos resíduos de antibióticos nos alimentos é muito baixa, são necessários métodos de detecção sensíveis.

O cumprimento destes programas de monitorização implica o *screening* deste tipo de compostos, exigindo metodologias analíticas simples, rápidas, pouco onerosas e sensíveis, que não dêem origem a resultados falso negativos, embora sejam aceitáveis alguns resultados falso positivos, uma vez que são submetidos posteriormente a métodos de confirmação (Petz, 1990).

Os métodos de *screening*, classificados como métodos de nível 3 pela Comissão do Codex Alimentarius (Joint FAO/WHO, 1993), devem proporcionar uma indicação fidedigna acerca da presença ou ausência do analito em estudo nas amostras para valores de concentração a nível dos LMRs, possibilitando a detecção de amostras contendo resíduos violativos.

Os métodos de confirmação devem permitir a identificação inequívoca dos compostos em estudo e a sua quantificação exacta para valores de concentração a nível dos LMRs (MacNeil e Ellis, 1995).

I. 5. 1. Cromatografia Líquida (LC)

Na literatura científica encontram-se descritas várias metodologias analíticas para a determinação de FQs em alimentos de origem animal.

O método cromatográfico mais utilizado para detecção e quantificação de FQs em tecidos animais é a cromatografia líquida (LC). Este método revela um limite de

I. Capítulo – Introdução Teórica

detecção e quantificação adaptado à pesquisa deste composto em tecido animal, tal como uma boa identificação do(s) antibiótico(s) existente(s) na amostra (Samanidou et al, 2005; Zhao et al, 2007).

No que respeita à detecção, alguns investigadores recorrem ao detector ultravioleta (Bailac et al, 2004), numerosos ao de fluorescência (FD) (Pecorelli et al, 2003; Ramos et al, 2003; Ho et al, 2004; Shen et al, 2004), enquanto outros usam a espectrometria de massa (MS) (Vyncht et al, 2002; Bailac et al, 2006; Hermo et al, 2006).

As FQs são compostos que possuem diferentes grupos funcionais na sua molécula, cuja presença torna mais complexos os mecanismos envolvidos na retenção nos sistemas cromatográficos.

Na LC de fase reversa (Dong, 2006), a fase estacionária é apolar e a fase móvel é ligeiramente polar e, actualmente, este é o método mais utilizado.

A fase reversa baseia-se no princípio de interacções hidrofóbicas que resultam em forças repulsivas entre um eluente polar, uma molécula pouco polar e a fase estacionária apolar. A parte da molécula não polar fica ligada à fase estacionária. Quanto mais apolar for o solvente, mais forças vão criar com a molécula pouco polar e menor será o seu tempo de retenção. Outro factor importante é o pH. Este agente pode alterar a polaridade da molécula a analisar e alterar as suas interacções com a fase móvel e a estacionária.

As ligações químicas e físicas à fase móvel e à fase estacionária determinam o tempo de retenção na coluna até à sua eluição (Kazakevich e LoBrutto, 2007).

A fase móvel pode ter uma composição constante (isocrática) ou pode-se alterar durante a eluição (gradiente). O recurso a gradiente pode ser importante caso não seja possível a separação de dois ou mais compostos com apenas um tipo de fase móvel e um tipo de fase estacionária. Também melhora a resolução para compostos que demoram muito tempo a eluir, que eluiriam lentamente, e não num período curto que permitisse a sua identificação e quantificação (Snyder et al, 2006).

As fases móveis são constituídas, na sua maioria, por uma mistura de água com acetonitrilo e ácido fosfórico, em proporções diversas (Garcia-Ovando et al, 2000; Zhao et al, 2007).

Outras fases móveis encontram-se referenciadas na literatura, contendo na sua composição ácido cítrico, tampão fosfato e a mistura de água e metanol (Garcia-Ovando et al, 2000; Kowalski et al, 2005; Samanidou et al, 2005).

I. Capítulo – Introdução Teórica

A utilização de tampão fosfato tem o grande inconveniente de promover a precipitação dos seus sais, que podem diminuir a resolução da coluna. Assim, são necessárias lavagens recorrentes da coluna, algumas por tempo prolongado, o que torna a sua utilização bastante trabalhosa, sendo de evitar, tanto quanto possível (Garcia et al, 2001).

Normalmente, a utilização de variação de gradiente é utilizada quando se está a identificar e quantificar um número elevado de FQs, pois assim é possível diminuir o tempo de eluição e otimizar a separação das FQs (Zhao et al, 2007).

O elemento comum nas fases móveis usadas é o tamponamento a pH 3, ou muito próximo deste valor, o que está relacionado com os pKa das FQs, ficando desta maneira na sua forma catiónica (Garcia et al, 2001; Shim et al, 2003; Zhao et al, 2007) (figura 7).

As FQs possuem propriedades fluorescentes e podem ser efectivamente detectadas por fluorimetria, uma vez que a intensidade da emissão de fluorescência é directamente proporcional ao poder da radiação de excitação.

As propriedades fluorescentes das FQs e seus derivados foram largamente exploradas para fins analíticos (Huang et al, 1997).

A detecção fluorimétrica proporciona um maior grau de sensibilidade e especificidade, constituindo um poderoso meio analítico na análise de resíduos, principalmente quando há a necessidade de reduzir ou mesmo eliminar as interferências presentes nos extractos dos alimentos, uma vez que existem poucos compostos naturais que possuam fluorescência nativa (Huang et al, 1997).

A detecção por espectrometria de massa (Cinquina et al, 2003; Lolo et al, 2006), apesar de exigir um equipamento mais complexo e dispendioso, é um método específico que permite a identificação inequívoca das FQs.

I. 5. 1. 1. Extracção/purificação

A principal finalidade desta fase consiste na obtenção de um produto definitivo que seja representativo da globalidade do alimento do qual a amostra é tomada, de forma a ser adequada à extracção sem perdas de resíduos ou alterações na sua estrutura química.

A preparação da amostra depende do tipo de análise a ser efectuada. No caso de algumas técnicas microbiológicas de *screening*, a amostra não é submetida a nenhum procedimento de homogeneização, mas para a restante metodologia analítica é necessário efectuar uma adequada homogeneização dos tecidos.

A trituração dos tecidos pode gerar calor suficiente que conduza a alterações das FQs, de modo que este procedimento deve ser efectuado na amostra parcialmente congelada, cortada em pequenos cubos com um bisturi estéril.

Existem várias técnicas de homogeneização, moinho, ultra-turrax, stomacher® e ultrassonificação.

Em qualquer dos processos, recomenda-se o acondicionamento das amostras em gelo aquando da sua homogeneização, a fim de evitar qualquer degradação das FQs (Kowalski et al, 2005).

As técnicas de extracção e purificação multi-resíduo, para além de minimizarem o tempo e o material usado na análise, devem proporcionar a obtenção de extractos limpos, com o mínimo de interferências, e que possuam elevadas concentrações dos resíduos em estudo.

Nos últimos anos, têm sido publicados numerosos métodos para a determinação das FQs em tecidos animais.

As técnicas de extracção e purificação aplicadas à análise de resíduos de FQs nos alimentos incluem aquecimento com ácidos, extracção/desproteíntização com ácidos ou solventes orgânicos miscíveis em água, combinados com tampões ou ácidos, extracção com tampões, ultracentrifugação, partição líquido-líquido, dispersão da matriz em fase sólida e extracção em fase sólida.

I. 5. 1. 1. 1. Extracção líquido-líquido

A extracção líquido-líquido baseia-se na partição do composto em estudo entre duas fases imiscíveis, para que o analito passe de uma fase para outra fase. O processo de extracção é repetido, de modo a maximizar a extracção do composto em estudo, com o mínimo de interferentes, para subsequente análise.

Na extracção com solventes orgânicos, a polaridade dos solventes, aliada à polaridade dos compostos em análise, à sua estabilidade e a sua relação com a matriz, constituem parâmetros condicionantes dos solventes a usar na extracção.

Em diversos trabalhos científicos vários métodos de extracção líquido-líquido de FQs presentes em matrizes de origem animal são referenciados. Os processos simples envolvem homogeneização com vareta de vidro e posterior centrifugação, e os mais complexos utilizam de extracção por fluidos supercríticos (Shim et al, 2003; Kirbis et al, 2005).

Os processos de homogeneização podem ser variados: a utilização da vareta de vidro, a utilização de Ultra-Turrax® (máquina que promove homogeneização mecânica tipo varinha eléctrica) e a ultrassonificação, que promove a lise das células e a libertação do seu conteúdo para o meio envolvente (Yorke e Froc, 2000; Kirbis et al, 2005)

Estes processos de homogeneização terão que ser efectuados com um meio líquido. Na maioria das vezes, é utilizado o tampão fosfato a pH 7 ou soluções ácidas a pH 3 (Garcia-Ovando et al, 2000; Yorke e Froc, 2000; Samanidou et al, 2005; Zhao et al, 2007). Alguns trabalhos referem a utilização de uma solução básica (pH 9) para a referida extracção (Yorke e Froc, 2000; Samanidou et al, 2004).

As FQs com grupo piperazilo têm dois pKa, um perto de pH 6 e outro próximo de pH 8, existindo, maioritariamente, na forma catiónica a pH ácido e na forma aniónica em pH básico. Existem na forma zwitteriónica a pH neutro, tendo a molécula, na globalidade, carga zero, mas tendo zonas com carga positiva e outras com carga negativa. São solúveis em água, mas pouco solúveis em soluções orgânicas (figura 7) (Bugyei et al, 1999; Pistos et al, 2005).

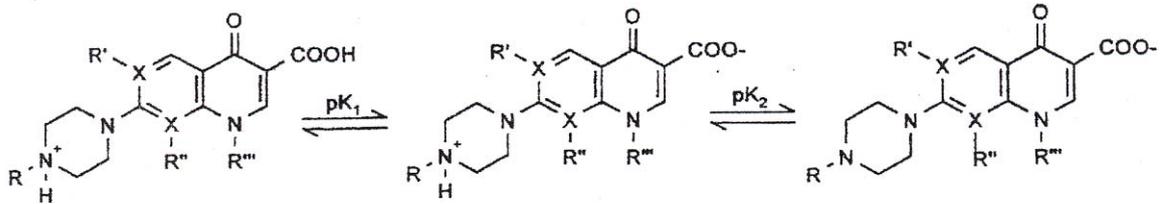


Figura 7. Comportamento ácido-base das fluoroquinolonas

Após o processo de homogeneização, utiliza-se a centrifugação para separar a parte sólida da amostra da parte aquosa. Nesta fase, várias velocidades e temperaturas foram utilizadas para efectuar uma boa separação, sendo normalmente utilizada mais do que uma centrifugação (Samanidou et al, 2005). As centrifugações a maior força centrífuga e a temperatura mais baixa são as mais rápidas e eficazes (Zhao et al, 2007).

I. 5. 1. 1. 2. Extracção em fase sólida (SPE)

As vantagens referenciadas para a extracção em fase sólida baseiam-se na rapidez de execução, simplicidade de manuseamento, melhor reprodutibilidade, obtenção de extractos mais limpos.

Esta metodologia é adaptável à automatização, conduzindo a uma melhor exactidão e precisão, bem como a uma maior reprodutibilidade (Samanidou et al, 2005; Zhao et al, 2007).

As colunas apolares usadas na SPE necessitam de um passo prévio de acondicionamento do enchimento por um processo de solvatação, em que são utilizados metanol, sempre como primeiro solvente, seguido normalmente de água. Após passagem dos extractos da amostra, que permite a retenção selectiva do analito no material de enchimento, procede-se a uma etapa intermédia de lavagem com água onde são eliminados os interferentes polares. A eluição é efectuada com um solvente adequado, sendo o metanol o mais utilizado (Samanidou et al, 2005; Zhao et al, 2007).

Estas técnicas permitem a separação dos compostos em estudo dos co-extractivos das amostras e melhoram a eficiência da extracção.

Após este passo, a solução é evaporada à secura em corrente suave de azoto, para evitar a decomposição dos compostos, e depois redissolvida num solvente apropriado, sendo este, antes da sua introdução no equipamento de LC, filtrado com um microfiltro

I. Capítulo – Introdução Teórica

para retirar alguma partícula de maiores dimensões que possa ainda estar no extracto da amostra (Posyniak et al, 1999; Zhao et al, 2007).

Para a efectivação desta etapa, pode recorrer-se a diferentes tipos de colunas Oasis, HLB e MAX e SDB-RPS (tabela 10) (Bailac et al, 2004).

Tabela 10. Eficácia de várias colunas de extracção em fase sólida e da extracção directa aplicadas à análise de diversas quinolonas. Adaptado de Bailac et al (2004).

Quinolonas	LMR (µg/kg)	Oasis HLB		Oasis MAX		SDB-RPS		Extracção directa	
		LOD (µg/kg)	R (%)	LOD (µg/kg)	R (%)	LOD (µg/kg)	R (%)	LOD (µg/kg)	R (%)
CIP	100 a	5	87	10	23	5	70	30	66
Danofloxacina	200	10	61	10	68	10	66	20	69
ENR	100 a	5	84	5	84	5	91	25	80
Sarafloxacina	-	5	80	5	78	5	87	15	60
Difloxacina	300	10	81	10	79	10	87	10	66
Ácido oxolínico	100	10	80	10	87	5	86	30	50
Flumequina	400	10	85	5	96	10	83	30	42

LOD- Limite de detecção.

R - percentagem de recuperação obtida com os três tipos de colunas SPE (amostras fortificadas com 240 µg/kg).

a- 100 µg/kg é o LMR para a soma de ENR e CIP

Da observação da tabela 10, verifica-se que a purificação através da coluna Oasis HLB é a que apresenta um menor limite de detecção e recuperações superiores, para a CIP e ENR.

Estes resultados são coincidentes com o estudo de Samanidou et al (2005), que conclui que, entre diversas colunas de SPE (DSC-18 (500mg/mL), NEXUS (30mg/1mL) e Oasis HLB (200mg/3mL)), a Oasis HLB era a que mais se adequava à pesquisa e quantificação de FQs (ENR, CIP, NOR e ofloxacina).

As colunas mais utilizadas para SPE são as Oasis HLB (Samanidou et al, 2005; Zhao et al, 2007), que são compostas por um polímero macroporoso poli

(divinilbenzeno-co-N-vinilpirrolidona). Apresentam características lipofílicas e hidrofílicas e são estáveis para todo o intervalo de pH. O monómero lipofílico é constituído pelo grupo divinilbenzeno que possibilita uma maior retenção dos analitos, particularmente importante na recuperação de compostos polares. O carácter hidrofílico é conferido pelo grupo N-vinilpirrolidona, que confere ao enchimento propriedades hidrofílicas, evitando os problemas de molhabilidade encontrados para os enchimentos de sílica octadecilgada (C₁₈).

I. 5. 1. 1. 3. Outros métodos de purificação

Encontram-se referenciados na bibliografia científica vários métodos de determinação das FQs em amostras de músculo de frango, por injeção directa no sistema cromatográfico, após precipitação das proteínas e centrifugação (Yorke e Froc, 2000).

