



Ana Rute Martins Costa Gomes

Determinação de Fluoroquinolonas em Tecido Muscular de Aves

Dissertação apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra para a obtenção do grau de Mestre em Segurança Alimentar sob a orientação da
Professora Doutora Angelina Lopes Simões Pena.

Setembro de 2013



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Ana Rute Martins Costa Gomes

Determinação de Fluoroquinolonas em Tecido
Muscular de Aves

Dissertação apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra para a obtenção do grau de
Mestre em Segurança Alimentar sob a orientação da Professora Doutora Angelina Lopes Simões Pena.

Setembro de 2013



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

“O que sabemos é uma gota, o que não sabemos é um oceano”
Isaac Newton

Agradecimentos

Agradeço à Professora Doutora Angelina Pena, pela amabilidade com que me recebeu, pela oportunidade que me concedeu ao permitir-me realizar este trabalho, pelo valioso apoio prestado durante a realização do mesmo e pelas críticas e sugestões relevantes feitas durante a orientação.

Ao Doutor André Pereira, pela paciência e apoio prestado, bem como pelas críticas e sugestões relevantes feitas durante a fase experimental deste trabalho.

À Sofia Ricardo, à Diana Lourenço, à Patrícia Ricardo e à Patrícia Vicente pela companhia nas horas passadas no laboratório e pelo incentivo. Bem hajam pela amizade.

À Luísa Veiga e à Margarida Martins, pela ajuda na recolha de amostras e ao Francisco Torres por toda a ajuda e incentivo prestados.

À Elsa Veiga, por me ter apoiado sempre e pela ajuda imprescindível na correção deste trabalho.

Aos meus amigos, pelo apoio e força que me deram. Sempre me ajudaram a ultrapassar os tempos mais complicados.

E por último, mas não menos importante, aos meus pais, pela paciência e apoio sempre prestados.

A todos os que contribuíram para a realização deste trabalho, o meu sincero agradecimento.

Abreviaturas

ADI – Dose Diária Aceitável

ADN – Ácido Desoxirribonucleico

CIP – Ciprofloxacina

DGAV – Direção Geral da Alimentação e Veterinária

DRA – Direção Regional da Agricultura

EFSA – Autoridade Europeia de Segurança Alimentar

EMA – Agência Europeia do Medicamento

ENR – Enrofloxacin

FD – Detecção por Fluorimetria

FDA – Food and Drug Administration

FQs – Fluoroquinolonas

FS – Fator Segurança

Gyr-A – Girase A

Gyr-B – Girase B

HPLC – Cromatografia Líquida de Alta Pressão

IS – Intervalo de Segurança

LMR – Limite Máximo de Resíduo

LOD – Limite de Detecção

LOQ – Limite de Quantificação

NOR – Norfloxacina

OMS – Organização Mundial de Saúde

SPE – Extração em Fase Sólida

TBA – Tetrabutylamónio

UE – União Europeia

Abstract

The aim of this study was to assess the contamination of antibiotics of the fluoroquinolones (FQs) group, norfloxacin (NOR), ciprofloxacin (CIP) and enrofloxacin (ENR), in 88 samples of chicken and 12 turkey samples for sale in small and large stores in mainland Portugal. Samples were collected for analysis in several districts of the country, Aveiro, Beja, Bragança, Castelo Branco, Coimbra, Évora, Faro, Leiria, Lisbon, Oporto, Santarém, Setúbal and VisUE, in order to obtain a representative sample.

As regards chickens, 72 (81.8%) samples were contaminated: 24 (33.3%) were contaminated with CIP, 16 (22.3%) with ENR and 32 (44.4%) with CIP and ENR. Of the 88 chicken, 3 exceeded the maximum residue limits, 100 µg/Kg, considering that this value is stipulated by the sum of CIP and ENR. None of the samples were contaminated with NOR.

Of the 12 turkey samples analyzed, 11 (91.6%) were contaminated. Within the contaminated samples, 6 (54.5%) were contaminated with CIP, 2 (18.1%) with ENR and 3 (27.3 %) with CIP and ENR.

The results of this work show that FQs continue to be used indiscriminately by producers, leading to serious public health problems.

Key-words: Fluoroquinolones, norfloxacin, ciprofloxacin, enrofloxacin, turkey and chicken muscle tissue and liquid chromatography.

Resumo

O objetivo deste estudo foi avaliar a contaminação de antibióticos do grupo das fluoroquinolonas (FQs), nomeadamente a norfloxacin (NOR), a ciprofloxacina (CIP) e a enrofloxacin (ENR) em 88 amostras de frango e 12 amostras de peru à venda em Portugal continental, em talhos e pequenas e grandes superfícies comerciais. Foram recolhidas amostras para analisar em vários distritos do país, Aveiro, Beja, Bragança, Castelo Branco, Coimbra, Évora, Faro, Leiria, Lisboa, Porto, Santarém, Setúbal e Viseu, de forma a obter uma amostra representativa.

No caso dos frangos, 72 (81,8%) amostras estavam contaminadas. Dentro das quais, 24 (33,3%) estavam contaminadas com CIP, 16 (22,3%) com ENR e 32 (44,4%) com CIP e ENR. Das 88 amostras de frango, 3 excediam o limite máximo de resíduo, 100 µg/Kg, tendo em conta que este valor é estipulado através da soma da CIP com a ENR. Nenhuma das amostras estava contaminada com NOR.

Das 12 amostras de peru analisadas, 11 (91,6%) estavam contaminadas; dentro das amostras contaminadas, 6 (54,5%) continham CIP, 2 (18,1%) continham ENR e 3 (27,3%) continham CIP e ENR.

Os resultados deste estudo demonstraram que os antibióticos continuam a ser usados por parte dos produtores de forma indiscriminada, levando a graves problemas de saúde pública.

Palavras-chave: Fluoroquinolonas, norfloxacin, ciprofloxacina, enrofloxacin, tecido muscular de perus e frangos e cromatografia líquida.

Índice

I.1. Introdução	1
I.2. Consumo de aves em Portugal	2
I.3. Perspetiva histórica.....	4
I.3.1. Fluoroquinolonas	4
I.3.2. Utilização de antibióticos em Veterinária.....	8
I.4. Legislação	9
I.5. Mecanismo de ação.....	9
I.6. Avaliação de segurança dos resíduos (Limite Máximo de Resíduo)	10
I.6.1. Intervalo de Segurança.....	11
I.7. Consumo de Fluoroquinolonas na União Europeia	12
I.8. Toxicidade provocada pela utilização de Fluoroquinolonas.....	14
I.8.1. Toxicidade crónica - Emergência de resistências bacterianas	14
I.8.1.1. <i>Salmonella</i>	15
I.8.1.2. <i>Campylobacter</i>	18
I.9. Metodologias analíticas para determinação de FQs	20
I.9.1. Métodos Microbiológicos	20
I.9.2. Métodos Imunológicos	21
I.9.3. Métodos de Confirmação	22
I.9.3.1. Extração e purificação da amostra.....	23
I.9.3.2. Extração em fase sólida	24
II.1. Materiais e metodologia	26
II.1.1. Reagentes e soluções.....	26
II.1.1.1. Reagentes.....	26
II.1.1.2. Soluções.....	26
II.1.2. Materiais.....	27
II.1.3. Equipamento	28
II.1.4. Amostragem.....	28
II.1.4.1. Recolha de amostras	28
II.1.4.2. Preparação e conservação das amostras.....	30
II.1.5. Metodologia analítica	31
II.1.5.1. Extração	31
II.1.5.2. Purificação da amostra.....	32
II.1.6. Detecção e quantificação de FQs	34
II.1.6.1. Método cromatográfico	34
II.1.6.1.1. Fase móvel.....	34

II.1.6.1.2. Fluorimetria	34
II.2. Validação da metodologia analítica.....	35
II.2.1. Seletividade.....	35
II.2.2. Linearidade	35
II.2.3. Ensaio de recuperação.....	36
II.3. Discussão de resultados	37
II.3.1. Otimização das condições cromatográficas.....	37
II.3.2. Otimização dos resultados de extração e purificação da amostra.....	38
II.3.3. Validação.....	39
II.3.3.1. Linearidade	39
II.3.3.1.1. Linearidade para padrões.....	39
II.3.3.1.2. Linearidade avaliada para amostras fortificadas	41
II.3.3.2. Limites de deteção e quantificação de FQs	45
II.3.3.3. Seletividade da amostra	46
II.3.3.4. Exatidão e precisão.....	47
II.3.4. Contaminação de NOR, CIP e ENR nas amostras de frango analisadas	50
II.3.4.1. Contaminação de FQs em Frango	50
II.3.4.2. Amostras de frango contaminadas por zonas	51
II.3.4.3. Contaminações por distrito	53
II.3.5. Amostras de peru contaminadas.....	60
II.4. Considerações Finais.....	62
Bibliografia	69

Índice de figuras

Figura 1 - Evolução da produção de carne de aves em Portugal. Adaptada INE (2010).....	2
Figura 2 – Estrutura do ácido nalidíxico.....	4
Figura 3 – Estrutura de Norfloxacin.....	5
Figura 4 - Estrutura da Enrofloxacin.....	6
Figura 5 - Estrutura da Ciprofloxacina.....	6
Figura 6 - Distribuição geográfica das zonas de recolha de amostras.....	30
Figura 7 - Esquema resumo do procedimento de extração.	32
Figura 8 - Esquema resumo da purificação da amostra.....	33
Figura 9 – Cromatograma de um padrão de 50 ng/mL contendo NOR, CIP e ENR.....	37
Figura 10 – Cromatograma de um ensaio branco.....	46
Figura 11 – Cromatograma de uma amostra fortificada com NOR, CIP e ENR para um nível de 50 ng/mL.....	47
Figura 12 – Cromatograma de uma amostra contendo níveis superiores ao LMR.....	51

Índice de tabelas

Tabela 1 - Classificação de quinolonas usadas em medicina humana.....	7
Tabela 2 – Classificação de quinolonas de uso veterinário na UE (EMEA/CVMP/SAGAM), 2006).....	8
Tabela 3 – Venda de quinolonas e produção de carne em alguns países da UE. Adaptado de EMEA/CVMP/SAGAM/184651/2005 (2007).	12
Tabela 4 – Resistência (%) face à ciprofloxacina em <i>S. enteritidis</i> em carne de galinha e frango. Adaptado de EFSA (2013).....	17
Tabela 5 – Resultados obtidos num estudo comparativo de 3 colunas de SPE. Adaptado de Bailac et al (2004).....	24
Tabela 6 - Plano de amostragem.....	29
Tabela 7 – Estudo dos vários procedimentos de extração e purificação da amostra realizados.....	38
Tabela 8 – Valores de LOD e LOQ para as FQs em estudo.....	46
Tabela 9 – Exatidão e precisão relativas à Nor.....	48
Tabela 10 – Exatidão e precisão relativas à CIP.....	49
Tabela 11 – Exatidão e precisão relativas à ENR.....	49
Tabela 12 – Resultados obtidos para as amostras analisadas.....	50
Tabela 13 – Amostras contaminadas com valores superiores ao LMR.....	52

Índice de Gráficos

Gráfico 1 – Curva de calibração para a norfloxacin	39
Gráfico 2 – Curva de calibração para a ciprofloxacina	40
Gráfico 3 – Curva de calibração para a enrofloxacin	40
Gráfico 4 – Curva de calibração de amostras fortificadas com norfloxacin no 1º dia de validação	41
Gráfico 5 - Curva de calibração de amostras fortificadas com ciprofloxacina no 1º dia de validação	41
Gráfico 6 - Curva de calibração de amostras fortificadas com enrofloxacin no 1º dia de validação	42
Gráfico 7 - Curva de calibração de amostras fortificadas com norfloxacin no 2º dia de validação	42
Gráfico 8 - Curva de calibração de amostras fortificadas com ciprofloxacina no 2º dia de validação	43
Gráfico 9 - Curva de calibração de amostras fortificadas com enrofloxacin no 2º dia de validação	43
Gráfico 10- Curva de calibração de amostras fortificadas com norfloxacin no 3º dia de validação	44
Gráfico 11 - Curva de calibração de amostras fortificadas com ciprofloxacina no 3º dia de validação	44
Gráfico 12 - Curva de calibração de amostras fortificadas com enrofloxacin no 3º dia de validação	45
Gráfico 13 - Percentagem de amostras de frangos contaminadas em Portugal continental	52
Gráfico 14 - Percentagem de amostras contaminadas com FQs em Aveiro n=5	53
Gráfico 15 - Percentagem de amostras contaminadas com FQs em Beja n=3	53
Gráfico 16 - Percentagem de amostras contaminadas com FQs em Bragança n=4	54
Gráfico 17 - Percentagem de amostras contaminadas com FQs em Castelo Branco n=6	54
Gráfico 18 - Percentagem de amostras contaminadas com FQs em Coimbra n=12	55
Gráfico 19 - Percentagem de amostras contaminadas com FQs em Évora n=5	55
Gráfico 20 - Percentagem de amostras contaminadas com FQs em Faro n=10	56
Gráfico 21 - Percentagem de amostras contaminadas com FQs em Leiria n=11	56
Gráfico 22 - Percentagem de amostras contaminadas com FQs em Lisboa n=5	57
Gráfico 23 - Percentagem de amostras contaminadas com FQs no Porto n=5	57
Gráfico 24 - Percentagem de amostras contaminadas com FQs em Santarém n=7	58
Gráfico 25 - Percentagem de amostras contaminadas com FQs em Setúbal n=2	58
Gráfico 26 - Percentagem de amostras contaminadas com FQs em Viseu n=4	59
Gráfico 27 - Percentagem de amostras de perus contaminadas com FQs em Portugal continental	60

Objetivos

O trabalho desenvolvido durante esta tese de mestrado teve como objetivo avaliar a contaminação de antibióticos do grupo das Fluoroquinolonas (FQs), nomeadamente a Ciprofloxacina (CIP), a Enrofloxacina (ENR) e a Norfloxacina (NOR), em amostras de tecido muscular de aves vendidas em Portugal continental.

Desta forma, pretendeu-se:

- Determinar e quantificar a presença das FQs, CIP, ENR e NOR, em amostras de tecido muscular de frango e peru;
- Observar se os níveis de FQs obtidos se encontram dentro dos limites máximos de resíduos (LMRs) permitidos pela legislação em vigor;
- Comparar os valores de FQs obtidos com outros estudos realizados.

Trabalho desenvolvido no decurso desta dissertação

Apresentação de comunicação em poster num encontro científico internacional

Pereira, A., Gomes, A., Lino, C., Pena, A., Does the use of fluoroquinolones in poultry production reach your plate? Portuguese nationwide surveillance. 8th conference on Sustainable Development of Energy, Water and Environment Systems. Dubrovnik, Croatia. September 22-27, 2013.

Comunicação de publicação em ata de encontro científico internacional

Pereira, A., Gomes, A., Lino, C., Pena, A., Does the use of fluoroquinolones in poultry production reach your plate? Portuguese nationwide surveillance. 8th conference on Sustainable Development of Energy, Water and Environment Systems. Dubrovnik, Croatia. September 22-27, 2013.

Revisão Bibliográfica

I.1. Introdução

A população humana tem vindo a demonstrar cada vez mais preocupação ao nível da sua saúde, tendo perceção do perigo que alguns riscos alimentares podem acarretar para a saúde humana (DGAV, 2009).

O conceito de segurança alimentar está cada vez mais presente no nosso dia-a-dia devido ao comércio internacional de alimentos, a algumas crises alimentares que vão surgindo e à importância de se ter uma dieta variada, o que promove a comercialização de produtos alimentares com mais segurança e qualidade sanitária (Sena et al, 2008).

Os alimentos são um importante veículo de transmissão de muitos agentes patogénicos e compostos químicos tóxicos, que podem ser introduzidos em qualquer etapa da cadeia alimentar, sendo assim imprescindível a inspeção e a implementação de medidas preventivas para assegurar a qualidade e segurança alimentar (Direção Geral de Saúde, 2004).

Esta preocupação é refletida nas ações das autoridades sanitárias a nível mundial incidindo na avaliação de perigos tais como: contaminações em alimentos por via de poluentes químicos ambientais; radioatividade em produtos hortofrutícolas, caça e pesca; agentes infecciosos e parasitários; uso de antibióticos em animais, plantas e organismos geneticamente modificados. Algumas destas contaminações devem-se à necessidade de produção de um volume cada vez mais elevado de alimentos de origem animal: carnes, leite, ovos, peixes, moluscos e mariscos (DGAV, 2009).

Uma das fontes de proteína mais acessível aos consumidores é a carne de aves, visto que é bastante rica em proteína de elevada qualidade, aminoácidos essenciais, vitaminas e sais minerais, sendo consumida por todo o mundo em grandes quantidades. Além disso, é um alimento economicamente acessível por parte da população; por exemplo, em Portugal a carne de frango é a de menor custo (Simões, 2010).

Na indústria avícola são frequentemente usados antibióticos para prevenir e tratar doenças. A administração de antibióticos a animais destinados ao consumo humano requer uma avaliação rigorosa sobre os possíveis impactos na saúde humana e animal, devido à presença de resíduos de antibióticos em tecidos edíveis e emergência de estirpes bacterianas resistentes em animais destinados ao consumo humano. O uso indiscriminado de antibióticos nestes animais pode levar ao aumento da emergência de resistências bacterianas e conseqüente risco de perda de eficácia destes medicamentos na medicina humana (Silva et al, 2009)

I.2. Consumo de aves em Portugal

O consumo de aves em Portugal é um mercado que se encontra em crescimento. Por exemplo, de 2008 para 2009 o consumo de carne de aves e ovos aumentou cerca de 2%, enquanto as carnes de ovelha, porco, cabra e bovino tiveram quebras no seu consumo (OMAIAA, 2010).

Portugal apresenta o maior consumo de carne de aves na União Europeia (UE), em particular carne de frango, correspondendo a cerca de 29% do consumo de carne em Portugal. O consumo de carnes brancas pelos portugueses teve um aumento de 10 Kg/habitante/ano, sendo Portugal, depois da Irlanda, o país da UE que mais consome carne de aves: uma média de 30 Kg por habitante/ano (Cânoa, 2008).

A figura 1 mostra a evolução da produção de carne de aves em Portugal entre 2008 e 2010. É possível observar que a quantidade de carne de frango produzida em Portugal se destaca claramente da produção de peru e pato. Segundo o Instituto Nacional de Estatística (INE), a produção de carne de aves aumentou de 2008 para 2010. O volume de produção de aves de capoeira teve um aumento de 1,5% quando comparado com o ano anterior, com 339 mil toneladas de aves produzidas. O frango de capoeira, que representa 75% das aves de capoeira, apresentou um volume de produção de 253 mil toneladas, o que representa um aumento de 0,6% em relação ao volume de frangos produzidos no ano anterior (INE, 2010).

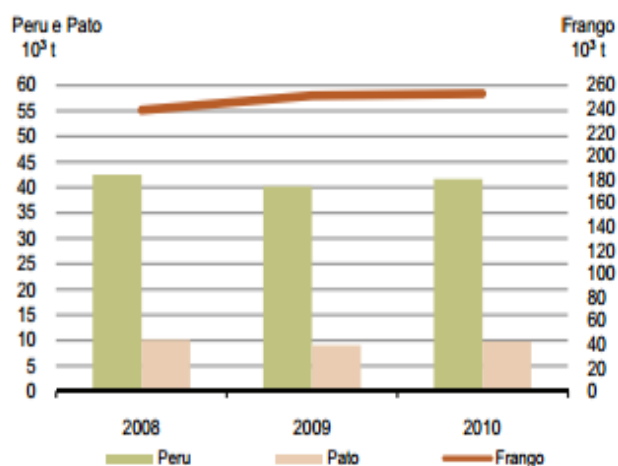


Figura 1 - Evolução da produção de carne de aves em Portugal. Adaptada INE (2010)

Existe um consenso entre médicos e nutricionistas de que a carne de aves é mais saudável do que as carnes vermelhas por conter uma menor quantidade de gorduras

saturadas, sendo estas muitas vezes apontadas como responsáveis por algumas doenças cardiovasculares. É um alimento rico em nutrientes e saudável, por exemplo, 100 g de peito de frango sem pele contêm 110 kcal e 23 g de proteína. É também rica em minerais, vitaminas, ferro e lípidos (Dalke, 2006). Além do fator saudável, existe também o fator económico que pesa bastante na escolha deste tipo de alimento. A carne de frango é mais barata quando comparada às restantes escolhas (Caleiro, 2009). Devido às características nutricionais é uma excelente escolha para grupos populacionais como crianças, idosos, grávidas e doentes (Caleiro, 2009).

A carne de aves não está sujeita a qualquer tipo de tabu religioso pelo que pode ser consumida por todos (Sena et al, 2008).

Em Portugal, o consumo de carne de aves já faz parte dos hábitos alimentares dos portugueses, sendo que tem vindo a aumentar ao longo dos anos (Sena et al, 2008).

I.3. Perspetiva histórica

I.3.1. Fluoroquinolonas

O desenvolvimento de antibióticos começou com a descoberta da penicilina por Alexandre Fleming em 1928. Fleming observou que as bactérias não se desenvolviam perto de fungos da família *Penicillium*, nascendo assim o primeiro antibiótico da história (Biomedical, 2003; Davies et al, 2010).

A introdução de antibióticos na medicina humana e veterinária foi um passo importante na medicina do século XX. Os primeiros antibióticos foram introduzidos nos anos 30 e um elevado número de novos compostos foi descoberto nas décadas seguintes (EMEA, 2007).

O uso de quinolonas foi iniciado em 1962 quando o ácido nalidíxico foi descoberto durante a produção de um fármaco contra a malária, sendo descrito por Lesher e Cols (Machado et al, 2009).

De uma forma geral, as quinolonas podem classificar-se em quatro gerações: a primeira geração compreende as quinolonas originais como o ácido nalidíxico (Figura 2), ácido oxolínico, ácido pipemídico e cinoxacina, entre outras. Estas quinolonas são caracterizadas por uma baixa biodisponibilidade oral, uma distribuição limitada nos tecidos e um limitado espectro de ação, restringindo-se a *Escherichia coli* e alguns organismos gram-negativos (Carrillo, 2008).

