



UNIVERSIDADE D  
COIMBRA

Vanessa dos Santos Azevedo

**MONITORIZAÇÃO DE COCCIDIOSTÁTICOS EM  
MÚSCULO DE AVES**

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

Junho de 2020

# AGRADECIMENTOS

Todas as palavras são poucas.

Agradeço do fundo do coração à minha família por me ter proporcionado mais um momento académico. Aos meus pais, cujo apoio foi indescritível e que nunca desistiram de mim. À minha irmã, por toda a ajuda e carinho que me proporcionou ao longo destes anos e por todo o apoio.

Ao meu namorado e melhor amigo, por me apoiar em todos os meus momentos, incentivar-me a ser mais e melhor, e por fazer de mim uma pessoa mais feliz e completa.

À Professora Doutora Angelina Pena e à Professora Doutora Liliana Silva, pela orientação, apoio e disponibilidade que sempre dispuseram na realização desta dissertação.

Agradeço à minha instituição, Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra não só por ter permitido concluir uma das maiores loucuras da minha vida, mas por me ter proporcionado cinco anos que jamais esquecerei.

A todos os professores que ao longo destes anos me ajudaram e incentivaram.

A todos aqueles que, não estando aqui mencionados, de alguma forma me apoiaram na realização deste mestrado.

# ABREVIATURAS, ACRÓNIMOS, SIGLAS E SÍMBOLOS

**ADI** – Dose diária aceitável

**ASAE** – Autoridade de Segurança Alimentar e Económica

**CE** – Comissão Europeia

**CC $\alpha$**  – Limite de decisão

**CC $\beta$**  – Capacidade de detecção

**DGAV** – Direção Geral de Alimentação e Veterinária

**DHP** – 4,6-dimetil-2-hidroxipirimidina

**DNC** – 4,4 -Dinitrocarbanilide

**EC** – Energias de Colisão

**EDI** – Ingestão diária estimada

**EFSA** – Autoridade Europeia para a Segurança dos Alimentos

**ELISA** – *Enzyme-linked immunosorbent assay*

**EM** – Estado de Membro

**EMA** – Agência Europeia do Medicamento (*European Medicines Agency*)

**ESI** – Ionização por *electrospray* (*Electrospray ionization*)

**ESI (-)** – Ionização por *electrospray* em modo negativo (*Electrospray ionization- negative mode*)

**ESI (+)** – Ionização por *electrospray* em modo positivo (*Electrospray ionization- positive mode*)

**FAO** – Organização da Alimentação e da Agricultura (*Food and Agriculture Organization*)

**FCIA** – Imunoensaio baseado em citometria de fluxo (*Flow cytometry-based immunoassay*)

**FEEDAP** – Painel dos Aditivos e Produtos ou Substâncias Usadas na Alimentação Animal

**FS** – Factor de segurança

**HILIC-MS/MS** – *Hydrophilic interaction liquid chromatography–tandem mass spectrometry*

**HPLC** – Cromatografia Líquida de Alta Performance (*High Performance Liquid Chromatography*)

**HPLC-FD** – Cromatografia Líquida de Alta Performance com Detecção por Fluorescência (*High Performance Liquid Chromatography – Detection with fluorescence*)

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

**HPLC-UV** – Cromatografia Líquida de Alta Performance com Detecção por Ultravioleta (*High Performance Liquid Chromatography – Ultraviolet*)

**IgG** – Imunoglobulina G

**IS** – Intervalo de Segurança

**JECFA** – Comité Conjunto FAO/OMS Especialista em Aditivos Alimentares

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

**LC-MS** – Cromatografia Líquida acoplada a Espectrometria de Massa (*Liquid chromatography – mass spectrometry*)

**LC-MS/MS** – Cromatografia Líquida acoplada a Espectrometria Massa sequencial (*Liquid chromatography tandem mass spectrometry*)

**LMRs** – Limites Máximos de Resíduo

**LOAEL** – Nível de efeito observável mais baixo

**LOD** – Limite de detecção

**LOQ** – Limite de quantificação

**MRM** – Monitorização de reacção múltipla (*Multiple Reaction Monitoring*)

**NOAEL** – Nível de efeito adverso não observável

**NOEL** – Nível de efeito não observado

**OMS** – Organização Mundial de Saúde

**ONU** – Organização das Nações Unidas

**PNCR** – Plano Nacional de Controlo de Resíduos

**RASFF** – Sistema de Alerta Rápido para Alimentos e Rações

**RSD** – *Relative Standard deviation*

**SPE** – Extracção em Fase Sólida (*Solid Phase Extraction*)

**SUPRAS** – Solventes supra-moleculares

**UE** – União Europeia

# RESUMO

A coccidiose, uma parasitose causada por protozoários do género *Eimeria* que pode levar à morte dos animais, constituindo uma grande ameaça para a indústria avícola global. Com o objectivo de diminuir as perdas e assegurar a saúde e o bem-estar dos animais são amplamente utilizados coccidiostáticos de forma profilática na indústria avícola no controlo deste tipo de infeções. Na União Europeia (UE), os coccidiostáticos estão autorizados principalmente como aditivos na alimentação animal, sendo extensivamente utilizados em espécies de criação intensiva, como aves e porcos. De acordo com a legislação europeia foram estabelecidos limites máximos de resíduos (LMRs) para todos os géneros alimentícios de origem animal, de forma a garantir um nível mais elevado de protecção da saúde humana.

Neste contexto este estudo teve como objectivo a monitorização de resíduos de coccidiostáticos em amostras de aves colhidas nas regiões norte e centro de Portugal Continental. Foi desenvolvida uma metodologia analítica inovadora simples, rápida, exacta e precisa, para a determinação de nove coccidiostáticos recorrendo à cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa sequencial (LC-MS/MS), devido à sua versatilidade e especificidade.

Contrariamente ao esperado, as amostras caseiras apresentaram uma contaminação maior relativamente às amostras adquiridas nos supermercados, com uma frequência de detecção de 47,1% e 10% respectivamente. A narasina e o lasalocida foram os coccidiostáticos que apresentaram maior frequência de detecção, e a halofuginona foi o único composto detectado em teores violativos em 2 amostras apresentando o maior risco para todas as faixas etárias.

Este estudo demonstra uma maior frequência de detecção dos compostos iónoforos no músculo de aves em comparação com os compostos sintéticos, pelo que podemos inferir uma maior utilização deste tipo de coccidiostáticos como aditivos nas rações.

**Palavras-Chave:** Coccidiose, coccidiostáticos, frango, peru, caseiras, supermercado, LC-MS/MS, ingestão diária estimada (EDI), risco.

# ABSTRACT

Coccidiosis, a parasitosis caused by protozoa of the genus *Eimeria* that can lead to the death of animals, constitutes a major threat to the global poultry industry. In order to reduce losses and ensure the health and welfare of animals, coccidiostats are widely used prophylactically in the poultry industry to control this type of infection. In the European Union (EU), coccidiostats are authorized primarily as additives for animal feed and are widely used in farmed species such as birds and pigs. In agreement with European legislation, maximum residue limits (MRLs) were established for all foodstuffs of animal origin, in order to guarantee a higher level of protection of human health.

In this context, this study aimed to monitor coccidiostatic residues in samples of birds collected in north and center of Portugal. A simple, fast, accurate and precise innovative analytical methodology was developed for the determination of nine coccidiostats using liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry (LC-MS / MS), due to its versatility and specificity.

Contrary to expectations, home samples showed greater contamination compared to samples purchased in supermarkets, with a detection frequency of 47.1% and 10% respectively. Narasin and lasalocid were the coccidiostats that had the highest detection frequency, and halofuginone was the only compound detected in violative levels in 2 samples presenting the highest risk for each age group.

This study demonstrates a higher frequency of detection of ionophore compounds in poultry muscle compared to synthetic compounds, so we can conclude a greater use of this type of coccidiostats as feed additives.

**Keywords:** Coccidiosis, coccidiostats, poultry, turkey, homemade, supermarket, LC-MS/MS, estimated daily intake (EDI), risk.

# OBJECTIVOS

A contaminação dos géneros alimentícios de origem animal com resíduos de coccidiostáticos constitui uma preocupação de saúde pública a nível mundial. Consequentemente, e de forma a garantir a Segurança Alimentar é necessário proceder ao controlo contínuo de acordo com a legislação europeia em vigor.

Este projeto de dissertação teve como principal objetivo o desenvolvimento de uma metodologia analítica simples, exacta e precisa para a detecção e quantificação por LC-MS/MS de resíduos de monensina, maduramicina, halofuginona, lasalocida, narasina, salinomicina, robenidina, decoquinato e diclazuril, permitidos na União Europeia (UE) como aditivos na alimentação animal, em amostras de tecido muscular de aves.

Para avaliar a ocorrência de coccidiostáticos em aves de consumo e o cumprimento dos limites legais estabelecidos procedeu-se à recolha de amostras de frangos e perus, de produção caseira e à venda em grandes superfícies comerciais, na região norte e centro de Portugal continental.

Foi realizada a avaliação do risco para todos os coccidiostáticos em estudo calculando a dose diária estimada (EDI), tanto para a média de consumo, como para os que apresentam um maior consumo, permitindo calcular o pior cenário e avaliar o risco dos resíduos destas substâncias para a saúde humana.

Os resultados obtidos neste estudo foram comparados com outros publicados na literatura científica e com os resultados do PNCR na avaliação do cumprimento da sua correcta utilização e do risco para a saúde humana.

# ÍNDICE

AGRADECIMENTOS .....	I
ABREVIATURAS, ACRÓNIMOS, SIGLAS E SÍMBOLOS.....	II
RESUMO.....	IV
ABSTRACT .....	V
OBJECTIVOS.....	VI
ÍNDICE DE GRÁFICOS.....	IX
ÍNDICE DE TABELAS .....	X

## I. Capítulo Introdução Teórica

INTRODUÇÃO.....	2
1. Coccidiose.....	5
2. Coccidiostáticos .....	7
2.1 Caracterização química dos coccidiostáticos.....	7
2.2 Utilização dos coccidiostáticos.....	10
2.2.1 Aditivos alimentares e Medicamentos Veterinários .....	10
2.2.2 Vacinas.....	11
2.3 Alternativas ao uso dos coccidiostáticos .....	12
2.4 Toxicidade .....	13
2.4.1 Resistência aos coccidiostáticos.....	15
3. Legislação Europeia.....	16
4. Metodologias analíticas.....	22
4.1 Preparação da amostra e extracção .....	22
4.1.1 Métodos de triagem.....	23
4.1.2 Métodos cromatográficos.....	25

## II. Capítulo Parte Experimental

1. Material e Métodos.....	31
1.1 Equipamento e material.....	31
1.2 Reagentes e padrões .....	31
1.3 Soluções padrão .....	31
1.4 Metodologia analítica.....	32
1.4.1 Amostragem e conservação da amostra.....	32
1.4.2 Preparação e extracção das amostras .....	32
1.4.3 Deteção e quantificação por LC-MS/MS .....	33
2. Resultados e Discussão .....	35
2.1 Validação da metodologia analítica .....	35

2.1.1	Linearidade .....	36
2.1.2	Efeito matriz.....	36
2.1.3	Limite de detecção (LOD) e limite de quantificação (LOQ) .....	36
2.1.4	Exatidão e Precisão .....	37
2.2	Frequência e Ocorrência .....	38
2.2.1	Frequência .....	41
2.2.2	Ocorrência .....	42
2.2.3	Comparação com outros estudos .....	44
2.3	Avaliação de Risco .....	46
CONCLUSÃO .....		51
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....		53

# ÍNDICE DE GRÁFICOS

<b>Gráfico 1</b> - Produção mundial de carne de frango, peru e ovos em comparação com o crescimento da população mundial, ao longo dos anos. ....	3
<b>Gráfico 2</b> - Produção em Portugal de carne de frango, peru e ovos em comparação com o crescimento da população em Portugal, ao longo dos anos.....	3
<b>Gráfico 3</b> - Incidência de cada coccidioso em amostras caseiras e de supermercado.....	41
<b>Gráfico 4</b> - Número de coccidiosos por amostra. ....	43
<b>Gráfico 5</b> - Consumo humano de carne de animais de capoeira (t) fornecido pelo Instituto Nacional de Estatística.....	50

# ÍNDICE DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> - Espécies de <i>Eimeria</i> mais importantes nos diferentes hospedeiros.....	5
<b>Tabela 2</b> - Características das espécies de <i>Eimeria</i> em Frangos. (Peek, 2010).....	7
<b>Tabela 3</b> - Características das espécies de <i>Eimeria</i> em Perus. (Peek, 2010) .....	7
<b>Tabela 4</b> - Estrutura química dos coccidiostáticos .....	8
<b>Tabela 5</b> - Limites máximos de resíduo e intervalo de segurança para cada composto, espécie e tecidos edíveis de acordo com o regulamento 2377/1990 revogado pelo regulamento 470/2009. E de acordo com os limites estabelecidos pelos Reg. 124/2009 e 610/2012. (European Union, 2020)(Comissão das Comunidades Europeias, 2009)(Comissão Europeia, 2012).....	18
<b>Tabela 6</b> - Métodos de determinação e ocorrência de coccidiostáticos. ....	28
<b>Tabela 7</b> - Fragmentos iônicos, modo de ionização e energias de colisão mais favoráveis para cada um dos compostos. ....	34
<b>Tabela 8</b> - Parâmetros otimizados para a fonte de ionização.....	34
<b>Tabela 9</b> - Condições cromatográficas. ....	35
<b>Tabela 10</b> - Coeficiente de correlação ( $R^2$ ), efeito matriz, limites de detecção e quantificação. ....	37
<b>Tabela 11</b> - Exatidão (%), Repetibilidade intra e inter-dia (desvio padrão relativo - RSD) (%). ....	38
<b>Tabela 12</b> - Frequência (%), intervalo ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ ) e média ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ ) dos coccidiostáticos ionóforos estudados.....	39
<b>Tabela 13</b> - Frequência (%), intervalo ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ ) e média ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ ) dos coccidiostáticos sintéticos estudados.....	40
<b>Tabela 14</b> - Frequência (%) e níveis ( $\mu\text{g/kg}$ ) de coccidiostáticos em carnes brancas reportados na literatura científica.....	46
<b>Tabela 15</b> - Comparação da ADI e EDI ( $\text{mg/kg}$ peso por dia), usando as abordagens de consumo médio e pior cenário (wcs) de consumo, para o total dos coccidiostáticos, selecionados para as diferentes populações.....	48