I. 5. 1. 2. Conservação dos extractos

Todos os investigadores são unânimes em relação à conservação dos extractos a 0-4 °C, até à sua injeção no sistema cromatográfico, de modo a minimizar degradação das FQs. Estudos até três meses confirmam que não há degradação significativa de FQs nos extractos conservados a 0-4°C e ao abrigo da luz (Kirbis et al, 2005; Samanidou, 2005; Zhao et al, 2007).

I. 5. 2. Outros métodos

I. 5. 2. 1. Métodos Microbiológicos

Os métodos microbiológicos, que se baseiam na propriedade comum dos antibióticos provocarem a inibição do crescimento dos microrganismos, permitem a detecção de antibióticos num único ensaio (Moniri e Dastehgoli, 2006).

Estes métodos são muito sensíveis e rápidos, permitindo a análise simultânea de um grande número de amostras, sendo no momento actual insubstituíveis no *screening* de resíduos de antibióticos.

A técnica microbiológica das quatro placas (FPT) (Bogaerts e Wolf, 1980) é a técnica mais difundida a nível da UE. O laboratório de referência comunitário para antibióticos de Fougères, em França, recomenda para o *screening* de resíduos de antibióticos, a técnica das quatro placas em amostras de tecido muscular.

Os resultados obtidos a nível da UE indicam que, de um modo geral, apenas 1 % das amostras analisadas são positivas na técnica das 4 placas (Woodward e Shearer, 1995).

A utilização de ensaios microbiológicos para a detecção de FQs possui várias limitações, uma vez que para algumas, tal como a sarafloxacina, o limite de detecção é superior ao LMR.

Uma vez que estas técnicas não são específicas, não permitem a distinção de compostos relacionados ou combinações complexas de antibióticos, pelo que se deve proceder a uma cuidadosa e adequada análise e interpretação dos resultados.

Com a indicação obtida pelos ensaios microbiológicos é possível adoptar o método físico-químico adequado à determinação do tipo de compostos presentes.

I. 5. 2. 2. Métodos Imunoquímicos

Estas técnicas são frequentemente utilizadas como métodos de *screening*, devido à elevada sensibilidade, apresentando limites de detecção inferiores aos LMRs, rapidez e simplicidade de execução, permitindo a análise simultânea de um grande número de amostras.

I. Capítulo – Introdução Teórica

Esta técnica fundamenta-se na reacção altamente específica anticorpo-antígeno e, teoricamente, não necessitaria de qualquer tratamento da amostra. Na prática, tal não se verifica, uma vez que a ligação não específica dos componentes da matriz, que existem em grandes quantidades, constitui um grave problema, exigindo um pré-tratamento da amostra (Aerts et al, 1995).

O composto a analisar é colocado em contacto com os anticorpos e adicionado de uma determinada quantidade de uma forma marcada do mesmo composto (por um radioisótopo, por uma enzima ou por um marcador fluorescente). Este tipo de ensaio baseia-se na capacidade do composto em análise em competir na reacção entre o anticorpo e o composto marcado, para se ligar aos locais específicos do anticorpo (Blake e Gould, 1984; Rouan, 1985; Stewart, 1986). A quantidade de composto marcado ligado é então determinada directamente, ou após a adição de um substrato adequado, que permita a sua detecção selectiva.

Existem kits comercializados especificamente para quinolonas. Estes testes, apesar de mais práticos que os microbiológicos, acabam assim por revelar-se mais dispendiosos, encarecendo a pesquisa (Nachamkin, 2000).

I. Capítulo – Introdução Teórica

II. Capítulo

Parte Experimental

II. Capítulo – Parte Experimental

II. Capítulo – Parte Experimental

II. 1. Materiais e métodos

II. 1. 1. Reagentes e soluções

II. 1.1.1. Reagentes

- Ácido sulfúrico 90-91% (Carlo ERBA, Milão, Itália)
- Ácido clorídrico 37% pró-análise (Merk, Darmstadt, Alemanha)
- Água para HPLC: a água utilizada foi purificada por destilação e passagem pelo sistema da Millipore (Milli-Q Integral 10, Billerica, E.U.A.)
- Azoto N45
- Ácido fosfórico 85% RPE-ACS (Carlo Erba, Milão, Itália)
- Água destilada
- Metanol para HPLC (Carlo Erba, Milão, Itália)
- Acetonitrilo para HPLC (Carlo Erba, Milão, Itália)
- Tetrabutilamónio (TBA) (Fluka, SIGMA-Aldrich, Steinheim, Alemanha)
- Padrão de Enrofloxacina, Ciprofloxacina e Norfloxacina, grau de pureza superior a 98%, qualidade HPLC (Sigma Chemicals Co, St. Louis, E.U.A)

II. 1. 1. 2. Soluções

- Solução de ácido sulfúrico 0,1684 M, preparada dissolvendo 10 mL de ácido sulfúrico 90-91% (Carlo ERBA, Milão, Itália) num balão volumétrico de 1 L com água destilada, perfazendo no final.

II. Capítulo – Parte Experimental

- Solução de ácido sulfúrico 0,005 M, preparada dissolvendo 29,7 mL da solução de 0,1684 M de ácido sulfúrico num balão volumétrico de 1 L com água destilada, perfazendo no final.

- Solução de ácido clorídrico 0,15 M, preparada adicionando 12,4 mL de ácido clorídrico a 37% a um balão volumétrico de 1 L com água destilada, perfazendo no final.

- Solução stock de CIP, ENR e NOR a 1 mg/mL, preparada dissolvendo 50 mg do padrão respectivo num balão volumétrico de vidro âmbar de 50 mL com cerca de 30 mL de ácido sulfúrico, colocar no ultrasons durante 15 minutos e no fim perfazer os 50 mL com ácido sulfúrico 0,005 M.

- Solução padrão de CIP 2,5 µg/mL, preparada através da diluição de 250 µL da solução de 1 mg/mL de CIP num balão volumétrico de 100mL com ácido sulfúrico a 0,005M.

- Solução padrão de NOR 2,5 µg/mL, preparada através da de 1 mg/mL de NOR.

- Solução padrão de ENR 2,5 µg/mL, preparada através da de 1 mg/mL de ENR.

- Soluções padrão contendo NOR, CIP e ENR na mesma solução e na mesma concentração, 0,0125 µg/mL, 0,025 µg/mL, 0,05 µg/mL, 0,1 µg/mL, 0,25 µg/mL, para elaboração de uma curva padrão e fortificações, efectuada através da dissolução das soluções padrão de 2,5 µg/mL em ácido sulfúrico 0,005 M.

Todas as soluções de trabalho contendo NOR, CIP e ENR foram armazenadas num balão volumétrico de vidro âmbar, entre 0 e 4 °C para evitar a sua deterioração, enquanto que as soluções stock foram armazenadas a -20°C.

II. 1. 2. Materiais

- Pipeta volumétrica de 1 mL
- Pipetas (2, 5, 10 mL)
- Seringas de vidro (50, 100, 250 µL)
- Balões volumétricos (20, 25, 50, 100, 1000 mL)
- Provetas

II. Capítulo – Parte Experimental

- Varetas de vidro
- Espátulas
- Tubos de ensaio
- Copos de precipitação
- Funis de vidro
- Parafilm “M” (Pechiney Plastic Packaging, Chicago, E.U.A.)
- Filtro de membrana com poro de 0,2 μm e diâmetro de 50 mm (Whatman, GE Healthcare, Little Chalfon, Inglaterra)
- Seringas de plástico de 2 mL
- Tubos de centrífuga
- Membrana para as amostras com poro de 0,45 μm DURAPORE® (Millipore, Irlanda)

II. 1. 3. Equipamento

- Colunas de extracção de fase sólida Oasis HLB 6cc/ 200 mg (Waters Corp. Milford, MA)
- Centrífuga Sigma modelo 3-16 K (St. Louis, E.U.A)
- Agitador de vortex modelo Zx3 (Unimag, Reagente 5, Portugal)
- Balança analítica Mettler Toledo modelo AG 285
- Aparelho de ultrassonificação modelo Sonorex RK 100 (Berlim, Alemanha)
- Sistema de vácuo para extracção em fase sólida
- Sistema de cromatografia líquida de alta performance (HPLC) composto por uma bomba Gilson modelo 307 (Gilson Medical Electronics, Villiers-le-Bel, França), um injector Rheodyne modelo 7125 (Cotati, Califórnia, E.U.A.) com loop de 50 μl
- Integrador SP 4270 (Hewlett Packard, Filadélfia, E.U.A.)
- Detector fluorimétrico, modelo 0305-9060 (LabAlliance, França)
- Coluna de HPLC Chromolith Performance RP-18e (100 x 4.6 mm) da Merck, (Darmstadt, Germany)
- Sistema de vácuo para filtrar a fase móvel (Büchi, Suíça)

II. 1. 4. Condições cromatográficas

II. 1. 4. 1. Fase Móvel

A fase móvel foi otimizada, de modo a obter a máxima resolução dos picos cromatográficos. Esta solução era constituída por ácido fosfórico 0,025 M (ajustada a pH 3 com TBA) e metanol (890:110), filtrada através de uma membrana com poros de 0,2 µm sob vácuo e desgaseificada por ultrasons durante 15 min.

O sistema HPLC funcionou à temperatura ambiente e com o fluxo de 2,5 mL/min, sendo o volume de injeção no sistema HPLC de 50 µL.

II. 1. 4. 2. Detecção fluorimétrica

As condições do detector fluorimétrico, acoplado ao sistema HPLC, foram optimizadas de forma a permitir a maximização da intensidade da fluorescência das fluoroquinolonas em estudo.

Os comprimentos de onda, de emissão e de excitação, foram optimizados através da obtenção do espectro de uma solução padrão com as respectivas FQs. Os comprimentos de onda de excitação e de emissão seleccionados foram de 278 nm e de 450 nm, respectivamente. A banda espectral de excitação e emissão foi de 10 nm.

II. 1. 5. Amostragem

A amostragem foi efectuada durante os meses de Abril e Maio de 2009, abrangendo as regiões norte, centro e sul de Portugal continental.

Foram adquiridas 5 amostras de frango em cada uma das cidades de Albufeira, Coimbra, Entroncamento, Lisboa, Porto, Tomar, e 3 amostras em Bragança, perfazendo um total de 33 amostras (mapa 1).



Mapa 1. Distribuição geográfica dos locais de aquisição de amostras

A aquisição das amostras foi feita em grandes e médias superfícies e em talhos tradicionais, sendo que em cada localidade foi adquirida uma amostra num talho tradicional.

Foram adquiridos frangos frescos sob diferentes denominações: “frango com miúdos”, “frango aberto para churrasco” e “frango sem miúdos”.

Foram ainda utilizados dois frangos cedidos por familiares, para servirem como brancos, criados em produção de subsistência, na qual não foram utilizados quaisquer alimentos compostos para alimentação animal.

II. 1. 6. Preparação e conservação das amostras

Imediatamente após a compra, os frangos foram conservados à temperatura de 0-4°C. No próprio dia de aquisição era retirado um pedaço de peito de, aproximadamente, 100g que era embalado e etiquetado com data de compra, local de venda e empresa produtora e congelado a -20°C.

As amostras foram todas analisadas durante o mês de Maio de 2009.

II. 1. 7. Metodologia analítica

A metodologia analítica aplicada à análise de NOR, CIP e ENR em tecido muscular de frango baseou-se nos métodos desenvolvidos por Pena et al (2003) e Samanidou et al (2005) (figuras 8 e 10).

II. 1. 7. 1. Extracção

A metodologia analítica aplicada na extracção do tecido muscular de frango abrange as seguintes etapas:

- Pesagem de 1,000g (mais ou menos 0,001g) de tecido muscular do peito de frango;
- Colocação desta amostra num tubo de centrifuga e adição de 7 mL de HCl (0,15 M);
- Agitação no vortex durante 1 minuto e extracção no ultrasons durante 15 minutos;
- Repouso durante 20 minutos, protegido da luz;
- Centrifugação durante 10 minutos a 13 000 g a 5°C;
- Separação do sobrenadante para um segundo tubo de ensaio, procedendo-se a uma segunda extracção da fase inferior, repetindo o processo de extracção referido.
- No final, o segundo sobrenadante adicionando-se ao sobrenadante retirado anteriormente (figura 8).

II. Capítulo – Parte Experimental

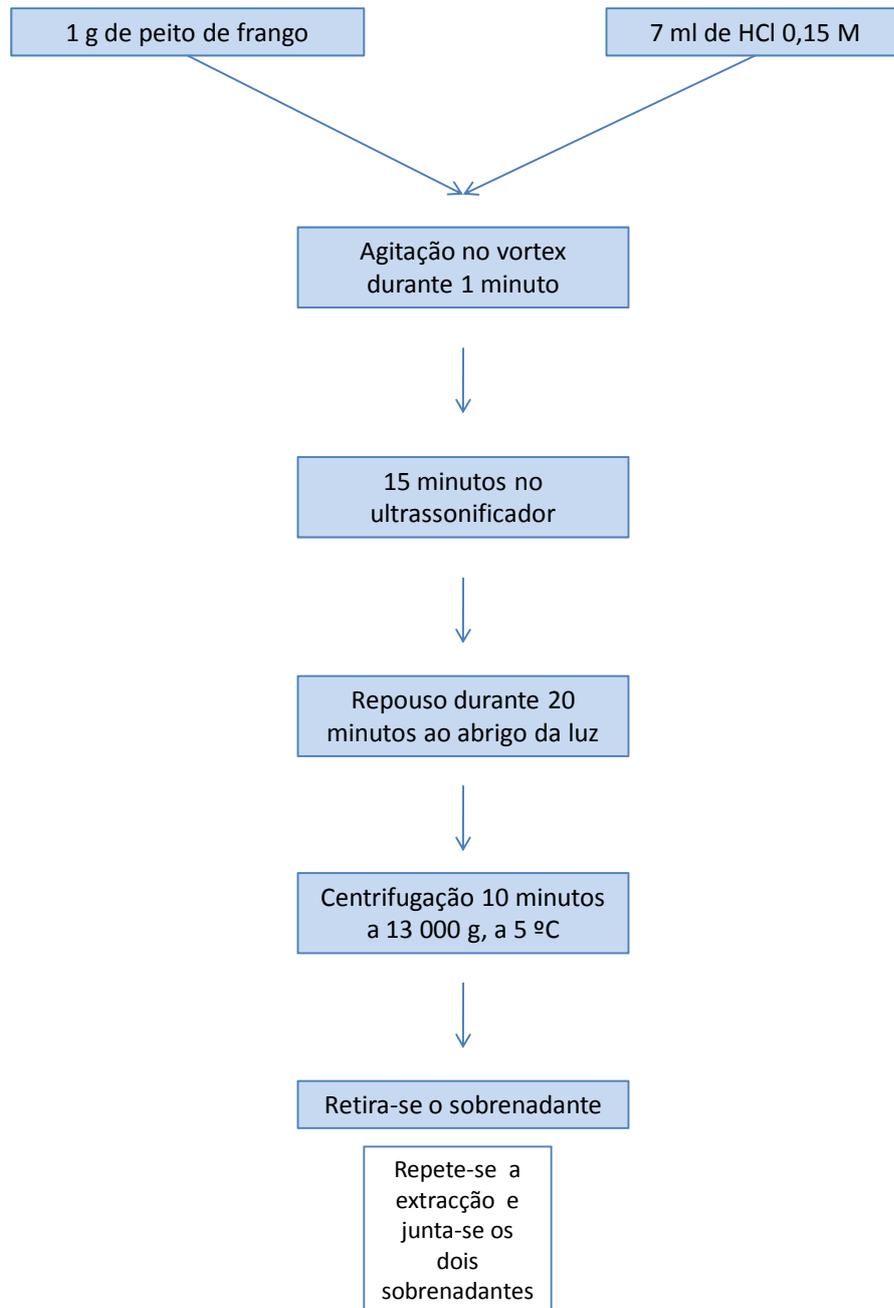


Figura 8. Esquema de extracção da metodologia analítica utilizada

II. 1. 7. 2. Purificação

Após o processo de extracção, procedeu-se à purificação do extracto da amostra utilizando uma coluna Oasis HLB, 200 mg (6cc), previamente acondicionada.