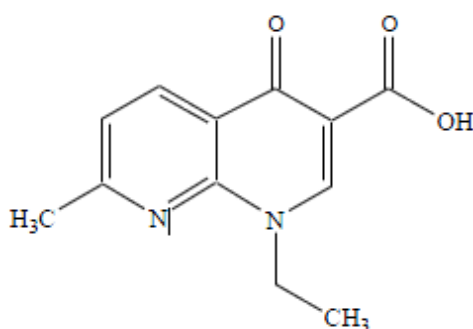


Figura 2 – Estrutura do ácido nalidíxico

A segunda geração de quinolonas apresenta um aumento da atividade antibacteriana contra *Enterobacteriaceae* e bactérias gram-negativas e gram-positivas (Carrillo, 2008). As fluoroquinolonas (FQs) derivam das quinolonas de 1ª geração como, por exemplo, o ácido nalidíxico, e devem o seu nome à adição de um átomo de flúor na posição 6 e do grupo

piperazil na posição 7, melhorando o seu espectro de ação, assim como a sua farmacocinética relativamente a compostos como o ácido nalidíxico (Centeno, 2010).

As mudanças estruturais existentes nesta segunda geração de quinolonas, em relação à primeira geração, permitem aumentar a sua biodisponibilidade oral e a distribuição sistêmica. Desta geração de quinolonas fazem parte FQs como a norfloxacin (NOR), ciprofloxacina (CIP), enrofloxacin (ENR), danofloxacin, difloxacina e marbofloxacina, entre outras (Carrillo, 2008; Herrera-Herrera et al, 2009).

Em 1980 surge a primeira FQ, a NOR (Figura 3), que foi também a primeira FQ a ser utilizada como antibiótico em medicina humana. A NOR possui um largo espectro de ação para a atividade antibacteriana, inclusive para bactérias gram-positivas, que era uma das limitações das quinolonas mais antigas. Apresenta boa distribuição nos tecidos e boa disponibilidade após administração. É utilizada em tratamentos de doenças respiratórias, biliares e infeções do trato urinário (Ovando et al, 2004).

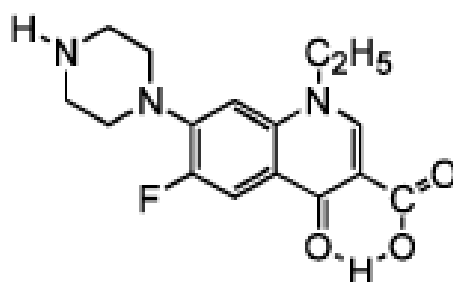


Figura 3 – Estrutura de Norfloxacin

A ENR (figura 4) foi introduzida no mercado em 1988, sendo das FQs mais utilizadas em medicina veterinária. É uma FQ com grande atividade antibacteriana e bactericida contra bactérias patogénicas encontradas em animais (Salehzadeh et al, 2007). Possui várias vantagens por conter um espectro de atividade que abrange a maioria dos gram-negativos e muitos gram-positivos (Almeida et al, 1994). É utilizada em medicina veterinária em cães, gatos, bovinos, suínos e aves (Salehzadeh et al, 2007) e possui uma boa capacidade de penetração em fluidos e tecidos.

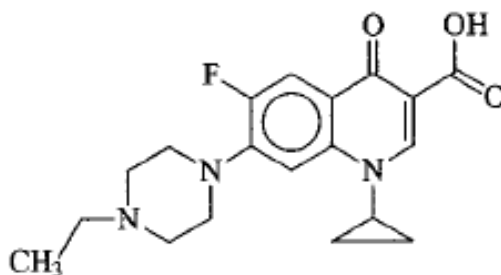


Figura 4 - Estrutura da Enrofloxacin

A CIP (figura 5) foi introduzida no mercado em 1987 (Ball, 2000) e é uma FQ amplamente utilizada em medicina humana, sendo que a sua utilização em animais é proibida. É um dos principais metabolitos da ENR e possui um amplo espectro de atividade antibacteriana. Tem boa biodisponibilidade após administração e boa distribuição nos tecidos. É considerado o antibiótico da classe das quinolonas mais utilizado em todo o mundo para o tratamento de infecções no Homem (El-Aziz et al, 1997; Ovando et al, 2004).

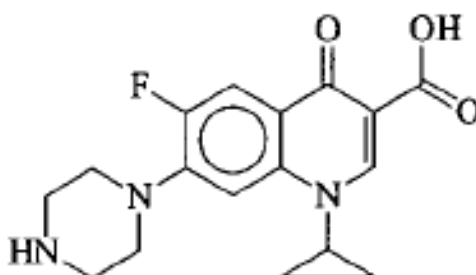


Figura 5 - Estrutura da Ciprofloxacin

Na terceira geração de quinolonas mantêm-se as características favoráveis da segunda geração, no entanto, evidenciam um aumento da atividade contra bactérias gram-positivas, anaeróbios e micobactérias. Estas quinolonas possuem uma excelente biodisponibilidade oral e um tempo de semivida prolongado, além de possuírem menor toxicidade sobre o sistema nervoso central. Neste grupo incluem-se quinolonas como levofloxacin, grepafloxacin e sparfloxacin, entre outras (Carrillo, 2008).

O grupo da quarta geração de quinolonas mantém o bom espectro de ação contra bactérias gram-negativas, gram-positivas e amplia a sua ação contra os anaeróbios. Neste grupo encontram-se a trovafloxacin, moxifloxacin e gatifloxacin, entre outras (Sharma et al, 2009).

A tabela 1 ilustra a classificação das quinolonas usadas em medicina humana por gerações, enquanto a tabela 2 ilustra a classificação das quinolonas permitidas na UE para uso veterinário.

Tabela 1 - Classificação de quinolonas usadas em medicina humana
(Ball, 2002; Anderson et al, 2003)

Quinolonas	1ª Geração		Ácido nalidíxico Ácido oxolínico Ácido pipemídico Ácido piromídico Cinoxacin Flumequina Roxacin
	Fluoroquinolonas	2ª Geração	Ciprofloxacina Enoxacin Fleroxacin Lomefloxacina Lomefloxacina Nadifloxacina Norfloxacina Ofloxacina Plefloxacina Rufloxacina
		3ª Geração	Balofloxacina Geprafloxacina Levofloxacina Pazufloxacina Sparfloxacina Temafloxacina Tosufloxacina
		4ª Geração	Alatrofloxacina Clinafloxacina Garenoxacin Gatifloxacina Gemifloxacina Moxifloxacina Prulifloxacina Sitafloxacina Trovafloxacina

Tabela 2 – Classificação de quinolonas de uso veterinário na UE (EMEA/CVMP/SAGAM), 2006)

Quinolonas	1ª Geração		Ácido oxolínico Flumequina
	Fluoroquinolonas	2ª Geração	Danofloxacina Difloxacina Enrofloxacina Ofloxacina

1.3.2. Utilização de antibióticos em Veterinária

Na UE a utilização de antibióticos como promotores de crescimento foi proibida por lei, numa primeira fase nos países escandinavos, como a Suécia em 1986, a Noruega em 1995 e a Dinamarca em 1998/1999. A 1 de Janeiro de 2006, a UE proíbe a utilização de antibióticos como promotores de crescimento na produção de animais em todos os estados membros. No entanto, a sua utilização continua a ser permitida nos Estados Unidos da América (Bengtsson, 2006).

Em sistemas de produção de pecuária com elevado número de animais confinados a espaços pequenos e pobres no que diz respeito às condições de higiene e segurança, a propagação de doenças infecciosas é mais favorecida, o que implica a utilização de antibióticos com mais frequência para o tratamento dos animais doentes (EMEA/CVMP/SAGAM, 2005).

A administração de antibióticos a animais pode ser feita de forma profilática, prevenindo a ocorrência de doença, quer em grupo quer individualmente, na forma de metafilático, prevenindo o aparecimento da doença em grupo e, por último, como terapêutico para tratar os animais doentes, em grupo ou de forma individual (Pfizer, 2007).

A utilização de antibióticos em medicina veterinária é estabelecida pela Agência Europeia do Medicamento (EMEA), disponibilizando listagens dos antibióticos que podem ser utilizados, assim como a sua forma de utilização (EMEA/CVMP/SAGAM, 2005).

I.4. Legislação

O Decreto-Lei n.º 151/2005 de 30 de Agosto é o diploma legal que apresenta e rege as normas de utilização e presença de antibióticos em carne destinada ao consumo humano, nomeadamente o fabrico, a venda e administração de antibióticos aos animais. Segundo este decreto de lei, todos os antibióticos administrados aos animais destinados ao consumo humano têm que ser prescritos por um médico veterinário. Este tipo de legislação incita a que os produtores tenham atenção ao Intervalo de Segurança (IS), ou seja, o tempo que decorre entre a administração do antibiótico e a data de abate do animal. É proibido o abate e a utilização de produtos provenientes de animais sujeitos a tratamento antes do final do IS. Cabe à Direção Regional de Agricultura (DRA), à Inspeção Geral das Atividades Económicas e à Direção Geral da Agricultura e Veterinária (DGAV) garantir o cumprimento da legislação.

O regulamento (UE) N.º 37/2010 da Comissão de 22 de Dezembro de 2009 estabelece limites máximos de resíduos (LMRs) de antibióticos nos alimentos de origem animal destinados ao consumo humano.

I.5. Mecanismo de ação

O mecanismo de ação das quinolonas é desencadeado pela inibição de duas enzimas necessárias para a replicação do ADN: a topoisomerase II (ADN girase) e a topoisomerase IV. As duas enzimas têm estruturas semelhantes, possuindo duas sub-unidades designadas por girase A (Gyr-A) e girase B (Gyr-B), tendo como consequência a inibição destas duas estruturas (Centeno, 2010).

A enzima topoisomerase II tem como função separar as duas cadeias de ADN, possibilitando desta forma a sua replicação. As quinolonas, ao ligarem-se aos pares da sub-unidade Gyr-A e ocupando o local que era destinado ao ADN, impedem a ligação deste.

A topoisomerase IV intervém depois de ocorrer a replicação, tendo em conta que as duas novas cadeias de ADN resultantes do processo de replicação estabelecem ligações entre si e é necessário serem removidas para que seja possível criar um novo cromossoma e integrá-lo na nova célula a ser formada. Quando o ADN apresenta carga positiva, a enzima topoisomerase IV ajuda no seu desenrolamento (Carrillo, 2008).

Quando se trata de bactérias gram-negativas, o principal mecanismo de inibição é o da inibição da topoisomerase II, enquanto nas bactérias gram-positivas é a inibição da topoisomerase IV o mecanismo principal (Song et al, 1999).

I.6. Avaliação de segurança dos resíduos (Limite Máximo de Resíduo)

A avaliação da segurança de resíduos baseia-se na Ingestão Diária Aceitável (ADI), na qual os LMRs se baseiam conseqüentemente. A ADI é uma estimativa da quantidade de resíduo que pode ser ingerida diariamente ao longo da vida do consumidor, sem acarretar qualquer risco para a sua saúde. A ADI é calculada tendo em conta o valor de concentração mais elevado que não provoca efeitos adversos (NOEL) ou através da concentração mais baixa que provoca efeitos tóxicos, multiplicado pelo fator de segurança (FS). O FS pode ser variável, entre 10 a 100, consoante a toxicidade do composto e os dados disponíveis sobre esse mesmo composto (EMEA, 2001).

Para determinar a ADI, considera-se que o peso médio de um ser humano é de 60 Kg. Como os valores da ADI são expressos em $\mu\text{g}/\text{Kg}$ ou mg/Kg , é multiplicada por 60 para se obter a quantidade de resíduo aceitável diariamente (EMEA, 2001). Para o cálculo em carne estima-se que o consumo diário é de 500g, sendo que dentro destes 500g, 300 são de músculo, 100 de fígado, 50 de rim e 50 de gordura. Perante estas proporções, são estipulados os LMRs para os diferentes tipos de tecidos referidos (EMEA, 2005).

O LMR é a concentração máxima de resíduo aceite pela UE num produto alimentar de origem animal ao qual tenha sido administrado um medicamento veterinário (EMEA, 2013). Para cada tecido edível (fígado, rim, gordura, tecido muscular) é determinado um LMR através das concentrações de resíduo da mesma ordem de grandeza da ADI (EMEA, 2005).

Os LMRs são estabelecidos de forma a que o consumo máximo estabelecido teoricamente não exceda a ADI (EMEA, 2001).

No cálculo do LMR da ENR é feita a soma dos resíduos de CIP com os resíduos de ENR, visto que a CIP é um dos principais metabolitos da ENR (EMEA, 2002).

Segundo a EMEA, o LMR de ENR permitido em tecido muscular de aves (frangos e peru) é de $100 \mu\text{g}/\text{Kg}$; para a pele e gordura, o LMR também é de $100 \mu\text{g}/\text{Kg}$, sendo para o fígado de $200 \mu\text{g}/\text{Kg}$ e para o rim de $300 \mu\text{g}/\text{Kg}$ (EMEA, 2002). Não existe um LMR estabelecido para a CIP porque o seu uso é proibido em medicina veterinária. Relativamente

à NOR, não está estabelecido nenhum LMR, porque é um antibiótico de uso em medicina humana (EMEA, 2005).

I.6.1. Intervalo de Segurança

Não existe um intervalo de segurança estabelecido para a CIP, uma vez que não é autorizado o seu uso em medicina veterinária (EMEA, 2007).

Para a NOR também não existe nenhum IS estabelecido, no entanto, alguns estudos demonstraram que quando se administrava a um animal 18 mg/kg de NOR durante 5 dias consecutivos, era possível observar que os resíduos de NOR permaneciam até 6 dias no fígado e no rim, permanecendo no músculo 96 horas após a última administração. No plasma não foram encontrados resíduos de NOR 24 horas após a sua administração (Diaz et al, 2001).

No caso da ENR, a farmacêutica Bayer aconselha a que, quando administrada em frangos (carne e vísceras), o IS seja de 7 dias e no caso de perus (carne e vísceras) seja de 10 dias. Estudos realizados com a ENR, em que foram administradas doses de 10 mg/Kg a frangos durante 5 dias consecutivos, mostraram que não é possível detetar resíduos de ENR no cérebro, coração, baço, músculo do peito e da coxa ao final de 48 horas; no soro, pulmão e pele só não foram detetados resíduos ao fim de 72 horas. Para o fígado, rim e gordura foram necessárias 96 horas para não serem detetados resíduos (EL-Aziz et al, 1997).

I.7. Consumo de Fluoroquinolonas na União Europeia

É de extrema importância analisar o consumo de FQs em medicina veterinária em Portugal em relação aos restantes membros da UE, tendo em conta que o consumo de carne de frango tem vindo a aumentar ao longo dos anos, comparativamente com outro tipo de carne.

Através da observação da tabela 3, referente à comercialização de quinolonas e produção de carne em 2003, podemos concluir que Portugal apresenta um elevado consumo de quinolonas e FQs, quando comparado a outros estados membros com maior produção de carne.

Tabela 3 – Venda de quinolonas e produção de carne em alguns países da UE. Adaptado de EMEA/CVMP/SAGAM/184651/2005 (2007).

País	Vendas de microbianos (toneladas)		Produção de carne (toneladas abatidas)			
	FQs	Todas as quinolonas	Vaca e veado	Porco	Frango	Produção
Dinamarca	0,1	0,1	147600	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
Reino Unido	1,4	1,4	687 000	690 000	1 569 987	2 946 987
Rep. Checa	0,8	1	103 775	409 102	215 802	728 679
Suécia	0,2 ^a	0,2	136 300	287 500	99 850	523 650

^a Inclui cães e gatos

^b Apenas frangos

Analisando mais detalhadamente estes dados, Portugal apresenta um consumo de 3 toneladas de FQs, embora não sejam discriminadas nos dados as espécies alvo destas FQs. Portugal comercializa no total 3,8 toneladas de quinolonas, sendo que uma grande parte destas (3 toneladas) são FQs para um volume de 663 000 toneladas de carne produzidas.

Esta quantidade de quinolonas utilizada é claramente elevada quando comparada, por exemplo, com o Reino Unido, onde são comercializadas 1,4 toneladas de FQs para um volume total de produção de 2 946 987 toneladas de carne. O mesmo acontece na Dinamarca, onde o volume de comercialização de quinolonas é de 0,1 toneladas e a produção total é de 2 109 594 toneladas de carne. Perante a análise destes dados é possível concluir que as FQs são utilizadas de forma excessiva em Portugal.

Estes dados vão ao encontro dos valores publicados no relatório da EFSA, referente ao ano de 2011, onde Portugal se evidencia como um dos países com maior incidência de casos de *Salmonella* com resistência à CIP, apresentando uma taxa de resistência de 90,2%. Este valor, demasiado elevado, está de acordo com os níveis de consumo de FQs em Portugal, justificando desta forma o elevado número de incidências de resistências (EFSA, 2013).

Lamentavelmente, os dados mais recentes do consumo de quinolonas em Portugal são referentes ao ano de 2003, não existindo dados mais recentes que ilustrem o consumo atual de quinolonas no nosso país.

A Dinamarca apresenta um volume de consumo de quinolonas mais baixo que os restantes países mencionados porque existe um controlo rigoroso das quantidades de antibióticos administrados aos animais doentes. Este controlo rigoroso não é feito por obrigatoriedade de cumprir algum tipo de legislação, mas sim por iniciativa própria das indústrias avícolas existentes na Dinamarca. Desta forma, as indústrias conquistam a confiança dos consumidores, uma vez que se colocam tantas questões relativas ao uso de antibióticos na produção animal e aos efeitos dessa mesma utilização que se repercutem na saúde dos consumidores (WHO, 2003).

Tendo em conta que as FQs são eficazes no tratamento de infeções nos animais, alguns casos chegam mesmo a ter poucas alternativas terapêuticas, devido ao facto de algumas bactérias terem adquirido resistência a antibióticos, que anteriormente possuíam sensibilidade perante estes. É de extrema importância salvaguardar o efeito terapêutico que estas FQs possuem durante o maior período de tempo possível. É ainda importante que se faça cumprir a legislação imposta, vigiando o cumprimento dessa mesma legislação e punindo legalmente o seu incumprimento (EMEA/CVMP/SAGAM/184651/2005, 2007).

I.8. Toxicidade provocada pela utilização de Fluoroquinolonas

Uma vez que a EMEA refere que as concentrações de FQs existentes na carne destinadas ao consumo humano não apresentam qualquer tipo de risco de toxicidade aguda (EMEA/CVMP/SAGAM/184651/2005, 2007), importa falar da toxicidade crónica resultante do uso de FQs em carne.

I.8.1. Toxicidade crónica - Emergência de resistências bacterianas

O uso de antibióticos em animais destinados à alimentação humana é a principal causa da emergência de casos de resistência bacteriana aos antibióticos (EFSA, 2013).

O uso de antibióticos pode levar ao aparecimento de estirpes bacterianas que se tornam resistentes aos mesmos e mesmo quando se usa um antibiótico de forma adequada, a sua exposição pode desencadear um mecanismo de resistência bacteriana (Silva et al, 2009).

Os primeiros casos de resistência bacteriana relatados foram identificados no final de 1980 (Lehtopolku, 2011). O problema da resistência bacteriana conduz a graves implicações clínicas, uma vez que diminui a eficácia do ou dos antibióticos à qual a estirpe se tornou resistente (Allix, 2010).

As chamadas zoonoses são infeções e doenças transmissíveis entre animais e seres humanos. Este tipo de infeção pode ser adquirido através do contacto com um animal doente ou através da ingestão de produtos alimentares provenientes desse animal. Este problema acarreta consequências para a saúde dos consumidores que podem ir desde sintomas leves a perigo de vida. O problema das bactérias zoonóticas é tornarem-se resistentes aos antibióticos e poderem comprometer o tratamento de infeções por elas provocadas em seres humanos (EFSA, 2013).

A maior preocupação relativamente ao uso de FQs na produção de animais, em particular o uso da ENR e CIP (metabolito da ENR), prende-se com a emergência de estirpes bacterianas resistentes no trato gastrointestinal. Uma utilização de forma excessiva nos animais leva a que as bactérias do trato gastrointestinal estejam em contacto permanente com o antibiótico, aumentando desta forma a possibilidade de emergirem resistências bacterianas para este grupo de antibióticos, sendo formado um reservatório de estirpes de bactérias resistentes às FQs. Muitas vezes estas estirpes de bactérias adquirem resistência a todas as FQs, não se restringindo apenas às que são administradas (resistência

cruzada) (FAO/WHO/OIE, 2007). Importa salientar que o risco não passa apenas pelas bactérias patogénicas adquirirem resistência, mas sim pelo risco de as bactérias que não são patogénicas para o Homem (comuns no trato gastrointestinal) transferirem a resistência a bactérias patogénicas (Harbottle et al, 2006).

O uso de FQs em aves e o desenvolvimento de resistência são motivo de preocupação por diversas razões. Em primeiro, porque as galinhas e frangos são reservatórios naturais para muitos microrganismos patogénicos, como é o caso da *Campylobacter* e da *Salmonella*. Estima-se que a contaminação das carcaças de aves na linha de processamento ronde os 20% para contaminações por *Salmonella* e os 80% para contaminações por *Campylobacter* (FDA-CVM, 2000).

Investigações epidemiológicas demonstraram que a *Campylobacter* é a causa mais conhecida de doença bacteriana nos Estados Unidos da América e que o consumo de frango é a fonte mais comum de infeção. Durante a manipulação, o abate e o processamento da carne de aves, pode ocorrer uma contaminação bacteriana da carcaça que pode resultar numa exposição humana durante a preparação e consumo dos produtos alimentares contaminados (FDA-CVM, 2000).

De acordo com a diretiva 2003/99/CE, relativa à vigilância de zoonoses e agentes zoonóticos, todos os países da UE são obrigados a monitorizar e comunicar casos de resistência microbiana em *Salmonella* e *Campylobacter* (EFSA, 2013).