# **I. Capítulo**

## **Introdução Teórica**

# INTRODUÇÃO

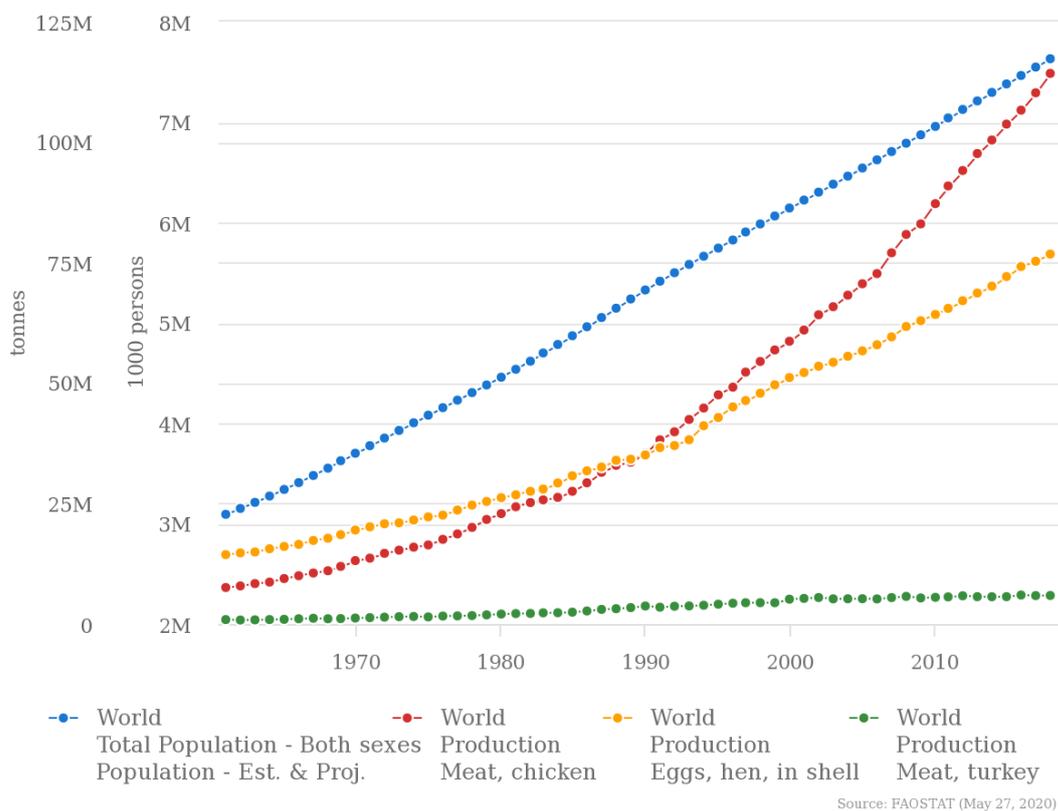
A Organização das Nações Unidas (ONU) prevê um aumento significativo do crescimento da população mundial, de 7,7 mil milhões chegará aos 11 mil milhões até o final do século 21 (United Nations, 2019).

Perante este crescimento demográfico, a FAO (Food and Agriculture Organization) prevê um incremento na procura de alimentos de 70% até 2050, o que irá favorecer inevitavelmente a expansão da cadeia de produção alimentar intensiva, com um subsequente aumento do consumo de carne.

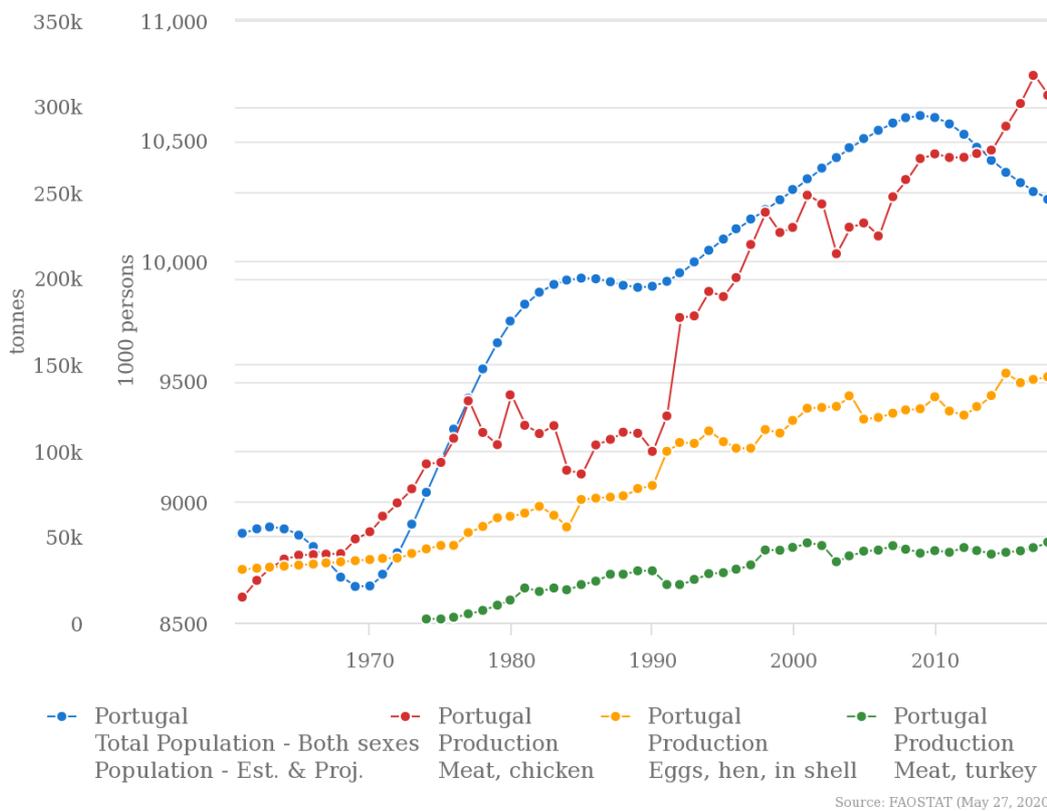
Temos de estar conscientes dos novos desafios alimentares e dos riscos para a saúde dos consumidores decorrentes do crescimento demográfico e da globalização.

Na protecção da saúde humana, a União Europeia (UE) elaborou um quadro legislativo global em matéria de segurança alimentar, que tem sido objecto de atenção constante e adaptado em função das novas realidades que surgem a cada dia.

A avicultura é um dos subsectores da agropecuária que mais contribui para a alimentação global. De acordo com a FAO, a produção mundial de carne de frango subiu de 7,6 para 114 milhões de toneladas (Gráfico 1) entre 1961 e 2018 e a produção de ovos subiu de 14 para 77 milhões de toneladas (Gráfico 1). Em 2017, a carne de frango representou cerca de 37% da produção global de carne como consequência da maior valorização nutricional da carne de aves (Food and Agriculture Organization of the United Nations, [s.d.]).



**Gráfico 1** - Produção mundial de carne de frango, peru e ovos em comparação com o crescimento da população mundial, ao longo dos anos.



**Gráfico 2** - Produção em Portugal de carne de frango, peru e ovos em comparação com o crescimento da população em Portugal, ao longo dos anos.

Como podemos verificar no gráfico 2 o crescimento populacional, em Portugal, favoreceu principalmente a expansão da cadeia produtiva de carne de frango em comparação com a produção de carne de peru e ovos. Entre 1990 e 1992 verificou-se um aumento exponencial na produção de carne de frango, de 77 803 toneladas. Apesar da diminuição do crescimento demográfico verificado a partir de 2009 pode-se constatar que a produção de carne de frango e ovos, em Portugal, continua a crescer.

De acordo com a Balança Alimentar Portuguesa, em 2016, o consumo anual per capita de carne de animais de capoeira e de ovos foi de respectivamente 31,1 kg de frango e 167 ovos (INE (Instituto Nacional de Estatística), 2017).

O sector pecuário de produção de carne de aves respondeu ao aumento da procura através da intensificação dos sistemas de produção de frangos, o que envolve o aumento da escala de produção e o uso de novas tecnologias. Uma das consequências negativas do aumento da produção intensiva, é o aumento na prevalência das chamadas "doenças de produção" que normalmente resultam de uma interação complexa de microrganismos patogénicos, da genética animal e do meio ambiente. Estas doenças, maioritariamente endémicas, tornam-se ainda mais problemáticas nos sistemas intensivos de produção podendo comprometer a saúde e o bem-estar animal, diminuir a produção e aumentar a pegada ecológica (Jones *et al.*, 2019).

Entre muitas doenças que afetam as aves em todo o mundo, a coccidiose, uma parasitose causada por protozoários do género *Eimeria*, está associada a uma elevada percentagem de mortalidade na indústria avícola global (Quiroz-castañeda e Dantán-gonzález, 2015). A infecção é caracterizada por diarreia com sangue, febre, perda de peso, desidratação e morte, dependente da gravidade da infecção (Matus e Boison, 2019).

Na produção intensiva de aves, devido à contaminação facilitada entre os animais a coccidiose conduz a grandes perdas económicas pelo que é imperativo actuar na prevenção e no tratamento da doença. A título de exemplo, em 2013, a coccidiose não controlada causou perdas de 0,21€ por ave, quando o lucro de uma avicultura na UE é de 0,10€ por ave, o que conduziu a grandes prejuízos (Jones *et al.*, 2019).

A UE enquanto maior exportador e importador agrícola do mundo, assume uma crescente responsabilidade, pela segurança alimentar a nível mundial. Na UE estão autorizados onze coccidiostáticos, como aditivos em alimentos para animais, particularmente para espécies criadas intensivamente, como aves e porcos (Clarke *et al.*, 2013), podendo também serem utilizados como medicamento veterinário.

No âmbito da segurança alimentar e das políticas comunitárias para defesa dos consumidores e da Saúde Pública e para cumprimento dos planos de monitorização de resíduos nos Estados-membros da UE, é obrigatório o controlo dos coccidiostáticos em aves, para aferir a extensão da sua utilização na produção destes animais e para avaliar o risco para a saúde humana.

## I. Coccidiose

A *Eimeria* é um parasita protozoário apicomplexa intracelular obrigatório, que pertence à família Eimeriidae. A doença clínica depende da dose ingerida de oocistos esporulados, assim como da susceptibilidade do hospedeiro. Os diferentes estágios de *Eimeria spp.* invadem as células do intestino e do duodeno (enterócitos) e replicam-se, resultando em alterações patológicas variáveis. Estas alterações vão desde a destruição local da barreira mucosa e do tecido subjacente, até efeitos sistémicos, como perda de sangue e morte. Coletivamente, estes sintomas estão associados a uma redução na produção de ovos, a um crescimento das aves prejudicado devido a uma má absorção de nutrientes, à enterite necrótica por *Clostridium perfringens* e ao aumento da mortalidade, especialmente em hospedeiros jovens. A Tabela I agrupa as diferentes espécies de *Eimeria* de acordo com os seus hospedeiros, e entre cada grupo da espécie mais virulenta à menos virulenta (Ahmad, El-Sayed e El-Sayed, 2016).

**Tabela I** - Espécies de *Eimeria* mais importantes nos diferentes hospedeiros.

Hospedeiro	<i>Eimeria spp.</i>	Referências
Frangos	<i>E. acervulina</i> , <i>E. brunetti</i> , <i>E. necatrix</i> , <i>E. tenella</i> , <i>E. maxima</i> , <i>E. mitis</i> , <i>E. praecox</i>	(Barbour et al., 2015; Fatoba e Adeleke, 2018)
Perus	<i>E. adenoids</i> , <i>E. meleagrimitis</i> , <i>E. dispersa</i> , <i>E. gallopavonis</i> , <i>E. meleagridis</i> , <i>E. innocua</i> , <i>E. subrotunda</i>	(Chapman, 2008; El-Sherry et al., 2019)
Coelhos	<i>E. stiedae</i> , <i>E. flavescens</i> , <i>E. intestinalis</i>	(Ahmad, El-Sayed e El-Sayed, 2016)
Ovelhas	<i>E. crandallis</i> , <i>E. ovinoidalis</i> , <i>E. faurei</i> , <i>E. granulosa</i> , <i>E. intricata</i> , <i>E. pallida</i> , <i>E. parva</i> , <i>E. weybridgensis</i>	(Ahmad, El-Sayed e El-Sayed, 2016)
Cabras	<i>E. arloingi</i> , <i>E. christenseni</i> , <i>E. caprina</i> , <i>E. hirci</i> , <i>E. ninakohlyakimovae</i> , <i>E. alijeji</i> , <i>E. spheronica</i> , <i>E. caprovina</i> , <i>E. hirci</i>	(Ahmad, El-Sayed e El-Sayed, 2016)
Porcos	<i>E. deblickei</i> , <i>E. polita</i> , <i>E. scabra</i> , <i>E. spinosa</i> , <i>E. porci</i> , <i>E. neodeblickei</i> , <i>E. perminuta</i> , <i>E. suis</i>	(Ahmad, El-Sayed e El-Sayed, 2016)
Gansos	<i>E. anseris</i> , <i>E. kotlani</i> , <i>E. nocens</i> , <i>E. stigmosa</i> , <i>E. truncate</i>	(Peek, 2010)
Patos	<i>E. anatis</i> , <i>E. battakhi</i> , <i>E. danailovi</i> , <i>E. saitamae</i> , <i>E. schachdagica</i>	(Peek, 2010)

Os oocistos não esporulados (não infetantes) são excretados e sofrem esporulação na presença de humidade, calor e oxigénio, tornando-se em oocistos esporulados (infetantes) (Quiroz-castañeda e Dantán-gonzález, 2015). A infecção de aves por *Eimeria spp.* começa quando o hospedeiro ingere os oocistos esporulados que excitam no intestino e cada um liberta 8 esporozoítos. Quando se encontram livres no intestino, os esporozoítos penetram rapidamente no enterócito do hospedeiro, encapsulam dentro de um vacúolo e replicam-se. Os merozoítos são então libertados em grande número, rompem a célula hospedeira e invadem novos enterócitos. O parasita tanto pode reinadir a célula, como danificar o intestino provocando manifestações graves. Após a última geração merogónica, os merozoítos invadem os enterócitos para se diferenciarem em gametócitos masculino e feminino. Após a fertilização, forma-se um oocisto revestido por uma membrana espessa. No exterior, esta célula inicia um processo de divisão interna, assexuada, designado por esporulação, de que resulta um número variável de células organizadas em esporozítos (Rodrigues, 2014).