Esta purificação em fase sólida (SPE) foi efectuada num sistema de vácuo (figura 9), em que há um aumento progressivo da pressão negativa até completa passagem do extracto das amostras pelas colunas, respeitando os valores permitidos pela coluna. Este sistema é utilizado para que a solução goteje ao sair da coluna, evitando assim um fluxo elevado.



Figura 9. Sistema de vácuo

Para proceder ao acondicionamento da coluna, foram utilizados 2 mL de metanol, seguidos de 2 mL de água Milli Q, sendo de imediato colocados na coluna o sobrenadante retirado da centrifugação anterior.

Após a passagem do extracto da amostra, a coluna foi lavada com 3 mL de água Milli Q e ficou a secar durante 15 minutos a 10 mm de Hg.

Posteriormente, as FQs foram eluídas com 2 mL de metanol.

O extracto recolhido no tubo de ensaio foi concentrado à secura a 45 °C sob uma corrente suave de azoto.

O resíduo seco foi dissolvido em 1 mL de ácido sulfúrico 0,005 M. Para o efeito, a mistura foi agitada no vortex durante 1 minuto e submetida durante 15 minutos à ultrassonificação, para a sua total dissolução. Antes de injectar 50 µl no sistema HPLC, a solução foi filtrada através de um filtro de membrana de 0,45 µm (figura 10).

II. Capítulo – Parte Experimental

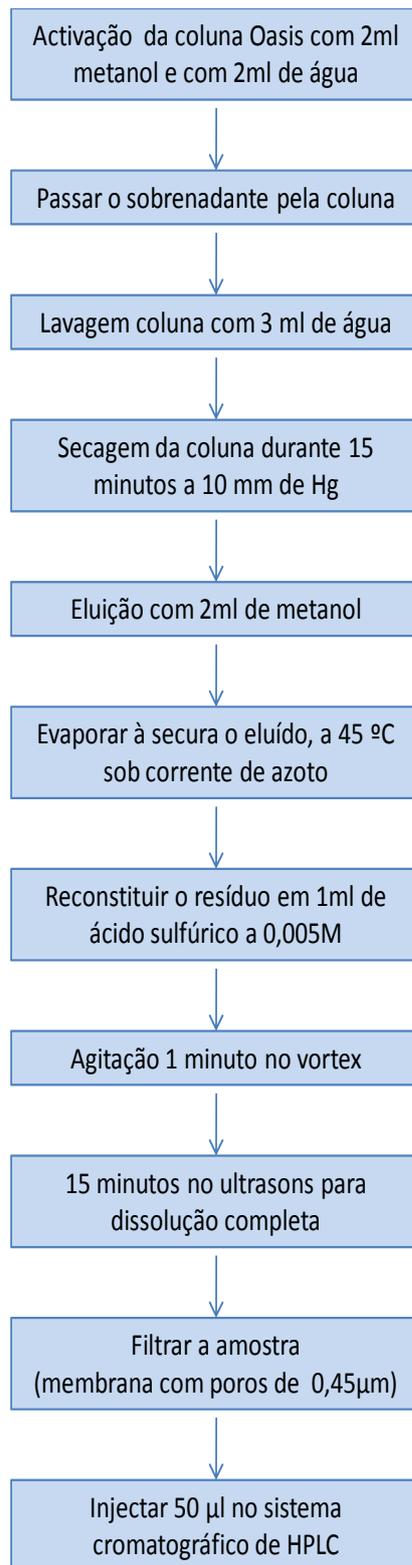


Figura 10. Esquema de purificação da metodologia analítica utilizada

II. 1. 7. 3. Detecção e quantificação

A LC acoplada a um detector fluorimétrico foi o sistema escolhido para a separação e determinação das três FQs nas amostras de tecido muscular de frango.

A fase móvel consistiu numa solução de ácido fosfórico 0,025 M (ajustada a pH 3 com TBA) e metanol na proporção (890:110).

A detecção fluorimétrica utiliza a fluorescência nativa das FQs. Para as quinolonas ácidas o espectro de emissão consiste numa banda entre os 350-400 nm, e entre 440-500 nm para as quinolonas piperazínicas (FQs). A fluorescência depende fortemente do pH do meio, sendo a maior intensidade de fluorescência obtida a baixo pH, de 2,5 a 4,5. A esses valores de pH, para as quinolonas piperazínicas, a forma predominante é a catiónica. A separação é normalmente feita com fase móvel de pH compreendido entre 2 a 4, o que permite maximizar a intensidade da fluorescência. Os comprimentos de onda de excitação e de emissão referidos na literatura científica variam entre 275-280 nm e 440-450 nm, respectivamente.

Os comprimentos de onda seleccionados neste estudo otimizados de acordo com o referido em II.1.4.2, correspondem a um comprimento de onda de excitação de 278 nm e um comprimento de onda de emissão de 450 nm.

II. 2. Validação das metodologias analíticas

Para validar a metodologia analítica, foi necessário observar quatro condições essenciais: inexistência de interferentes (selectividade), proporcionalidade entre a resposta da área de cada composto e a concentração do mesmo (linearidade), a exactidão e a precisão.

II. 2. 1. Selectividade

Foram analisadas duas amostras de frangos de produção caseira em cuja alimentação não foram introduzidos antibióticos ou alimentos compostos para alimentação animal, de modo a proceder à avaliação do efeito matriz do músculo de frango.

Estas amostras foram analisadas utilizando a metodologia referida em II.1.7., que serviu para verificar se a matriz músculo de frango possui interferentes que pudessem comprometer a identificação e quantificação da NOR, CIP ou ENR.

II. 2. 2. Linearidade

A análise da variação da resposta linear deste método foi efectuada no intervalo de concentração apropriado para este tipo de análise, de modo a que os resultados obtidos estivessem dentro das concentrações onde a linearidade foi confirmada. A linearidade atesta a proporcionalidade entre as áreas obtidas dos cromatogramas e as concentrações existentes nas amostras, sendo esta relação maior, quanto mais próximo for o valor do coeficiente de correlação (r^2) da unidade. Neste estudo procedeu-se à avaliação da linearidade através de soluções padrão com diferentes concentrações das FQs e através de extractos provenientes de amostras fortificadas, com o objectivo de avaliar o efeito matriz, de acordo com a Directiva CE 657/2002.

II. 2. 3. Estudos de recuperação

Os ensaios de fortificação permitiram avaliar a exactidão e precisão da metodologia analítica utilizada. Para a efectivação dos ensaios de recuperação recorreu-se às amostras de frangos de produção caseira. Para o efeito foram usados 4 níveis de fortificação para a ENR e a CIP, 20 µg/kg, 50 µg/kg, 100 µg/kg e 250 µg/kg,

II. Capítulo – Parte Experimental

respectivamente, e 3 níveis de fortificação para a NOR, 50 µg/kg, 100 µg/kg e 250 µg/kg.

Após fortificação, as amostras foram colocadas no escuro durante 30 minutos. Em seguida, procedeu-se à extracção e purificação de acordo com o descrito em II.1.7.

A exactidão da metodologia analítica foi avaliada através das percentagens de recuperação, e a precisão intra-dia e inter-dia foi avaliada para os diversos níveis de fortificação.

A precisão intra-dia foi avaliada por injeccção no mesmo dia das soluções referidas em triplicado (n=3) e a precisão inter-dia durante três dias consecutivos.

A precisão intra-dia foi calculada através da média dos desvios padrões das percentagens de recuperação de cada dia, para cada composto analisado.

A precisão inter-dia foi calculada através da média dos desvios padrões das percentagens de recuperação dos três dias, para cada composto analisado.

II. 3. Resultados e Discussão

II. 3. 1. Optimização das condições cromatográficas

Relativamente à fase móvel, apesar da maior parte dos artigos referir uma mistura de água com acetonitrilo (ACN), este foi substituído pelo metanol, uma vez que se obteve uma boa resolução, idêntica à obtida com o ACN. Esta alteração deveu-se principalmente ao menor custo do metanol, face ao elevado aumento do custo do ACN verificado nos últimos meses, sendo uma situação que actualmente é tomada em conta por todos os laboratórios.

Esta foi optimizada utilizando as soluções padrão e com base nas fases móveis de Kowalski et al (2005) e Pena et al (2003). Foram experimentadas as seguintes proporções na mistura água/metanol: 935:65, 930:70, 925:75, 920:80, 910:90, 900:100, 895:105, 890:110, 885:115 e 880:120.

II. Capítulo – Parte Experimental

Estas proporções foram utilizadas com diferentes velocidades do fluxo (0,5 mL/min; 1 mL/min; 1,5 mL/min; 2 mL/min; 2,5 mL/min e 3 mL/min). A melhor separação foi obtida com a mistura água/metanol (890:110) e um fluxo de 2,5 mL/min. A separação entre os três compostos, com resolução adequada e, de preferência, com tempos de retenção curtos, pode ser observada na figura 11.

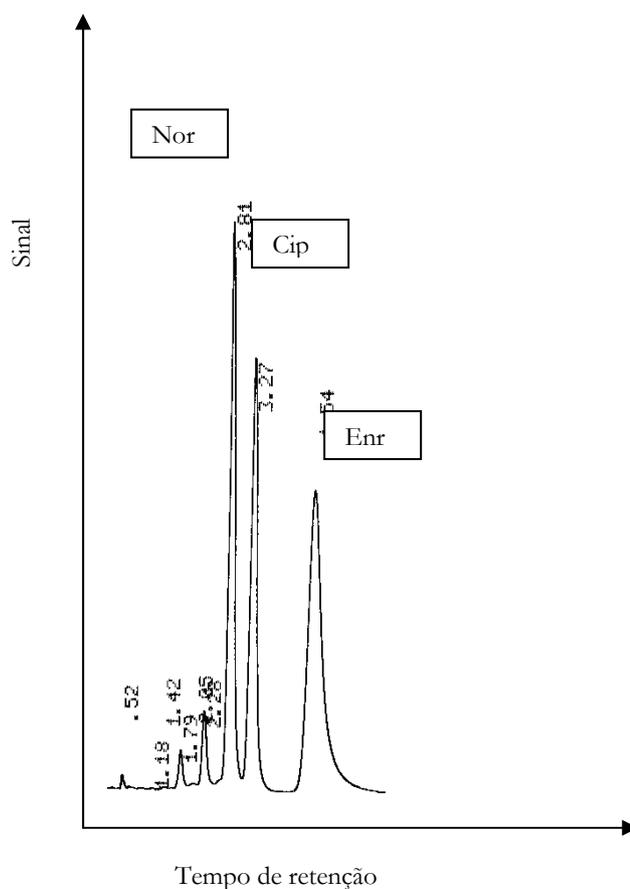


Figura 11. Cromatograma obtido a partir de uma solução padrão contendo NOR, CIP e ENR

II. 3. 2. Optimização dos procedimentos de extracção e purificação

Experimentaram-se vários métodos de extracção e purificação referidos na literatura científica, com o objectivo de otimizar a eficiência da extracção e minimizar a quantidade de impurezas extraídas.

Assim, a investigação incidiu sobre os seguintes processos de extracção:

- 1 -Extracção a pH alcalino (pH=9,0), preconizada pelo Laboratório de Referência Europeu para antibióticos (York e Froc, 2000; Samanidou et al (2005).
- 2 -Extracção com PBS (pH=7,0) referida por Zhao et al (2007).
- 3 -Extracção com HCl 0,15 M (Pena et al, 2003; Samanidou et al, 2005).

Os métodos de extracção, tanto a pH ácido como a pH alcalino, reportados na literatura científica, baseiam-se no facto das FQs possuírem dois pKa, como referido em II. 5. 1. 1. 1.. A valores de pH abaixo ou acima dos quais a molécula está ionizada, possuindo carga positiva ou negativa, consoante o pH seja ácido ou alcalino.

Estas três técnicas de extracção são semelhantes, diferindo apenas a solução de extracção e respectivo pH e o processo de homogeneização utilizado, entre os quais o Ultra Turrax (Garcia et al, 2005).

Como já referido anteriormente, encontram-se descritos na literatura científica métodos de extracção a diferentes valores de pH: a pH 7,0 (Garcia-Ovando et al, 2000; Garcia et al, 2005; Zhao et al, 2007), a pH ácido (Pena et al, 2003; Samanidou et al, 2005) e a pH alcalino (9,0) (York e Froc, 2000; Samanidou et al, 2005).

Deste modo, e com o objectivo de maximizar a eficiência de extracção com a presença do mínimo de interferentes, procedeu-se à avaliação de várias metodologias de extracção descritas na literatura científica.

Em relação à extracção a pH alcalino (pH=9,0), foram avaliadas as duas metodologias analíticas descritas na literatura científica referidas anteriormente (York e Froc, 2000; Samanidou et al 2005).

Em primeiro lugar, a amostra foi submetida à técnica de extracção referida por York e Froc (2000), por ser preconizada pelo Laboratório Europeu de Referência para antibióticos, e que se baseia na extracção a pH=9 na ausência de purificação, procedendo à injecção directa dos extractos. Uma vez que os brancos obtidos segundo

II. Capítulo – Parte Experimental

esta metodologia analítica continham muitos interferentes, procedeu-se a uma purificação por SPE na tentativa de os eliminar. A escolha do tipo de adsorvente a utilizar neste procedimento baseou-se num estudo no qual foi avaliada a eficiência de diversas colunas de SPE nomeadamente, DSC-18 (500mg/mL), NEXUS (30mg/mL) e Oasis HLB (200mg/3mL). Este estudo demonstrou que os melhores resultados, quer no que respeita à percentagem de recuperação das FQs, quer no que respeita à eliminação de interferentes da matriz, foram obtidos com a coluna Oasis HLB-200mg/6cc, que contém um co-polímero macroporoso com características de retenção lipofílicas e hidrofílicas. Estes resultados são concordantes com os de Zhao et al (2007). No entanto, a inclusão de um procedimento de purificação através de uma coluna Oasis HLB na técnica de Yorke e Froc (2000) revelou percentagens de recuperação muito baixas, muitos interferentes e pouca precisão nos resultados obtidos.