1.8.1.1. *Salmonella*

Em 1997 a Organização Mundial de Saúde (OMS) concluiu existirem provas de que o uso de antibióticos em animais selecionava serotipos de *Salmonella* não tifoide que apresentavam resistência aos antibióticos. Essas bactérias foram posteriormente transmitidas aos seres humanos através do contacto direto com os animais ou através da alimentação (Guardabassi, 2010). As FQs constituem um importante grupo de antibióticos na medicina humana e o aumento da resistência por parte de bactérias como a *Salmonella* constitui uma preocupação crescente a nível da saúde pública, devido à diminuição da eficácia no tratamento de infeções em medicina humana (Centeno, 2010; Haese, 2004).

Estudos revelaram que na UE a resistência de *Salmonella* a partir de casos de salmoneloses em humanos foi bastante elevada (WHO, 2008).

Praticamente todas as aves possuem no seu intestino *Salmonella*, podendo ser portadores assintomáticos. Esta é transmitida normalmente aos seres humanos através da

ingestão de alimentos, como é o caso dos ovos, leite e carne de aves. Outros alimentos podem ser contaminados por contaminação cruzada, no caso de serem preparados na mesma bancada e com os mesmos utensílios usados em alimentos contaminados, por exemplo legumes, ou ainda no caso de as mãos não serem lavadas entre a manipulação de carne crua e saladas (WHO, 2008).

Este tipo de infeção, tanto no homem como nos animais, tem vindo a ser reconhecido como um problema de saúde pública. Mais de 90% das infeções provocadas por *Salmonella* não tifoide são adquiridas através de infeções hospitalares, animais (aves), pessoas contaminadas, água contaminada, alimentos e fezes de aves (Fasure et al, 2011).

A salmonelose em humanos manifesta-se através do aparecimento de febre, dor abdominal, náuseas e vómitos. A maior parte destas infeções provocadas por *Salmonella* podem surgir num grau leve, sob a forma de doença gastrointestinal e não necessitam de tratamento antimicrobiano. No entanto, algumas podem-se apresentar num grau mais grave com desidratação associada (EFSA, 2013).

A CIP é usada no tratamento das salmoneloses e, como tal, a resistência da *S. enterica* à CIP acaba por se tornar num problema grave de saúde pública (Randall et al, 2006). A resistência da *Salmonella* face a este tipo de tratamento resulta na falha do mesmo (EFSA, 2013).

Em alimentos de origem animal, nomeadamente perus, galinhas e frangos, foram observados casos de resistência à CIP variável entre 1,8% e 90,2%. A resistência à CIP foi mais frequente para casos de *S. enteritidis* e *S. typhimurium* (EFSA, 2013).

Quando se compara a carne de peru, galinha e frango, é possível concluir que a maior incidência de casos de *Salmonella* é em frangos, sendo que é na carne de frango que se encontram mais casos de resistência à CIP (EFSA, 2013).

A tabela 4 mostra que Portugal se encontra em primeiro lugar na tabela dos países com maior incidência de resistência de *S. enteritidis* face à CIP. Para 41 casos registados de incidência de resistência bacteriana para a espécie *Gallus gallus*, foi registada uma taxa de resistência de 90,2%, o que é de facto bastante alarmante. Um valor próximo de Portugal só se encontra em Espanha que, para o mesmo caso, apresenta uma taxa de resistência de 65,7%. Todos os restantes países identificados nesta tabela apresentam valores significativamente mais baixos quando comparados a Portugal e Espanha.

Tabela 4 – Resistência (%) face à ciprofloxacina em *S. enteritidis* em carne de galinha e frango. Adaptado de EFSA (2013)

País	Resistência à ciprofloxacina (≥ 4 mg/L)					
	Humanos		<i>Gallus gallus</i>		Frangos	
	N	%Res.	N	%Res.	N	%Res.
Alemanha	191	0	133	0	16	25,0
Áustria	1,266	0,1	53	5,7	—	—
Bélgica	—	—	—	—	57	1,8
Dinamarca	288	23,6	—	—	—	—
Eslováquia	172	1,7	18	0	—	—
Eslovénia	210	0	—	—	—	—
Espanha	613	0,2	67	65,7	—	—
Estónia	217	1,4	—	—	—	—
França	—	—	41	2,4	—	—
Grécia	111	0	17	11,8	—	—
Holanda	317	9,1	31	6,5	—	—
Hungria	20	0	32	9,4	—	—
Irlanda	58	0	—	—	—	—
Itália	148	15,5	16	6,3	—	—
Letónia	97	0	—	—	19	15,8
Lituânia	1,464	0,6	—	—	—	—
Luxemburgo	30	3,3	—	—	—	—
Malta	47	6,4	—	—	—	—
Polónia	—	—	274	47,4	—	—
Portugal	—	—	41	90,2	—	—
Reino Unido	2,596	33,7	—	—	—	—
Roménia	120	0	—	—	—	—
Total	7,965	12,8	723	30,8	92	8,7

1.8.1.2. *Campylobacter*

A *Campylobacter* é um agente patogénico que muitas vezes é transmitido ao ser humano através da ingestão de produtos alimentares contaminados: carne, leite cru e alguns produtos lácteos; pode ainda infetar peixe e produtos derivados, mexilhões e legumes frescos, embora esta contaminação aconteça com menor frequência. Existem outras formas de contaminação, como é o caso do contacto com aves vivas, ingestão de água a partir de fontes de água não tratada, contacto com animais de estimação e outros animais que possam ser identificados como fontes de possível infeção (EFSA, 2013).

Os frangos são frequentemente colonizados com *Campylobacter* às duas semanas de vida, quando expostos a outros animais, como outros frangos, aves selvagens, roedores, insetos e águas contaminadas, excretando grandes quantidades de *Campylobacter* através das fezes. Pode ainda haver infeção durante o transporte de aves e no abate quando não existem condições de higiene adequadas (FDA, 2005).

As manifestações clínicas mais frequentes deste agente passam pela diarreia e enterite. Em alguns casos mais graves, pode mesmo chegar a provocar sequelas neuropatológicas, como é o caso da síndrome de Guillian-Barré. Nos Estados Unidos da América a *Campylobacter* é considerada o agente mais comum de diarreia bacteriana, com mais de um milhão de pessoas a serem infetadas por ano. A campilobacteriose é geralmente limitante, não apresentando sintomas com duração superior a 10 dias, no entanto, pode ser letal em populações que se encontrem mais vulneráveis.

O tratamento que tem vindo a ser prescrito para casos de campilobacteriose passa pelo uso de FQs. No entanto, um aumento da prevalência de resistência por parte da *Campylobacter* a estas demonstrou que o seu uso na produção avícola limita a eficácia clínica (Price et al, 2005). O aumento da emergência da resistência bacteriana ocorreu após as FQs terem sido permitidas para o uso em aves de capoeira. Foram realizados estudos com o objetivo de avaliar se a ingestão de aves de capoeira contribuía para o aumento da resistência de *Campylobacter* resistentes às FQs. Os resultados dos estudos foram conclusivos quanto ao facto de o consumo de produtos avícolas estar intrinsecamente ligado ao aparecimento de emergência de resistências bacterianas (Kassenborg et al, 2004; Price et al, 2005). A emergência de resistências bacterianas da *Campylobacter* face a estas é generalizada por todo o mundo, por exemplo, na Tailândia e na Índia foram identificados 80% e 77%, respetivamente, de resistência face à CIP. Os Emirados Árabes Unidos e a África do Sul também apresentam elevadas taxas de resistência bacteriana, 85,4% e 91%,

respetivamente, face à CIP. Na China as taxas de resistência foram ainda mais elevadas, sendo que o valor de resistência para a CIP chegou a rondar os 95,8-99% (Lehtopolku, 2011).

Na UE foram detetados elevados níveis de *Campylobacter* resistentes à ampiciclina, CIP, ácido nalidíxico e tetraciclina em humanos. Dados relativos a alguns países, como a Espanha, Hungria, Lituânia e Itália, chegaram mesmo a demonstrar que a resistência a estes antibióticos atingia níveis elevados ou até muito elevados. Em Espanha o nível de resistência de *Campylobacter* face à CIP é de 78,4% e para o ácido nalidíxico é de 89,5%. (EFSA, 2013).

A EFSA conclui que nos últimos cinco anos a emergência de resistências de *Campylobacter* em aves da espécie *Gallus gallus* face à CIP tem aumentado consideravelmente em países com a Áustria, França e Espanha. Em 2011 o maior número de casos relatados de estirpes de *Campylobacter* resistentes na UE foram para a CIP; em Espanha os valores de resistências face à CIP foram de 84,6%, seguindo-se a Lituânia com 81,2% (EFSA, 2013).

I.9. Metodologias analíticas para determinação de FQs

A presença de antibióticos na carne destinada ao consumo humano é controlada pelas entidades oficiais de fiscalização e serviços analíticos, na sequência da decisão 2002/657/CE da UE. Cada estado membro necessita de ter um programa de controlo de resíduos de antibióticos. Para esta monitorização é necessário desenvolver metodologias analíticas que incluem critérios para identificação e confirmação dos antibióticos. Tendo em conta que a concentração de resíduos de antibióticos presentes nos alimentos é muito baixa, são necessários métodos de deteção sensíveis e específicos. Os métodos de monitorização de resíduos encontram-se divididos em dois grupos: os métodos de *screening* e os métodos de confirmação (Toldrá et al, 2006).

Os métodos de *screening* são metodologias simples, rápidas, pouco dispendiosas e sensíveis, por forma a não se obter resultados falsos negativos. Estes métodos devem apresentar um resultado fidedigno sobre a presença ou ausência do antibiótico em estudo nas amostras para valores de concentração ao nível dos LMRs, possibilitando desta forma a identificação de amostras que se encontram ilegais. São exemplos de métodos de *screening* os métodos microbiológicos e imunoquímicos (Companyó, 2009).

A metodologia de confirmação deve permitir a identificação dos antibióticos em estudo e a sua quantificação exata para valores de concentração ao nível dos LMRs (MacNeil e Ellis, 1995).

Numa fase inicial da análise de antibióticos é muito importante a fase de preparação da amostra, especialmente quando se trata de alimentos sólidos, como é o caso da maior parte dos produtos alimentares de origem animal (Toldrá et al, 2006).

I.9.1. Métodos Microbiológicos

Para a deteção de resíduos de antibióticos em alimentos destinados ao consumo humano existem testes microbiológicos que se baseiam na inibição do crescimento microbiano, permitindo a deteção de antibióticos em apenas um ensaio. (Souza, 2012).

Estes tipos de métodos são bastante sensíveis, rápidos e permitem analisar um grande número de amostras. A técnica microbiológica mais utilizada é a técnica das quatro placas, sendo que também é a mais utilizada na UE. Resultados obtidos na UE demonstram

que apenas 1% das amostras analisadas com a técnica das quatro placas apresenta resultados positivos (Woodward e Shearer, 1995).

No entanto, estudos realizados comprovaram que para muitos resíduos estes testes não eram suficientemente sensíveis, tendo em conta que os limites de deteção eram superiores aos LMRs, como acontece no caso da sarafloxacina (Pikkemaat, 2009; Aerts et al, 1995).

Estas técnicas não permitem a distinção entre compostos relacionados ou combinações de antibióticos, pois são técnicas que não apresentam especificidade, exigindo sempre uma análise e interpretação cuidada dos resultados obtidos (Campanyó et al, 2009).

1.9.2. Métodos imunológicos

Estes testes são frequentemente utilizados como métodos de *screening*, devido à sua elevada sensibilidade e limites de deteção inferiores aos LMRs. Apresentam simplicidade de execução, são rápidos e permitem a análise de um grande número de amostras. Têm por base a reação antígeno-anticorpo, tendo em conta que este tipo de interação é muito específico e bastante útil para a deteção de resíduos veterinários e químicos nos produtos de origem animal. Uma técnica bastante usual é o método de Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA); neste caso o sistema de deteção é baseado num reagente marcado com uma enzima. O composto a analisar é colocado em contacto com os anticorpos e é adicionada uma quantidade pré-definida do mesmo composto marcado por um radioisótopo, por uma enzima ou um marcador fluorescente. O antibiótico em análise terá de competir na reação entre o anticorpo e o composto marcado, para se poder ligar aos recetores específicos do anticorpo (Toldrá et al, 2006).

As vantagens da utilização de métodos imunológicos prendem-se com a sua apresentação na forma de *kit*, permitindo analisar um grande número de amostras por cada *kit*, rapidez de utilização e elevada especificidade e sensibilidade em comparação com a deteção convencional de outros métodos. Apesar de serem mais práticos do que os métodos microbiológicos, podem apresentar reações cruzadas e são mais dispendiosos, encarecendo desta forma a pesquisa (Aerts et al, 1995; Toldrá et al, 2006).

Estes testes são geralmente qualitativos, uma vez que são concebidos para indicar se um resultado é positivo ou negativo, ou seja, a presença ou ausência de antibióticos. Este tipo de teste não identifica em específico o resíduo de antibiótico, não identificando se o

resíduo de medicamento se encontra ou não acima do LMR permitido. Quando comparados aos testes de confirmação, estes são mais rápidos, fáceis de utilizar e relativamente mais baratos (Dairy Food Safety, 2005).

1.9.3. Métodos de Confirmação

Na literatura científica encontram-se descritas várias metodologias analíticas para a determinação de FQs em alimentos. Com o desenvolvimento verificado nos últimos anos a Cromatografia Líquida de Alta Pressão (HPLC) acoplada a um detetor é o método instrumental mais utilizado (Zhao et al, 2007).

A maior parte das metodologias analíticas descritas na literatura científica referem a utilização de um detetor de fluorescência para a deteção de FQs, devido à sua fluorescência nativa. A deteção por fluorimetria (FD) apresenta várias vantagens, nomeadamente maior sensibilidade e seletividade, tendo em conta que poucos compostos naturais apresentam fluorescência, reduzindo ou eliminando interferências presentes nas amostras de alimentos (Huang, 1997; Ovando et al, 2004; Shim et al, 2003; Zhao et al, 2007). No entanto, atualmente é necessário efetuar a confirmação por espectrometria de massa (Herme et al, 2005; Hoof et al, 2004).

Na análise das FQs encontram-se descritas várias fases móveis. Existe alguma diversidade de combinações de reagentes utilizados, sendo que a maior parte das fases móveis utilizadas são constituídas por água, metanol e acetonitrilo. Todos os trabalhos descritos utilizam uma mistura dos três em conjunto ou nas mesmas proporções (Garcia et. al, 2005; Herme et. al, 2006; Ovando et al, 2000; Kowalski et. al, 2005; Stoilova et al, 2010). Existem também trabalhos onde são utilizados como constituintes da fase móvel ácido fórmico e acetonitrilo (Zhao et al, 2007), ácido acético e hidróxido de amónio (Schneider, 2001), ácido fosfórico, metanol e trietilamina (Shim et al, 2003).

Vários autores descrevem o tamponamento das fases móveis a pH 3 para que as FQs permaneçam na sua forma catiónica (Zhao et al, 2007).

1.9.3.1. Extração e purificação da amostra

As amostras adquiridas para análise devem ser conservadas a uma temperatura de -18°C até serem analisadas, não devendo ser excedido um período de três meses (Kowalski et al, 2005).

A extração da amostra serve para se obter uma substância de interesse que seja representativa do alimento em estudo. É importante que no processo de extração não ocorram perdas da substância em estudo nem alteração da sua estrutura (Shim et al, 2003).

Para realizar a extração, a amostra é geralmente triturada, no entanto, como a trituração da amostra pode gerar calor e destruir algumas propriedades de interesse, esta deve ser feita com a amostra parcialmente congelada. A homogeneização da amostra é realizada com o objetivo de fragmentar as células, de modo a permitir toda a extração do conteúdo tecidual. É realizada com recurso a um vortex, ultra-turrax, moinho ou um equipamento de ultrassonificação (Kowalski et al, 2005; Yorke et al, 2000; Stoilova, 2010).

A maioria dos métodos de extração é baseada em extrações com recurso a solventes, solventes orgânicos ou uma mistura de solventes orgânicos e aquosos. A extração das FQs, em amostras biológicas deve ter em conta a ionização de dois grupos funcionais, o grupo carboxilo (ácido) e o grupo piperazinil (básico); estes dois grupos estão envolvidos em interações de pH entre FQs e matrizes biológicas e interferem na eficiência da extração (Shim et al, 2003).

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

Encontram-se descritos na literatura científica vários métodos de extração que incluem técnicas de extração/purificação da amostra usando a extração/desproteínização com recurso a ácidos ou solventes orgânicos, ultracentrifugação, extração com a utilização de tampões e partição líquido-líquido (Schneider, 2001; Stoilova et al, 2010; Zhao et al, 2007).

I.9.3.2. Extração em fase sólida

A extração em fase sólida (SPE) apresenta algumas vantagens, tais como a rapidez de execução, melhor reprodutibilidade, simplicidade de manuseamento e obtenção de extratos mais limpos. É passível de ser automatizada, o que pode minimizar a utilização de solventes (Sigma-Aldrich, 1998).

O procedimento geral engloba os processos de acondicionamento, passagem da amostra, lavagem e eluição, utilizando diversos solventes.

Após uma revisão da literatura científica, é possível constatar que são utilizados vários tipos de adsorventes em SPE. Na tabela 5 são apresentados alguns tipos de colunas de SPE utilizadas na determinação de FQs.

Tabela 5 – Resultados obtidos num estudo comparativo de 3 colunas de SPE. Adaptado de Bailac et al (2004)

Quinolonas	LMR ($\mu\text{g}/\text{Kg}$)	Oasis HLB		Oasis Max		SDB-RPS	
		LOD ($\mu\text{g}/\text{Kg}$)	R (%)	LOD ($\mu\text{g}/\text{Kg}$)	R (%)	LOD ($\mu\text{g}/\text{Kg}$)	R (%)
Á. oxolínico	100	10	80	10	87	5	86
CIP	100 ¹	5	87	10	23	5	70
Danofloxacina	200	10	61	10	68	10	66
Difloxacina	300	10	81	10	79	10	87
ENR	100 ¹	5	84	5	84	5	91
Flumequina	400	10	85	5	96	10	83
Sarafloxacina	---	5	80	5	78	5	87

LOD – Limite de deteção

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

¹ – LMR para a soma da ENR com CIP (100 $\mu\text{g}/\text{Kg}$)

Após a análise da tabela 5, é possível concluir que a purificação realizada através das colunas Oasis HLB é a que apresenta limites de deteção mais baixos e percentagens de recuperação mais elevadas, na ordem dos 87% para a CIP e 84% para a ENR. Quando comparadas as colunas Oasis Max e SDB-RPS às colunas Oasis HLB, estas apresentam percentagens de recuperação para a CIP na ordem dos 23% e 70%, respetivamente, enquanto para a ENR apresentam percentagens de recuperação na ordem dos 84% e 91%, respetivamente.

As colunas Oasis HLB são compostas por um copolímero, com equilíbrio hidrofílico-lipofílico de fase reversa, sendo únicas nas suas características de estabilidade e retenção dos analitos e reprodutibilidade dos resultados (Waters, 2013).

Samanidou também realizou um estudo para averiguar quais as colunas mais adequadas para a determinação e quantificação de FQs, em que englobou três tipos de colunas: DSC-18 (500mg/ml), Nexus (30 mg/1ml) e Oasis HLB (200 mg/3mL). Este estudo indicou que se obtinham melhores resultados quando se usavam as colunas Oasis HLB, estando de acordo com os resultados da tabela 5 (Samanidou et al, 2005).

Parte experimental

II. Parte Experimental

Neste capítulo serão apresentados todos os materiais e métodos utilizados para a determinação de fluoroquinolonas em tecido muscular de frango e peru.

II.1. Materiais e metodologia

II.1.1. Reagentes e soluções

II.1.1.1. Reagentes

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

II.1.1.2. Soluções

- Solução de ácido sulfúrico 0,1684 M, preparada através da dissolução de 10 mL de ácido sulfúrico 90-91% num balão volumétrico de 1L, perfazendo com água destilada.
- Solução de ácido fosfórico 0,025 M, ajustada a pH 3 com recurso a hidróxido de tetrabutílamónio.
- Solução de ácido fosfórico 0,5 M, preparada através da dissolução 33,6 mL de solução de ácido fosfórico 1,4535 M num balão volumétrico de 1L, perfazendo o restante volume com água destilada.
- Soluções de CIP, ENR e NOR a 1mg/mL, preparadas através da dissolução de 10 mg do respetivo padrão num balão volumétrico de vidro âmbar de 10 mL

com cerca de 30 mL de ácido sulfúrico. Colocar a solução no ultrasons durante 15 minutos e no fim perfazer os 50 ml com ácido sulfúrico a 0,005M.

- Soluções padrão de CIP, ENR e NOR na mesma solução e na mesma proporção, ou seja, 0,0075 µg/mL, 0,0125 µg/mL, 0,025 µg/mL, 0,05 µg/mL, 0,1 µg/mL e 0,25 µg/mL para elaboração de curvas padrão e de fortificação, efetuadas através da dissolução das soluções padrão de 2,5 µg/mL em ácido sulfúrico 0,005 M.

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

II.1.2. Materiais

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

- Varetas de vidro

II.1.3. Equipamento

- Aparelho de ultrassonificação modelo Sonorex RK 100 (Berlim, Alemanha)
- Balança analítica Mettler Toledo modelo AG 285
- Centrífuga Sigma Modelo 3-16 K (St. Louis, E.U.A)
- Coluna de HPLC Chromolith® Performance RP-18e (10 - 4.6 mm) da Merck
- Colunas de extração de fase sólida Oasis HLB, 200 mg (6cc) (Damstadt, Alemanha)
- Detetor fluorimétrico Inteligente, Jasco FP-2020 Plus (Japão)
- Evaporador Labconco rapidvap vertex (Kansas)
- Sistema de cromatografia líquida de alta performance (HPLC) composto por uma bomba Gilson modelo 307 (Gilson Medical Electronics, Villiers-le-Bel, França), um injetor Rheodyne modelo 7125 (Cotati, Califórnia, E.U.A) com loop de 20 µL.
- Sistema de vácuo para extração em fase sólida
- Sistema de vácuo para filtração de fase móvel Buchi (Suíça)
- Vortex Retsch Mixer (Alemanha)

II.1.4. Amostragem

II.1.4.1. Recolha de amostras

A recolha de amostras foi realizada durante o período de Março a Maio de 2013, englobando as regiões do norte, centro e sul de Portugal continental.