O ciclo de vida curto, entre 4-6 dias, dependendo da espécie, e a produção abundante de oocistos esporulados aumenta a probabilidade de infeção de uma grande população de animais (Quiroz-castañeda e Dantán-gonzález, 2015). Além disso, a natureza resistente da parede do oocisto ajuda-o a proteger-se das condições externas e dos efeitos adversos dos desinfetantes químicos, garantindo assim sua sobrevivência a longo prazo no ambiente, favorecendo a sua disseminação, com conseqüente aumento das aves infetadas (Barbour *et al.*, 2015).

Nos frangos e nos perus, assim como nas outras espécies, a *Eimeria* desenvolve-se em zonas específicas do intestino apresentando diferentes graus de patogenicidade. Nas tabelas 2 e 3 indica-se, para cada espécie de *Eimeria* o local do intestino afectado e a respectiva patogenicidade (Barbour *et al.*, 2015; El-Sherry *et al.*, 2019; Fatoba e Adeleke, 2018).

**Tabela 2** - Características das espécies de *Eimeria* em Frangos. (Peek, 2010)

<b>Eimeria em Frangos</b>							
<b>Espécie</b>	<i>E. tenella</i>	<i>E. brunetti</i>	<i>E. maxima</i>	<i>E. necatrix</i>	<i>E. mitis</i>	<i>E. acervulina</i>	<i>E. praecox</i>
<b>Área Parasitada</b>							
<b>Local</b>	Ceco	Ceco e recto	Íleo e jejuno	Íleo e jejuno	Íleo	Duodeno	Ceco
<b>Patogenicidade</b>	Moderada a Severa	Moderada a Severa	Moderada a Severa	Moderada a Severa	Baixa	Moderada a Severa	Baixa

**Tabela 3** - Características das espécies de *Eimeria* em Perus. (Peek, 2010)

<b>Eimeria em Perus</b>							
<b>Espécie</b>	<i>E. adenoides</i>	<i>E. meleagrimitis</i>	<i>E. dispersa</i>	<i>E. meleagridis</i>	<i>E. gallopavonis</i>	<i>E. innocua</i>	<i>E. subrotunda</i>
<b>Área Parasitada</b>							
<b>Local</b>	Ceco	Íleo e jejuno	Intestino delgado	Íleo e jejuno	Recto	Duodeno	Duodeno
<b>Patogenicidade</b>	Severa	Moderada	Baixa	Não	Moderada	Não	Não

## 2. Coccidiostáticos

### 2.1 Caracterização química dos coccidiostáticos

Os coccidiostáticos utilizados na indústria avícola dividem-se em duas categorias, os compostos ionóforos e os compostos sintéticos. Geralmente, os ionóforos inibem o desenvolvimento do parasita, interferindo na passagem de iões através da membrana celular, afetando o equilíbrio osmótico, enquanto os compostos sintéticos exercem o seu efeito inibindo as diferentes vias bioquímicas do parasita (Quiroz-castañeda e Dantán-gonzález, 2015).

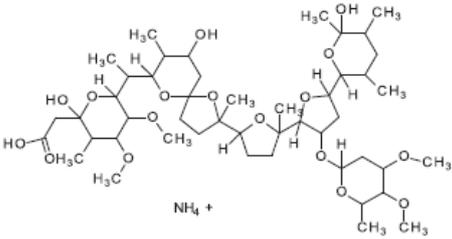
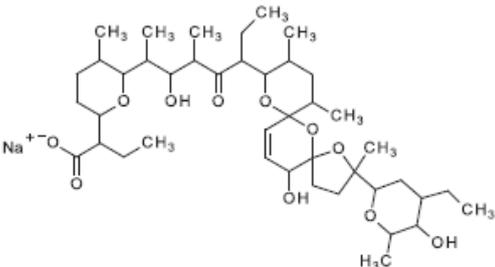
Os compostos monensina (1), salinomicina (2), narasina (3), lasalocida (4) e maduramicina (5) e semduramicina (6) são coccidiostáticos ionóforos, que podem ser classificados como: ionóforos monovalentes (monensina, narasina, salinomicina), ionóforos

glicosídicos monovalentes (maduramicina, semduramicina) e ionóforo divalente (lasalocida) (Noack, Chapman e Selzer, 2019).

Os coccidiostáticos ionóforos, são produzidos pela fermentação de *Streptomyces spp.* ou *Actinomadura spp.* (Noack, Chapman e Selzer, 2019). A estrutura química destes compostos consiste em vários éteres cíclicos, um grupo ácido carboxílico livre numa das extremidades da molécula e um grupo álcool na outra extremidade. São denominados antibióticos poliéteres e podem formar pseudomacroclicocomplexos com catiões alcalinos. São substâncias que apresentam afinidade com catiões tais como  $K^+$ ,  $Na^+$ ,  $Ca^{2+}$  e  $Mg^{2+}$ , servindo como veículo de transporte para estes iões através de membranas celulares, sendo esta a base da sua actividade biológica.

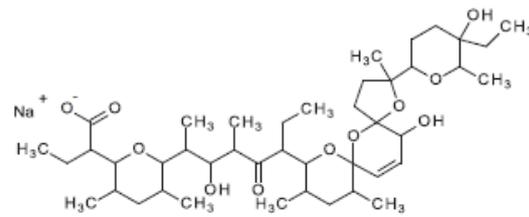
Os compostos robenidina (**7**) (grupo químico das guanidinas), halofuginona (**8**) (grupo químico das 4 quinazolinonas), diclazuril (**9**) (grupo químico dos benzeno-acetonitrilos), decoquinato (**10**) (grupo químico das quinolonas) e nicarbazina (**11**) (metabolitos: 4,6-dimetil-2-hidroxipirimidina (DHP) e 4,4 -dinitrocarbanilide (DNC)) são coccidiostáticos sintéticos. Estes compostos são produzidos por síntese química e apresentam um modo de ação específico. A sua classificação é realizada de acordo com o mecanismo de acção, sendo que o decoquinato inibe a respiração mitocondrial do parasita e o diclazuril, halofuginona, nicarbazina, robenidina apresentam um modo de acção desconhecida (Noack, Chapman e Selzer, 2019).

**Tabela 4 - Estrutura química dos coccidiostáticos**

Nome	Estrutura
Monesina (1)	
Salinomicina (2)	

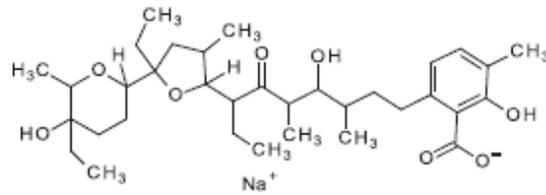
Narasina

(3)



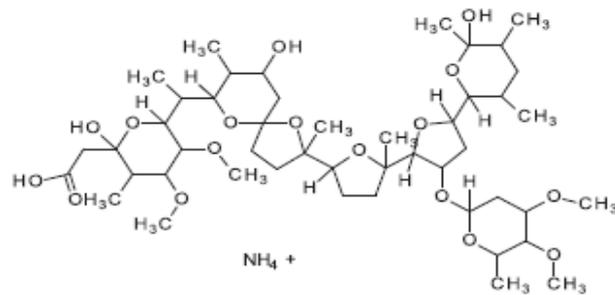
Lasalocida

(4)



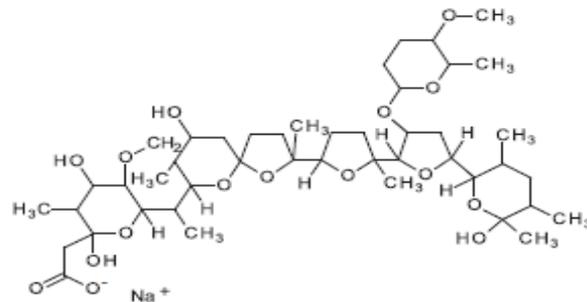
Maduramicina

(5)



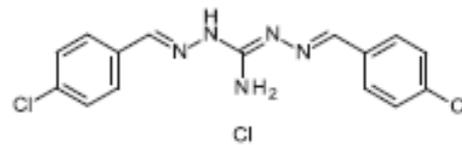
Semduramicina

(6)



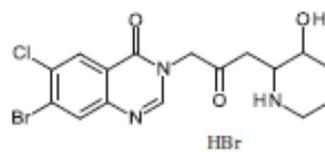
Robenidina

(7)



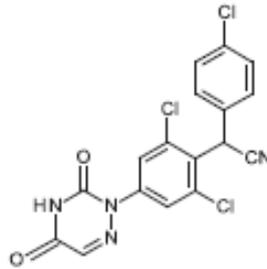
Halofuginona

(8)



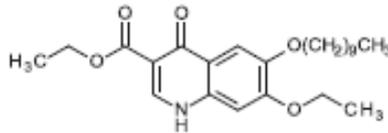
Diclazuril

(9)



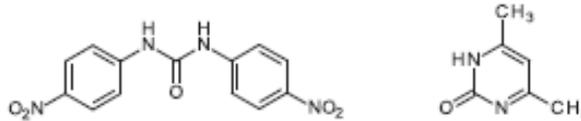
Decoquinato

(10)



Nicarbazina

(11)



## 2.2 Utilização dos coccidiostáticos

### 2.2.1 Aditivos alimentares e Medicamentos Veterinários

A coccidiose é considerada uma das principais doenças em aves de confinamento. Mesmo com o cumprimento de todas as normas sanitárias, as características da *Eimeria*, já referidas, impossibilitam a sua erradicação em todas as aves. Torna-se assim imperativo na indústria avícola intensiva a utilização profilática de coccidiostáticos na prevenção ou supressão da coccidiose, evitando deste modo perdas económicas e garantindo o bem-estar dos animais. No caso dos frangos de engorda e de modo a evitar uma reinfecção, através dos oocistos esporulados da *Eimeria*, são utilizados profilaticamente ao longo da vida do animal (Matus e Boison, 2019).

Os coccidiostáticos são substâncias que inibem de forma reversível o desenvolvimento de determinadas fases do ciclo de reprodução do parasita, e a retirada destes compostos pode levar à conclusão do ciclo e possivelmente ao reaparecimento de sinais clínicos, após a interrupção da medicação (CVMP (Committee for Medicinal Products for Veterinary Use), 2018).

Os coccidiostáticos sintéticos têm sido utilizados para o controlo da coccidiose desde o final da década de 1940. Com a descoberta dos coccidiostáticos ionóforos e a utilização da monensina na década de 1970, ocorreram grandes avanços no controlo da coccidiose (Kadykalo *et al.*, 2017).

De acordo com o Regulamento (CE) n.º 1831/2003 do Parlamento Europeu e do Conselho, de 22 de Setembro de 2003, estão autorizados na UE os coccidiostáticos ionóforos salinomicina, narasina, monensina, lasalocida, maduramicina e semduramicina e os coccidiostáticos químicos robenidina, decoquinato, halofuginona, nicarbazina e diclazuril como aditivos destinados à alimentação animal em espécies em que a coccidiose é mais frequente, como é o caso de aves, dos perus e dos coelhos (Parlamento Europeu e Conselho da União Europeia, 2003).

De acordo com o Regulamento (UE) n.º 37/2010 da Comissão de 22 de Dezembro de 2009, relativo à autorização dos medicamentos veterinários em espécies produtoras de géneros alimentícios, os coccidiostáticos também são utilizados como medicamentos veterinários em espécies em que o seu uso não é autorizado como aditivo, ou seja, para as espécies em que a coccidiose não é frequente (Comissão Europeia, 2010).

Alguns exemplos de coccidiostáticos utilizados como medicamentos veterinários são: o clopidol que inibe a respiração mitocondrial do parasita, à semelhança do decoquinato, as sulfonamidas que inibem a via do ácido fólico e o amprólio que inibe competitivamente a captação de tiamina (Noack, Chapman e Selzer, 2019).

### **2.2.2 Vacinas**

Durante décadas, a vacina tem sido usada para o controlo da coccidiose. Atualmente, são usados três tipos de vacinas: vacinas não atenuadas, atenuadas e recombinantes (Barbour *et al.*, 2015).