Foi também ensaiada a metodologia referida por Samanidou et al (2005), idêntica à anterior. Após extração com hidróxido de sódio e purificação através de uma coluna Oasis HLB, obtiveram-se baixos valores exactidão, na ordem dos 20%.

Nesta investigação, procedemos também à avaliação da técnica extração com PBS (pH=7) seguida de purificação por SPE através de uma coluna Oasis HLB (Zhao et al., 2007). Os valores de exactidão obtidos, segundo as nossas condições de trabalho, foram também muito baixos, não permitindo a sua aplicação neste estudo.

As metodologias de extração em meio ácido, referenciadas na bibliografia científica (Posyniak et al, 1999; York e Froc, 2000; Garcia et al 2005; Kirbis et al, 2005), não incluem nenhum procedimento de purificação dos extractos. Esta alternativa também foi avaliada, e verificámos, após a extração em meio ácido, a presença de interferentes que impediam a identificação e quantificação das FQs. Deste modo foi necessário proceder a uma purificação posterior.

A extração com HCl 0,15M, seguida de purificação através de uma Oasis HLB 200mg/6 mL, conduziu a bons resultados de exactidão e à obtenção de brancos limpos, com poucos interferentes, e foi, por estes motivos, a metodologia seleccionada neste estudo.

Relativamente ao procedimento de SPE, através de colunas Oasis 200 mg/6mL, foram experimentados vários processos de lavagem da coluna, com diferentes soluções, desde água HPLC a uma mistura água/metanol 3:1, passando por concentrações intermédias. A utilização de água permitia obter percentagens de recuperação mais elevadas, mas não era eficaz na remoção dos interferentes. À medida que se aumentava

a concentração de metanol na solução de lavagem, a situação invertia-se, com a obtenção de percentagens de recuperação mais baixas e a obtenção de extractos com menos interferentes.

Procedemos também à optimização da centrifugação, de modo a obter extractos mais lípidos, promovendo uma maior remoção de alguns interferentes. Concluiu-se que, aumentando a velocidade, baixando a temperatura e aumentando o tempo de centrifugação, facilitava a eliminação de interferentes, obtendo-se uma solução mais límpida, demonstrada pela passagem mais rápida na SPE.

II. 3. 3. Validação

II. 3. 3. 1. Selectividade

Os brancos extraídos das amostras analisadas foram idênticos, apresentando poucos interferentes que podem ser desprezados, uma vez que correspondiam praticamente ao ruído da linha de base, como podemos observar na figura 12.

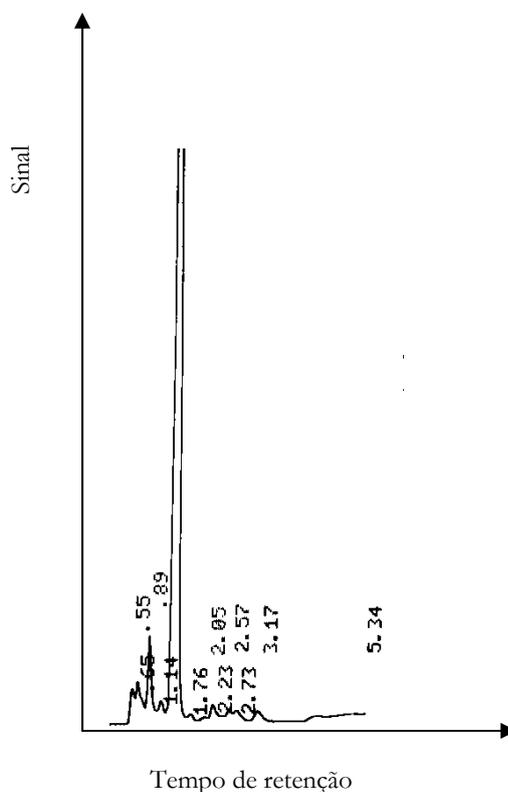


Figura 12. Cromatograma de uma amostra sem FQs (ensaio em branco)

II. 3. 3. 2. Linearidade

A avaliação da variação da resposta linear foi efectuada quer com soluções padrão, quer com extractos de amostras fortificadas.

Na primeira situação, foram utilizadas soluções padrão com concentrações de 0,0125 µg/mL, 0,025 µg/mL, 0,05 µg/mL, 0,1 µg/mL e 0,25 µg/mL.

Esta escolha teve por objectivo obter concentrações dos analitos em estudo na matriz frango dentro da gama de valores estabelecidos para os LMRs, compreendidos entre 12,5 µg/kg e 250 µg/kg.

Os resultados da avaliação da linearidade do método analítico foram adequados, dentro das concentrações pretendidas, obtendo-se, respectivamente, coeficientes de correlação (r^2) de 0,9997, 0,9989 e 0,9994 para a NOR, CIP e ENR, tal como demonstram os gráficos seguintes (gráfico 1, 2 e 3).

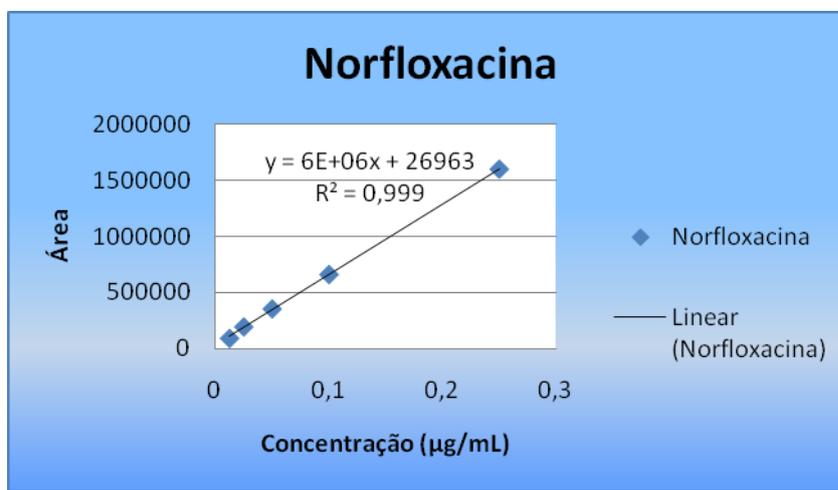


Gráfico 1. Curva de calibração para a NOR

II. Capítulo – Parte Experimental

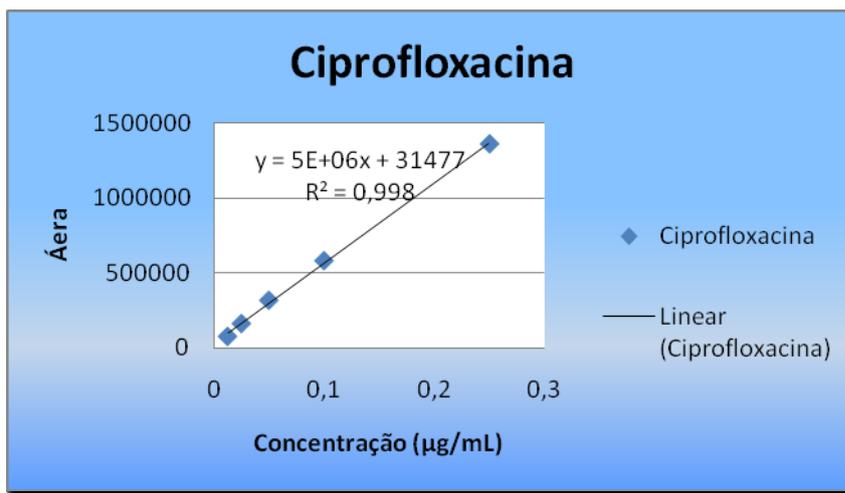


Gráfico 2. Curva de calibração para a CIP

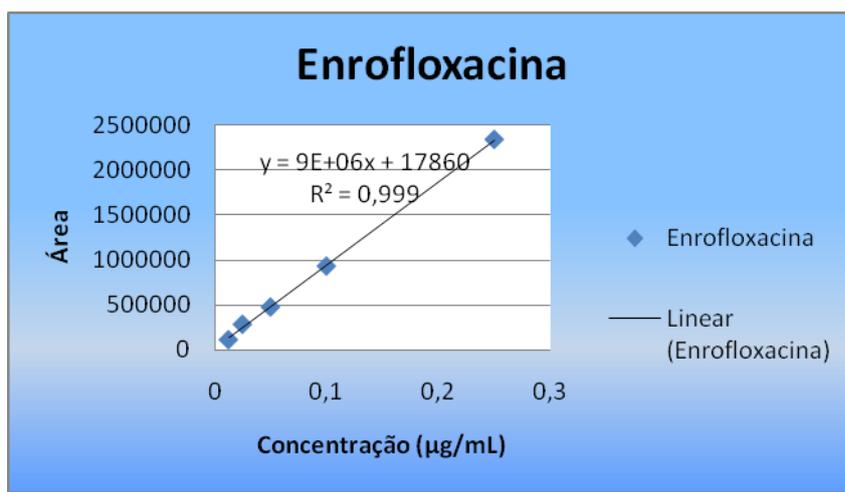
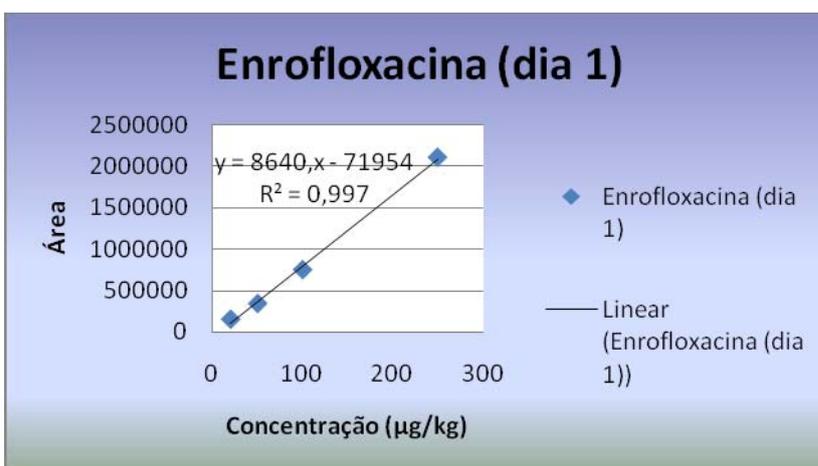
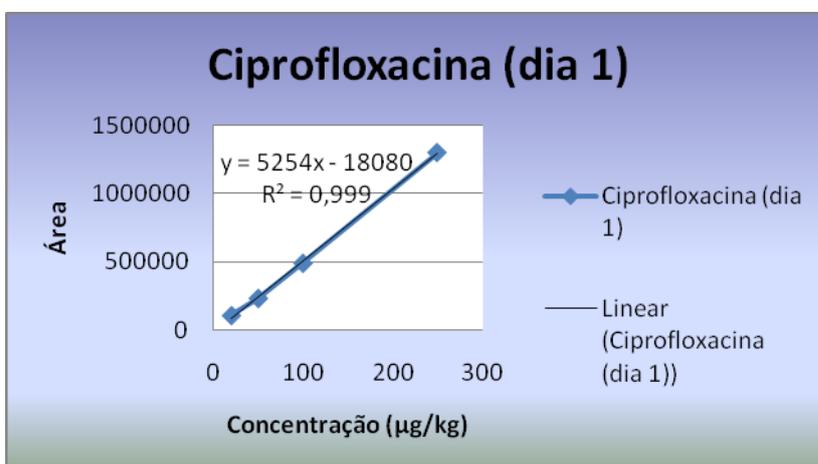
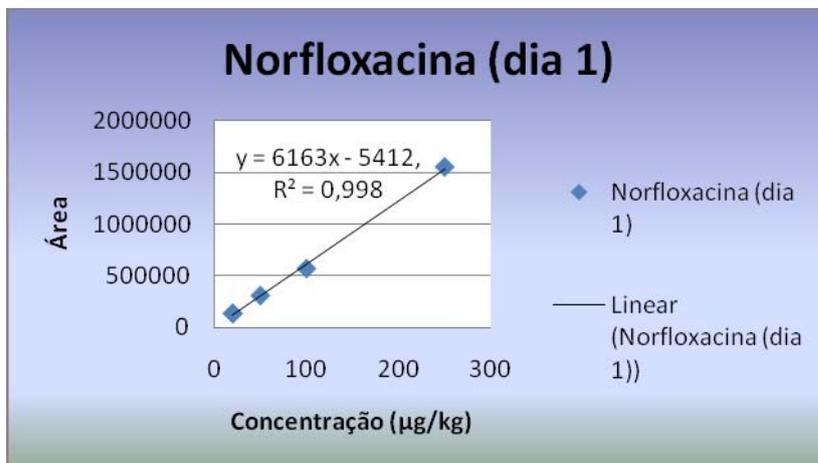


Gráfico 3. Curva de calibração para a ENR

Procedeu-se também à avaliação da linearidade em amostras fortificadas, tendo-se obtido linearidade com boa correlação (r^2 sempre superior a 0,9979) (gráficos 4 a 12).