Para os ensaios preliminares e validação da metodologia foram usados frangos caseiros cedidos por familiares; estes frangos foram usados como brancos, pois tínhamos informação de que não tinham sido usados antibióticos nestes animais e a sua alimentação tinha sido feita à base de vegetais e pouca ração, sendo que na semana que antecedeu o seu abate não tinham comido ração.

A recolha das amostras foi realizada em talhos e pequenas e grandes superfícies comerciais. As amostras foram adquiridas sob diferentes formas: no caso do

frango foram adquiridas sob a forma de “perna de frango”, “peito de frango”, “frango para canja”, “frango do campo” e “frango para churrasco”; no caso do peru, foram apenas adquiridos bifes de peru.

A tabela 6 indica o local e o número de amostras adquiridas.

Tabela 6 - Plano de amostragem.

Zona de recolha de amostras	Número de amostras de frango	Número de amostras de peru
Alcobaça	6	
Amiais de Baixo	4	
Anadia	4	
Budens	1	
Coimbra	12	1
Covilhã	6	
Entroncamento	4	1
Évora	5	1
Lisboa	5	1
Mação	2	
Macedo de Cavaleiros	2	
Mealhada	1	
Mirandela	2	1
Nelas	4	2
Odemira	3	
Palmela	5	1
Peniche	5	
Pernes	1	
Porto	5	
Sagres	3	1
Silves	6	1
Sines	2	1

A figura 6 ilustra uma visão geral da recolha de amostras por Portugal continental. As zonas assinaladas no mapa são zonas onde foram adquiridas amostras.

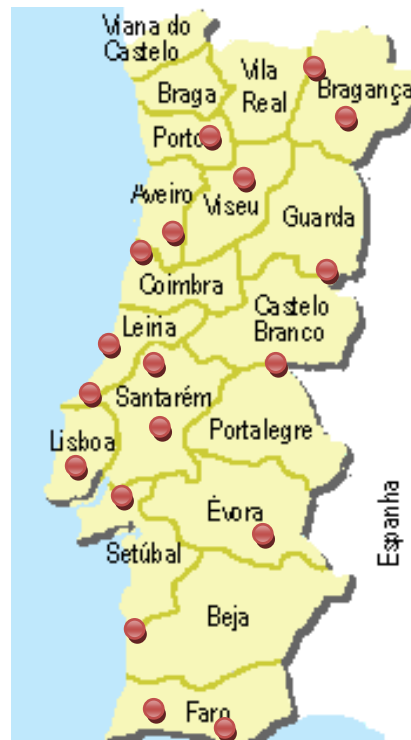


Figura 6 - Distribuição geográfica das zonas de recolha de amostras.

II.1.4.2. Preparação e conservação das amostras

Foi retirada uma porção de uma zona com músculo e isenta de gordura com cerca de 100g e colocada numa embalagem devidamente etiquetada com data e local da recolha e produtor. A embalagem com a amostra foi congelada a uma temperatura de -20°C para posteriormente serem realizadas as análises.

II.1.5. Metodologia analítica

Toda a metodologia usada na determinação de FQs (CIP, ENR e NOR) em tecido muscular de frango foi baseada na metodologia usada por Pena et al (2010), com algumas modificações.

II.1.5.1. Extração

O Procedimento usado na extração do tecido muscular de peito de frango foi o indicado de seguida:

- Pesagem de 1,000g de tecido muscular de carne de aves isento de pele e gordura;
- Colocação da amostra num tubo de centrifuga e adição de 7 mL de H_3PO_4 na concentração de 0,5 M;
- Agitação no vortex durante 1 minuto e posterior extração no equipamento de ultrasons durante 15 minutos;
- Repouso durante 10 minutos ao abrigo da luz;
- Centrifugação durante 10 minutos a 13000 g a 3°C;
- Separação do sobrenadante para um novo tubo de ensaio, seguindo-se uma nova extração da fase inferior, repetindo o processo de extração anteriormente indicado;
- Adição do segundo sobrenadante ao sobrenadante retirado anteriormente;
- Centrifugação do sobrenadante resultante das duas centrifugações anteriores.

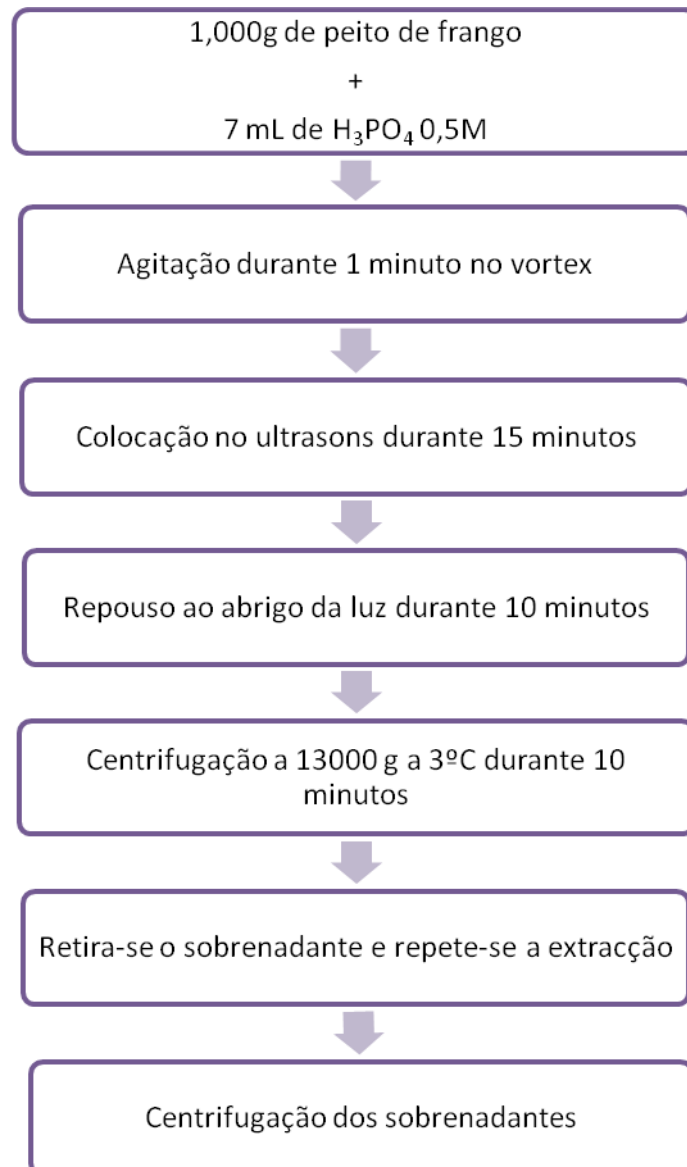


Figura 7 - Esquema resumo do procedimento de extração.

II.1.5.2. Purificação da amostra

Posteriormente ao processo de extração foi feita a passagem dos extratos da amostra através de uma coluna Oasis HLB, 200 mg (6cc), tendo sido anteriormente ativada.

Foi utilizado um sistema de vácuo, onde ocorre uma variação progressiva da pressão até que o extrato da amostra passe na sua totalidade. É importante que a passagem da amostra por estas colunas seja feita gota a gota para evitar que a passagem da amostra atinja um fluxo elevado, não ficando totalmente retida no enchimento da mesma.

O procedimento da purificação dos extratos é feito da seguinte forma:

- Ativação da coluna utilizando 2 mL de metanol seguidos de 2 mL de água;
- Colocação do sobrenadante retirado da centrifugação anterior na coluna;
- Passagem do extrato da amostra;
- Lavagem da coluna com 2 mL de água e secagem da coluna durante 15 minutos a 10 mm de Hg;
- Eluição do resíduo resultante da passagem do extrato com 2 mL de metanol;
- Recolha do extrato para um tubo de ensaio concentrado à secura de 45°C numa corrente suave de azoto;
- Dissolução do resíduo seco em 1 mL de H₂SO₄ 0,005 M e agitação da mistura no vortex durante 1 minuto;
- Dissolução da mistura no ultrassons durante 15 minutos para total dissolução;
- Filtração da solução num filtro de membrana de 0,45 µm antes de injeção no sistema de HPLC.

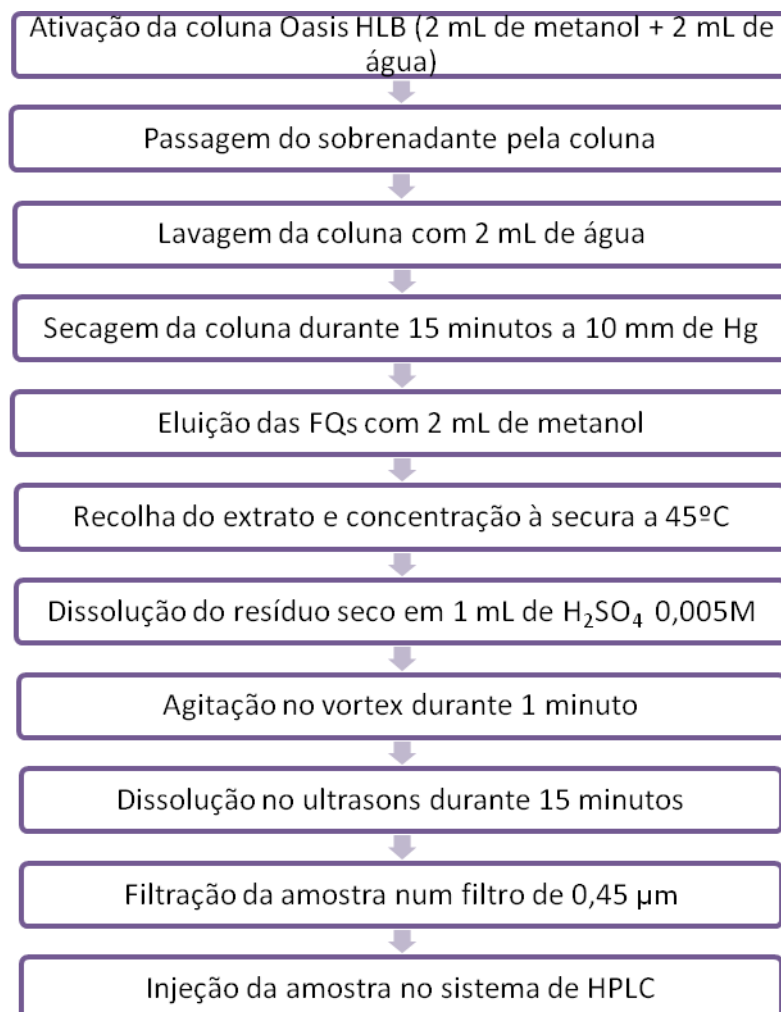


Figura 8 - Esquema resumo da purificação da amostra.

II.1.6. Detecção e quantificação de FQs

Para a deteção e quantificação das três FQs estudadas foi usado um equipamento de HPLC com detetor fluorimétrico para, desta forma, ser possível identificar e quantificar as FQs em causa.

II.1.6.1. Método cromatográfico

II.1.6.1.1. Fase móvel

A fase móvel foi escolhida com o intuito de obter a melhor resolução dos picos cromatográficos possível. Inicialmente foram testadas duas fases móveis, uma constituída por uma solução tampão constituída por ácido fosfórico 0,025 M a pH 3 (ajustamento do pH foi feito com TBA) e metanol na proporção de 890:110 e outra constituída pela mesma solução tampão, metanol e acetonitrilo numa proporção de 885:90:25, respetivamente. Depois de serem adicionados todos os reagentes, a fase móvel foi filtrada com recurso a um filtro de membrana com porosidade de 0,2 µm sob vácuo e posteriormente colocada a desgaseificar no ultrasons durante 15 minutos.

Foram testadas as duas fases móveis e foi possível observar que a fase móvel com melhor resolução dos picos era a segunda fase móvel, ou seja, solução tampão pH 3, metanol e acetonitrilo na proporção de 885:90:25. Os picos, além de apresentarem uma melhor resolução com esta fase móvel, também apresentavam um tempo de retenção mais curto.

II.1.6.1.2. Fluorimetria

As condições fluorimétricas devem ser estudadas e otimizadas por forma a que a intensidade da fluorescência das FQs em estudo possa ser maximizada.

Foram utilizados os comprimentos de onda de emissão e de excitação otimizados no trabalho Pena et al (2010): 278 nm e 450 nm, respetivamente.

II.2. Validação da metodologia analítica

A validação de um método analítico é definida pelo conjunto de todos os procedimentos necessários para demonstrar que um determinado método, desenvolvido para identificar e quantificar um composto em determinada matriz, é suficientemente fiável para se obterem resultados com elevado grau de confiança. Um método devidamente validado e caracterizado dá origem a resultados que possam ser fidedignos. A validação passa por um conjunto de etapas necessárias quer para validar um novo método analítico quer para revalidar um método já descrito na literatura científica. Um protocolo geral de validação engloba a avaliação dos seguintes parâmetros: seletividade, linearidade, limites de deteção e quantificação, exatidão e precisão (Ribani et al, 2004).

II.2.1. Seletividade

A seletividade avalia o grau de interferentes, impurezas, produtos de degradação, bem como outros componentes que possam estar presentes na matriz. As amostras foram analisadas de acordo com a metodologia referida anteriormente, com o intuito de saber se a matriz músculo de frango possuía ou não interferentes com o mesmo tempo de retenção dos compostos em estudo e que comprometessem a identificação dos antibióticos em estudo (NOR, CIP e ENR).

II.2.2. Linearidade

A linearidade corresponde à capacidade do método em fornecer resultados diretamente proporcionais à concentração dos analitos em estudo. A linearidade demonstra a proporcionalidade entre as áreas obtidas dos cromatogramas e as concentrações que estão presentes nas amostras; esta relação é maior, quanto mais próximo for o valor do coeficiente de correlação r^2 da unidade (Ribani, et al, 2004). Durante este estudo a avaliação da linearidade foi feita através de soluções padrão, com diferentes níveis de concentração de FQs e através de amostras fortificadas, avaliando o efeito matriz.

II.2.3. Ensaios de recuperação

A avaliação da exatidão e da precisão da metodologia utilizada foi realizada através dos ensaios de fortificação. Os ensaios de fortificação foram realizados na amostra de frango considerado branco, ou seja, no frango caseiro sem administração de antibióticos, e foram efetuados 5 níveis de fortificação para a NOR, CIP e ENR: 12,5 µg/Kg; 25 µg/Kg; 50 µg/Kg; 100 µg/Kg e 200 µg/Kg. Posteriormente à fortificação, as amostras foram colocadas 20 minutos ao abrigo da luz. De seguida, realizou-se o procedimento anteriormente descrito para a preparação da amostra.

Através das percentagens de recuperação foi possível avaliar a exatidão, enquanto que a precisão intra-dia e inter-dia foi avaliada através do desvio padrão.

É de referir que a precisão intra-dia foi calculada através da média dos desvios padrões das percentagens de recuperação de cada antibiótico analisado em cada dia; a precisão inter-dia foi calculada através da média dos desvios padrões das percentagens de recuperação dos antibióticos em estudo, para os três dias.

II.3. Discussão de resultados

II.3.1. Otimização das condições cromatográficas

Foram testadas duas fases móveis, uma constituída por solução tampão (pH3) e metanol na proporção de 990:110, muitas vezes referida em artigos, e outra descrita por Pena et al (2010), constituída por solução tampão (pH3), metanol e acetonitrilo na proporção de 885:90:25.

Também foram testadas duas velocidades de fluxo diferentes (1 mL/min e 1,5 mL/min).

Com este estudo foi possível observar que os resultados eram melhores quando usada a segunda fase móvel, constituída por solução tampão, metanol e acetonitrilo, a uma velocidade fluxo de 1,5 mL/min. Com a observação do cromatograma era possível verificar que os picos apresentavam melhor resolução e tempos de retenção relativamente mais curtos, como se pode observar na figura 9.

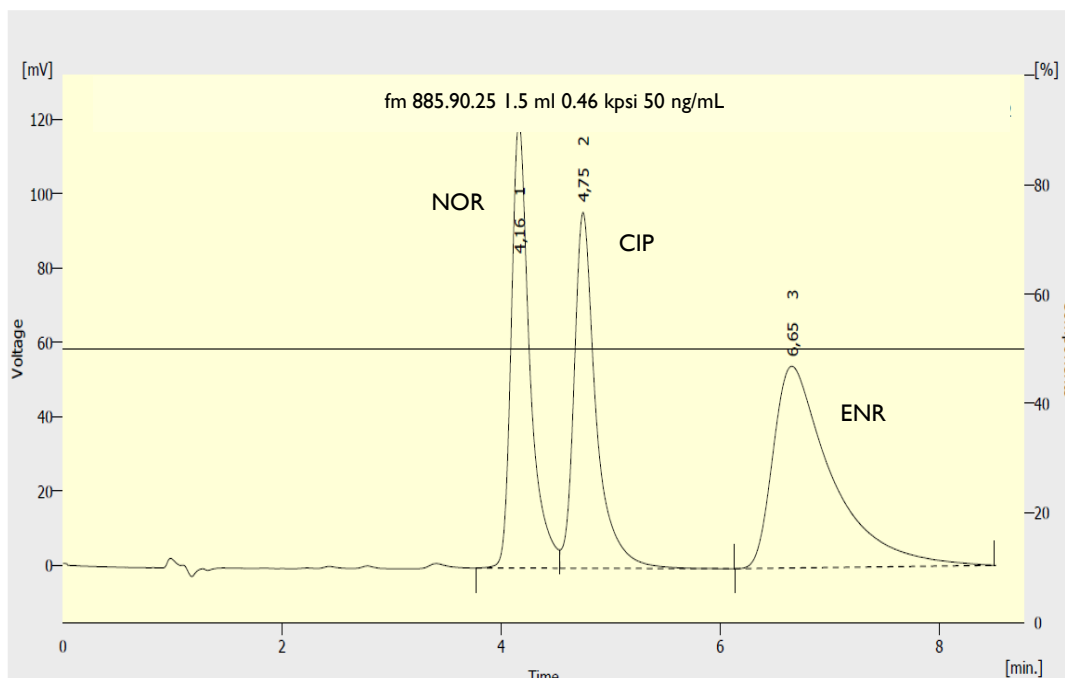


Figura 9 – Cromatograma de um padrão de 50 ng/mL contendo NOR, CIP e ENR.

II.3.2. Otimização dos resultados de extração e purificação da amostra

Foram experimentados vários métodos de extração e purificação descritos na literatura científica com o intuito de otimizar o método de extração.

Tabela 7 – Estudo dos vários procedimentos de extração e purificação da amostra realizados.

Ensaio	Extração	Lavagem	Eluição	Eluente
Ensaio 1	H ₃ PO ₄ 0,10 M	2 ml de H ₂ O	2 ml de metanol	Metanol
Ensaio 2	H ₃ PO ₄ 0,5 M	2 ml de H ₂ O	2 ml de metanol	Metanol
Ensaio 3	H ₃ PO ₄ 0,10 M	3 ml de 5% de metanol/H ₂ O	2 ml de metanol	Metanol
Ensaio 4	H ₃ PO ₄ 0,10 M	3 ml de 5% de metanol/H ₂ O	2ml de ácido fórmico em metanol/H ₂ O + 2 ml de hidróxido de amónio em metanol/H ₂ O	Ácido fórmico em metanol/H ₂ O e Hidróxido de amónio em metanol/H ₂ O
Ensaio 5	H ₃ PO ₄ 0,10 M	2 ml de água	2 ml de metanol	Metanol
Ensaio 6	H ₃ PO ₄ 0,10 M	2 ml de 5% metanol/H ₂ O	2 ml de metanol	Metanol
Ensaio 7	H ₃ PO ₄ 0,5 M	8 ml de H ₂ O	2 ml de metanol	Metanol

Após terem sido testados os sete ensaios anteriormente indicados, foi possível chegar à conclusão de que o melhor resultado de extração era obtido com o ensaio 2, ou seja, quando se usava como reagente de extração o H₃PO₄ 0,5 M, se lavavam as colunas de SPE com 2 ml de água e se eluía a amostra com 2 mL de metanol. Esta foi a metodologia adotada por evidenciar a obtenção de resultados mais satisfatórios (Herrera-Herrera et al, 2009; Jenkins et al, 2003; Pereira, 2009; Sahaerezad et al, 2004).

II.3.3. Validação

II.3.3.1. Linearidade

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

Foram usadas soluções padrão com concentrações de 7,5 ng/mL, 12,5 ng/mL, 25 ng/mL, 50 ng/mL, 100 ng/mL e 200 ng/mL, para ser possível detetar concentrações das FQs em estudo abaixo e acima do LMR estabelecido, ou seja, 100 µg/Kg para a soma da ENR com a CIP. Os valores de r^2 obtidos para a NOR, CIP e ENR foram 0,9996, 0,9998 e 0,9999, respetivamente, evidenciando uma boa correlação, como se pode verificar através dos gráficos que ilustram os testes da linearidade para padrões.

II.3.3.1.1. Linearidade para padrões

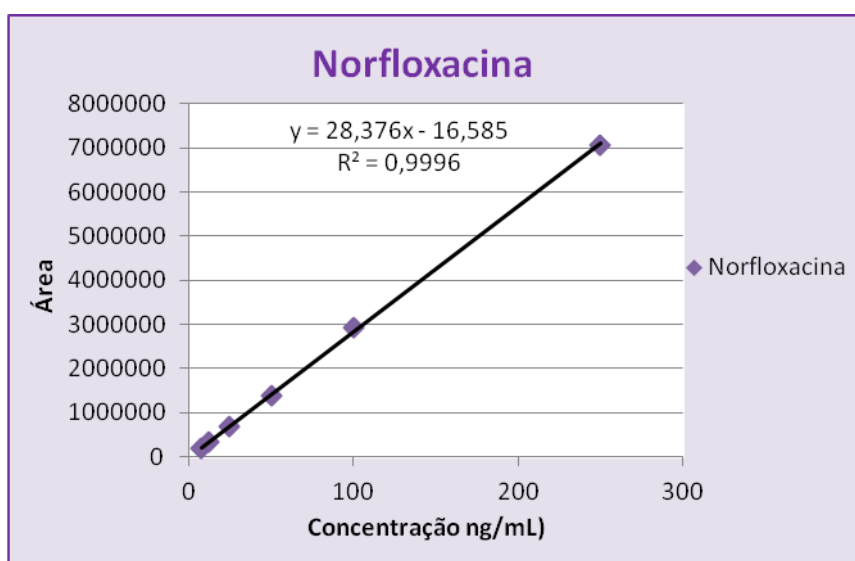


Gráfico 1 – Curva de calibração para a norfloxacina.