A vacinação anticoccidiana não atenuada utiliza parasitas vivos de *Eimeria* e oferece uma alternativa eficaz à quimioprofilaxia. A proteção imune é alcançada após a ingestão de doses controladas de oocistos. As primeiras vacinas anticoccidianas vivas, como Coccivac<sup>®</sup> e, mais recentemente, Immucox<sup>®</sup>, incluíram oocistos de *Eimeria* de tipo selvagem não modificado.

As vacinas não atenuadas são amplamente utilizadas a nível mundial e são eficazes na proteção contra o parasita (Blake *et al.*, 2017). Embora as vacinas não atenuadas possam ter muito sucesso, as infecções causadas por duas ou mais estirpes do parasita podem levar ao surgimento de novas estirpes não estudadas e muito resistentes, o que leva à ocorrência de novos surtos. A atenuação do parasita parece superar este inconveniente (Ahmad, El-Sayed e El-Sayed, 2016).

A virulência da vacina anticoccidiana atenuada é geralmente reduzida devido à selecção de isolados de *Eimeria* mais precoces, ou seja, isolados que não apresentam um ciclo de vida completo em comparação com a estirpe *Eimeria* com ciclo de vida normal. Embora as vacinas anticoccidianas atenuadas ainda sejam muito utilizadas actualmente, o baixo grau de protecção imunológica exigiu que fosse complementada com adjuvantes, que consistem em diferentes citocinas, com o intuito de melhorar a imunidade (Fatoba e Adeleke, 2018; Quiroz-castañeda e Dantán-gonzález, 2015).

Como resultado surgiram as vacinas anticoccidianas recombinantes que utilizam antígenos das espécies de *Eimeria* que possuem propriedades imunogénicas para desencadear uma resposta imune eficaz (Barbour *et al.*, 2015). No entanto, a diversidade genética dos antígenos da vacina e a ineficiência da vacina para combater a co-infecção de espécies de *Eimeria* levou a várias modificações nas vacinas recombinantes, entre elas a criação de vacinas de DNA de epítomos multivalentes (Fatoba e Adeleke, 2018).

No futuro, as vacinas baseadas em DNA, poderão ser desenvolvidas para proteger contra a coccidiose e adoptarão a inclusão de genes específicos que codificam as proteínas imunogénicas (Barbour *et al.*, 2015).

Apenas existem duas vacinas aprovadas pela Agência Europeia do Medicamento (EMA) a Evant<sup>®</sup> e a Evalon<sup>®</sup>, estas vacinas não atenuadas são utilizadas para frangos. A Evalon<sup>®</sup> apresenta um período de imunidade superior à Evant<sup>®</sup> e ambas não apresentam qualquer contra-indicação.

### **2.3 Alternativas ao uso dos coccidiostáticos**

A pressão para a redução da utilização de medicamentos veterinários na cadeia alimentar levou à procura de estratégias alternativas para o controlo da coccidiose.

O uso de produtos naturais que incluem prebióticos e probióticos, extratos de plantas, extratos de fungos, óleos essenciais, entre outros, é uma alternativa. A maioria dos produtos naturais não visa especificamente o parasita, mas têm uma acção benéfica na microbiota intestinal e estimulam o sistema imunológico (Chapman *et al.*, 2013).

Os prebióticos e probióticos contribuem para restabelecer o equilíbrio da microbiota intestinal e promovem a resistência do sistema imunológico das aves contra infeções. A suplementação da alimentação animal com probióticos e prebióticos contribui para restabelecer o equilíbrio da microbiota intestinal, podendo excluir competitivamente bactérias

patogénicas secundárias à coccidiose, como *Clostridium perfringens* (Kadykalo et al., 2017). A co-administração de probióticos com a vacinação resulta num melhor desempenho em comparação à vacinação isolada (Barbour et al., 2015).

O uso de extratos de plantas e fungos, bem como óleos essenciais, é baseado no princípio da fitoterapia ou aromaterapia (Kadykalo et al., 2017), mas todos os produtos naturais têm de ser avaliados quanto à segurança e toxicidade antes da sua autorização de utilização (Chapman et al., 2013).

## **2.4 Toxicidade**

A avaliação da toxicidade de um medicamento veterinário é fundamental para o processo de avaliação do risco, conforme refere o artigo 3º do Regulamento (CE) n.º 178/2002 do Parlamento Europeu e do Conselho, de 28 de Janeiro de 2002, um dos pilares para a Segurança Alimentar (Parlamento Europeu e o Conselho da União Europeia, 2002).

O perfil toxicológico de cada coccidiostático baseia-se em mecanismos de ação moleculares. Relativamente aos ionóforos ocorre uma alteração no transporte de iões transmembranares. Em contraste com esse grupo bastante homogéneo, os compostos não ionóforos representam um grupo muito heterogéneo de compostos que, apesar de ter uma longa história como coccidiostáticos, nem todos os seus mecanismos de ação são ainda conhecidos (Dorne et al., 2013).

A presença de coccidiostáticos nos géneros alimentícios não pode colocar em causa a saúde do consumidor, e é necessário proceder à análise do risco para a saúde humana, através da realização de estudos farmacocinéticos e toxicológicos em animais de laboratório durante o procedimento de autorização de introdução no mercado.

O Regulamento (CEE) n.º 2377/90 do Conselho, de 26 de Junho de 1990, revogado pelo Regulamento (CE) n.º 470/2009 do Parlamento Europeu e do Conselho, de 6 de Maio de 2009 e pelo Regulamento (UE) n.º 37/2010 da Comissão de 22 de Dezembro de 2009, foi o primeiro a estabelecer os Limites Máximos de Resíduos (LMRs) (Comissão Europeia, 2010; Conselho das Comunidades Europeias, 1990; Parlamento Europeu e o Conselho da União Europeia, 2009). O Limite Máximo de Resíduos é entendido como a concentração máxima de resíduos resultantes da utilização de um medicamento veterinário, que não apresenta risco de toxicidade para a saúde humana, e que é aceite pela CE como legalmente autorizado.

O estabelecimento dos LMRs é calculado através dos valores da ingestão diária aceitável (ADI), ou seja, a quantidade de resíduos em tecidos edíveis que se pode consumir diariamente de forma segura, durante toda a vida, sem que haja algum risco para a saúde humana (European Medicines Agency, 2012). A ADI é calculada com base no valor de concentração mais elevado que não provoca efeitos adversos (NOEL) ou no valor da concentração mais baixa que provoca efeitos adversos, multiplicado por um factor de segurança (FS) ou por um factor de incerteza apropriado (Bacila *et al.*, 2017). No cálculo da ADI, considera-se que o peso médio de um ser humano é de 60kg, e é expressa em  $\mu\text{g}/\text{kg}$  ou  $\text{mg}/\text{kg}$ .

Para animais não-alvo, raramente há dados suficientes para permitir a identificação de NOAELs, portanto o nível de efeito observável mais baixo (LOAEL) é estimado a partir dos dados clínicos disponíveis e é usado para caracterizar o risco para cada animal não-alvo (Dorne *et al.*, 2013).

O cálculo dos LMRs é avaliado com base no padrão de consumo dos alimentos, na distribuição tecidual dos resíduos do medicamento, de forma a que os LMRs sejam proporcionais à concentração de resíduos reflectindo a sua cinética de depleção em cada tecido. Os estudos de depleção de resíduos facilitam a obtenção desta informação e permitem a identificação do tecido alvo e a selecção do resíduo marcador.

O desrespeito do intervalo de segurança (IS), intervalo obrigatório entre a administração do medicamento e o abate do mesmo para consumo humano estabelecido, durante a utilização de um medicamento veterinário, é uma das principais causas da presença de resíduos de medicamentos em géneros alimentícios de origem animal, e uma preocupação a nível da segurança alimentar a nível mundial (Dasenaki e Thomaidis, 2018).

A toxicidade crónica é a principal preocupação a nível da saúde humana, embora tenham sido reportados alguns casos de toxicidade aguda em humanos. A Autoridade Europeia para a Segurança dos Alimentos (EFSA) e o Comité Conjunto FAO/OMS Especialista em Aditivos Alimentares (JECFA) estabeleceram, com base em dados toxicológicos, ingestão diária aceitável (ADI) para todos os coccidiostáticos, em valores que variam entre 0,00003  $\text{mg} / \text{kg}$  de peso corporal / dia para halofuginona e 0,2  $\text{mg} / \text{kg}$  de peso corporal / dia para nicarbazina, dependendo da sua toxicidade (Roila *et al.*, 2019).

No âmbito do Plano Nacional de Controlo de Resíduos (PNCRs) cada estado membro (EM) da UE assegura a monitorização de todos os géneros alimentícios de origem animal

destinados ao consumo humano, de modo a dar cumprimento aos LMRs estabelecidos pela legislação europeia, na salvaguarda da saúde humana (Clarke *et al.*, 2014).

Em espécies não direcionadas, a identificação e caracterização do risco baseia-se em mecanismos básicos de toxicidade e em casos clínicos de intoxicação para identificar concentrações críticas para cada coccidiostático. A toxicidade verificada em espécies animais não-alvo está relacionada com: (1) consumo accidental de alimentos fortificados (na maioria dos casos destinados a aves de engorda) por outras espécies animais; (2) erros de mistura de alimentos ou ingestão de concentrados de pré-mistura com quantidades inseguras de ionóforos; (3) o uso *off label*, accidental ou intencional, que resulta em reações adversas em aves adultas (galinhas poedeiras), avestruzes, aves ornamentais e de caça, coelhos, camelos, veados, búfalos e seres humanos; e (4) interação medicamentosa com outros medicamentos veterinários (espécies-alvo e não-animais) (Dorne *et al.*, 2013).

A avaliação da segurança realizada pelo Painel dos Aditivos e Produtos ou Substâncias Usadas na Alimentação Animal (FEEDAP) abrange a inocuidade para os animais, consumidores e os utilizadores, bem como para o ambiente. No âmbito desta avaliação é também estudado o risco de resistência cruzada nos protozoários.

#### **2.4.1 Resistência aos coccidiostáticos**

Dada a ubiquidade da coccidiose é necessária, conforme referimos, a utilização profilática dos coccidiostáticos na produção intensiva de aves. A exposição continua a níveis baixos de coccidiostáticos aumenta a probabilidade de seleção de estirpes resistentes e o desenvolvimento de resistência dos protozoários responsáveis pela coccidiose aos medicamentos disponíveis, o que conduz à diminuição da sua eficácia (Dasenaki e Thomaidis, 2018).

Na produção intensiva de aves, o subsequente confinamento dos animais em espaços que não cumprem os estabelecidos pela legislação europeia, associado com más práticas de higiene e no não isolamento de animais infetados (Chang *et al.*, 2019) resulta num aumento de surtos de coccidiose (Matus e Boison, 2019). Estas situações de incumprimento da legislação durante a produção intensiva de aves, resultam num aumento da utilização de coccidiostáticos e consequentemente de casos de resistência parasitária aos coccidiostáticos.

Aproximadamente 45% da alimentação produzida anualmente na UE para aves e coelhos contém um coccidiostático como aditivo (Dorne *et al.*, 2013), aumentando para 53% no Canadá (Agunos *et al.*, 2017). No Reino Unido, em 2011 foram vendidos, para o controlo

da coccidiose, cerca de 277 toneladas de coccidiostáticos, em que mais de 70% pertenciam ao grupo dos ionóforos (Noack, Chapman e Selzer, 2019).

O uso extensivo e prolongado de coccidiostáticos levou a resistência parasitária contra todas moléculas disponíveis no mercado. Em alguns casos, a resistência foi induzida muito rapidamente, como no caso dos coccidiostáticos sintéticos. No caso dos ionóforos o desenvolvimento da resistência levou vários anos (Kadykalo *et al.*, 2017).

O desenvolvimento de resistência aos coccidiostáticos levou a esforços crescentes para a identificação de novos compostos capazes de exercer uma actividade anticoccidiana. Um exemplo é o nitromezuril, um novo coccidiostático que ainda se encontra em fase de avaliação para que possa entrar no mercado (Feia *et al.*, 2013; Noack, Chapman e Selzer, 2019).

Com o objectivo principal de controlar a coccidiose, e uma vez que nas últimas décadas não se verificou o desenvolvimento e a aprovação de novos medicamentos, (Noack, Chapman e Selzer, 2019), é fundamental garantir a utilização correcta dos coccidiostáticos e o cumprimento das normas europeias de produção intensiva nos aviários de grandes dimensões, com altas densidades de aves criadas em confinamento.

### **3. Legislação Europeia**

A autorização para o uso de coccidiostáticos para o controle da coccidiose em animais de criação é dada pela Diretiva 70/524/CEE, de 23 de novembro de 1990, com as alterações que lhe foram introduzidas pelo Regulamento (CE) n.º 1831/2003 do Parlamento Europeu e do Conselho, de 22 de Setembro de 2003, relativo aos aditivos destinados à alimentação animal (Comissão das Comunidades Europeias, 1990; Parlamento Europeu e Conselho da União Europeia, 2003).

O Regulamento (CE) n.º 1831/2003 cumpre os princípios estabelecidos pelo Regulamento (CE) n.º 178/2002 do Parlamento Europeu e do Conselho, de 28 de Janeiro de 2002, e constituiu um grande avanço no que diz respeito aos aditivos para a alimentação animal. Este diploma legal tem por objectivo *“estabelecer um procedimento comunitário para a autorização da colocação no mercado e do uso de aditivos para a alimentação animal, bem como definir regras para a supervisão e a rotulagem daqueles aditivos e de pré-misturas, a fim de constituir uma base para assegurar um elevado nível de protecção da saúde humana e animal, do bem-estar dos animais, do ambiente e dos interesses dos utilizadores e consumidores relativamente aos aditivos para a alimentação animal”*.