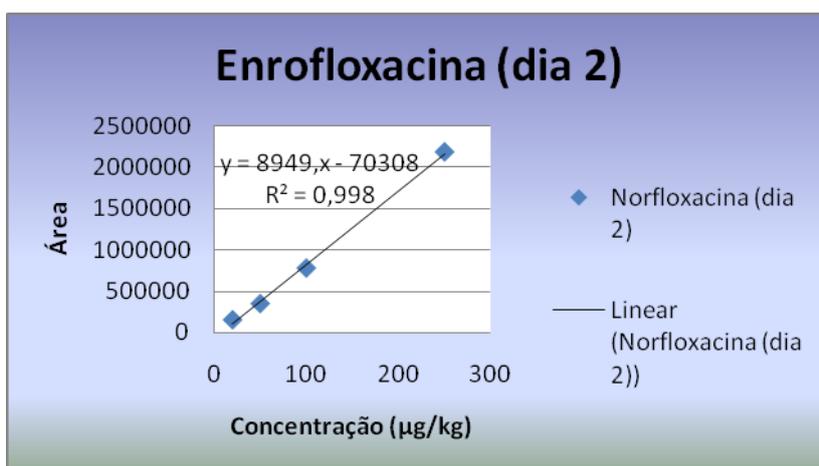
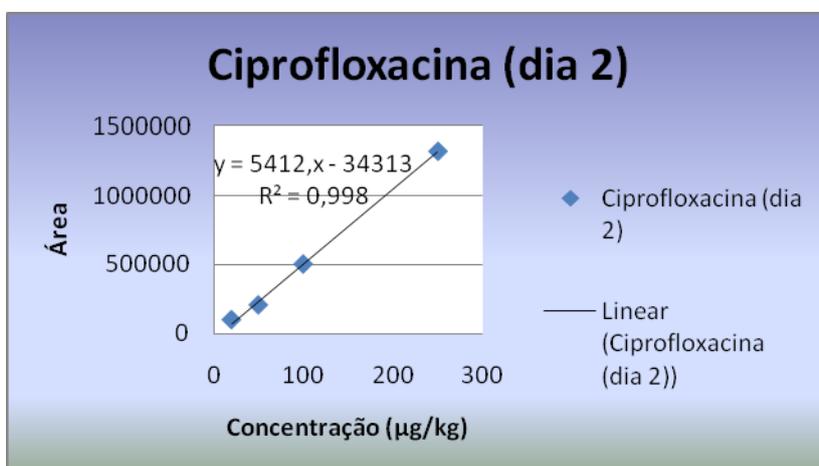
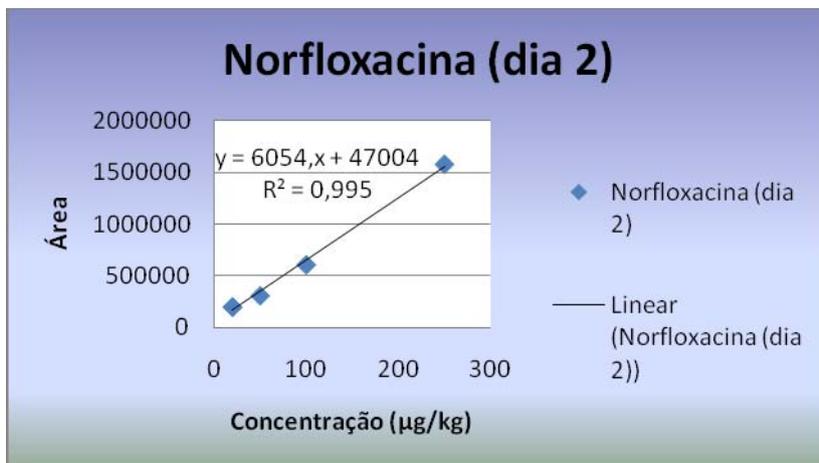
O resultados são apresentados individualmente e por cada dia de validação (gráficos 4 a 12).

II. Capítulo – Parte Experimental



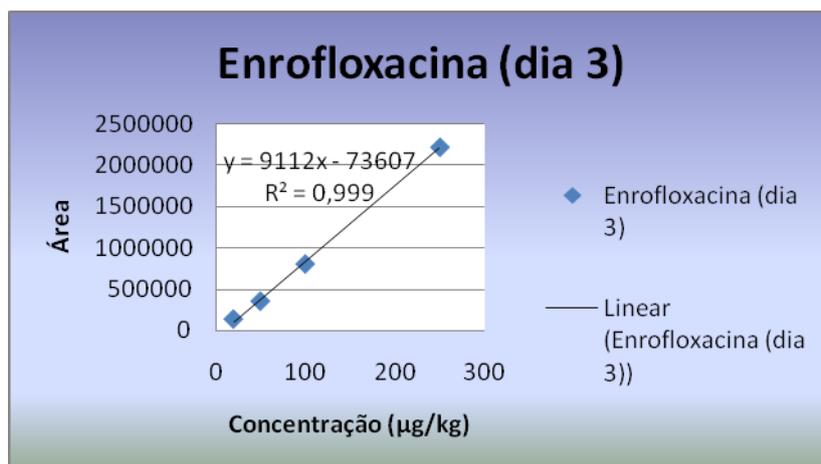
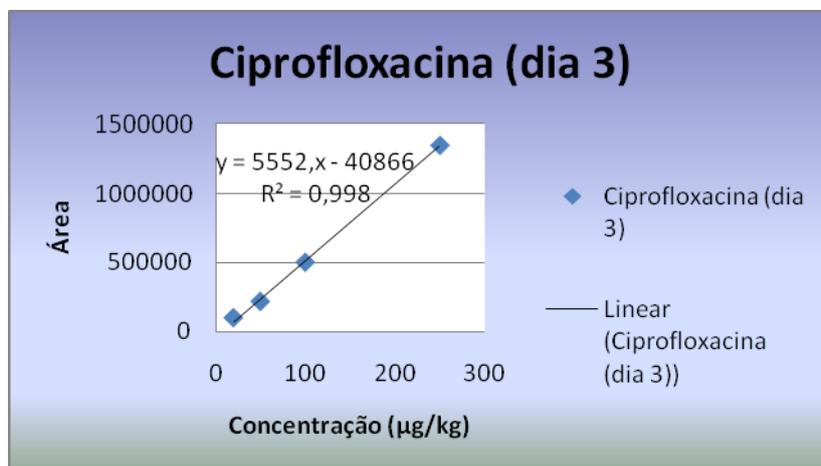
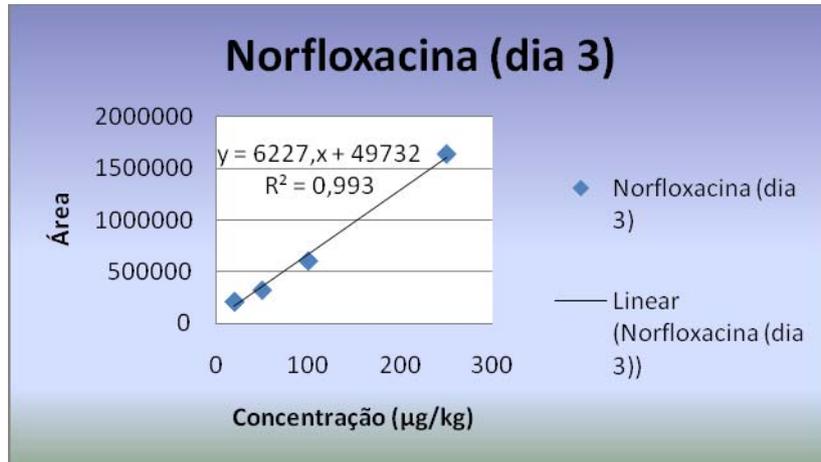
Gráficos 4, 5 e 6. Curvas de calibração utilizando amostras fortificadas para o dia 1 da validação relativas à NOR, CIP e ENR

II. Capítulo – Parte Experimental



Gráficos 7, 8 e 9. Curvas de calibração utilizando amostras fortificadas para o dia 2 da validação relativas à NOR, CIP e ENR

II. Capítulo – Parte Experimental



Gráficos 10, 11 e 12. Curvas de calibração utilizando amostras fortificadas para o dia 3 da validação relativas à NOR, CIP e ENR

II. 3. 3. 3. Exactidão e Precisão

Relativamente aos ensaios de fortificação, foram avaliados quatro níveis de fortificação correspondentes a 20 µg/kg, 50 µg/kg, 100 µg/kg e 250 µg/kg, de acordo com os LMRs estabelecidos para a CIP e ENR, preparados por adição de padrões a um grama de músculo de frango. Na NOR, como não existe LMR, não se efectuou o nível de fortificação mais baixo, tendo-se procedido à avaliação de 3 níveis de fortificação. A figura 13 representa um cromatograma de uma amostra fortificada com NOR, CIP e ENR.

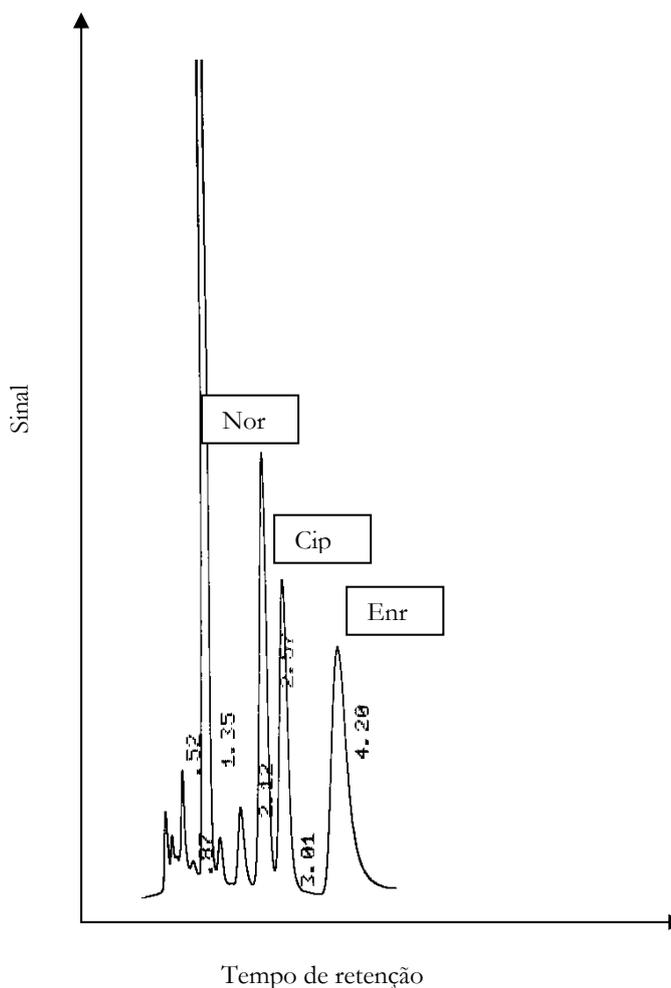


Figura 13. Cromatograma de uma amostra fortificada com NOR, CIP e ENR

II. Capítulo – Parte Experimental

Relativamente à exactidão do método, os resultados relativos às percentagens de recuperações nas amostras fortificadas foram adequados, como podemos constatar nas tabelas 11, 12 e 13. As percentagens de recuperação foram superiores a 76,9%, para todos os níveis de fortificação. A CIP apresenta a percentagem mais baixa, 76,9%, para o nível de fortificação de 50 µg/kg, enquanto que para a ENR a percentagem de recuperação mais baixa é de 84,9%, para o mesmo nível de fortificação. Para a NOR foram obtidos os valores mais elevados, superiores a 93,9 %.

As percentagens de recuperação obtidas para a NOR oscilaram entre 93,9% e 104,8% para os níveis de fortificação a 100 µg/kg e 250 µg/kg, respectivamente. No que respeita à CIP, os valores variaram entre 76,9% e 97,1% para os níveis de fortificação a 50 µg/kg e 250 µg/kg, respectivamente. Para a ENR as percentagens de recuperação foram de 84,9% a 109,5% para os níveis de fortificação a 50 µg/kg e 250 µg/kg, respectivamente.

Comparando os valores de percentagens de recuperação obtidas pela metodologia analítica proposta com os descritos na literatura científica, podemos constatar que os valores obtidos são idênticos aos métodos que incluem um procedimento de purificação, para os quais as percentagens variam entre 73% e 110%, sendo a maioria na ordem dos 80% (Kowalski et al, 2005; Samanidou et al, 2005; Zhao et al, 2007). No caso das metodologias analíticas que não incluem nenhum procedimento de purificação, apresentam percentagens mais baixas, na ordem dos 60% – 70% (Kirbis et al, 2005), e deste modo inferiores às obtidas neste estudo.

O valor da precisão intra-dia mais elevado, 8,4%, foi obtido para o nível de fortificação mais baixo de ENR (20 µg/kg), sendo o valor para a mesma concentração de CIP de 5,5%. Para o nível de fortificação de 50 µg/kg os valores foram de 5,3% para a NOR, 4,0% para a CIP e de 2,8% para a ENR. Para o nível de fortificação de 100 µg/kg os valores foram de 2,7% para a NOR, 3,9% para a CIP e de 1,0% para a ENR. Para o nível de fortificação mais elevado de 250 µg/kg, a precisão intra-dia variou de 0,4% para a NOR, 0,5% para a CIP e 1,1% para a ENR (tabela 11, 12 e 13).

Estes valores demonstram um claro decréscimo à medida que as concentrações dos níveis de fortificação aumentam.

Relativamente à precisão inter-dia, os valores alcançados para o nível de fortificação de 20 µg/kg, foram de 5,2% para a CIP e de 4,3% para a ENR. Para o nível de fortificação de 50 µg/kg, os valores foram de 3,1% para a NOR, 6,1% para a CIP e

II. Capítulo – Parte Experimental

de 3,3% para a ENR. Para o nível de fortificação de 100 µg/kg, obteve-se 4,0% para a NOR e ENR e 1,5% para a CIP. Finalmente, para o nível de fortificação de 250 µg/kg, a NOR apresentou um valor de 2,7%, a CIP 2,0% e a ENR 2,6%, como podemos observar nas tabelas 11, 12 e 13.

A precisão inter-dia também teve tendência para diminuir à medida que os níveis de fortificação aumentavam.

Tabela 11. Valores relativos à exactidão e precisão da NOR

Nível de fortificação (µg/kg)	Média de recuperação (%)*	Repetibilidad e intra-dia (%)	Repetibilidad e inter-dia (%)
50	99,0	5,3	3,1
100	93,9	2,7	4,0
250	104,8	0,4	2,7

* n=3

Tabela 12. Valores relativos à exactidão e precisão da CIP

Nível de fortificação (µg/kg)	Média de recuperação (%)*	Repetibilidad e intra-dia (%)	Repetibilidad e inter-dia (%)
20	89,4	5,5	5,2
50	76,9	4,0	6,1
100	87,6	3,9	1,5
250	97,1	0,5	2,0

* n=3

Tabela 13. Valores relativos à exactidão e precisão da ENR

Nível de fortificação (µg/kg)	Média de recuperação (%)*	Repetibilidade e intra-dia (%)	Repetibilidade e inter-dia (%)
20	91,2	8,4	4,3
50	84,9	2,8	3,3
100	94,4	1,0	4,0
250	109,5	1,1	2,6

* n=3

Os valores da exactidão e precisão da metodologia analítica, de acordo com os parâmetros internacionais preconizados pela AOAC/FAO/IUPAC e pelo Comité da União Europeia para a análise de resíduos, são adequados à pesquisa da NOR, CIP e ENR em tecido muscular de frango (Jenke, 1996).

II. 3. 3. 4. Limites de detecção e limites de quantificação

Relativamente ao limite de quantificação (LOQ), este foi de 20 µg/kg para a CIP e ENR e de 50 µg/kg para a NOR, sendo estas as concentrações mais baixas utilizadas nos ensaios de fortificação.

Na literatura científica encontram-se descritos limites de detecção para a ENR, CIP e NOR entre os 0,2 µg/kg a 8 µg/kg (Garcia et al, 2005; Kowalski et al, 2005; Samanidou et al, 2005). Relativamente aos limites de quantificação encontram-se valores desde 5 µg/kg a 25 µg/kg (Shim et al, 2003; Garcia et al, 2005).

II. 3. 4. Níveis de NOR, CIP e ENR nas amostras

Das trinta e três amostras analisadas, 76% (25) estavam contaminadas com NOR, 15% (5) estavam contaminadas com ENR e 12% contaminadas com NOR e ENR (gráfico 13 e tabela 14). Da análise do cromatograma representado na figura 14, pode-se

II. Capítulo – Parte Experimental

suspeitar da presença de CIP. Mas, uma vez que o pico cromatográfico da CIP é muito pequeno, não se distinguindo totalmente do ruído de fundo, seria necessário proceder à sua confirmação por espectrometria de massa (LC-MS), o que não foi possível.