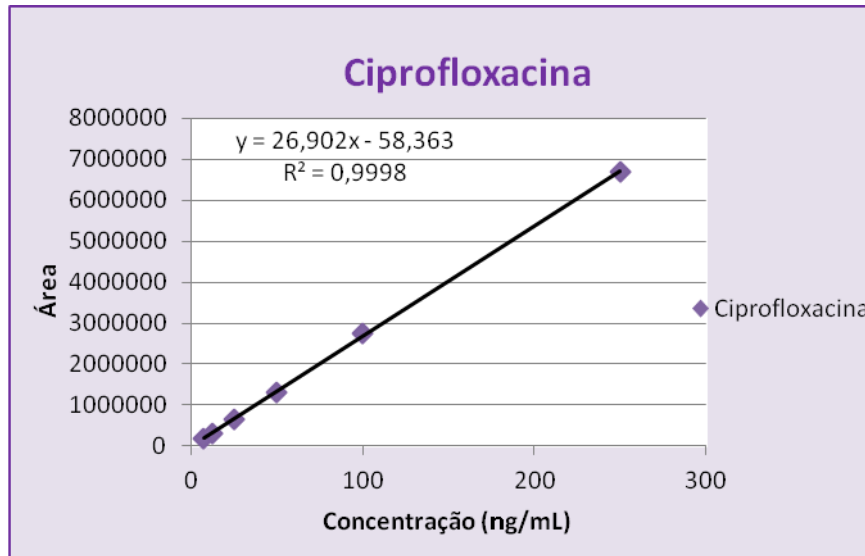


Gráfico 2 – Curva de calibração para a ciprofloxacina.

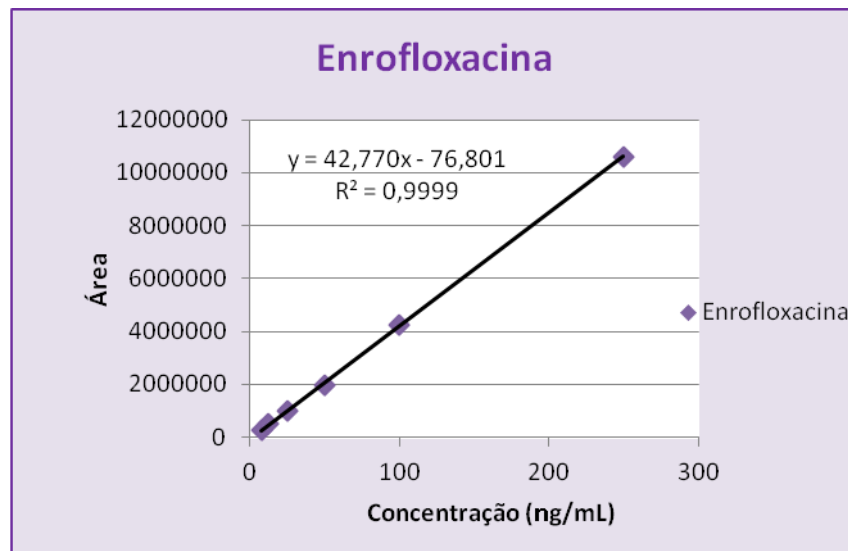


Gráfico 3 – Curva de calibração para a enrofloxacina.

II.3.3.1.2. Linearidade avaliada para amostras fortificadas

Foram analisadas as amostras fortificadas para proceder à avaliação da linearidade (n=3) na matriz. Os resultados desta avaliação são apresentados de seguida e por dias de análise.

Dia I

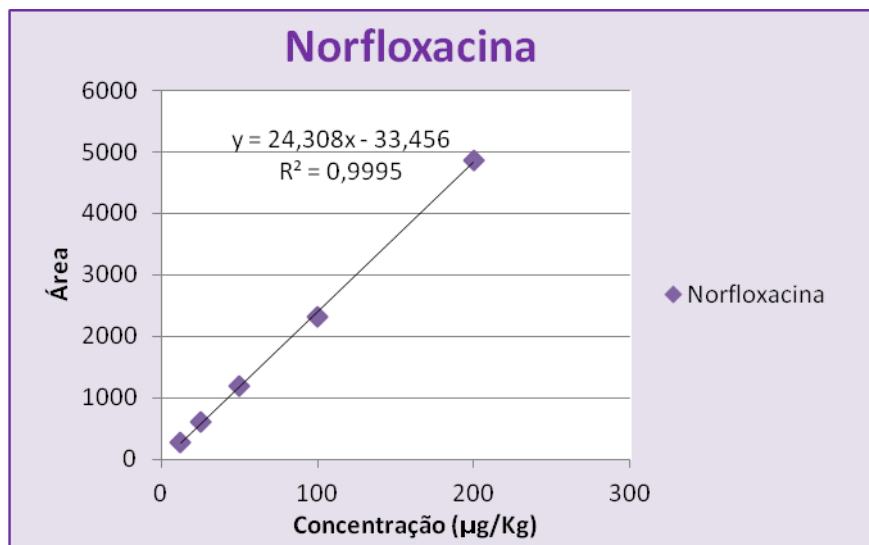


Gráfico 4 – Curva de calibração de amostras fortificadas com norfloxacinina no 1º dia de validação.

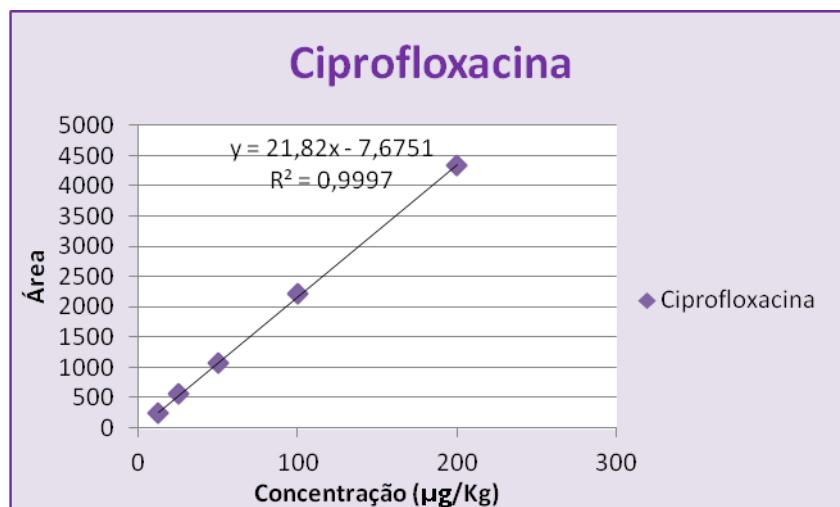


Gráfico 5 - Curva de calibração de amostras fortificadas com ciprofloxacina no 1º dia de validação.

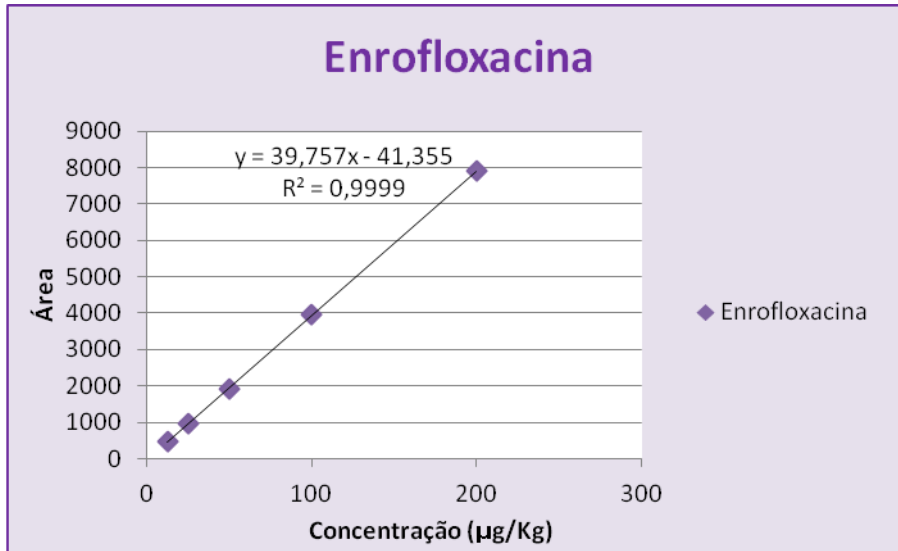


Gráfico 6 - Curva de calibração de amostras fortificadas com enrofloxacinina no 1º dia de validação.

Dia 2

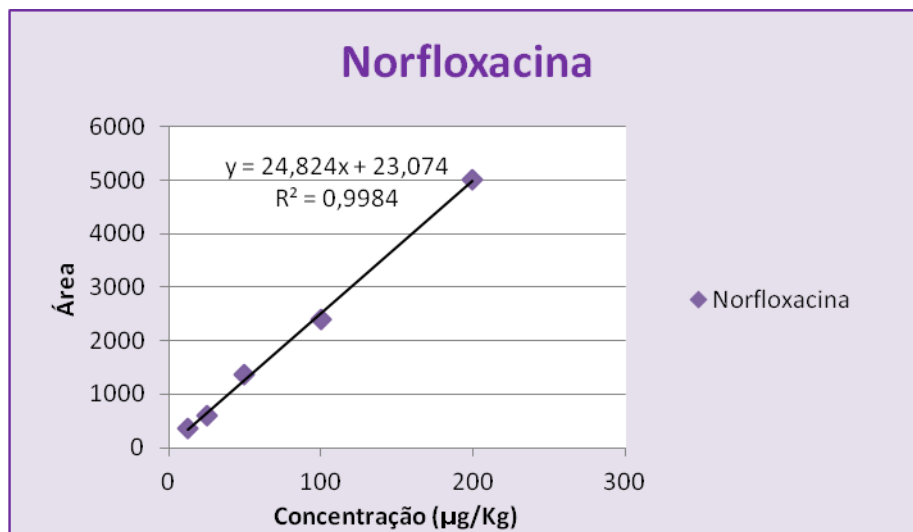


Gráfico 7 - Curva de calibração de amostras fortificadas com norfloxacinina no 2º dia de validação.

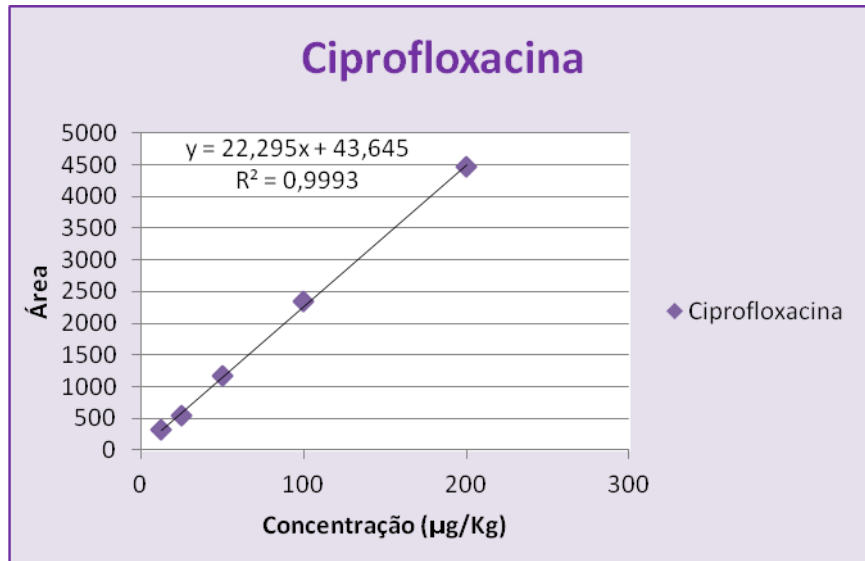


Gráfico 8 - Curva de calibração de amostras fortificadas com ciprofloxacina no 2º dia de validação.

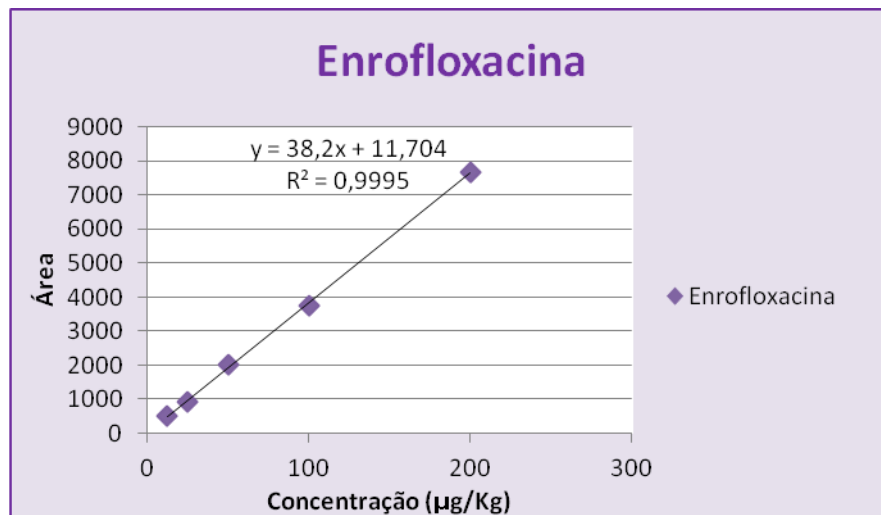


Gráfico 9 - Curva de calibração de amostras fortificadas com enrofloxacinina no 2º dia de validação.

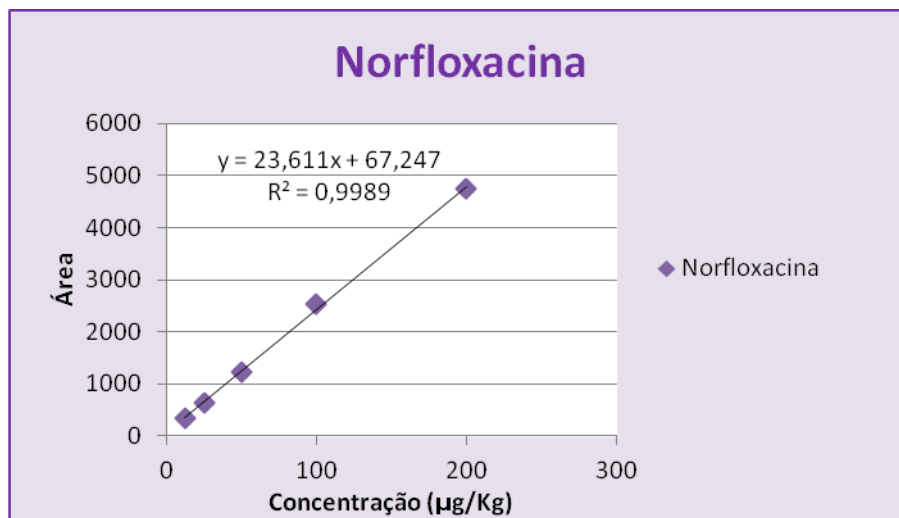


Gráfico 10- Curva de calibração de amostras fortificadas com norfloxacinina no 3º dia de validação.

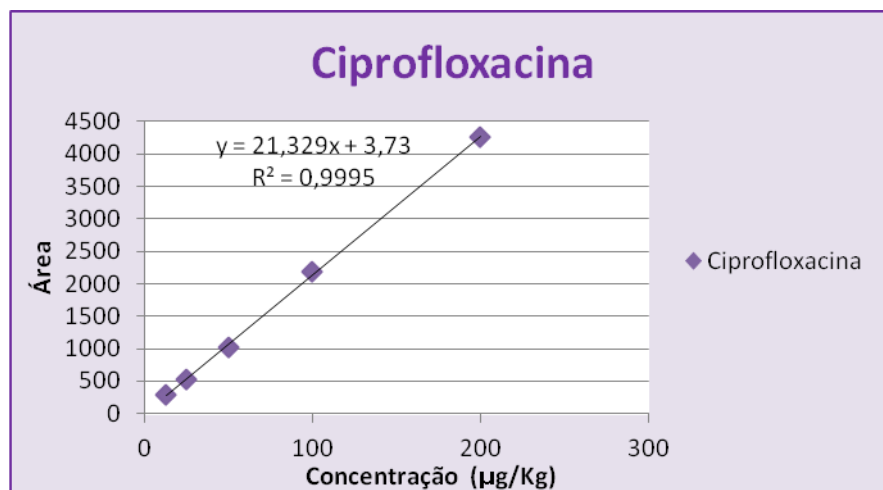


Gráfico 11 - Curva de calibração de amostras fortificadas com ciprofloxacina no 3º dia de validação.

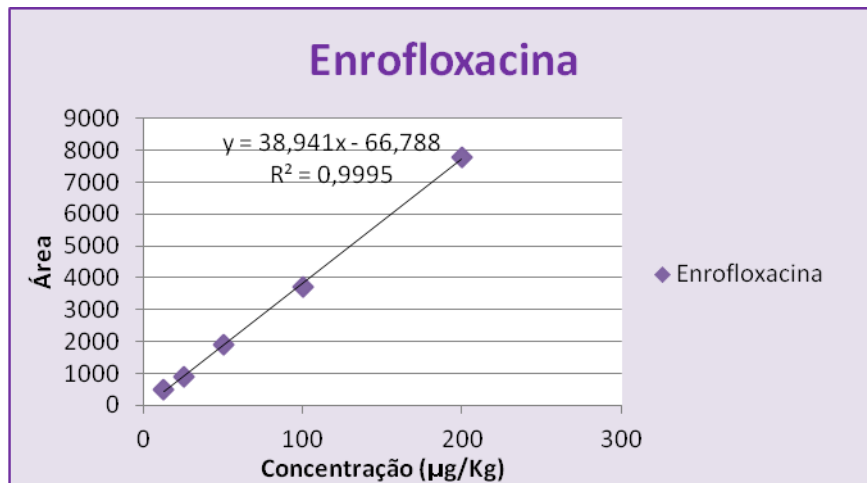


Gráfico 12 - Curva de calibração de amostras fortificadas com enrofloxacin no 3º dia de validação.

Através da análise dos gráficos anteriores é possível afirmar que a linearidade apresenta boa correlação. No caso da NOR, o valor médio do r^2 para os três dias de validação é de 0,9989, para a CIP é de 0,9995 e para a ENR é de 0,9996. Como estes valores se aproximam do valor da unidade, é possível afirmar que existe uma boa correlação.

II.3.3.2. Limites de detecção e quantificação de FQs

O limite de detecção (LOD) representa a menor concentração da substância em análise que pode ser detetada, embora não seja necessariamente quantificada, enquanto que o limite de quantificação (LOQ) representa a menor concentração de substância em análise que pode ser quantificada.

Existem várias formas para calcular os limites de detecção e de quantificação; estes podem ser calculados pelo método visual, método relação sinal-ruído ou por um método que se baseie em parâmetros da curva analítica (Ribani et al, 2004).

Os LODs e LOQs foram calculados através do último método indicado, ou seja, no método baseado em parâmetros da curva analítica. Para o LOD foi usada a seguinte fórmula

$LOD = 3 \times \frac{s}{S}$ em que s é o desvio padrão das amostras consideradas como brancos e S é a

inclinação da curva analítica. No caso do LOQ, este é calculado de forma semelhante, LOQ

$= 10 \times \frac{s}{S}$, em que o s e o S são os mesmos que foram usados para calcular o LOD. Depois

de analisadas todas as amostras consideradas como ensaios brancos, foram calculados os valores de LOD e LOQ como se pode verificar através da tabela 8.

Tabela 8 – Valores de LOD e LOQ para as FQs em estudo.

Limites	NOR ($\mu\text{g/Kg}$)	CIP ($\mu\text{g/Kg}$)	ENR ($\mu\text{g/Kg}$)
Identificação (LOD)	4,23	1,64	0,69
Quantificação (LOQ)	14,21	5,48	2,33

II.3.3.3. Seletividade da amostra

Após a análise de várias amostras consideradas como brancos (frangos caseiros), é possível verificar que as interferências correspondem essencialmente ao ruído da linha base e surgem antes do tempo de retenção das FQs em estudo, como podemos observar através da figura 10.