A EFSA (Autoridade Europeia para a Segurança dos Alimentos) avalia a segurança e emite pareceres científicos relativamente aos aditivos destinados à alimentação animal. As autorizações de introdução no mercado têm um tempo limitado, 10 anos. O requerente deve apresentar a identificação do aditivo, uma descrição do método de produção, fabrico e de análise para determinação de resíduos, assim como a utilização prevista para o aditivo e uma proposta de monitorização pós comercialização. No *dossier* de introdução no mercado o requerente também deve incluir todos os estudos efectuados sobre o aditivo. Para renovar a autorização o requerente tem de enviar: uma cópia da autorização da introdução no mercado, um relatório dos resultados de pós-comercialização e novas informações relativamente ao aditivo. Os pedidos de autorização de introdução no mercado devem incluir estudos para o estabelecimento e avaliação dos limites máximos de resíduos (LMRs) para os aditivos, de forma a garantir um nível mais elevado de protecção da saúde humana e animal e do ambiente.

O Regulamento (CE) n.º 1831/2003 estabelece os LMRs para os tecidos edíveis das diferentes espécies alvo, e a criação de um laboratório de referência comunitário para a análise de aditivos para a alimentação animal. Este laboratório tem como função: tratar das amostras de referência e avaliar os métodos analíticos utilizados no controlo de coccidiostáticos na alimentação animal. O Laboratório de Referência Comunitário intervém na resolução de litígios entre os EM, além de outras disposições.

A autorização para coccidiostáticos pode ser concedida para mais que uma espécie animal alvo, desde que os dados específicos da espécie sejam apresentados ao painel FEEDAP da EFSA. As espécies-alvo típicas são aves de capoeira, perus e coelhos dada sua maior susceptibilidade à infecção. Numa determinada espécie, o seu uso pode ser limitado a uma categoria animal ou a uma faixa etária específica. O exemplo mais proeminente é a situação em frangos. A maioria dos coccidiostáticos é licenciada para frangos de engorda e frangos de criação, para as quais o uso de coccidiostáticos na alimentação é indispensável (Dorne *et al.*, 2013).

Para o mesmo coccidiostático são estabelecidos LMRs diferentes, para cada espécie animal e tecido edível. O Regulamento (CE) n.º 124/2009 da Comissão, de 10 de Fevereiro de 2009, e o Regulamento (UE) n.º 610/2012 da Comissão, de 9 de julho de 2012, estabelecem os limites máximos para a presença de coccidiostáticos em géneros alimentícios resultantes da contaminação cruzada inevitável destas substâncias em alimentos para animais não visados que tem sido alvo de uma constante actualização (Tabela 5) (Comissão das Comunidades Europeias, 2009; Comissão Europeia, 2012).

Em contrapartida, os coccidiostáticos autorizados para uso em galinhas poedeiras apresentam um intervalo de segurança maior, pois existe um risco considerável que os coccidiostáticos sejam excretados nos ovos, resultando num nível indesejável de exposição do consumidor humano. Portanto, o termo espécie-alvo abrange, na maioria dos casos, galinhas de engorda, galinhas criadas para postura, perus até a idade de 12 ou 16 semanas (conforme definido na autorização do produto específico) e, às vezes, coelhos e galinhas pintadas (Tabela 5). É preciso enfatizar que um frango ou um peru após o período definido transforma-se numa espécie animal não-alvo (Dorne *et al.*, 2013). As concentrações na alimentação e os tempos de retirada apropriados são prescritos durante a avaliação de pré-comercialização.

**Tabela 5** - Limites máximos de resíduo e intervalo de segurança para cada composto, espécie e tecidos edíveis de acordo com o regulamento 2377/1990 revogado pelo regulamento 470/2009. E de acordo com os limites estabelecidos pelos Reg. 124/2009 e 610/2012. (European Union, 2020)(Comissão das Comunidades Europeias, 2009)(Comissão Europeia, 2012)

<b>Coccidiostáticos</b>	<b>Espécies alvo</b>	<b>LMR</b>	<b>Intervalo de segurança</b>
<b>Monensina</b>	Frangos de engorda	25 µg/kg de pele + gordura 8 µg/kg de fígado, rim e músculo.	1 dia
	Perus (máx. 16 semanas)		1 dia
	Galinhas de postura	2 µg/kg de pele + gordura, rim e músculo; 8 µg/kg de fígado.	1 dia
	Ovos	2 µg/kg	-
<b>Salinomicina</b>	Frangos de engorda	150 µg/kg de fígado; 40 µg/kg de rim; 15 µg/kg de músculo, 150 µg/kg de pele/gordura.	0 dias
	Galinhas de postura	5 µg/kg de fígado; 2 µg/kg de rim; 2 µg/kg de músculo, 2 µg/kg de pele/gordura.	0 dias
	Ovos	3 µg/kg	-
<b>Narasina</b>	Frangos de engorda	50 µg/kg para todos os tecidos.	1 dia
	Ovos	2 µg/kg	-
<b>Lasalocida</b>	Frangos de engorda	20 µg/kg de músculo; 100 µg/kg de pele e tecido adiposo, fígado; 50 µg/kg de rim.	5 dias
	Perus (máx. 12 semanas)		5 dias
	Galinhas de postura	-	5 dias
	Faisões, galinhas-pintadas, codornizes e perdizes, exceto a criação de aves.	-	5 dias
	Ovos	5 µg/kg	-

<b>Maduramicina</b>	Frangos de engorda	150 µg/kg de fígado, pele e gordura; 100 µg/kg de rim; 30 µg/kg de músculo.	3 dias
	Perus (máx. 16 semanas)	-	5 dias
	Ovos	12 µg/kg	-
<b>Semduramicina</b>	Frangos de engorda	-	5 dias
<b>Robenidina</b>	Frangos de engorda	800 µg/kg de fígado; 350 µg/kg de rim; 200 µg/kg de músculo; 1 300 µg/kg de pele/gordura	5 dias
	Perus	400 µg / kg de pele / gordura 400 µg / kg de fígado 200 µg kg de rim 200 µg / kg de músculo	5 dias
	Coelhos de criação	200 µg/kg para fígado e rim; 100 µg/kg para todos os outros tecidos;	5 dias
	Coelhos de engorda		5 dias
	Ovos	25 µg/kg	-
<b>Halofuginona</b>	Frangos de engorda	NA	5 dias
	Perus (máx. 12 semanas)	NA	5 dias
	Ovos	6 µg/kg	-
<b>Diclazuril</b>	Frangos de engorda	1 500 µg/kg de fígado; 1 000 µg/kg de rim; 500 µg/kg de músculo; 500 µg/kg de pele/gordura.	-
	Perus		-
	Galinhas-pintadas		-
	Galinhas de postura	-	-
	Ovos	2 µg/kg	-
<b>Decoquinato</b>	Frangos de engorda	1 000 µg/kg de fígado e pele + gordura; 800 µg/kg de rim; 500 µg/kg de músculo.	-
<b>Nicarbazina</b>	Frangos de engorda	15 000 µg de DNC/kg de fígado; 6 000 µg de DNC/kg de rim; 4000 µg de DNC/kg para músculo e pele / gordura.	1 dia
	Ovos	300 µg/kg	-

NA: não aplicável

Para evitar a transferência de coccidiostáticos, o Regulamento (CE) n.º 183/2005 do Parlamento Europeu e do Conselho, de 12 de Janeiro de 2005, estabelece requisitos específicos para empresas que utilizam coccidiostáticos na produção de alimentos para animais, relativos principalmente às instalações e equipamentos, produção, armazenamento e transporte, para evitar qualquer contaminação cruzada (Parlamento Europeu e o Conselho da União Europeia, 2005). Além disso, a Directiva 2009/8/CE da Comissão, de 10 de Fevereiro de 2009, estabelece níveis máximos inevitáveis de transferência de coccidiostáticos em alimentos para animais não visados, a fim de proteger a saúde dos animais e garantir que o risco para os consumidores seja insignificante (Comissão das Comunidades Europeias, 2009; Delahaut *et al.*, 2010).

A transferência inevitável dos coccidiostáticos pode ocorrer quando uma linha de produção é usada para produzir diferentes tipos de ração para diferentes espécies e categorias de animais. Só após o processamento de vários lotes de alimentos as concentrações de coccidiostáticos diminuem para os níveis máximos de transferência inevitável (1%) (Radičević *et al.*, 2017). Esta situação resulta na presença de concentrações de coccidiostáticos em rações para animais não-alvo o que constitui um grave risco à saúde da espécie animal e da saúde humana se resultar na presença de resíduos de coccidiostáticos em tecidos edíveis (Dasenaki e Thomaidis, 2018).

Em 2011, foi reportada a morte de 5 cavalos devido a uma intoxicação alimentar provocada pelo consumo de ração que continha narasina.

Em Portugal, o Plano Nacional de Controlo de Resíduos (PNCR) coordenado pela Direcção Geral de Alimentação e Veterinária (DGAV) avalia o cumprimento deste conjunto de medidas, e integra o controlo analítico dos resíduos de coccidiostáticos em géneros alimentícios, tendo por objectivo analisar e pôr em evidência os riscos de resíduos de coccidiostáticos nos géneros alimentícios de origem animal.

A Directiva 96/23/CE do Conselho de 29 de Abril de 1996, exige que cada EM tenha implementado planos de monitorização da ocorrência de resíduos de medicamentos veterinários em animais vivos e produtos de origem animal. Assim, o PNCR, é o plano de vigilância que assegura o cumprimento da legislação sobre a presença de resíduos em géneros alimentícios. A Decisão da Comissão 97/747/CE, de 27 de Outubro de 1997, detalha os níveis e a frequência da amostragem oficial, realizada pela autoridade competente, previstos na Directiva 96/23/CE para a monitorização dos resíduos em tecidos edíveis de origem animal,

de forma a dar cumprimento dos LMR estabelecidos, e garantir que não é utilizada nenhuma substância proibida (Comissão das Comunidades Europeias, 1997; Conselho da União Europeia, 1996).

Nestes programas são reportados todos os resultados apresentados pelos EM, e detectados os casos de incumprimento, por comparação dos teores encontrados com os estabelecidos na legislação da UE, a fim de garantir alimentos seguros num mundo cada vez mais global.

O Sistema de Alerta Rápido para Alimentos e Rações (RASFF) é uma ferramenta essencial para assegurar o fluxo de informações e garantir uma reação rápida quando são detectados riscos à saúde pública na cadeia alimentar. Entre 2017 e 2019 foram registadas oito notificações no RASFF relacionadas com os coccidiostáticos. A notificação mais recente foi em novembro de 2019, que diz respeito a uma amostra de ração para perus violativa, contendo lasalocida em teor superior ao LMR.

A EFSA no seu último relatório de dezembro de 2019 reporta os resultados de todas as amostras não-conformes na UE, em 2018. Segundo este relatório, 0,16% das amostras tiveram resultados não conformes para anticoccidianos pertencentes ao grupo B2b estes resultados foram reportados em bovinos (0,03%), porcos (0,01%), frangos (0,17%), e ovos (0,65%) (EFSA (European Food Safety Authority), 2020).

Comparando os resultados de 2018 com os de 2017 verifica-se que em 2018 não foram encontradas amostras com resultados não conformes em cavalos, o que indicia uma diminuição da utilização de coccidiostáticos para espécies não autorizadas ou um maior controlo da contaminação cruzada. O número de amostras não conformes aumentou em ovos (0,47%) e em bovinos (0,00%), diminuiu em frangos (0,21%), cavalos (0,85%) e coelhos (0,65%) e inalterado em porcos (0,01%) (EFSA (European Food Safety Authority), 2019). Apesar da legislação ser cada vez mais rigorosa e das metodologias serem mais sensíveis verifica-se que os coccidiostáticos continuam a ser amplamente utilizados pelos produtores de forma incorreta.

O Relatório da EFSA de 2018 sobre os resultados da monitorização de resíduos de medicamentos veterinários e outras substâncias em animais vivos e produtos de origem animal, não reporta amostras de aquacultura contaminadas (EFSA (European Food Safety Authority), 2020).

#### **4. Metodologias analíticas**

O PNCR de cada EM integra as exigências da legislação europeia para o controlo da presença de coccidostáticos em géneros alimentícios. Deste modo, as metodologias analíticas desenvolvidas para a sua determinação têm que cumprir os critérios de desempenho estabelecidos pela Decisão da Comissão 2002/657/CE de 12 de Agosto de 2002, para a identificação e confirmação de coccidostáticos.

Dada a presença residual e o número elevado de amostras a analisar os métodos analíticos para a determinação de resíduos de substâncias farmacologicamente activas no PNCR, dividem-se em dois grupos: os métodos de triagem e os métodos de confirmação.

Os métodos de triagem são metodologias simples, rápidas e sensíveis. Por forma a não se obter resultados falsos negativos, estes métodos devem apresentar um resultado fidedigno sobre a presença ou ausência da substância em estudo nas amostras para valores de concentração ao nível dos LMRs, possibilitando desta forma a identificação de amostras violativas apresentando resultados não conformes.

A metodologia analítica utilizada na confirmação dos resíduos dos analitos detectados nas amostras deve permitir a identificação inequívoca e sua quantificação exacta, precisa e específica para valores de concentração ao nível dos LMRs, para cumprimento da legislação estabelecida na UE.

##### **4.1 Preparação da amostra e extracção**

Numa metodologia analítica, os resultados de uma análise quantitativa só serão confiáveis se a alíquota da amostra submetida ao processo analítico representar, com suficiente exatidão, a composição média da amostra.

A amostragem é de extrema importância. Em Portugal é realizada por técnicos das autoridades competentes, DGAV e ASAE, de acordo com o plano de amostragem estabelecido e as exigências dos métodos analíticos. A amostragem oficial deve indicar a identificação do animal ou produto animal, a natureza, quantidade e método de colheita, e a análise de resíduos ou das substâncias a efectuar no âmbito do PNCR.