Das 26 amostras contaminadas, 25 continham NOR (76%), sendo esta a contaminação mais comum dos compostos analisados. Esta contaminação pode estar relacionada com o facto de a NOR ainda não ter LMR definido, o que pode conduzir a um abuso na sua utilização.

Todas as amostras recolhidas no Porto, Bragança e Albufeira continham NOR, o que demonstra uma utilização extensiva desta FQ.

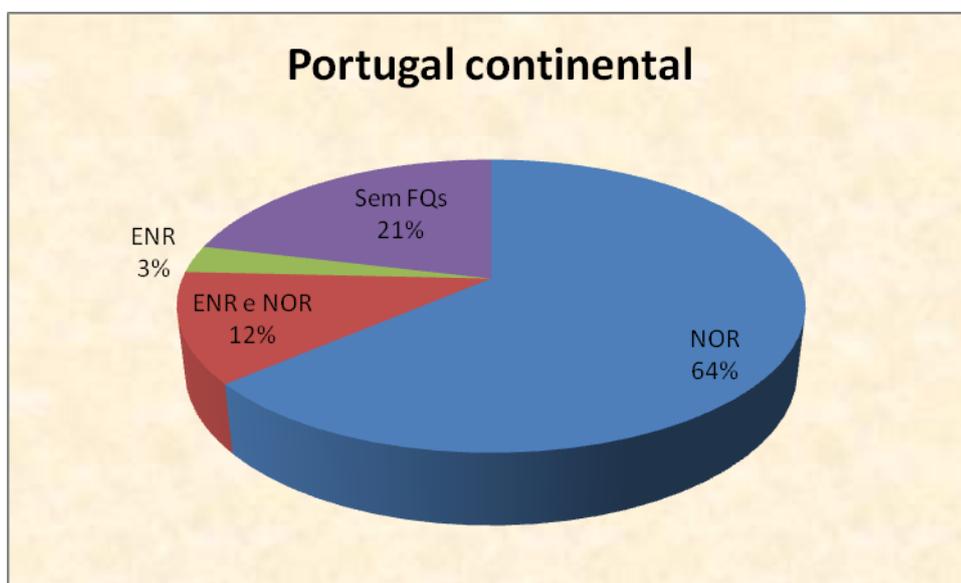


Gráfico 13. Percentagem de amostras contaminadas com NOR, CIP e ENR em Portugal continental

Apenas uma das amostras de Albufeira (figura 14) apresentou valores de ENR superiores ao LMR. A concentração detectada foi de 102,2 $\mu\text{g}/\text{kg}$, superior ao LMR estabelecido de 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$.

Tabela 14. Teores ($\mu\text{g}/\text{kg}$) e frequência de detecção (%) de FQs em amostras de frangos nas diferentes localidades.

FQs	Albufeira (n=5)		Bragança (n=3)		Coimbra (n=5)		Entroncamento (n=5)		Lisboa (n=5)		Porto (n=5)		Tomar (n=5)		TOTAL (n=33)	
	Teores	% (n)	Teores	% (n)	Teores	% (n)	Teores	% (n)	Teores	% (n)	Teores	% (n)	Teores	% (n)	Teores	% (n)
NOR	< LOQ	100 (5)	< LOQ	100 (3)	< LOQ	60 (3)	< LOQ	80 (4)	< LOQ	60 (3)	< LOQ	100 (5)	< LOQ	40 (2)	< LOQ	76 (25)
CIP		0		0		0		0		0		0		0		0
ENR	102,2	20 (1)		0		0	< LOQ	40 (2)	< LOQ	40 (2)		0		0	< LOQ a 102,2	15 (5)

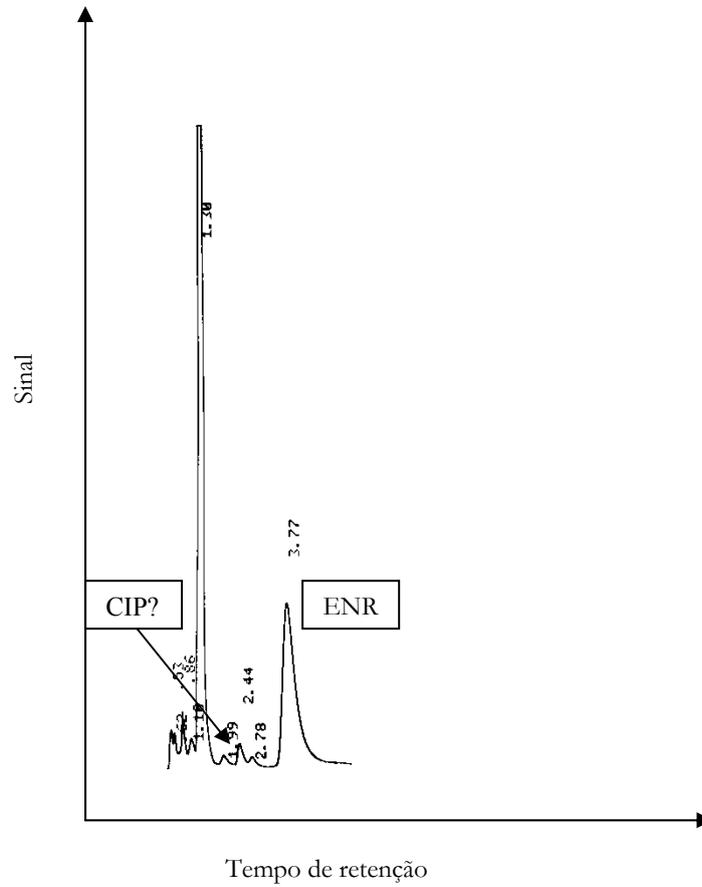


Figura 14. Cromatograma de uma amostra contendo ENR (superior ao LMR)

Relativamente à distribuição geográfica, em todas as localidades onde se adquiriram frangos foram detectadas amostras contaminadas, sendo Tomar a que continha uma menor percentagem de contaminação, 40%.

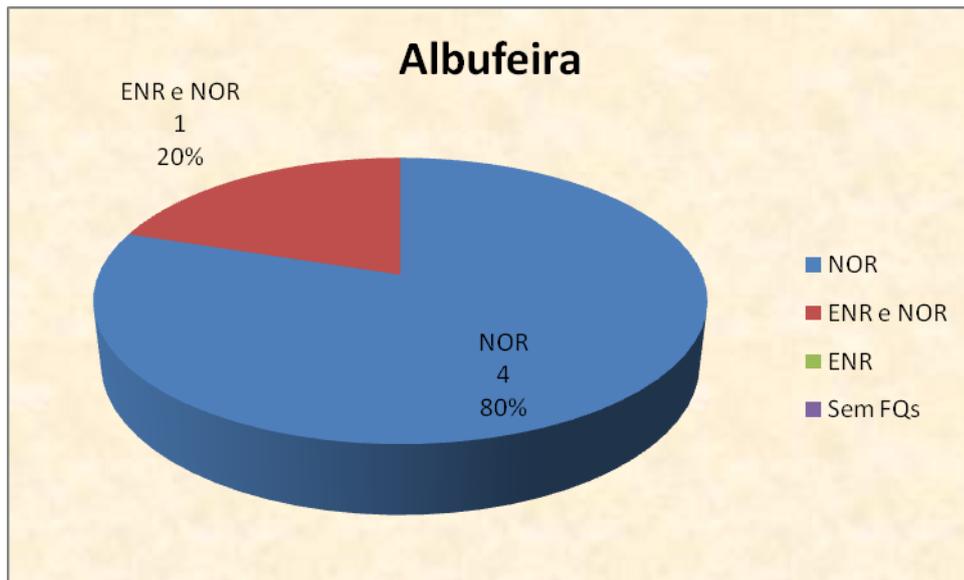


Gráfico 14. Percentagem de amostras contaminadas com NOR, CIP e ENR em Albufeira

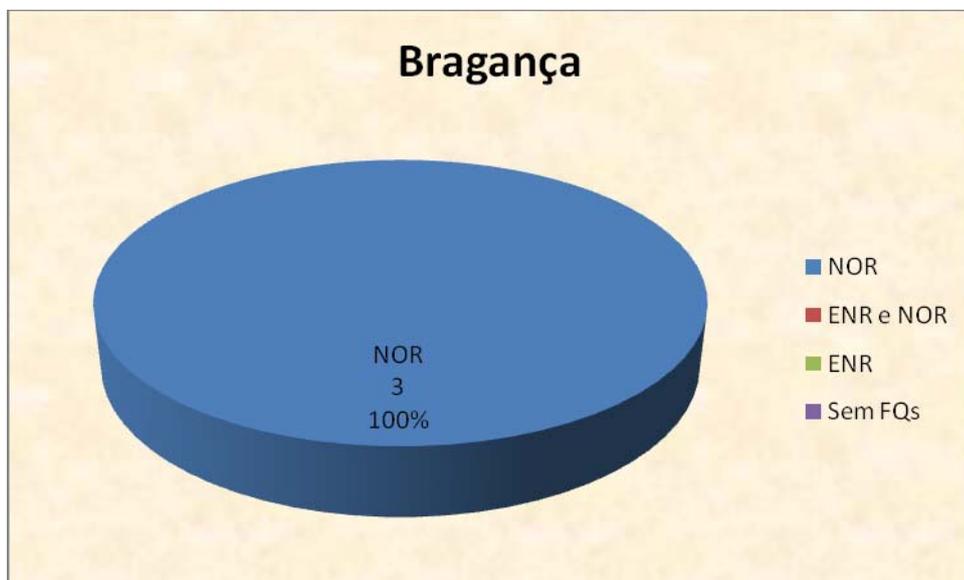


Gráfico 15. Percentagem de amostras contaminadas com NOR, CIP e ENR em Bragança

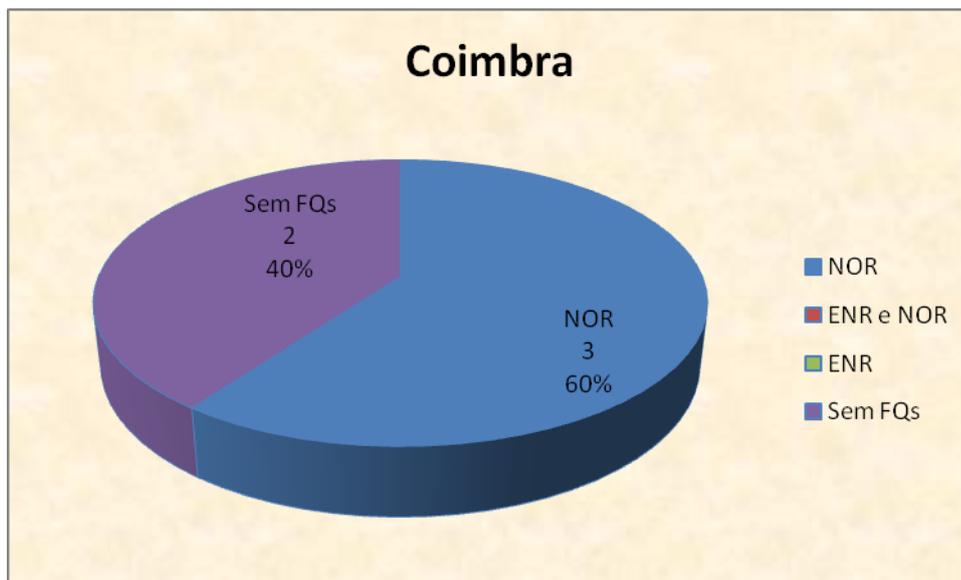


Gráfico 16. Percentagem de amostras contaminadas com NOR, CIP e ENR em Coimbra

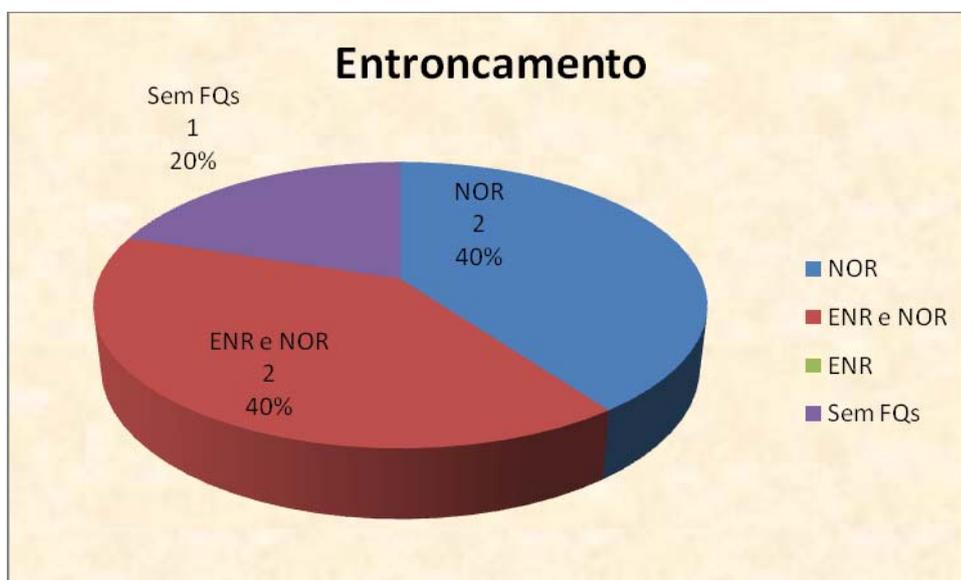


Gráfico 17. Percentagem de amostras contaminadas com NOR, CIP e ENR no Entroncamento