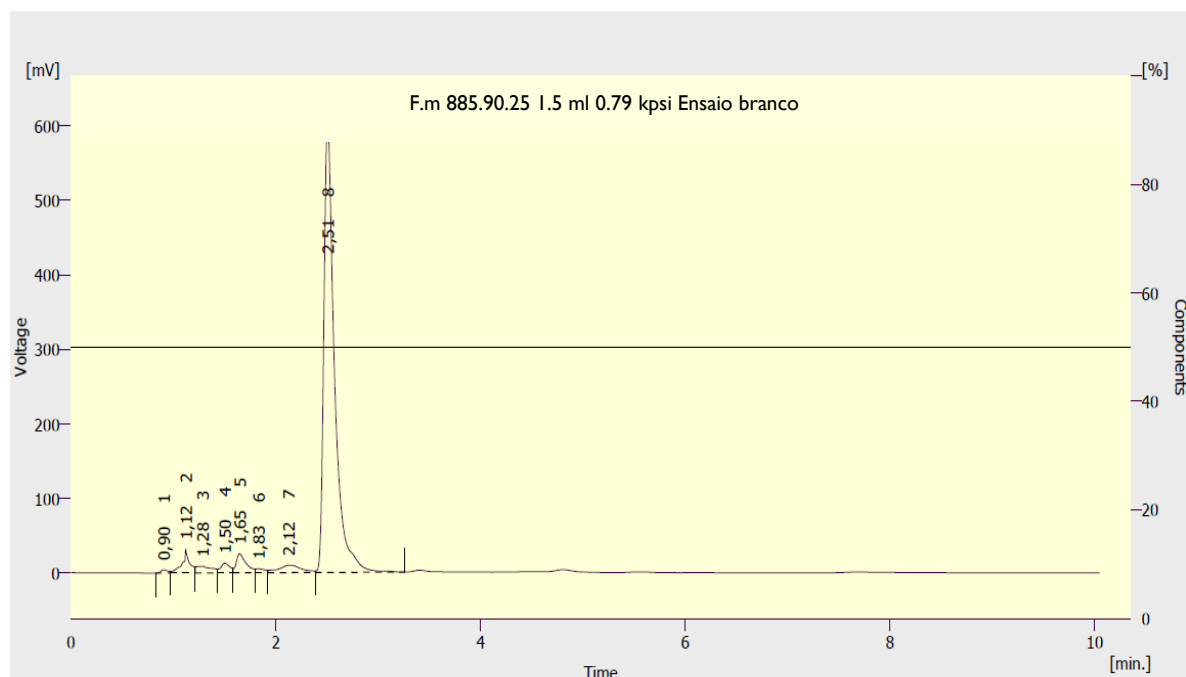


Figura 10 – Cromatograma de um ensaio branco.

II.3.3.4. Exatidão e precisão

O estudo da exatidão e precisão foi realizado através da avaliação de cinco níveis de fortificação: 12,5 µg/Kg; 25 µg/Kg; 50 µg/Kg; 100 µg/Kg e 200 µg/Kg. A figura 11 ilustra um cromatograma de uma amostra fortificada com NOR, CIP e ENR para o nível de 50 µg/Kg.

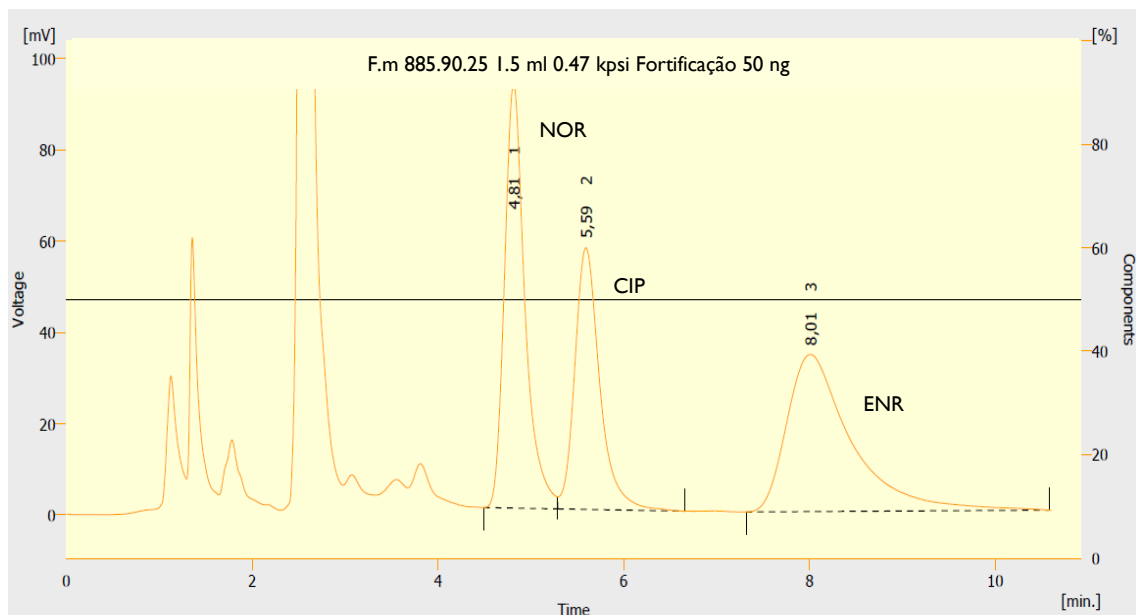


Figura 11 – Cromatograma de uma amostra fortificada com NOR, CIP e ENR para um nível de 50 ng/mL..

Entende-se por exatidão a concordância entre o resultado de um ensaio e o valor de referência aceite como convencionalmente verdadeiro (Almeida et al, 2005).

Através das tabelas seguintes podemos concluir que foram obtidas boas percentagens de recuperação, sendo que a percentagem mais baixa de recuperação obtida para os cinco níveis de fortificação foi de 87,5% para a NOR, 82,6% para a CIP e 89,1% para a ENR. Podemos verificar que o nível de recuperação mais baixo para a NOR, CIP e ENR é respetivamente 100 µg/Kg, 200 µg/Kg e 25 µg/Kg. Os valores das percentagens de recuperação para os níveis oscilaram entre os 87,5% e os 94,8% para a NOR, 82,6% e os 86,2% para a CIP e entre os 89,1% e os 93,9% para a ENR.

Comparando os valores de recuperação obtidos neste estudo com valores obtidos em estudos semelhantes, podemos verificar que os valores obtidos vão ao encontro dos referidos na bibliografia, variando entre 82,5% e 111% (Marni et al, 2011; Pereira, 2009; Samanidou, 2004; Zhao et al, 2007).

Relativamente à precisão, esta é baseada no grau de concordância entre os resultados obtidos numa série repetida de ensaios efetuados na mesma amostra. A precisão de um método analítico é usualmente expressa através do desvio padrão ou do desvio padrão relativo. Na precisão devem-se considerar dois aspetos bastante importantes, a precisão intra-dia e a precisão inter-dia (Almeida et al, 2005).

O valor de precisão intra-dia mais elevado foi de 14,8% relativo à CIP para o nível de fortificação mais baixo, ou seja, 12,5 ng/mL, sendo que para o mesmo nível a NOR e a ENR apresentaram valores de RSD de 13,4% e de 5,1%, respetivamente. Para os restantes níveis de fortificação, no caso da NOR obtiveram-se valores entre 2,2% e 6,9%, para a CIP os valores oscilaram entre 1,5% e 5,2% e para a ENR variaram entre 2,2% e 2,9%. Como esperado, os níveis de fortificação mais elevados apresentam valores de precisão mais baixos do que os níveis de fortificação mais baixos. Para a precisão inter-dia, no caso da NOR o valor mais elevado foi de 4,1%, para a CIP e ENR de 5,2% e 1,1%, respetivamente, para o nível mais baixo de fortificação. Para os restantes níveis de fortificação os valores variaram entre 0,04% e 0,5% para a NOR, 0,04% e 0,3% para a CIP e 0,03% e 0,5% para a ENR. Comprova-se mais uma vez que os níveis de fortificação mais elevados apresentam melhores valores de precisão.

As tabelas 8, 9 e 10 apresentam os valores de recuperação e variação intra-dia e inter-dia, obtidos neste estudo.

Tabela 9 – Exatidão e precisão relativas à Nor.

Nível de fortificação (ng/mL)	Média de recuperação (%)	Intra-dia (%)	Inter-dia (%)
12,5	94,8	13,4	4,1
25	87,9	3,2	0,5
50	90,9	6,9	0,5
100	87,5	5,3	0,2
200	88,2	2,2	0,04

n=3

Tabela 10 – Exatidão e precisão relativas à CIP.

Nível de fortificação (ng/mL)	Média de recuperação (%)	Repetibilidade e intra-dia (%)	Repetibilidade e inter-dia (%)
12,5	86,2	14,8	5,2
25	82,9	1,5	0,3
50	83,5	5,2	0,5
100	85,1	3,1	0,1
200	82,6	1,9	0,04

n=3

Tabela 11 – Exatidão e precisão relativas à ENR.

Nível de fortificação (ng/mL)	Média de recuperação (%)	Repetibilidade intra-dia (%)	Repetibilidade inter-dia (%)
12,5	93,1	5,1	1,1
25	89,1	2,9	0,5
50	93,4	2,5	0,5
100	92,2	2,8	0,07
200	93,9	2,2	0,03

n=3

II.3.4. Contaminação de NOR, CIP e ENR nas amostras de frango analisadas

II.3.4.1. Contaminação de FQs em Frango

Após a análise de 88 amostras de frango provenientes de várias zonas do país, podemos constatar que todas as zonas apresentavam amostras contaminadas, e que nenhuma amostra continha NOR.

A tabela II ilustra o número de amostras contaminadas, ou seja, acima do LOD, em cada grupo de amostras.

Tabela 12 – Resultados obtidos para as amostras analisadas.

FQs	NOR	CIP ≥ LOD (1,64 µg/Kg)	ENR ≥ LOD (0,69 µg/Kg)
Aveiro (5 amostras)	—	5	2
Beja (3 amostras)	—	3	1
Bragança (4 amostras)	—	3	3
Castelo Branco (6 amostras)	—	5	6
Coimbra (12 amostras)	—	4	8
Évora (5 amostras)	—	2	4
Faro (10 amostras)	—	6	5
Leiria (11 amostras)	—	6	8
Lisboa (5 amostras)	—	3	2
Porto (5 amostras)	—	5	1
Santarém (11 amostras)	—	11	6
Setúbal (7 amostras)	—	4	2
Viseu (4 amostras)	—	2	1

II.3.4.2. Amostras de frango contaminadas por zonas

Das 88 amostras de frango, 72 (81,8%) estavam contaminadas com FQs, 24 (33,3%) com CIP e 16 (22,3%) com ENR; 32 (44,4%) amostras estavam contaminados com CIP e ENR.

Das 88 amostras analisadas três continham níveis violativos, ou seja, superior ao LMR de 100 $\mu\text{g}/\text{Kg}$. A figura 12 ilustra uma dessas amostras.

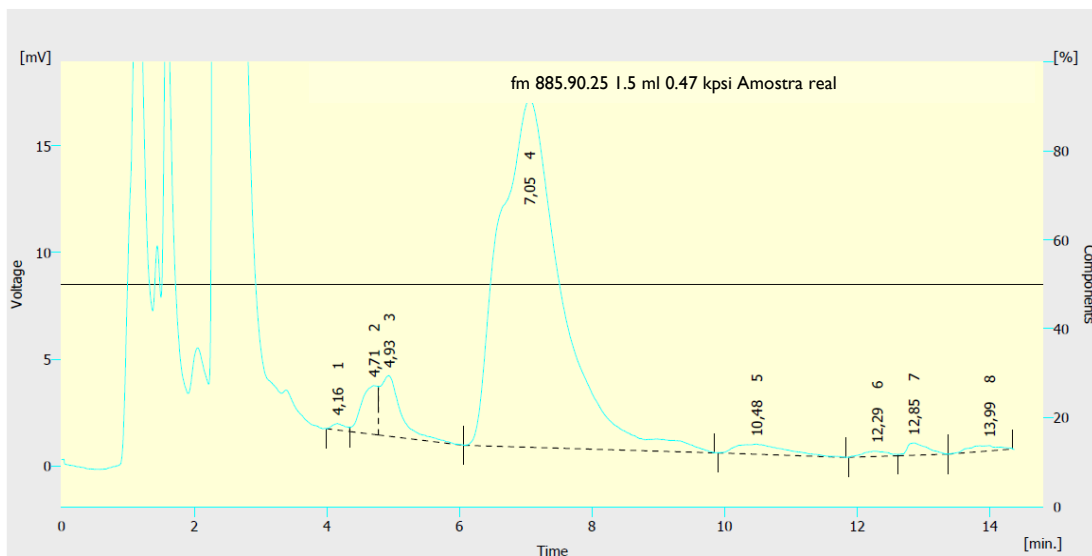


Figura 12 – Cromatograma de uma amostra contendo níveis superiores ao LMR.

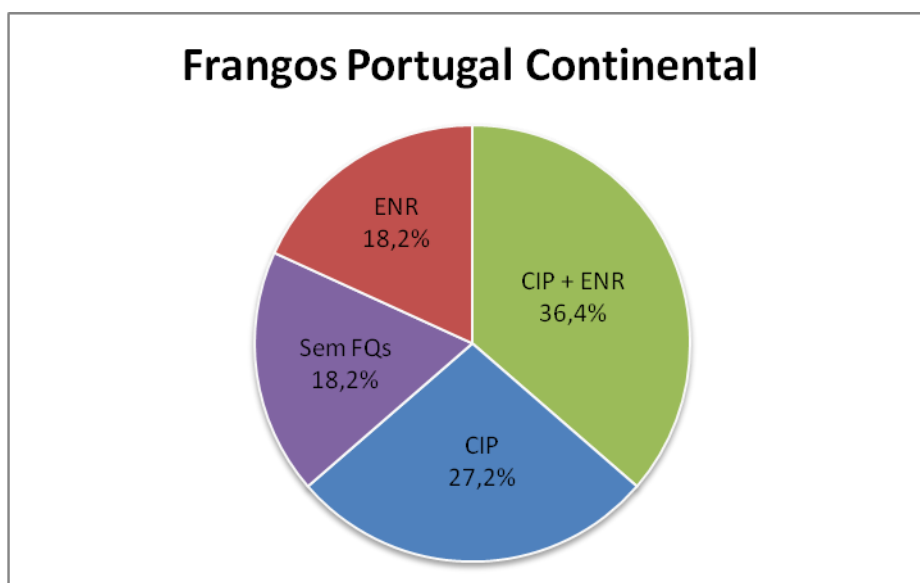
A tabela 12 representa as amostras que estão acima do limite legal permitido, ou seja, superiores a 100 $\mu\text{g}/\text{Kg}$; não esquecendo que este valor é considerado com a soma da concentração da CIP e da ENR. Como tal, foram encontradas três amostras que excediam os 100 $\mu\text{g}/\text{Kg}$, duas amostras em Castelo Branco e uma amostra em Santarém. No caso das amostras de Castelo Branco, estas já passavam o limite legal só com o valor da ENR e no caso da amostra de Santarém, esta só passava o limite legal com a soma da concentração da CIP com a ENR.

Tabela 13 – Amostras contaminadas com valores superiores ao LMR.

FQs	NOR	CIP >100 µg/Kg	ENR >100 µg/Kg	CIP + ENR >100 µg/Kg
Castelo Branco	_____	_____	2	_____
Santarém	_____	_____	_____	1

Como podemos observar na tabela 12, as concentrações de ENR variaram entre 141,65 e 147,01 µg/Kg, mas considerando a soma da CIP, de acordo com o estabelecido LMR, os valores oscilaram entre 148,93 e 153,89 µg/Kg. Relativamente à amostra de Santarém, o valor obtido foi de 104,6 µg/Kg (ENR + CIP).

O gráfico 13 ilustra a contaminação por FQs em frangos.

**Gráfico 13** - Percentagem de amostras de frangos contaminadas em Portugal continental.

II.3.4.3. Contaminações por distrito

Os gráficos seguintes ilustram o nível de contaminações de FQs por zonas do país, sendo que algumas zonas foram agrupadas por distritos para o número de amostras ser mais representativo.

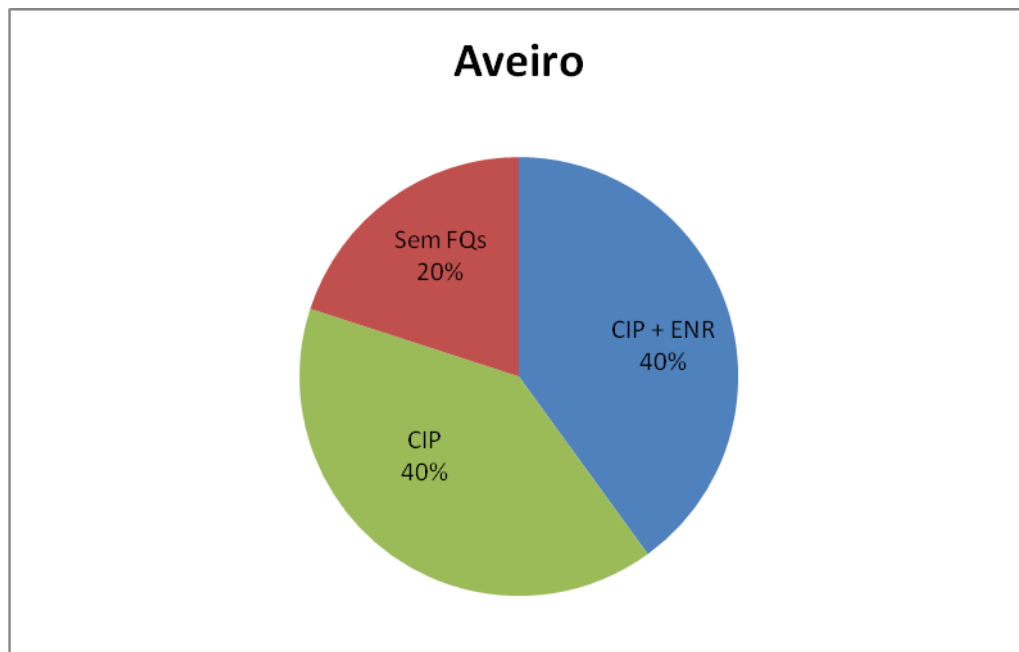


Gráfico 14 - Percentagem de amostras contaminadas com FQs em Aveiro n=5.

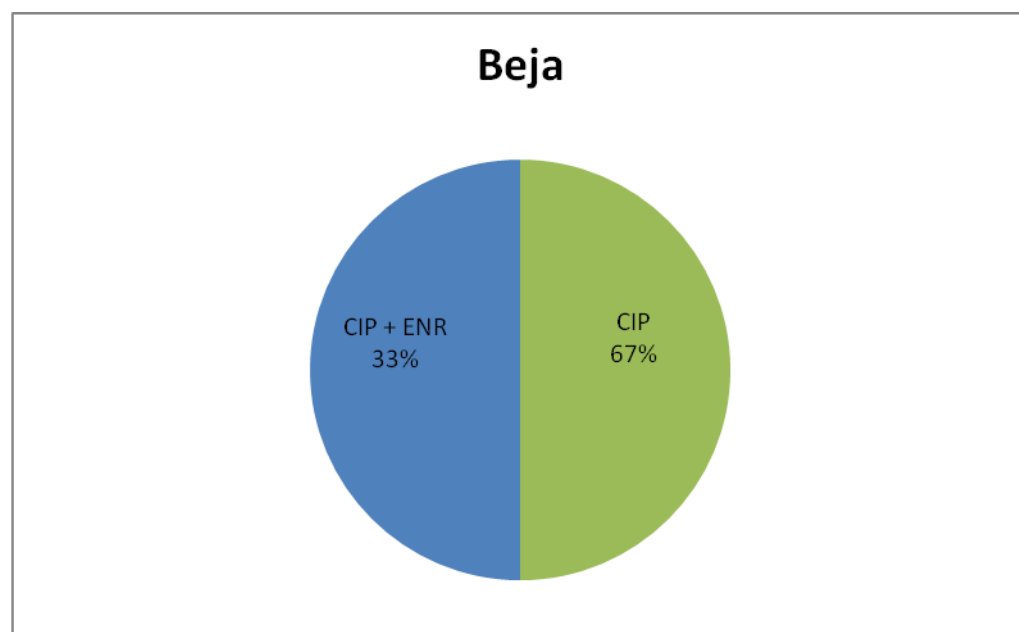


Gráfico 15 - Percentagem de amostras contaminadas com FQs em Beja n=3.

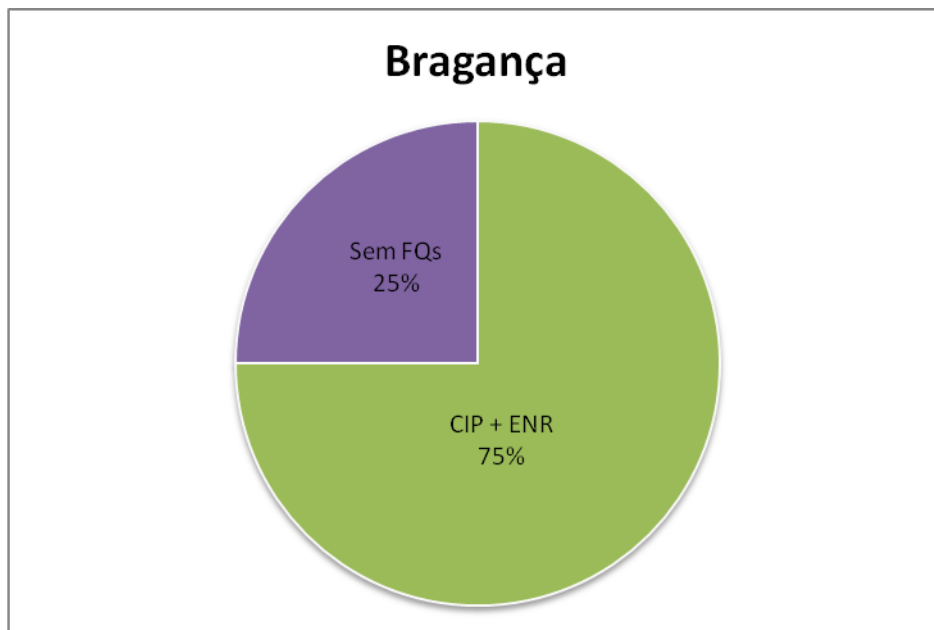


Gráfico 16 - Percentagem de amostras contaminadas com FQs em Bragança n=4.