A preparação da amostra é um processo que deve ser considerado como parte integrante de um método analítico na obtenção de um produto definitivo representativo da globalidade do género alimentício. Qualquer que seja o analito ou método de análise, a preparação da amostra para controlo de resíduos de substâncias farmacologicamente activas

nas matrizes alimentares pode ser complexa e demorada, e pode constituir um factor limitante da qualidade do resultado analítico.

O procedimento de extração e a metodologia analítica a desenvolver e validar depende do analito, da concentração em que está presente na matriz alimentar e da matriz em análise.

Os processos de extracção são desenvolvidos de acordo com as propriedades físico-químicas dos compostos de interesse. A extracção de coccidiostáticos é geralmente realizada com solventes orgânicos ou misturas hidro-orgânicas. Em ambos os casos, os principais solventes utilizados são acetonitrilo, metanol e acetona, que promovem uma extracção bastante eficiente, com uma elevada recuperação para os coccidiostáticos. A agitação mecânica combinada com a sonicação é uma técnica de extração comum (Huet *et al.*, 2013).

O objectivo é a obtenção de um extracto representativo do analito em análise na amostra em causa, mas devido à complexidade das matrizes alimentares são co-extraídas substâncias interferentes com o analito que podem interferir na análise e tem de ser eliminadas.

A purificação dos extractos usando a técnica de extracção em fase sólida (SPE) é provavelmente a abordagem mais amplamente descrita para a preparação de amostras para análise de coccidiostáticos (Clarke *et al.*, 2014).

Na análise de amostras complexas, como são os géneros alimentícios, a extracção em SPE permite o desenvolvimento de metodologias analíticas sensíveis, selectivas e robustas, permitindo, em alguns casos, a sua automatização para uma maior rapidez de execução, sem comprometer o desempenho da metodologia analítica.

A SPE consiste na adsorção selectiva do analito em absorventes, seguida da sua desadsorção com solventes, o que permite a eliminação de interferentes dos extractos das amostras a analisar, reduzindo ou evitando os efeitos da matriz e a, supressão de iões, na análise por LC-MS.

Uma etapa final de evaporação pode ser incluída para concentrar o extrato e, assim, aumentar a sensibilidade do ensaio (Huet *et al.*, 2013).

#### **4.1.1 Métodos de triagem**

Como métodos de triagem, as técnicas de imunoensaio são muito utilizadas uma vez que apresentam uma elevada sensibilidade e selectividade. São métodos simples que permitem a análise simultânea de um grande número de amostras adequadas para verificar a presença

ou ausência de substâncias farmacologicamente activas em géneros alimentícios, permitindo detectar os resultados potencialmente não conformes (Clarke *et al.*, 2014).

Os métodos imunológicos são baseados na interação antígeno-anticorpo, que é muito específico para um determinado resíduo (Reig e Toldra, 2008). O processo de conjugação antígeno-anticorpo afecta a sensibilidade e especificidade da técnica (Clarke *et al.*, 2014).

A técnica *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (ELISA) é baseada em reagentes marcados com enzimas. Existem diferentes formatos para quantificação de antígenos, como os testes ELISA de anticorpo duplo ou sanduíche e testes ELISA competitivos diretos (Reig e Toldra, 2008). Em geral, o desempenho depende das concentrações do anticorpo e do antígeno marcado com enzima/revestimento e do tempo de incubação em cada etapa (Huet *et al.*, 2013).

Os biossensores foram desenvolvidos nos últimos anos como uma abordagem alternativa para verificar a existência de medicamentos veterinários na carne. Em geral, estes sensores contêm um anticorpo como elemento de reconhecimento que interage com o analito (Reig e Toldra, 2008). Para detectar o sinal, o biossensor usa um dispositivo sensor, ou transdutor, para converter a resposta biológica num sinal elétrico, o qual é amplificado, armazenado e quantificado por um processador (Huet *et al.*, 2013). Os biossensores podem ser capazes de detectar simultaneamente vários resíduos de medicamentos veterinários numa amostra de cada vez e alguns autores relataram não haver necessidade à purificação do extracto da amostra (Reig e Toldra, 2008).

O imunoensaio baseado em citometria de fluxo (FCIA) utiliza microesferas paramagnéticas, que são coradas com fluoróforos. Variando os fluoróforos, é possível distinguir diferentes esferas com o código de cores, e diferentes compostos ou conjugados podem ser acoplados nas superfícies de diferentes conjuntos de esferas. A superfície do cordão carboxilado permite o acoplamento covalente químico simples de diferentes coccidiostáticos com ou sem proteínas transportadoras. Os anticorpos ligados são quantificados com um anticorpo secundário (IgG) marcado com a proteína fluorescente (R) – ficoeritrinacomo (PE). Dentro do citómetro de fluxo com laser duplo, uma fonte de luz (laser vermelho) excita os corantes internos que identificam cada microesfera e a outra fonte de luz (laser verde) quantifica o corante *reporter* (PE) na superfície da esfera refletido como intensidade de fluorescência (Bienenmann-ploum *et al.*, 2012).

#### 4.1.2 Métodos cromatográficos

Como já foi salientado a monitorização dos resíduos de coccidiostáticos nos géneros alimentícios é imperativa, por força de lei, e a sua confirmação e quantificação é realizada utilizando métodos cromatográficos que cumprem os critérios de identificação e quantificação exigidos. A cromatografia líquida de alta *performance* (HPLC) é uma técnica separativa em que a escolha do sistema de detecção é muito importante para a selectividade e para a sensibilidade.

Na sua determinação encontram-se descritos na literatura científica métodos por cromatografia líquida de alta performance com detecção por UV ou fluorescência (HPLC-UV e HPLC-FD) (Barreto *et al.*, 2017).

A maioria dos coccidiostáticos químicos possui um cromóforo UV nativo e pode ser analisada diretamente por HPLC-UV. Em contraste, os ionóforos geralmente requerem derivatização química para permitir a análise de resíduos em concentrações residuais da ordem de  $\mu\text{g kg}^{-1}$  (Clarke *et al.*, 2014).

O desenvolvimento de métodos analíticos multi-resíduos para a determinação simultânea de vários coccidiostáticos pode ser bastante desafiante devido à diversidade química desses compostos e à necessidade de baixos limites de quantificação (LOQs).

Nos últimos anos, os métodos hifenizados, como a cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa sequencial (LC-MS / MS), são a metodologia analítica de referência para a identificação inequívoca e confirmação da presença de resíduos de coccidiostáticos em amostras de géneros alimentícios e rações. Devido à sua versatilidade, especificidade e sensibilidade, possibilitam a detecção e quantificação a níveis de concentração inferiores aos dos LMRs estabelecidos (Dasenaki e Thomaidis, 2018).

De acordo com as diretrizes europeias os resultados positivos de resíduos de coccidiostáticos em géneros alimentícios devem ser confirmados usando métodos que forneçam informação relativamente à estrutura química da substância a analisar, sendo a cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa sequencial (LC-MS/MS) o método mais amplamente utilizado. A Decisão da Comissão 2002/657/CE, de 12 de Agosto de 2002 estabelece que para fins de confirmação, sempre que os fragmentos forem medidos com outra técnica que não a do varrimento total, deve usar-se um sistema de pontos de identificação para interpretar os resultados. Para a confirmação das substâncias, é necessário um mínimo de 3 pontos de identificação, e são estabelecidos os iões e as respectivas intensidades.

O acoplamento da cromatografia líquida de alta eficiência com um detetor de espectrometria de massa triplo quadrupolo (LC-MS/MS) fornece melhor especificidade e sensibilidade em comparação com HPLC com detecção convencional ou LC-MS. Além disso, é possível obter uma redução significativa na preparação da amostra e no desenvolvimento cromatográfico. A monitorização de duas transições pai-filha, possibilita a confirmação inequívoca da presença de resíduos, conforme exigido pela legislação da Comissão Europeia (Galarini *et al.*, 2011).

A introdução de técnicas de ionização à pressão atmosférica, como a ionização por eletronebulização (*electrospray ionization*, ESI) permitiu a aplicação da técnica LC-MS/MS na determinação de resíduos de medicamentos veterinários de elevado peso molecular e termossensíveis. A técnica de ionização ESI facilita a análise de moléculas pequenas a relativamente grandes e hidrofóbicas a hidrofílicas e, portanto, é muito adequada para a análise de resíduos de medicamentos veterinários (Reig e Toldra, 2008).

A Tabela 6 resume algumas metodologias analíticas publicadas na literatura científica entre 2017 e 2020 conducentes ao controlo eficaz destas substâncias em matrizes alimentares. Têm em comum o facto de utilizarem o acetonitrilo como agente extractor, que permite uma extracção bastante eficiente, permitindo uma boa exactidão do método analítico, e de recorrerem à LC-MS/MS de modo a obter informação estrutural do analito para a sua identificação inequívoca de acordo com a Decisão da Comissão 2002/657/CE, de 12 de Agosto de 2002. Apenas o estudo de González-Rubio *et al.* 2020 efectuou a extracção utilizando solventes supramoleculares (SUPRAS).

As vantagens apresentadas pela cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massa sequencial (LC-MS/MS), superam, em muitos casos, os extensivos procedimentos de purificação requeridos em algumas amostras alimentares. Barreto *et al.* (2017) e Rusko *et al.* (2018) procederam à determinação simultânea de 14 e 18 coccidiostáticos respectivamente, em amostras de músculo de frango e ovos, por HPLC-QqLIT-MS/MS e LC-HRMS, por injeção directa dos extractos dos compostos em estudos em acetonitrilo.

Com a excepção destes 2 métodos analíticos todos os outros recorrem à purificação dos extractos antes da análise por LC-MS/MS.

Como já foi referido, a Tabela 6 apresenta os mais recentes métodos analíticos reportados na literatura científica para a determinação dos coccidiostáticos em matrizes alimentares. Os estudos descritos satisfazem os critérios de sensibilidade, exactidão, precisão

e especificidade requeridos para os métodos analíticos para que possam ser aplicados na análise de rotina destes compostos, a níveis de concentração inferiores aos LMRs estabelecidos em diversas matrizes alimentares incluídas no PNCRs.

No estudo de Barreto *et al.* (2017) no qual foram analisados 14 coccidiostáticos em 619 amostras de ovos e 2663 amostras de músculo de frango, apenas 7 amostras de ovos e 13 amostras de músculo de frango apresentaram resultados não-conformes.

Na monitorização de 18 coccidiostáticos realizada por Rusko *et al.* (2019), por LC-HRMS apenas 1 amostra de ovo, em 81 amostras analisadas, apresentou resultado não-conforme, e não foi detectado nenhum dos coccidiostáticos em estudo em amostras de músculo de frango, Dasenaki e Thomaidis (2018) efectuaram o controlo de 16 coccidiostáticos em 82 amostras de músculo de frango e ovos, por HILIC-MS/MS e apenas uma amostra de músculo de frango apresentou um resultado não-conforme.

O estudo de González-Rubio *et al.* realizado em 2020, em Espanha, refere a determinação de narasina, salinomina, lasalocida, maduramicina, monensina e semduramicina, em amostras de músculo de frango, músculo de bovino e seus derivados: rim e fígado, ovos, leite e gordura de suíno. Apesar do número muito baixo de amostras analisadas foi observada a presença de 3 amostras em concentrações violativas, acima dos LMRs 1 amostra positiva de gordura de suíno, 1 de rim de bovino e 1 de ovos.

Na monitorização de coccidiostáticos na matriz carne de vaca, nenhuma, das 50 amostras analisadas, se encontrava contaminada, como era expectável (Zhao *et al.*, 2018).

**Tabela 6** - Métodos de determinação e ocorrência de coccidiostáticos.

Tipo de amostra	Coccidiostáticos	Extracção/ Purificação	Deteccção e Quantificação	LOD (µg/kg)	LOQ (µg/kg)	Exactidão	Precisão	Ocorrência	Bibliografia
Músculo de frango e ovos.	Lasolacida, maduramicina, monensina, narasina, salinomicina, semduramicina, robenidina, diclazuril, toltrazuril, trimetopim, clopidol, amprolium, diaveridina e nicarbazina	Extracção com 10 ml de acetone nitrilo	<b>HPLC-QqLIT-MS/MS</b> (liquid chromatography-quadrupole linear ion trap-tandem mass spectrometer system) <b>Coluna:</b> Poroshell 120 EC-C18 acoplada a uma coluna C18 <b>Volume de injeccção:</b> 4 µl <b>Fase móvel:</b> gradiente de água e acetone nitrilo <b>Fluxo:</b> 0,5 ml/min	10% do LMR	25% do LMR	73 -115%	0,4 - 21%	619 amostras de ovos das quais 7 são não-conformes; 2663 amostras de músculo das quais 13 são não-conformes.	(Barreto et al., 2017)
Músculo de frango e ovos.	Amprolium, clopidol, decoquinato, monensina, nequinato, toltrazuril, toltrazuril sulfona, e toltrazuril sulfóxido, diclazuril, lasalocida, salinomicina, halofuginona, maduramicina, narasina, nicarbazina, robenidina e semduramicina.	Extracção com 20 ml de acetone nitrilo	<b>LC-HRMS</b> (liquid chromatography - Orbitrap high resolution mass spectrometry) <b>Coluna:</b> Kinetex C18 <b>Volume de injeccção:</b> 4 µl <b>Fase móvel:</b> água, acetone nitrilo e metanol <b>Fluxo:</b> 0,3 ml/min	Ovos: CCα: 2,2 - 336 µg/kg	Ovos: CCβ: 2,58 – 401 µg/kg	Ovos: 94,1 - 105,8%	Ovos: 5,2 – 21,3%	81 amostras de ovos das quais 1 é não conforme; 3 amostras de musculo das quais 0 não-conformes.	(Rusko et al., 2019)
				Músculo de frango: CCα: 2,64 - 589 µg/kg	Músculo de frango: CCβ: 3,74- 749 µg/kg	Músculo de frango: 91,6 – 105,7%	Músculo de frango: 5,2 – 20,4%		
Músculo de animais (frango, porco, bovino, coelho) e ovos.	Lasalocida A, amprolium, monensina, narasina, maduramicina, robenidina, decoquinato, nicarbazina, clopidol, halofuginona, ethopabate, diaveridina, arprinocid, diclazuril, semduramicina e nigericina.	Extracção sólido-líquido com acetone nitrilo e SPE dispersivo	<b>HILIC-MS/MS</b> (hydrophilic interaction liquid chromatography-tandem mass spectrometry) <b>Coluna:</b> ACQUITY UPLC BEH HILIC <b>Volume de injeccção:</b> 4 µl <b>Fase móvel:</b> acetone nitrilo (A) e formato de amónio com ácido fórmico (B) <b>Fluxo:</b> 100 µl/min	0.004 - 0.560	0.004 - 0.560	79,1% - 118%	5,3%-20% em músculo; 6,4%-17% em ovos.	82 amostras de tecido animal e ovos das quais 1 de músculo de frango é não-conforme.	(Dasenaki e Thomaidis, 2018)