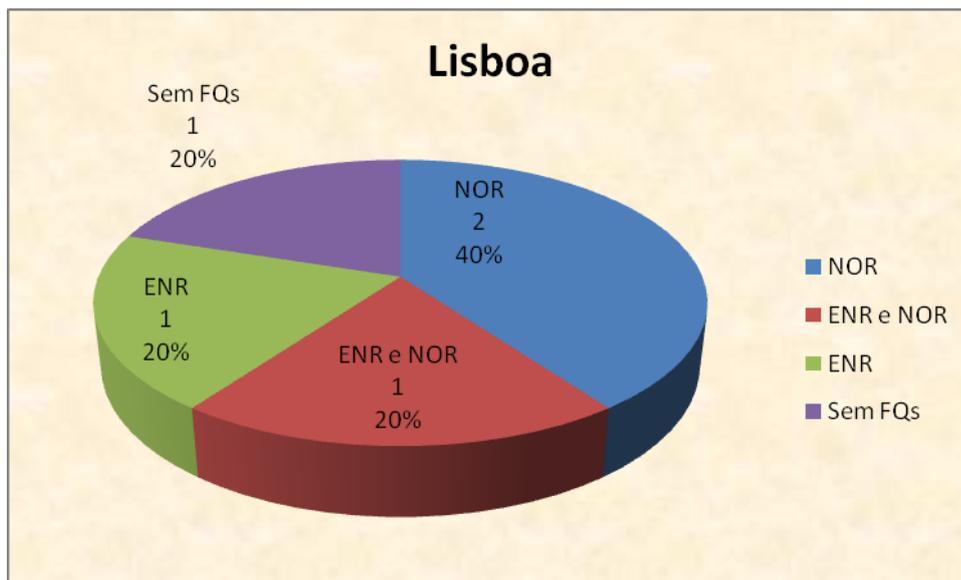


Gráfico 18. Percentagem de amostras contaminadas com NOR, CIP e ENR em Lisboa

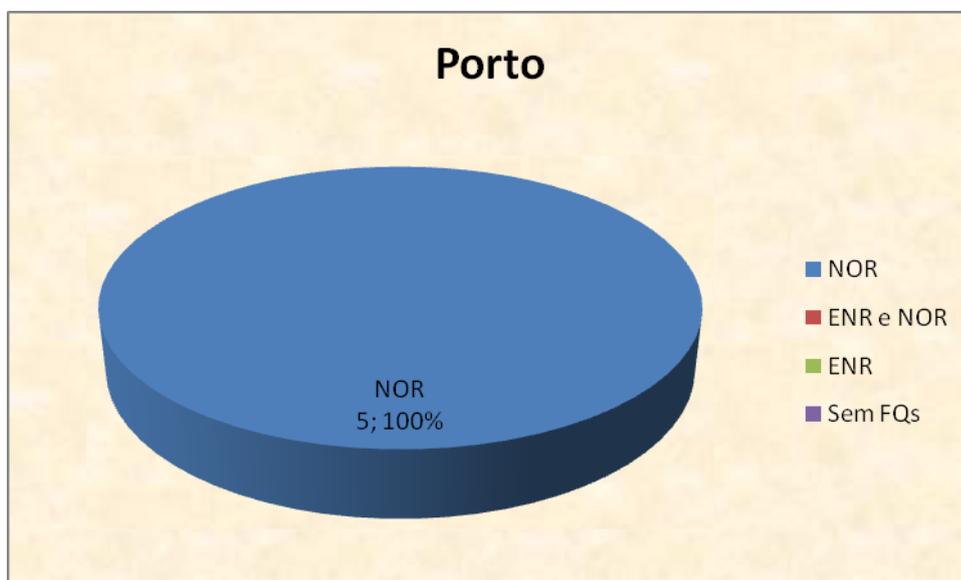


Gráfico 19. Percentagem de amostras contaminadas com NOR, CIP e ENR no Porto

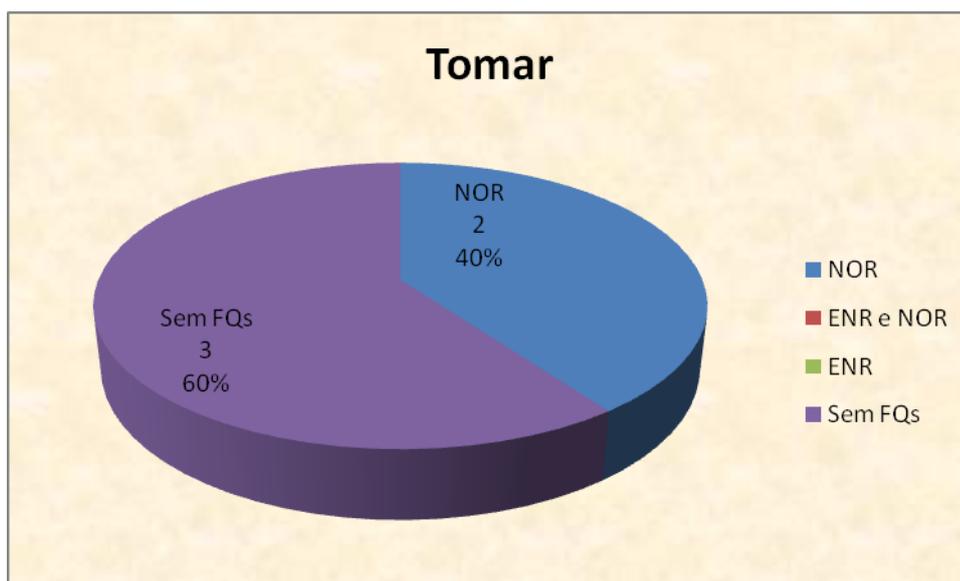


Gráfico 20. Percentagem de amostras contaminadas com NOR, CIP e ENR em Tomar

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

Apesar de se encontrarem descritas na literatura científica várias metodologias para a detecção e quantificação das FQs, apenas dois estudos eram relativos à sua determinação e quantificação de resíduos de ENR e NOR em amostras de frangos (Al-Mustafa et al, 2000; Salehzadeh et al, 2007).

Um destes estudos, realizado no Irão (Salehzadeh et al, 2007), em 90 amostras de frangos, revela que apenas duas amostras excedem o LMR de 100 µg/kg estabelecido para o músculo, mas que todas as amostras apresentam resíduos de ENR, sendo a média de 18,32 µg/kg. Este estudo efectuou apenas a determinação da ENR e não da CIP, seu principal metabolito, uma vez que o LMR é estabelecido para a soma da ENR e CIP. Este estudo refere que, no Irão, os esforços para controlar e diminuir o mau uso de FQs é insuficiente e que deve haver um maior controlo sobre a carne de frango colocada à venda.

II. Capítulo – Parte Experimental

Estes resultados não são concordantes com os obtidos no presente estudo, pois apenas foram detectadas 15% de amostras com ENR. No entanto, uma amostra também possuía valores superiores ao LMR.

Segundo o estudo de Al-Mustafa et al (2000), realizado em frangos de 32 explorações na Arábia Saudita, foi detectada a NOR nas amostras de 14 dessas explorações. Correspondendo a 36% das amostras de frangos de produtores locais contaminadas com NOR, enquanto 57% das amostras de fígado também estavam contaminadas. Nestas amostras, a concentração detectada oscilou entre 270 µg/kg e 3430 µg/kg. Este exemplo ilustra, muito provavelmente, a realidade de muitos locais onde os produtores não estão alertados para este problema de Saúde Pública ou, simplesmente, apenas estão concentrados na prossecução de lucros, sem estarem sujeitos a qualquer sanção por utilização indevida de antibióticos. Acresce que, com estas concentrações, não serão de excluir alterações na flora intestinal humana e reacções alérgicas.

Comparativamente, os resultados encontrados em Portugal para a NOR são mais elevados, pois este antibiótico foi detectado em 76% das amostras recolhidas em diferentes regiões de Portugal, apesar de não se encontrarem concentrações tão elevadas como na Arábia Saudita, sendo todos os valores inferiores ao LOQ.

Naturalmente que este estudo necessitaria de analisar um maior número de amostras, para haver uma maior abrangência na amostragem e para que os resultados obtidos permitissem obter conclusões mais sustentadas. Por outro lado, poderão haver variações ao longo do ano, consoante a temperatura ou até mesmo, consoante a intensidade da produção animal, circunstância que pode levar a um abate mais precoce, podendo este coincidir com uma fase de maior utilização de FQs.

Os consumos de FQs em veterinária em Portugal, em 2003/2004, são, no mínimo, três vezes superiores por quilo de carne produzida aos outros países da UE analisados (EMEA/CVMP/SAGAM/184651/2005, 2007).

Os resultados obtidos no presente estudo confirmam a continuação da utilização de FQs na produção de frangos devido a 79% dos frangos conterem vestígios destes antibióticos. Também o elevado número de resistências em animais a FQs em Portugal (EMEA/CVMP/SAGAM/184651/2005, 2007) é explicado pelos elevados consumos verificados.

Com estes resultados prova-se que a utilização de antibióticos é uma realidade. As percentagens elevadas de contaminação demonstram, não apenas, uma utilização para

II. Capítulo – Parte Experimental

tratamento em caso de doença, mas uma utilização indiferenciada em praticamente todos os frangos. Cria-se deste modo, um meio propício à aquisição de resistências por parte de bactérias colonizadoras dos frangos e sua possível transferência ao Homem, ou transferência dessas resistências a bactérias patogénicas que possam vir a infectar o Homem.

Os resultados de um estudo no qual foram detectados estirpes de *Enterococcus spp.* resistentes à CIP nas águas dos efluentes de matadouros de frangos (Costa et al, 2006), reforçam este tipo contaminação, com graves consequências para a Saúde Pública. Os resultados indicam que o nível de contaminação em Portugal é da ordem dos 10,2%, enquanto na Suécia são inferiores a 1%.

Como as FQs constituem um importante grupo de antibióticos na medicina humana, a emergência de resistências poderá conduzir a uma menor eficácia na terapêutica, com tempos de internamento mais longos, e podendo mesmo observar, em alguns casos mortalidade (Barza e Travers, 2002).

Este consumo pode também provocar modificações na flora intestinal humana, com consequências imprevisíveis.

II. 4. Conclusões

As FQs continuam a ser utilizadas em grandes quantidades na produção de frangos para consumo humano. A existência de 79 % de amostras contaminadas não pode ser atribuída apenas a tratamentos esporádicos.

Os resultados obtidos em todas as regiões de Portugal analisadas revelam a utilização disseminada de FQs na produção de frangos a nível nacional.

A NOR é a mais frequentemente FQ encontrada no músculo de frango (76%), com níveis inferiores ao LOQ.

II. Capítulo – Parte Experimental

A contaminação do tecido muscular de frango para consumo humano por ENR afecta 15 % dos frangos, uma das amostras continha concentração superior ao LMR estabelecido.

Este trabalho necessita obviamente de ter continuação, para melhor avaliação dos níveis de contaminação por FQs da carne de frango em Portugal. Esta é uma área sensível onde a Saúde Pública portuguesa deverá actuar de forma adequada.

II. 5. Considerações finais

Com o objectivo de promover uma boa imagem do produto junto dos consumidores, produtores de alguns países diminuíram a utilização de antibióticos na produção de frangos, sem que tivesse havido aumento de custos (Doyle, 2001; WHO, 2003). Esta imagem contrasta com a realidade portuguesa, onde os produtores continuam a utilizar as FQs. Retira-se destes dados que não é a questão económica que leva à utilização de FQs, mas o desconhecimento de outros métodos mais seguros (Doyle, 2001; WHO, 2003) ou, mais grave ainda, a resistência à mudança e a acomodação a técnicas utilizadas há muito tempo com prejuízo da Saúde Pública.

Tendo em conta que o desenvolvimento de novos antibióticos tem reduzido drasticamente, será de todo o interesse salvaguardar a eficácia daqueles que actualmente dispomos e que têm demonstrado bons resultados. A rapidez com que algumas bactérias vão adquirindo resistências não se compadece com a lentidão da disponibilização de novos antibacterianos no mercado. Para além da descoberta de novas moléculas não ser inesgotável, o mercado farmacêutico, por razões comerciais, tem privilegiado a investigação e desenvolvimento de medicamentos para doenças crónicas, em prejuízo dos antibióticos.

II. Capítulo – Parte Experimental

Bibliografia

Bibliografia

Bibliografia

Aerts, M.M.L., Hogenboom, A.C., Brinkman, U.A., 1995. Analytical strategy for the screening of veterinary drugs and their residues in edible products. *Journal of Chromatography B* 667:1-14.

Al-Mustafa, Z.H., Al-Ghamdi, M.S., 2000. Use of norfloxacin in poultry production in the eastern province of Saudi Arabia and its possible impact on public health. *International Journal on Environmental Health Research* 10(4):291-299.

Bailac, S., Ballesteros, O., Jiménez-Lozano, E., Barrón, D., Sanz-Nebot, V., Navalón, A., Vílchez, J.L., Barbosa, J. 2004. Determination of quinolones in chicken tissues by liquid chromatography with ultraviolet absorbance detection. *Journal of Chromatography A* 1029:145-151.

Bailac, S., Barron, D., Sanz-Nebot, V., Barbosa, J., 2006. Determination of fluoroquinolones in chicken tissues by LC-coupled Electrospray ionization and atmospheric pressure chemical ionization. *Journal Separation Science* 29:131-136.

Ball, P., 2000. Quinolone generations: natural history or natural selection? *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 46(1):17-24.

Barza, M., Travers, K., 2002. Excess infections due to antimicrobial resistance: the “Attributable Fraction”. *Clinical Infectious Diseases* 34(3):126-130.

Baytril®, 1999. Mechanism of action. Bayer AG Leverkusen.

Baytril® 10%, 2005. Resumo das Características do Medicamento.

Bengtsson, B., Wierup, M., 2006. Antimicrobial resistance in Scandinavia after the ban of antimicrobial growth promoters. *Animal Biotechnology* 17(2):147-156.

Blake, C., Gould, B.J., 1984. Use of enzymes in immunoassay techniques. A review. *Analyst* 109:533-547.

Bibliografia

Bogaerts, C.A., Wolf, F., 1980. A standardized method for the detection of residues of anti-bacterial substances in fresh meat. *Die Fleischwirtschaft* 60:672-674.

Brynes, S.D., Sundlof, S.F., Vilim, A., Lambert, G., Yong, M.S., Fitzpatrick, S.Z., 1996. International harmonization of the maximum residue levels for veterinary drugs via dietary intake estimates. Residues of Veterinary Drugs in Food. *Proceedings of Euroresidue III Conference* 296-300.

Brynes, S.D., Yong, M.S., 1993. Harmonization of tolerances under the free trade agreement between the United States and Canada. *Proceedings of Euroresidue II Conference* 226-230.

Bugyei, K., Black, W.D., McEwen, S., 1999. Pharmacokinetics of enrofloxacin given by oral, intravenous and intramuscular routes in broiler chickens. *Canadian Journal of Veterinary Research* 63:193-200.

Cinquina, A.L., Roberti, P., Giannetti, L., Longo, F., Draisci, R., Fagiolo, A., Brizioli, N.R., 2003. Determination of enrofloxacin and its metabolite ciprofloxacin in goat milk by HPLC with diode array detection. *Journal of Chromatography Analysis* 987:221-226.

Costa, P.M., Vaz-Pires, P.M., Bernardo, F.M., 2006. Antibiotic resistance of *Enterococcus spp.* isolated from wastewater and sludge of poultry slaughterhouses. *Journal of Environmental Science and Health, Part B* 41(8):1393-1403.

Decisão 93/256/CEE, 1993. *Jornal Oficial das Comunidades Europeias* L118 64-79.

Deibler, R.W., Rahmati, S., Zechiedrich, E.L., 2001. Topoisomerase IV, alone unknots DNA in *E. coli*. *Genes & Development* 15:748-761.

Díaz, D., Picco, E.J., Encinas, T., Rubio, M., Litterio, N.J., Boggio, J.C., 2001. Resíduos tissulares de nicotinato de norfloxacin administrado por via oral en cerdos. *Archivos de Medicina Veterinaria* v.33 n.1.

Bibliografia

Directiva 97/6/CE, 1997. *Jornal Oficial das Comunidades Europeias* L35 11-20.

Directiva 97/72/CE, 1997. *Jornal Oficial das Comunidades Europeias* L351 55-60.

Dong, M.W., 2006. *Modern HPLC for practicing scientist*. Wiley-Interscience.

Doyle, M. E. 2001. *Alternatives to antibiotic use for growth promotion in animal husbandry*. Food Research Institute, University of Wisconsin-Madison.