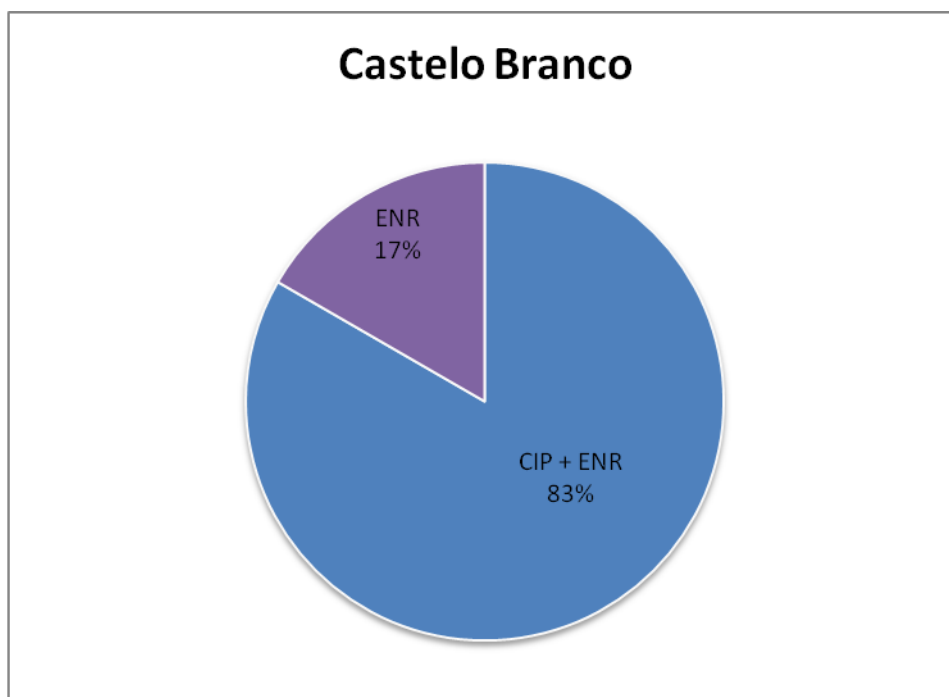


Gráfico 17 - Percentagem de amostras contaminadas com FQs em Castelo Branco n=6.

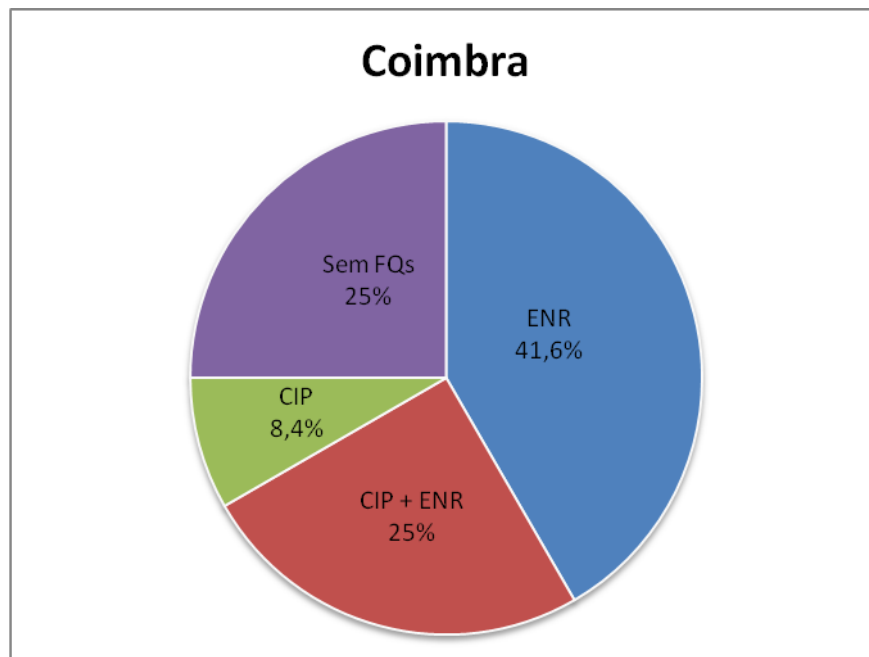


Gráfico 18 - Percentagem de amostras contaminadas com FQs em Coimbra n=12.

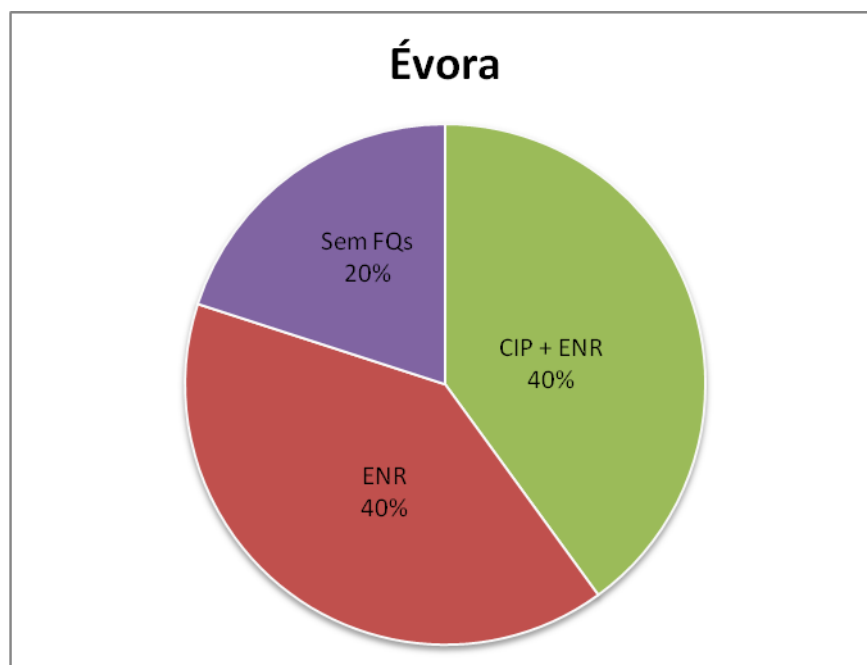


Gráfico 19 - Percentagem de amostras contaminadas com FQs em Évora n=5.

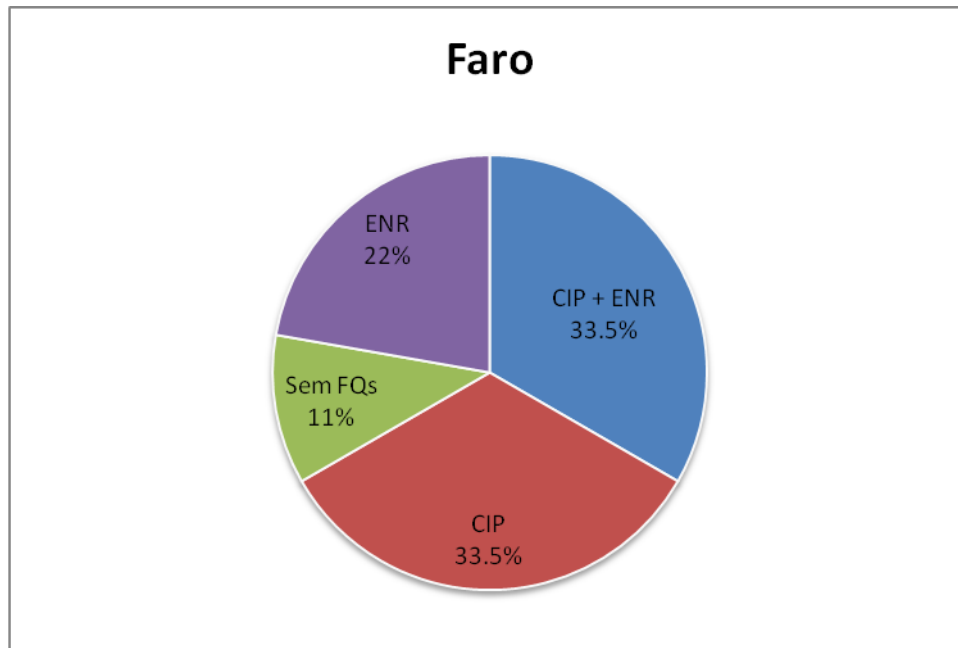


Gráfico 20 - Percentagem de amostras contaminadas com FQs em Faro n=10.

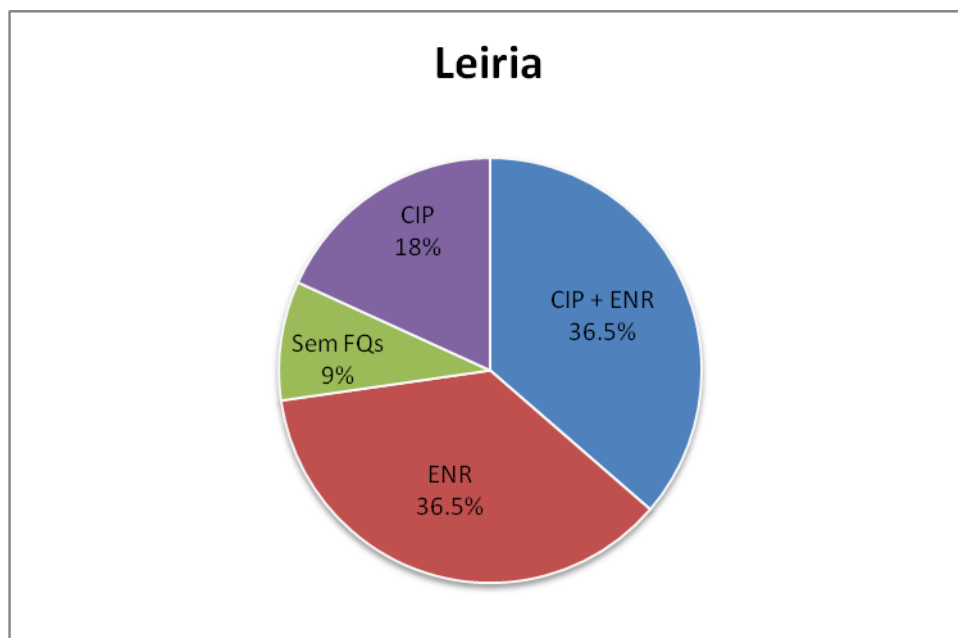


Gráfico 21 - Percentagem de amostras contaminadas com FQs em Leiria n=11.

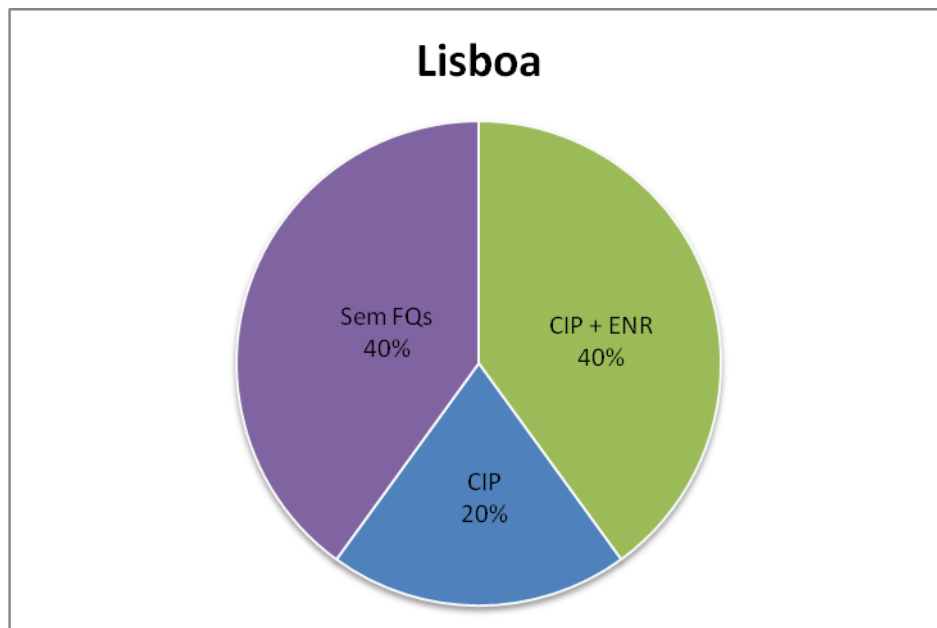


Gráfico 22 - Percentagem de amostras contaminadas com FQs em Lisboa n=5.

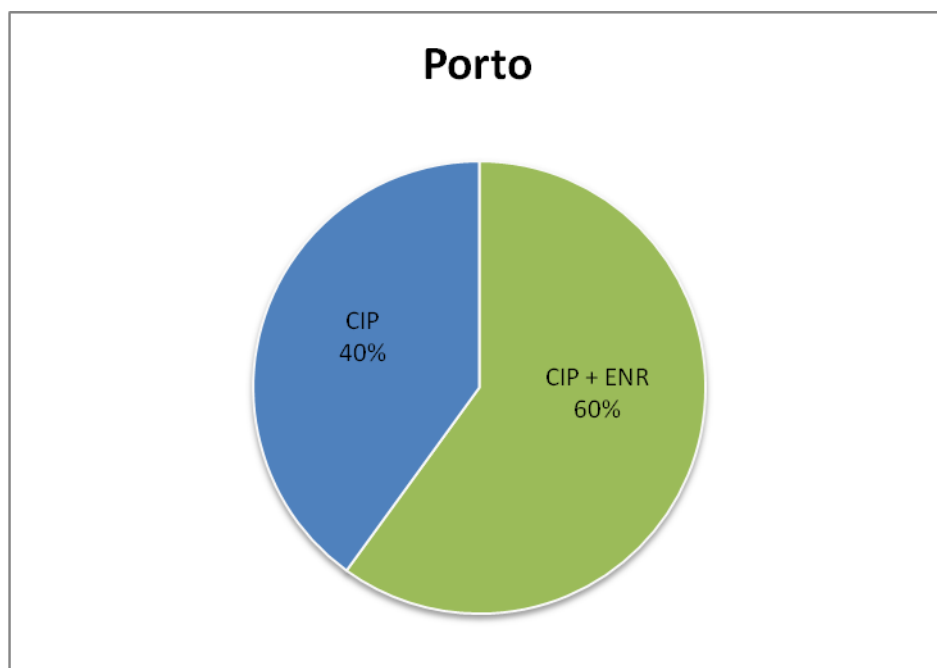


Gráfico 23 - Percentagem de amostras contaminadas com FQs no Porto n=5.

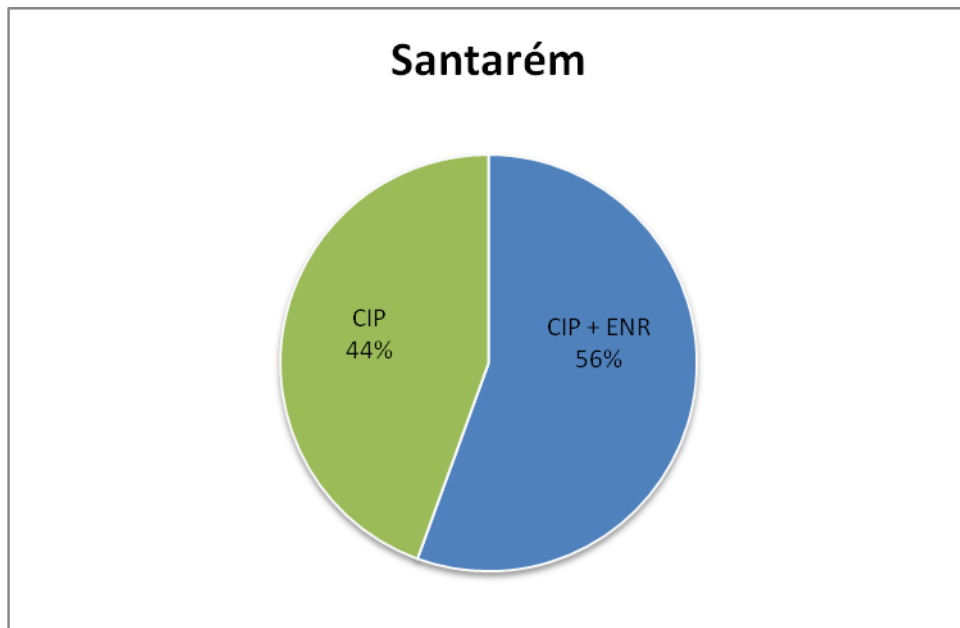


Gráfico 24 - Percentagem de amostras contaminadas com FQs em Santarém n=7.

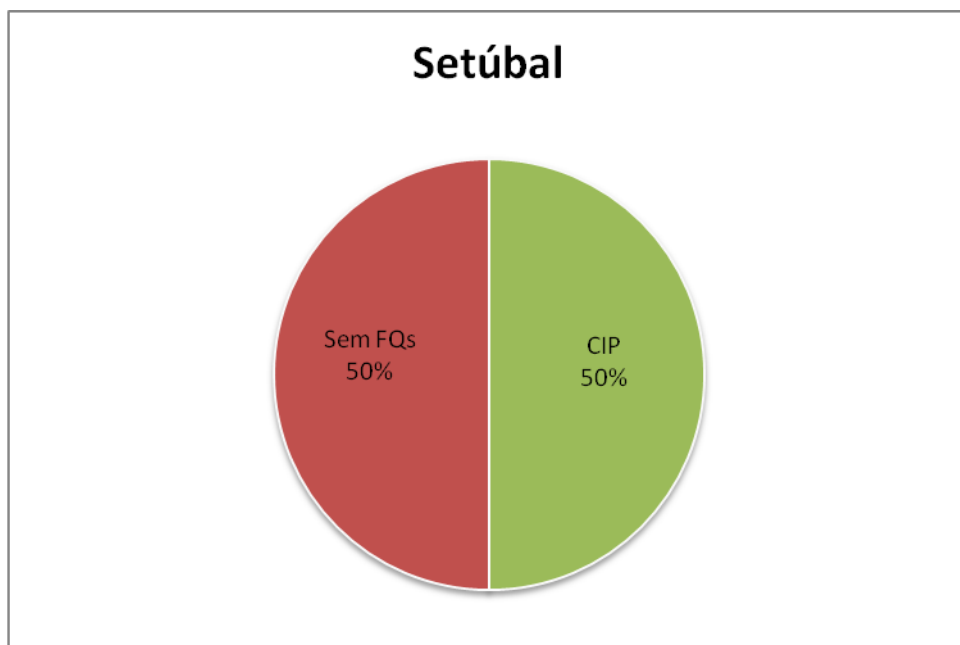


Gráfico 25 - Percentagem de amostras contaminadas com FQs em Setúbal n=2.

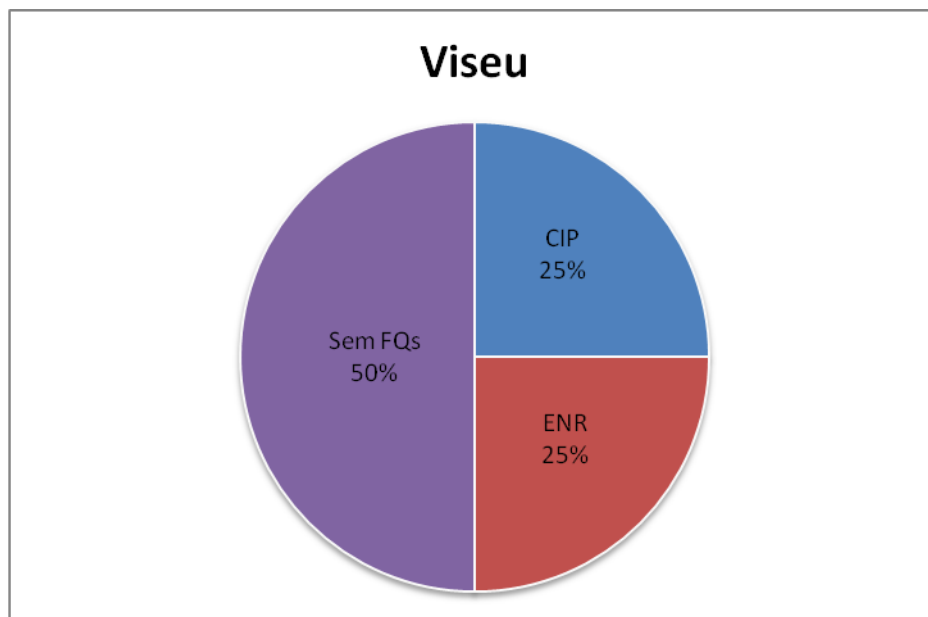


Gráfico 26 - Percentagem de amostras contaminadas com FQs em Viseu n=4.

Através da análise dos gráficos apresentados anteriormente é possível concluir que nenhuma amostra analisada se encontra contaminada com NOR, antibiótico não autorizado em medicina veterinária. Estes resultados demonstram uma melhoria em relação ao estudo realizado em 2009 em Portugal, no qual 76% das amostras estavam contaminadas com NOR, embora esses valores fossem inferiores ao LOQ (Pereira, 2009).

Relativamente à CIP e ENR, 33,3% das amostras estavam contaminadas com CIP, 22,3% estavam contaminadas apenas com ENR e 44,4% das amostras estavam contaminadas com CIP e ENR. Perante este resultado é possível inferir a extensa utilização da ENR devido à sua elevada frequência nas amostras analisadas e é importante realçar a presença de CIP, principal metabolito de ENR, mas que constitui um importante antibiótico em medicina humana. Em 88 amostras de frango analisadas, apenas 16 não se encontravam contaminadas.

Estes resultados vão ao encontro dos resultados presentes num relatório recentemente publicado, onde se referia que grandes proporções de *Salmonella spp.* e *Campylobacter* apresentavam elevada resistência à CIP, inclusive no caso da *Salmonella spp.*; em produtos de origem animal, a maior incidência foi em perus, galinhas e frangos de campo, onde a proporção rondava os 29-50%. Este estudo faz ainda referência ao facto de a resistência de *Salmonella* à CIP estar mais presente em frangos do que em galinhas (EFSA, 2013).

Estes dados mostram que deve haver uma maior consciencialização por parte dos produtores portugueses na administração deste importante grupo de antibióticos, uma vez que estão a promover a disseminação de resistências de bactérias colonizadoras da carne de aves e a sua passagem aos consumidores, levando desta forma a uma diminuição do efeito da medicação utilizada nestes casos.

Por outro lado, deve haver um controlo mais rigoroso por parte das entidades de fiscalização, de forma a tentar minimizar a ocorrência de resíduos de antibióticos. Seria também interessante realizar este estudo em épocas do ano de maior consumo de aves em Portugal, por exemplo no Natal, onde o consumo de aves é maior, nomeadamente o consumo de peru.

II.3.5. Amostras de peru contaminadas

Devido ao número insuficiente de amostras analisadas, os resultados apresentados poderão ser menos fidedignos, mas representam valores preliminares. Não foi possível fazer a avaliação por distritos, tendo em conta que o número de amostras por distrito não era representativo.