**Tabela 6 – Métodos de determinação e ocorrência de coccidiostáticos**

<b>Tipo de amostra</b>	<b>Coccidiostáticos</b>	<b>Extração/ Purificação</b>	<b>Deteção e Quantificação</b>	<b>LOD (µg/kg)</b>	<b>LOQ (µg/kg)</b>	<b>Exactidão</b>	<b>Precisão</b>	<b>Ocorrência</b>	<b>Bibliografia</b>
Carne de vaca	Halofuginona, lasalocida, maduramicina, monensina, narasina, nigericina, robenidina e salinomicina.	Extração com ácido acético, acetonitrilo e acetato de etilo e purificação com CNW C18 SPE.	<b>UPLC-MS/MS</b> ( <i>ultraperformance liquid chromatography-tandem mass spectrometry</i> ) <b>Coluna:</b> ACQUITY UPLC® BEH C18 <b>Volume de injeção:</b> 10 µl <b>Fase móvel:</b> solução ácido-água (A) e metanol puro(B) <b>Fluxo:</b> 0,3 ml/min	0,14 -0,32	0,43 - 1,21	71,96%-100,32%;	2,65% - 12,38%	50 amostras de carne das quais nenhuma é não-conforme	(Zhao <i>et al.</i> , 2018)
Músculo de frango, músculo de bovino e seus derivados: rim e fígado, ovos, leite e gordura de suíno.	Narasina, salinomicina, lasalocida, maduramicina, monensina e semduramicina.	Extração com solventes supra moleculares e SPE dispersivo.	<b>LC-MS/MS</b> <b>Coluna:</b> Phenomenex Luna C18 <b>Volume de injeção:</b> 2 µl <b>Fase móvel:</b> ácido fórmico (0,1%) em água (A) e ácido fórmico (0,1%) em metanol(B) <b>Fluxo:</b> 250 µl/min	0,004 -0,07	-	71 - 112%	1 - 10%	14 amostras das quais 3 amostras são não-conformes (gordura de suíno, rim de bovino e ovos)	(González-Rubio <i>et al.</i> , 2020)

# **II. Capítulo**

## **Parte Experimental**

# I. Material e Métodos

## I.1 Equipamento e material

No procedimento de extracção usou-se uma centrífuga, a 5444g, 4°C, por 15 minutos (Sigma 3–16K, Sigma Laborzentrifugen GmbH, Germany) e um banho de ultrassons (Sonorex RK 510S, Germany). Foram ainda usados uma balança de precisão, um agitador Vortex, um agitador vertical e um evaporador de azoto.

As análises de LC-MS/MS foram realizadas utilizando um cromatógrafo líquido de alta performance (Thermo Finnigan, San Jose, California, USA) acoplado a uma armadilha de iões linear (LIT-MS) (LTQ XL, Thermo Scientific, San Jose, California, USA). A coluna LC (Waters Spherisorb ODS2; 3µm, 150x2.1mm i.d; Waters Corporation, Milford, U.S.A.) foi precedida de um cartucho de protecção (Waters Spherisorb ODS2; 5µm, 10x4.6mm i.d.; Waters Corporation, Milford, U.S.A.).

## I.2 Reagentes e padrões

Os padrões dos coccidiostáticos, com um grau de pureza  $\geq 98\%$ , lasolacida de sódio, narasina de sódio, salinomicina de sódio, monensina de sódio, maduramicina de sódio, halofuginona, robenidina, diclaruzil, decoquinato e diclaruzil, foram adquiridos à Sigma Chemicals Co. (St. Louis, EUA).

O acetonitrilo para o procedimento de extração, de grau para HPLC, foi igualmente adquirido à Sigma Chemicals Co. (St. Louis, EUA). A água bi-distilada foi obtida diariamente através de um sistema Milli-Q (Millipore, Bedford, MA, EUA). O acetonitrilo e o ácido fórmico para as análises de LC-MS/MS (Merck, Darmstadt, Germany) foram adquiridos à Merck (Darmstadt, Germany).

## I.3 Soluções padrão

As soluções padrão *stock* dos coccidiostáticos foram preparadas a 1mg/mL, por diluição com ACN.

As soluções intermédias foram preparadas por diluição da solução padrão a 10 com ACN. As soluções de trabalho foram preparadas entre 240 – 2400ng/mL em fase móvel, por diluição da solução intermédia.

As soluções padrão para a curva de calibração em solvente e em matriz foram preparadas tendo em conta os LMRs estabelecidos para os coccidiostáticos. As soluções padrão para a curva de calibração foram preparadas, por diluição em acetonitrilo, a concentrações que variaram entre 3 e 60µg/L (3, 5, 8, 12, 20, 30, 45, 60µg/L), para os seguintes compostos: lasalocida, narasina, salinomicina, monensina, maduramicina e halofuginona. Para os compostos robenidina, decoquinato e diclazuril o intervalo variou entre 30 e 600µg/L (30, 50, 80, 120, 200, 300, 450, 600µg/L).

As soluções para a curva de calibração em matriz foram preparadas por forma a corresponderem às concentrações da curva de calibração em solvente. Assim, para os compostos: lasalocida, narasina, salinomicina, monensina, maduramicina e halofuginona as fortificações realizadas variaram entre 3 e 60µg/kg (3, 5, 8, 12, 20, 30, 45, 60µg/kg). Já para os compostos robenidina, decoquinato e diclazuril o intervalo variou entre 30 e 600 µg/kg (30, 50, 80, 120, 200, 300, 450, 600µg/kg).

## **1.4 Metodologia analítica**

### **1.4.1 Amostragem e conservação da amostra**

A aquisição de amostras de frango e peru foi realizada em supermercados e também se obtiveram amostras caseiras. A amostragem foi efectuada durante os meses de setembro a dezembro de 2019, na região norte e centro de Portugal continental.

Foi adquirido um total de 54 amostras: 47 de frango (87%) e 7 de peru (13%), nas regiões de Aveiro, Coimbra e Chaves. Analisaram-se 20 amostras de supermercado (37%) e 34 amostras caseiras (63%).

### **1.4.2 Preparação e extracção das amostras**

Imediatamente após a aquisição, as aves foram identificadas com a data de obtenção, espécie, local e empresa de produção (se aplicável). Por fim, as amostras foram congeladas. No dia do ensaio de extração retirou-se uma alíquota de tecido muscular do peito.

Após pesagem, para tubo de centrifugação, de  $3 \pm 0.05$ g de músculo das aves, previamente triturado e homogeneizado, o procedimento de extração consistiu na adição de 10mL de acetonitrilo (Barreto *et al.*, 2017) e agitação em vórtex durante 5 minutos. Depois de um repouso de 10 minutos, a amostra foi colocada em banho de ultrassons, durante 5 minutos. Posteriormente, agitou-se durante 10 minutos em agitador vertical e centrifugou-se

durante 15 minutos, a 5444g, a 4°C. Então, o sobrenadante foi transferido para um tubo de ensaio e evaporou-se o extracto à secura, a 45°C, sob corrente suave de azoto.

O resíduo seco, após redissolução em 600µL de acetonitrilo/água (90/10, v/v), foi microfiltrado e analisado por LC-MS/MS.

### **1.4.3 Detecção e quantificação por LC-MS/MS**

Para a optimização das condições de detecção, realizou-se uma infusão direta de cada uma das soluções intermédias dos coccidiostáticos, em modo de aquisição automática, tanto em ionização positiva (ESI+) como em ionização negativa (ESI-). Determinam-se assim os fragmentos iónicos percursores, em modo MS, e respectivos produtos, em modo MS/MS, bem como as condições do instrumento que proporcionam as maiores intensidades desses fragmentos.

Uma vez que o procedimento analítico instrumental decorreu em modo *Multiple Reaction Monitoring* (MRM), utilizaram-se os pares ião precursor>ião produto indicados na tabela 7 como as transições a monitorizar na quantificação e confirmação dos compostos. Assim, nesta tabela indicam-se os fragmentos iónicos percursores e os dois produtos mais intensos, em que Q indica o ião usado para quantificação e C o ião usado para confirmação. Indica-se também a polaridade da fonte de ionização que se revelou mais favorável, bem como as energias de colisão normalizadas (EC) mais adequadas.

**Tabela 7** - Fragmentos iónicos, modo de ionização e energias de colisão mais favoráveis para cada um dos compostos.

Composto	Polaridade da fonte de ionização	Ião precursor	Iões produto		Energia de colisão normalizada (%)
Lasalocida	Positivo	613 [M <sup>+</sup> Na] <sup>+</sup>	595	QP	21,0
			377	CP	
Narasina	Positivo	788 [M <sup>+</sup> Na] <sup>+</sup>	531	QP	27,5
			413	CP	
Salinomicina	Positivo	773 [M <sup>+</sup> Na] <sup>+</sup>	413	QP	26,0
			513	CP	
Monensina	Positivo	693 [M <sup>+</sup> Na] <sup>+</sup>	675	QP	23,0
			657	CP	
Maduramicina	Positivo	940 [M <sup>+</sup> Na] <sup>+</sup>	878	QP	23,0
			921	CP	
Halofuginona	Positivo	416 [M <sup>+</sup> H] <sup>+</sup>	398	QP	11,0
			138	CP	
Robenidina	Positivo	334 [M <sup>+</sup> H] <sup>+</sup>	195	QP	19,0
			317	CP	
Diclazuril	Negativo	405 [M <sup>+</sup> H] <sup>-</sup>	334	QP	15,0
			335	CP	
Decoquinato	Positivo	418 [M <sup>+</sup> H] <sup>+</sup>	372	QP	17,0
			390	CP	

Uma vez definidas as condições de operação para o espectrómetro de massa, foram optimizadas as condições da fonte de ionização. Esta optimização foi feita por infusão directa de cada uma das soluções intermédias de coccidiostáticos, fazendo variar as condições de temperatura da fonte, gás nebulizador (GÁS 1) e gás de colisão (GÁS 2). A solução de compromisso mais favorável alcançada está indicada na Tabela 8.

**Tabela 8** - Parâmetros optimizados para a fonte de ionização.

Gás de nebulização	Azoto
Gás de colisão	Hélio
Ionização	Electrospray
Temperatura da fonte (°C)	275°C
Fluxo do gás nebulizador (arb. <sup>a</sup> )	40
Fluxo do gás de varrimento auxiliar (arb. <sup>a</sup> )	5

<sup>a</sup> Unidades arbitrarias

---

As condições cromatográficas definidas para o presente trabalho indicam-se na Tabela 9.

**Tabela 9** - Condições cromatográficas.

Pré-coluna cromatográfica	Waters Spherisorb ODS2 (5µm, 10x4.6mm)
Coluna cromatográfica	Waters Spherisorb ODS2 (3µm, 150x2.1mm)
Fase móvel	A: Água com 0,2% de ácido fórmico B: Acetonitrilo com 0,2% de ácido fórmico
Fluxo	200µL/min
Volume de injeção	20µL

## 2. Resultados e Discussão

### 2.1 Validação da metodologia analítica

A validação de um método analítico pode ser definida como o processo de avaliação da eficiência de um método analítico novo ou adaptado de método conhecido, em análise de rotina de um laboratório. O objectivo da validação consiste em demonstrar que o método analítico é adequado para o seu propósito. Determinado método é considerado validado se suas características estiverem de acordo com os pré-requisitos estabelecidos.

Toda a validação analítica a ser usada no presente estudo baseou-se nos critérios de desempenho e procedimentos para a validação de métodos de triagem e de confirmação em cromatografia líquida com detecção por espectrometria de massa estabelecidos na Decisão da Comissão 2002/657/CE, de 12 de Agosto de 2002 (Comissão das Comunidades Europeias, 2002).

O método foi validado de acordo com a referida Decisão da Comissão de 12 de agosto de 2002 que dá execução ao disposto na Directiva 96/23/CE do Conselho de 29 de Abril de 1996 relativamente ao desempenho de métodos analíticos e à interpretação de resultados (Comissão das Comunidades Europeias, 2002).

Para a validação desta metodologia analítica avaliaram-se diferentes parâmetros de validação tais como: linearidade, efeito matriz, limite de detecção e limite de quantificação, exatidão e precisão.