El-Aziz, M.I., Aziz, M.A., Soliman, F.A., Afify, N.A., 1997. Pharmacokinetic evaluation on enrofloxacin in chickens. *British Poultry Science* 38(2):164-168.

EMEA 2005. *The rules governing medicinal products in the European Union. Establishment of maximum residue limits (MRLs) for residues of veterinary medicinal products in foodstuffs of animal origin*.

EMEA Maximum Residue Levels 388/98, 1998. Committee for veterinary medicinal products. Enrofloxacin (modification for bovine, porcine and poultry). Summary report 2.

EMEA Maximum Residue Levels 389/98, 1998. Committee for veterinary medicinal products. Enrofloxacin (extension to sheep, rabbits and lactating cows). Summary report 3.

EMEA Maximum Residue Levels 820/02, 2002. Committee for veterinary medicinal products. Enrofloxacin (extension to all food producing species). Summary report 5.

EMEA Maximum Residue Levels, 1998. Committee for veterinary medicinal products. Enrofloxacin. Summary report 1.

Bibliografia

EMA/CVMP/SAGAM/184651/2005, 2007. Committee for medicinal products for veterinary use (CVMP), public statement on the use of (fluoro)quinolones in food-producing animals in the European Union: Development on resistance and impact on Human and animal health.

Endtz, H.P., Ruijs, G.J., Klingerren, B., Jansen, W.H. Van Der, R.T., Mouton, R.P., 1991. Quinolone resistance in *Campylobacter* isolated from man and poultry following the introduction of fluoroquinolones in veterinary medicine. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 27:199-208.

FAO/WHO/OIE, 2007. Report of the Joint FAO/WHO/OIE Expert meeting on critically important antimicrobials.

FDA, 2004. Proposal to withdraw approval of the new animal drug application for enrofloxacin for poultry.

FDA, 2005. FDA announces final decision about veterinary medicine.

Feinman, S.E., 1998. Antibiotics in animal feed: drug resistance revisited. *American Society for Microbiology News* 64:24-30.

Ferreira, W.F.C., Sousa, J.C.F., 1998. Microbiologia. *Lidel*, Edições técnicas.

Garcia, M.A., Solans, C., Calvo, A., Hernandez, E., Rey, R., Bregante, M.A., Puig, M., 2005. Determination of Enrofloxacin and its primary metabolite, Ciprofloxacin, in pig tissues. Application to residue studies. *Biomedical Chromatography* 19:27-31.

Garcia, M.A., Solans, C., Hernandez, E., Puig, M., Bregante, M.A., 2001. Simultaneous determination of Enrofloxacin and its primary metabolite, Ciprofloxacin in chicken tissues. *Chromatographia* 54:191-194.

Garcia-Ovando, H., Gorla, N., Weyers, A., Ugnia, L., Martinez, L., Giacomelli, N., Liboa, R., Chiostrri, E., Davicino, R., 2000. Enrofloxacin liquid-liquid extraction

Bibliografia

from chicken muscle and HPLC detection. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies* 25(15):2391-2397.

Griggs, D.J., Johnson, M.M., Frost, J.A., Humphrey, T., Jorgensen, F., Piddock, L.J., 2005. Incidence and mechanism of ciprofloxacin resistance in *Campylobacter spp.* isolated from commercial poultry flocks in the United Kingdom before, during and after fluoroquinolone treatment. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 49:699-707.

Hakanen, A., Jalava, J., Kotilainen, P., Jousmies-Somer, H., Siitonen, A., Huovinen, P., 2002. Gyr A polymorphism in *Campylobacter jejuni*: detection of Gyr A mutation in 162 *C. jejuni* isolates by single-strand conformation polymorphism and DNA sequencing. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 46:2644-2647.

Harbottle, H., Thakur, S., Zhao, S., White, D.G., 2006. Genetics of antimicrobial resistance. *Animal Biotechnology* 17(2):111-124.

Hermo, M.P., Barron, D., Barbosa, J., 2006. Development of analytical method for multiresidue determination of quinolones in pig muscle samples by liquid chromatography with ultraviolet detection, liquid chromatography-mass spectrometry and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 1104:132-139.

Ho, C., Sin D.W.M., Tang, H.P.O., Chung, L.P.K. Siu, S.M.P., 2004. Determination and online clean-up of fluoroquinolones in bovine milk using column-switching liquid chromatography fluorescence detection. *Journal of Chromatography A* 1061:123-131.

Hooper, D.C., Wolfson, J.S., 1993. Mechanism of quinolone action and bacterial killing. *American Society for Microbiology, Quinolone antimicrobial agents* 2:53-75.

Horwitz, W., 1998. Sampling and preparation of samples for chemical examination. *Journal of the Association of Official Analytical Chemists* 71:241-245.

Bibliografia

Huang, Z., Huang, H., Ruxiu, C., Yun'e, Z., 1997. Study on the fluorescence properties of some fluoroquinolones in various media. *Wuhan University Journal of Natural Sciences* vol.2 3:353-358.

Humphrey, T.J, Jorgensen, F., Frost, J.A., Wadda, H., Domingue, G., Elviss, N.C., Griggs, D.B., Piddock, L.J.V., 2005. Prevalence and subtypes of ciprofloxacin-resistant *Campylobacter spp.* in commercial poultry flocks before, during, and after treatment with fluoroquinolones. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 49(2):690-698.

Jenke, D.R., 1996. Chromatographic method validation: a review of current practices and procedures. II. Guidelines for primary validation parameters. *Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies* 19(5):737-757.

Joint FAO/WHO, 1993. Food Standards Programme Codex Alimentarius Commission. *Codex Alimentarius* 2^a ed. 3.

Kazakevich, Y.V., LoBrutto, R., 2007. HPLC for pharmaceutical scientists. John Wiley-Interscience.

Kirbis, A., Marinsek, J., Flajs, V.C., 2005. Introduction of the HPLC method for the determination of quinolone residue in various muscles tissues. *Biomedical Chromatography* 19:259-265.

Kowalski, C., Rolinski, Z., Slawik, T., Glód, B.K., 2005. Determinations of norfloxacin in chicken tissues by HPLC with fluorescence detection. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies* 28(1):121-135.

Levy, S. B., 1998. Multidrug resistance – A Sign of Times. *New England Journal of Medicine* 338:1376-1378.

Lin, J., Michel, L.O., Zhang, Q., 2002. CmeABC functions as a multidrug efflux system in *Campylobacter jejuni*. *Antimicrobial. Agents and Chemotherapy* 46:2124-2131.

Bibliografia

Lolo, M., Pedreira, S., Miranda, J.M., Vasquez, B.I., Franco, C.M., Cepeda, A., Fente, C., 2006. Effect of cooking on enrofloxacin residues in chicken tissue. *Food Additives & Contaminants* 23(10):988-993.

MacNeil, J.D., Ellis, R.L., 1995. Regulatory overview of antibiotic use in food-producing animals in North America and current methods of detection and analysis. *Journal of the Association of Official Analytical Chemist International* 1:2-29.

Maravic, G., Flogel, M., 1998. Microbial resistance to macrolide-lincosamide-streptogramin type B antibiotics based on ribosome methylation. *Acta Pharm.* 48:1-7.

Meng, J., Doyle, M.P., 1997. Emerging issues in microbiological food safety. *Annual Review of Nutrition* 17:255-275.

Moniri, R., Dastehgoli, K., 2006. Fluoroquinolone-resistance *Escherichia coli* isolated from healthy broilers with previous exposure to fluoroquinolonas: Is there a link). *Microbial Ecology in Health and Disease* 17(2):69-74.

Morais, J.H., Jackson, A.P., Smith, C.V., Sjikotra, N., Maxwell, A., Liddington, R.C., 1997. Crystal structure of the breakage-reunion domains of DNA gyrase. *Nature* 388(28):903-906.

Nachamkin, I., Engberg, J., Aarestrup, F.M., 2000. Diagnosis and antimicrobial susceptibility of *Campylobacter spp.* *Campylobacter 2^a ed, Washington D.C. ASM Press* 45-66.

Pecorelli, I., Galarini, R., Bibi, R., Floridi, Al., Casciarri, E., Floridi, A., 2003. Simultaneous determination of thirteen quinolones from feeds using accelerated solvent extraction and liquid chromatography. *Analalytical Chimica Acta* 483:81.

Pena A., Silva, S. R. C., Lino C. M., Silveira M.I.N., 2003. Determination of four fluoroquinolones in chickens by HPLC with fluorescence detection. *Proceedings 3rd*

Bibliografia

Scientific Meeting of The Spanish Society of Chromatography and Related Techniques
-3rd Waste Water Cluster European Workshop. p. 87.

Petz, M., 1990. Trends and perspectives in analytical methodology. Proceedings of Euroresidue I. Conference. Utrecht: Euroresidue I Conference.

Pistos, C., Tsantili-Kakoulidou, A., Koupparis, M., 2005. Investigation of the retention/pH profile of zwitterionic fluoroquinolones in reversed-phase and ion-interaction high performance liquid chromatography. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 39:438-443.

Posyniak, A., Zmudzki, J., Semeniuk, S., Niedzielska, J., Ellis, R., 1999. Determination of fluoroquinolone residues in animal tissues by liquid chromatography. *Biomedical Chromatography* 13:279-285.

Pumbwe, L., Piddock, L.J., 2002. Identification and molecular characterisation of CmeB, a *Campylobacter jejuni* multidrug efflux pump. *FEMS Microbial Lett.* 206:185-189.

Ramos, M., Aranda A., Garcia, E., Reuvers, T., Hooghuis, H., 2003. Simple and sensitive determination of five quinolones in food by liquid chromatography by fluorescence detection. *Journal of Chromatography B* 789:373-381.

Regulamento CE N° 2821, 1998. *Jornal Oficial das Comunidades Europeias* L298 4-28.

Rodriguez S.C., 1998. La amenaza de la resistencia microbiana. Madrid: Instituto de Salud Carlos III.

Rouan, M.C., 1985. Antibiotic monitoring in body fluids. *Journal of Chromatography* 340:361-400.

Bibliografia

Salehzadeh, F., Salehzadeh, A., Rokni, N., Madani, R., Golchinefar, F., 2007. Enrofloxacin residue in chicken tissues from Tehran slaughterhouses in Iran. *Pakistan Journal of Nutrition* 6(4):409-413.

Samanidou, V.F., Christodoulou, E.A., Papadoyannis, I.N., 2005. Determination of fluoroquinolones in edible animal tissue samples by high performance liquid chromatography after solid phase extraction. *Journal of Separation Science* 28:555-565.

Sapkota, A.R., Lefferts, L.Y., McKenzie, S., Walker, P., 2007. What do we feed to food-production animals? A review of animal feed ingredients and their impacts on human health. *Environmental Health Perspectives* 115(5):663-670.

Shen, J.Y., Kim, M.R., Lee, C.J., Kim, I.S., Li, K.B., Shim, J.H., 2004. Supercritical fluid extraction of the fluoroquinolones norfloxacin and ofloxacin from orally treated chicken breast muscle. *Analytical Chimica Acta* 513:451-455.

Shim, J.H., Shen, J.Y., Kim, M.R., Lee, C.J., Kim, I.S., 2003. Determination of the fluoroquinolone enrofloxacin in edible chicken muscle by supercritical fluid extraction and liquid chromatography with fluorescence detection. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51:7528-7532.

Smith, K.E., Besser, J.M., Hedberg, C.W., Leano, F.T., Bender, J.B., Wicklund, J.H., Johnson, B.P., Moore, K.A., Osterholm, M.T., 1999. Quinolone-resistant *Campylobacter jejuni* infections in Minnesota, 1992-1998. *New England Journal of Medicine* 340(20):1525-1532.

Snyder, L.R., Kirkland, J.J., Glajch, J.L., 2006. Practical HPLC method development, 2^a ed. Wiley-Interscience.

Song, C., Ryu, H., Park, J., Ko, T., 1999. Mechanism of DNA Gyrase inhibition by quinolones: I. Spectral analysis for nalixidic acid polymorphism. *Korean Chemist Society* 20(6):727-730.

Bibliografia

Stewart, M.J., 1986. Immunoassays. Clarks isolation and identification of drugs 2^a ed.. *Pharmaceutical Press* 148-159.

Sumano, L.H., Gutierrez, O.L., Aguilera, R., Rosiles, M.R., Bernard, B.M., Gracia, M.J., 2004. Influence of hard water on the bioavailability of enrofloxacin in broilers. *Poultry Science* 83:726-731.

Sweetman, S., 2004. Martindale The Complete Drug Reference (34th edition). *The Pharmaceutical Press*.

Takahashi, H., Hayakawa, I., Akimoto, T., 2003. The history of the development and changes of quinolone antibacterial agents. *Yakushigaku Zasshi* 38(2):161-179.

Threlfall, E.J., 2002. Antimicrobial drug resistance in *Salmonella*: Problems and perspectives in food and water-borne infections. *FEMS Microbiology Review* 26:141-148.

Tollefson, L., Karp, B.E., 2004. Human health impact from antimicrobial use in food animals. *Médecine et Maladies Infectieuses* 34(11):514-521.

Verhoef-Verhallen, E., Rijs, A., 2003. The complete encyclopedia of chickens. *Rebo International*.

Vyncht, G., Jánosi, A., Bordin, G., Toussaint, B., Maghuin-Rogister, G., Pauw, E., Rodriguez, A.R., 2002. Multiresidue determination of (fluoro)quinolone antibiotics in swine kidney using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 952:121-129.

Wassenaar, T.M., 2005. Use of antimicrobial agents in veterinary medicine and implication for Human Health. *Critical Reviews in Microbiology* 31(3):155-169.

Wentland, M.P., 1993. Quinolone antimicrobial agents ed2. *American Society for Microbiology* XIII-XIV.

Bibliografia

White, D.G., Zhao, S., Simjee, S., Wagner, D.D., McDermott, P.F., 2002. Antimicrobial resistance of foodborne pathogens. *Microbes and Infections* 4:405-412.

WHO, 1997. The medical impact of the use of antimicrobial drugs in food animals. Report of the World Health Organization's Meeting, Berlin 13-17.

WHO, 2003. Impact of antimicrobial growth promoter termination in Denmark. WHO/CDS/CPE7ZFK/2003.1.

WHO, 2008. Antimicrobial resistance from food animals. INFOSAN information note No. 2/2008 – Antimicrobial Resistance.

Woodward, K.N., Shearer, G., 1995. Antibiotic use in animal production in the European Union: regulation and current methods for residue detection. *The Scientific Association Dedicated to Excellence in Analytical Methods* 3:45-75.

Yorke, J.C., Froc, P., 2000. Quantification of nine quinolonas in chicken tissues by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. *Journal of Chromatography A* 882:63-77.

Zhao, A.J., Jiang, H.Y., Ding, S.Y., Li, X.L., Wang, G.Q., Li, C., Shen, J.Z., 2007. A reliable LC method with fluorescence detection for quantification of (fluoro)quinolone residues in chicken muscle. *Chromatographia* 65:539-544.