Relativamente às 12 amostras de peru, 11 (91,6%) estavam contaminadas, 6 (54,5%) estavam contaminados com CIP, 2 (18,1%) estavam contaminados com ENR e 3 (27,3%) estavam contaminados com CIP e ENR.

O gráfico 27 ilustra a contaminação das amostras de peru recolhidas em Portugal continental.

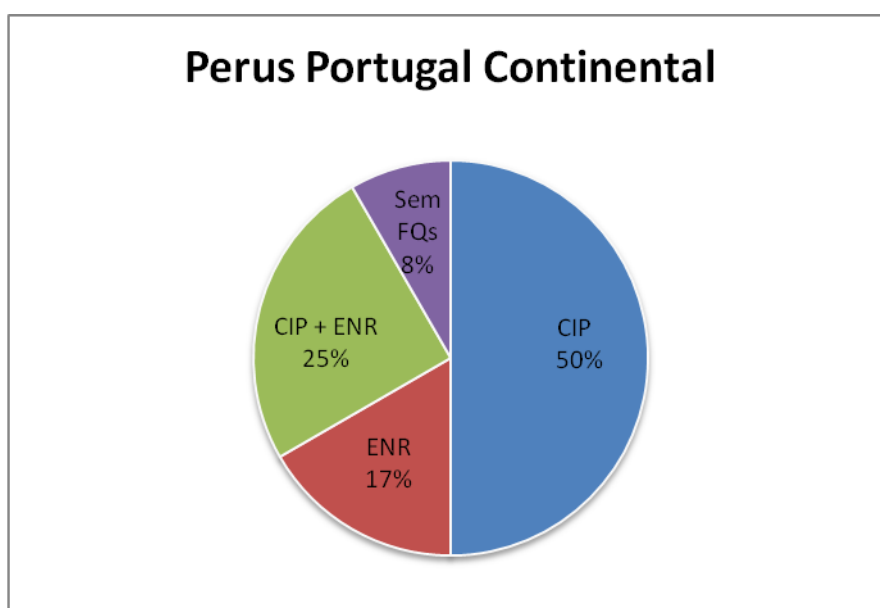


Gráfico 27 - Percentagem de amostras de perus contaminadas com FQs em Portugal continental.

II.4. Conclusões

Após a análise dos dados obtidos, é possível afirmar que o cenário em Portugal, em termos de utilização de NOR, melhorou substancialmente em relação ao último estudo efetuado, pois nenhuma amostra se apresentava contaminada com NOR. No entanto, 72 amostras de frango continham resíduos de CIP ou ENR, ou de ambas. Este facto revela que as boas práticas de administração de antibióticos podem não estar, a ser cumpridas.

Através da amostragem realizada a nível nacional nos diferentes distritos, podemos concluir que existe uma contaminação generalizada da carne de aves com FQs, uma vez que todas as zonas apresentam amostras contaminadas. Dentro de cada zona existem amostras isentas de contaminação por parte dos antibióticos em estudo.

O maior nível de contaminação nas amostras analisadas refere-se ao conjunto CIP com ENR, com 44,4% de amostras contaminadas, seguindo-se 33,3% de amostras contaminadas com CIP e 22,3% de amostras contaminadas com ENR.

De forma isolada é a CIP que prevalece indo ao encontro dos resultados divulgados pela EFSA, onde Portugal ocupa a liderança da tabela com mais casos de ocorrência de resistências à CIP.

Três das amostras analisadas possuíam concentrações superiores ao LMR, ou seja, superior a 100 µg/Kg para a soma da CIP com a ENR.

Este tipo de estudos faz parte dos programas obrigatórios de monitorização de resíduos de medicamentos veterinários efetuados anualmente em cada estado membro, sendo regulado pela Diretiva 96/23/EC.

Assim, convém realçar a importância da continuação deste tipo de trabalho, para dar continuidade à avaliação dos níveis de contaminação de FQs presentes na carne de aves.

II.5. Considerações Finais

Os resultados obtidos neste estudo alertam para o facto de em Portugal existir uma contaminação generalizada da carne de aves com FQs, uma vez que todos os distritos apresentaram amostras contaminadas.

Em suma, o uso indiscriminado de antibióticos é um grave problema de segurança alimentar em Portugal, e é necessário serem tomadas medidas de vigilância mais apertadas na produção deste género de produtos alimentares, por forma a cumprir a legislação europeia de acordo com a Diretiva 96/23/EC.

Bibliografia

AERTS, M.; HOGENBOOM, A.; BRINKMAN, U. – Analytical strategies for the screening of veterinary drugs and their residues in edible products. *Journal of Chromatography B: Biomedical Applications*. 667 (1995) 1-40.

ALLAN,R.; LOW,D. – Fluoroquinolones Antibiotics. Berlin:Birkhäuser, (2003). ISBN: 3-7643-6591-9. 3-31.

ALLIX,E. – Promotores de crescimento para frangos de corte. Porto Alegre, (2010).

ALMEIDA,M.; MACHADO,M. – Fluoroquinolonas. *Medicina Interna*. Vol. 1, N°3 (2005).

ANDERSSON.M.; MACGOWAN.A. – Development of the quinolones. Edição 51, Supl. S1, 1-11. Bristol: *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, (2003).

ANDRIOLE,V. – The Quinolones: Past, Present and Future. 41 (Suppl 2) Connecticut: Yale University School of Medicine, (2009).

ANTONIO,N.; OLIVEIRA,C.; CANESINI,R.; ROCHA,J. – Mecanismos de Resistência Bacteriana. *Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária*. N° 12 (2009). ISSN: 1679-7353.

BAILAC, S., BALLESTEROS, O., JIMÉNEZ-LOZANO, E., BARRÒN, D., SANZ-NEBOT, V., NAVALÓN, A., VILCHEZ., J.L., BARBOSA, J. – Determination of quinolones in chicken tissues by liquid chromatography with ultraviolet absorbance detection. *Journal of Chromatography A* 1029:145-151.

BALL, P. – Quinolone generations: natural history or natural selection? *Journal of Antimicrobial Chematography* 46(1):17-24.

BAPTISTA,P.; VENÂNCIO,A. – Os perigos para a Segurança Alimentar no Processamento de Alimentos. Guimarães: FORVISÃO – Consultadoria em Formação Integrada, Lda. ISBN 972-99099-3-8. p. 66-67. (2003).

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

CALEIRO, P. – Avaliação da qualidade higio-sanitária da carne de frango: pesquisa de *Listeria monocytogenes* por PCR. Lisboa, Universidade Técnica de Lisboa, Faculdade de Medicina Veterinária. Tese de Mestrado. 2009.

CAMPANYÓ, R., GRANADAS, J., GUITERAS, J., PRATA, M. – Antibiotics in food: Legislation and Validation of Analytical Methodologies. *Anal Bional Chem* 395:877-891 (2009).

CÂNOA, J. – Requisitos para a implementação do HACCP em matadouros de aves. Lisboa, (2008).

CARRILLO, M. – Aplicación de fluoroquinolonas en medicina veterinaria: criterios farmacocinéticos y farmacocinéticos/farmacodinámicos (PK/PD). Universidade de Murcia, Facultadad de Veterinaria, Departamento de Farmacología. (2008)

CENTENO, M.M. – Influência do uso de Fluoroquinolonas no aparecimento de *Escherichia coli* E *Salmonella spp.*. Lisboa, Faculdade de Medicina Veterinária, (2010). Dissertação do Mestrado Integrado em Medicina Veterinária.

COOKE, C.; SINGER, R.; JANG, S.; HIRSH, D. – Enrofloxacin resistance in *Escherichia coli* isolated from dogs with urinary tract infections. *Scientific Reports: Original Study*. Vol.220, nº2. (2002).

CRISTINA, A. – Alternativas ao uso de promotores de crescimento em avicultura. *Poli-nutri Nutrição Animal*, (2005).

Dairy Food Safety – Antibiotic Residue Screening Test Methods. Dairy Food Safety Victoria. (2005).

DALKE,V. – Análise de resíduos de antibióticos em carne de frango. Novo Hamburgo: (2006).

DAVIES, J., DAVIES, D. – Origins and Evolution of Antibiotic Resistance. Microbiology and Molecular Biology Reviews p. 417-433. (2010).

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

DÍAZ, D.P, PICCO, E.J., ENCINAS, T., RUBIO, M., LITTERIO, N.J., BOGGIO, J.C. – Resíduos tisulares de nicotinato de norfloxacin administrado por via oral en cerdos. Archivos de Medicina Veterinaria V. 33 nº1(2001).

Diretiva 97/72/CE, 1997. Jornal Oficial das Comunidades UEuropeias L351 55-60.

Decreto-Lei nº. 151/2005. Diário da República- 1ª Série-A Nº 166 30 de Agosto de 2005

DGAV – A segurança sanitária dos alimentos. Ministério da Agricultura, do Desenvolvimento Rural e das Pescas (2009).

EFSA – The European Union Summary Report on antimicrobial resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in 2013. EFSA Journal. 11(5):3196. (2013).

EL-AZIZ, M.I., AZIZ, M.A., SOLIMAN, F.A., AFIFY, N.A., - Pharmacokinetic evaluation on enrofloxacin in chickens. British Poultry Science 38(2): 164-168. (1997)

EMA – The rules governing medicinal products in European Union. Establishment of maximum residue limits (MRLs) for residue of veterinary medicinal products in foodstuffs of animal origin. (2005)

EMA/CVMP/187/00 – Committee for medicinal products for veterinary use, note for guidance on the risks analysis approach for residues of veterinary medicinal products in food of animal origin. (2001)

EMEA – Maximum Residue Levels 820/02, 2002. Committee for veterinary medicinal products. Enrofloxacin (extension to all food producing species). Summary report 3.

EMEA/CVMP/SAGAM/184651/2005 – 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. (2007)

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

FASURE,K.; DEJI-AGBOOLA,M.; AKINYEMI,O. – Antimicrobial resistance patterns and emerging fluoroquinolone resistant *Salmonella* isolates from poultry and asymptomatic poultry workers. Vol.6(11) 2610-2615. African Journal of Microbiology. (2012)

FDA – FDA announces final decision about veterinary medicine. (2005).

FDA-CVM – Human Health Impact of Fluoroquinolones Resistant *Campylobacter* Attributed to the Consumption of Chicken. (2000).

FMI, Food Marketing Institute – Low-Level use of antibiotics in Livestock and Poultry. (2003).

GARCIA, M.; SOLANS, C.; HERNANDEZ, E.; PUIG, M.; BREGANTE, M. – Simultaneous Determination of Enrofloxacin and its Primary Metabolite, Ciprofloxacin, in Chicken Tissues. Chromatographia. N° 3/4. (2001)

GARCIA, M.; SOLANS, C.; CALVO, A.; HERNANDEZ, E.; REY, R.; BREGANTE, M.; PUIG, M. – Determination of enrofloxacin and its primary metabolite, ciprofloxacin, in pig tissues. Application to residues studies. Biomedical Chromatography. 19:27-31. (2005).

GUARDABASSI,L.; JENSEN,L.; KRUSE,H. – Guia de Antimicrobianos em Veterinária. Artemed, (2010). ISBN 9788536322308.

HAESE,D.; SILVA,B. – Antibióticos como promotores de crescimento em monogástricos. Revista Electrónica Nutritime. Vol. I, N°1 (2004).

HANWEN, S.; WEI, Z.; HE, P. – Effective Separation and Simultaneous Determinations of Four Fluoroquinolones in Milk by CE with SPE. Chromatographia. Vol.68, nº5/6. (2008)

HARBOTTLE, H.; THAKUR, S.; ZHAO, S.; WHITE, G. – Genetics of antimicrobial resistance. Animal Biotechnology. 17(2):111-124. (2006)

HERMO, M.; BARRÓN, D.; BARBOSA, J. – Development of analytical methods for multiresidue determination of quinolones in pig muscle samples by liquid chromatography with ultraviolet detection, liquid chromatography-mass spectrometry and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. Journal of Chromatography A. 1104 (2005) 132-139.

HOOFF, N.; WASCH, K.; OKERMAN, L.; REYBROECK, W.; POELMANS, S.; NOPPE, H.; BRABANDER, H. – Validation of a liquid chromatography-tandem mass spectrometric method for the quantification of eight quinolones in bovine muscle, milk and aquacultured products. Analytica Chimica Acta. (2005).

HUANG, Z., HUANG, H., RUXIU, C., YUN'E, Z. – Study on the fluorescence properties of some fluoroquinolones in various media. Wuhan University Journal of Natural Sciences vol. 2 3:353-358.

INE – Estadísticas Agrícolas. Instituto Nacional de Estadística, I.P. (2010).

JACKSON, L.; REYES, L.; CORDIÉS, M. – Quinolonas y terapia antimicrobiana. Acta Medica. 58-65 (1998).

JACOBY, G – Mechanisms of Resistance to Quinolones. Supplement Article. (2013).

JENKINS, M.; YOUNG, M. – Determination of Fluoroquinolone Residues in Bovine Kidney Using SPE and LC/MS/MS. Waters. (2003).

YORKE, J.; FROC, P. – Quantification of nine quinolones in chicken tissues by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. *Journal of Chromatography A*. 882 (2002) 63-77.

LEHTOPOLKU, M. – Antimicrobial Resistance in *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. University of Turku. (2011).

KOWALSKI, C.; ROLINSKI, Z.; SLAWIK, T.; GLÓLD, B. – Determination of Norfloxacin in Chicken Tissues by HPLC with Fluorescence Detection. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*. Vol. 28. 121-135. (2005).

MACHADO, J.; OLIVEIRA, A.; ANTONIO, N.; CANESINI, R.; ROCHA, J.; NEGRI, D. – Quinolonas: Revisão de Literatura. *Revista Científica de Medicina Veterinária*. Nº 12 (2009). ISSN: 1679-7353.

MACNEIL, J.D., ELLIS, R.L. – Regulatory overview of antibiotic use in food-producing animals in North of America and current methods of detection and analysis. *Journal of the Association of Official Analytical Chemistry International* 1:2-29 (1995).

MARNI, S.; MUSTAFA, M.; MARZURA, R. – Analysis of Quinolones in Poultry Muscles Using Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry. *Malaysian Journal of Veterinary Research*. Vol. 2, nº1: 1-15. (2011).

MINARINI, L. – Estudo dos mecanismos de resistência às quinolonas em enterobactérias isoladas em alguns estados brasileiros. Ribeirão Preto: (2008).

NAVRÁTILOVA, P.; BORKOVCOVÁ, I.; VYHNÁLKOVÁ, J.; VOKLOVÁ, L. – Fluoroquinolone Residues in Raw Cow's Milk. *Czech J. Food Sci.* Vol. 29, nº6: 641-646. (2011).

Observatório dos Mercados Agrícolas e das Importações Agro-alimentares – Evolução da Balança de Pagamento do Setor das Carnes. (2010)

OVANDO,H.; GORLA,N.; BIOL,DR.; WEYERS,A.; UGNIA,V.; MAGNOLI,V. – Simultaneous quantification of ciprofloxacin, enrofloxacin and balofloxacin in broiler chicken muscle. Vet. XXXVI, N°1. Argentina: Facultad de Agronomía y Veterinaria, Universidad Nacional de Río Cuarto, (2004).

OVANDO, H.; GORLA, N.; WEYERS, A.; UGNIA, L.; MARTINEZ, L.; GIACOMELLI, N.; LIBOA, R.; CHIOSTRI, E.; DAVICINO, R. – Enrofloxacin Liquid-Liquid Extraction from Chicken Muscle and HPLC Detection. Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies. 23 (15), 2391-2397. (2007).

PISTOS, C.; TSANTILI-KALOULIDOU, A.; KOUPPARIS, M. – Investigation of the relation/pH profile of zwitterionic fluoroquinolones in reversed-phase and ion-interaction high performance liquid chromatography. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Chromatography 13:279-285. (2005)

PENA, A.; SILVA, L.; PEREIRA, A.; MEISEL, L.; LINO, C. – Determination of Fluoroquinolone residues in poultry muscle in Portugal. Anal Bioanal Chem. 397:2615-2621. (2010).

Pfizer – Uso prudente de antimicrobianos. Pfizer. (2007).

PEREIRA, A. – Determinação de Resíduos de Fluoroquinolonas em Amostras de Tecido Muscular de Frangos e Respetivo Impacto na Saúde Humana. Coimbra, Universidade de Coimbra, Faculdade de Medicina. Tese de Mestrado. 2009.

PIKKEMAAT, M. – Microbial screening methods for detection of antibiotic residues in slaughter animals. Anal Bioanal Chem. 395:893-905. (2009).

PRICE,L.; JONHSON,E.; VAILES,R.; SILBERGELD,E. – Fluoroquinolone-Resistant Campylobacter Isolates from Conventional and Antibiotic-Free Products. Vol.113, N°5. Environmental Health Perspectives, (2005).

RANDALL, L.; COOLES, S.; COLDHAM, N.; STAPLETON, K.; PIDDOCK, L.; WOODWARD, M. – Modification of Enrofloxacin Treatment Regimens for Poultry

Experimentally Infected with *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium DT104 To Minimize Selection of Resistance. *Antimicrobial Agents And Chemoterapy*. Vol. 50, nº 12 (2006).

Regulamento (CEE) Nº 2377/90, 1990, Legislação Comunitária.

Regulamento (UE) Nº 37/2010, 2010, Jornal Oficial da União UEuropeia L 15/I.

RIBANI, M.; JARDIM, C.; MELO, L. – Validação em Métodos Cromatográficos e Electroforéticos. Revisão. *Química Nova*. Vol. 27, nº 5, 771-780. (2004).

RODRIGUEZ, S.C. – La amenaza de la resistencia microbiana. Madrid: Instituto de Salud Carlos III. (1998)

SALEHZADEH,F.; SALEHZADEH,A.; ROKNI,N.; MADANI,R.; GOLCHINEFAR,F. – Enrofloxacin in Chicken Tissues Tehran Slaughterhouses in Iran. *Pakistan Journal of Nutrition*. Vol. 6 (4) (2007).

SAMANIDOU, V.; CHRISTODOULOU, E.; PAPADOYANNIS, L. – Determination of fluoroquinolones in edible animal tissue samples by high performance liquid chromatography after solid phase extraction. Grécia: Laboratory of Analytical Chemistry Department of Chemistry, Aristotle University of Thessaloniki, (2004).

SCHNEIDER, M. – Multiresidue Analysis of Fluoroquinolone Antibiotics in Chicken Tissue Using Automated Microdialysis-Liquid Chromatography. *Journal of Chromatography Science*. Vol. 39. (2001).

SHARMA, P., ANKIT, J., SANDEEP, J. – Fluoroquinolone antibacterials: a review on chemistry, microbiology and therapUetic prospects. *Polish PharmacUetical Society*. Vol.66 Nº 6 pp. 587-604. (2009)

SHIM, J.; SHEN, J.; KIM, M.; LEE, C.; KIM, I. – Determination of the Fluoroquinolone Enrofloxacin in Edible Chiken Muscle by Supercritical Fluid Extraction and Liquid Chromatography with Fluorescence Detection. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. (2003).

SIGMA – Guide to Phase Extraction. Sigma-Aldrich Co. (1998).

SIMÕES,A. – Avaliação da Contaminação por *Campylobacter* spp. Em peitos de frango embalados em atmosfera protetora e em superfícies do ambiente fabril. (2010). Dissertação do Mestrado em Segurança Alimentar.

SONG, C., RYU, H., PARK, J., KO, T. – Mechanism of DNA Gyrase inhibition by quinolonas: I. Spectral analysis for nalidíxíc acid polymorphism. Korean Chemist Society 20(6): 727-730 (1999).

SOUZA,A. – Alternativas ao Uso de Promotores de Crescimento em Avicultura. Poli-Nutri: Nutrição Animal. (2007).

SOUZA,M. – Resíduos de antibióticos em carne bovina. Goiânia, (2012).

SOUZA,R.; MAGNANI,N.; OLIVEIRA,T. - Mecanismos de Resistência às quinolonas em *Salmonella* spp..V.31,nº2, p.413-428, Abr/Jun. (2010).

STOILLOVA, N.; PETKOVA. – Developing and Validation of Method for Detection of Quinolone Residues in Poultry Meat. Trakia Journal of Sciences. Vol.8, nº1, 64-69. (2010).

SU,S.; CHANG,M.; CHANG,C.; CHANG,P.; CHOU,S. – Simultaneous Determination of Quinolones in Livestock and Marine Products by High Performance Liquid Chromatography. Journal Food and Drugs Analysis. Vol.11, N°2 (2003) p.114-127.

TINGYUE, G. – Liquid-Liquid Partitioning Methods for Bioseparations. In: AHUJA, A. The Handbook of Bioseparations. New York: Academic Press, 2000. 329-364.

TOLDRÁ,F.; REIG,M. – Methods for rapid detection of chemical and veterinary drug residues in animal foods. Valência: Department of Food Science, Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos, (2006).

TORTORICE,K.; GOETZ,M. – Drug class Review: Fluoroquinolones . (2003).

VENTRIGLIA,M.; VIVES,E.; MEDVEDOVSKY,D.; ROTHLIN,R. – Farmacología II: Quinolonas. (2003).

VICENTE,A. – Estudo da Susceptibilidade de *Campylobacter spp.* aos Macrólidos e às Fluoroquinolonas em Estirpes Isoladas em Hospitais Portugueses. (2009). Dissertação.

WEBTLAND, M.P. – Quinolone antimicrobial agents ed2. American Society for Microbiology XIII-XIV. (1993).

WHO – Impact of antimicrobial growth promoter termination in Denmark. WHO/CDS/CPE7ZFK/2003.1. (2003).

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

WOODWARD, K.N., SHEARER, G. – Antibiotic used 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 (1995).

ZHAO, S.; JIANG, S.; DING, S.; LI, X.; WANG, G.; LI, C.; SHEN, J. – A reliable LC Method with Fluorescence Detection for Quantification of (Fluoro)quinolone Residues in Chicken Muscle. Chromatographia. Vol.65, nº9/10 539-544. (2007).