### 2.1.1 Linearidade

A linearidade atesta a proporcionalidade entre as áreas obtidas nos cromatogramas e as concentrações existentes nas amostras, sendo esta relação maior, quanto mais próximo for o valor do coeficiente de correlação ( $R^2$ ) da unidade. Neste estudo procedeu-se à avaliação da linearidade em padrão, através de soluções padrão com diferentes concentrações dos coccidiostáticos, e em matriz, através de amostras fortificadas a concentrações correspondentes à da curva de calibração em padrão, de acordo com a Decisão da Comissão 2002/657/CE, de 12 de Agosto de 2002.

Os coeficientes de correlação obtidos para as curvas de calibração em solvente e em matriz foram adequados, superiores a 0,999 (Tabela 10).

### 2.1.2 Efeito matriz

As curvas de calibração em solvente e em matriz foram usadas para calcular o efeito da matriz (ME), dividindo o declive da curva de calibração em matriz (B) pelo declive da curva de calibração em padrão (A). Assim, a razão dos declives ( $B/A \times 100$ ) foi definida como o efeito matriz (ME%). O valor obtido foi interpretado da forma seguinte: um valor de 100% demonstra uma ausência de efeito matriz, um valor superior a 100% indica um aumento do sinal e abaixo de 100% uma supressão de sinal (Rubert *et al.*, 2011). Os valores de efeito matriz variaram de composto para composto, como se pode observar na Tabela 10, entre 96,21% e 100,51%, pelo que se pode considerar o efeito-matriz negligenciável.

### 2.1.3 Limite de detecção (LOD) e limite de quantificação (LOQ)

O limite de detecção (LOD) de um procedimento analítico corresponde à menor quantidade de analito que pode ser detectada numa amostra. O limite de quantificação (LOQ) corresponde à menor quantidade de analito que pode ser determinada quantitativamente numa amostra com exatidão e precisão adequadas.

O LOD e o LOQ foram estimados através da curva de calibração em matriz como  $|3.3S_y/x|/b$  e  $|10S_y/x|/b$ , respectivamente, onde  $b$  corresponde ao declive da curva e  $S_y/x$  corresponde ao desvio padrão residual da função linear.

A narasina foi o composto com o LOD mais baixo, 0,91  $\mu\text{g/Kg}$ , enquanto o decoquinato apresentou o valor mais elevado, de 7,35  $\mu\text{g/Kg}$ . Os valores de LOQ variam entre 2,76  $\mu\text{g/Kg}$  e 22,27  $\mu\text{g/Kg}$ , para a narasina e para o decoquinato, respectivamente (Tabela 10).

**Tabela 10** - Coeficiente de correlação ( $R^2$ ), efeito matriz, limites de detecção e quantificação.

Composto	Coeficiente de correlação ( $R^2$ ) em padrão	Coeficiente de correlação ( $R^2$ ) em matriz	Efeito Matriz	LOD ( $\mu\text{g/Kg}$ )	LOQ ( $\mu\text{g/Kg}$ )
Maduramicina	0,9996	0,9997	100,19	1,22	3,7
Lasalocida	0,9999	0,9996	98,87	1,55	4,7
Diclazuril	0,9999	0,9999	100,51	5,74	17,4
Robenidina	1	0,9999	98,65	6,26	18,98
Halofuginona	0,9998	0,9997	96,21	1,36	4,12
Decoquinato	0,9999	0,9999	99,4	7,35	22,27
Salinomicina	0,9994	0,999	98,32	2,29	6,95
Monensina	0,9999	0,9998	99,83	1,12	3,4
Narasina	0,9999	0,9998	100,03	0,91	2,76

#### 2.1.4 Exatidão e Precisão

A exactidão corresponde ao grau de concordância entre o resultado de um ensaio e o valor de referência aceite. A precisão corresponde ao grau de concordância entre resultados de ensaios independentes obtidos em condições (pré-estabelecidas) específicas.

Para determinar a exatidão e a precisão do método foram realizados ensaios de fortificação, usando brancos e amostras fortificadas a três níveis diferentes como indicado na Tabela 11. Para cada nível de fortificação foram realizados replicados ( $n=3$ ), em três dias diferentes.

As percentagens de recuperação obtidas foram superiores a 71,0%, para todos os níveis de fortificação. A salinomicina apresentou a percentagem de recuperação mais baixa, 71,0%, para o nível de fortificação de  $5\mu\text{g/kg}$ , enquanto que a narasina apresentou a percentagem de recuperação mais elevada, 86,03%, para o mesmo nível de fortificação.

A precisão foi avaliada através da repetibilidade intra-dia e inter-dia (% RSD). Como se pode observar na Tabela 11, os valores obtidos foram adequados.

O valor da repetibilidade intra-dia mais elevado, 6,82%, foi obtido para a robenidina para o nível de fortificação de  $200\mu\text{g/kg}$ . O valor 0,56% foi o valor mais baixo obtido, este valor foi observado para a monensina, no nível de fortificação  $20\mu\text{g/kg}$  e para a maduramicina a  $60\mu\text{g/kg}$ . Relativamente à repetibilidade inter-dia, o valor mais elevado foi de 5,20% para a robenidina, para o nível de fortificação de  $200\mu\text{g/kg}$ , enquanto para o nível de fortificação mais baixo,  $5\mu\text{g/kg}$ , para a salinomicina observou-se o valor mais baixo, 0,08%.

**Tabela 11** - Exatidão (%), Repetibilidade intra e inter-dia (desvio padrão relativo - RSD) (%).

Composto	Nível de fortificação (µg/kg)	Exatidão (%)	Repetibilidade intra-dia (%RSD) <sup>a</sup>	Repetibilidade inter-dia (%RSD) <sup>a</sup>
Maduramicina	5	71,49	2,13	4,22
	20	81,23	2,05	0,52
	60	83,28	0,56	1,82
Lasalocida	5	83,37	1,30	0,84
	20	79,41	1,79	0,31
	60	78,96	1,51	0,21
Salinomicina	5	71,00	4,33	0,08
	20	77,92	2,19	4,06
	60	79,42	1,81	2,90
Monensina	5	84,85	2,28	1,98
	20	83,87	0,56	0,82
	60	85,06	1,94	2,77
Narasina	5	86,03	1,28	1,52
	20	81,00	0,79	1,11
	60	80,66	1,34	1,50
Halofuginona	5	81,86	1,65	3,35
	20	80,88	1,56	0,28
	60	80,92	2,14	0,98
Robenidina	80	85,07	2,07	2,80
	200	75,57	6,82	5,20
	600	81,53	0,81	1,77
Diclazuril	80	80,11	2,12	0,77
	200	75,88	0,75	1,76
	600	82,12	1,83	1,81
Decoquinato	80	81,82	1,20	1,21
	200	81,51	3,03	1,97
	600	80,20	1,07	0,37

## 2.2 Frequência e Ocorrência

Por forma a determinar a presença de nove coccidiostáticos, maduramicina, lasalocida, diclazuril, robenidina, halofuginona, decoquinato, salinomicina, monensina e narasina, em amostras de tecido muscular de frango e peru, adquiridas comercialmente e caseiras, foi analisado um total de 54 amostras. As Tabelas 12 e 13 apresentam os resultados relativos à frequência, intervalo e média de contaminação dos coccidiostáticos ionóforos e sintéticos, respectivamente. O Gráfico 3 indica o número de vezes que cada coccidiostático foi detectado em amostras caseiras e de supermercado.

**Tabela 12** - Frequência (%), intervalo ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ ) e média ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ ) dos coccidiostáticos ionóforos estudados.

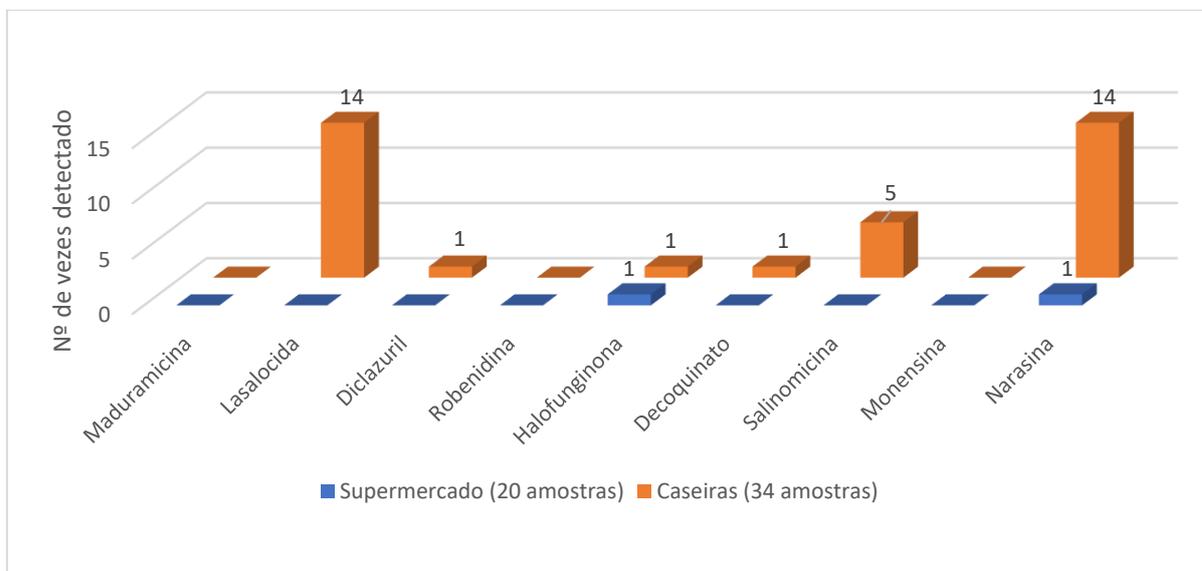
Tipo de amostra	Salinomicina			Lasalocida			Monensina			Narasina			Maduramicina		
	% Frequência (n° positivas)	Intervalo ( $\mu\text{g/kg}$ )	Média $\pm$ SD ( $\mu\text{g/kg}$ )	% Frequência (n° positivas)	Intervalo ( $\mu\text{g/kg}$ )	Média $\pm$ SD ( $\mu\text{g/kg}$ )	% Frequência (n° positivas)	Intervalo ( $\mu\text{g/kg}$ )	Média $\pm$ SD ( $\mu\text{g/kg}$ )	% Frequência (n° positivas)	Intervalo ( $\mu\text{g/kg}$ )	Média $\pm$ SD ( $\mu\text{g/kg}$ )	% Frequência (n° positivas)	Intervalo ( $\mu\text{g/kg}$ )	Média $\pm$ SD ( $\mu\text{g/kg}$ )
<b>Caseiras (total) (34)</b>	14,7% (5)	n.d -7,07	0,62 $\pm$ 1,61	41,2% (14)	n.d -7,15	2,40 $\pm$ 3,00	0% (0)	-	-	41,2% (14)	n.d-5,84	2,17 $\pm$ 2,65	0% (0)	-	-
<b>Frango (caseiras) (30)</b>	14,7 % (5)	n.d -7,07	0,70 $\pm$ 1,70	38,3% (13)	n.d -7,15	2,50 $\pm$ 3,00	0% (0)	-	-	41,2% (14)	n.d-5,84	2,46 $\pm$ 2,70	0% (0)	-	-
<b>Perú (caseiras) (4)</b>	0% (0)	-	-	1,9% (1)	n.d -6,73	1,68 $\pm$ 3,37	0% (0)	-	-	0% (0)	-	-	0% (0)	-	-
<b>Supermercado (total) (20)</b>	0% (0)	-	-	0 % (0)	-	-	0% (0)	-	-	5% (1)	n.d-5,13	0,26 $\pm$ 1,15	0% (0)	-	-
<b>Frango (supermercado) (17)</b>	0% (0)	-	-	0% (0)	-	-	0% (0)	-	-	5% (1)	n.d-5,13	0,30 $\pm$ 1,24	0% (0)	-	-
<b>Perú (supermercado) (3)</b>	0% (0)	-	-	0% (0)	-	-	0% (0)	-	-	0% (0)	-	-	0% (0)	-	-
<b>Total (54)</b>	9,3% (5)	n.d -7,07	0,39 $\pm$ 1,31	25,9% (14)	n.d -7,15	1,51 $\pm$ 2,64	0% (0)	-	-	27,8% (15)	n.d-5,84	1,46 $\pm$ 2,39	0% (0)	-	-

Notas: SD – standart deviation (desvio padrão); n.d – não detectado

**Tabela 13** - Frequência (%), intervalo ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ ) e média ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ ) dos coccidiostáticos sintéticos estudados.

Tipo de amostra	Halofuginona			Diclazuril			Robenidina			Decoquinato		
	% Frequência (n° positivas)	Intervalo ( $\mu\text{g/kg}$ )	Média $\pm$ SD ( $\mu\text{g/kg}$ )	% Frequência (n° positivas)	Intervalo ( $\mu\text{g/kg}$ )	Média $\pm$ SD ( $\mu\text{g/kg}$ )	% Frequência (n° positivas)	Intervalo ( $\mu\text{g/kg}$ )	Média $\pm$ SD ( $\mu\text{g/kg}$ )	% Frequência (n° positivas)	Intervalo ( $\mu\text{g/kg}$ )	Média $\pm$ SD ( $\mu\text{g/kg}$ )
<b>Caseiras (total) (34)</b>	2,9% (1)	n.d -2,06	0,06 $\pm$ 0,36	2,9% (1)	n.d -8,30	0,24 $\pm$ 1,42	0% (0)	-	-	2,9% (1)	n.d -11,14	0,33 $\pm$ 1,91
<b>Frango (caseiras) (30)</b>	2,9% (1)	n.d -2,06	0,07 $\pm$ 0,38	2,9% (1)	n.d -8,30	0,28 $\pm$ 1,52	0% (0)	-	-	2,9% (1)	n.d -11,14	0,37 $\pm$ 2,03
<b>Perú (caseiras) (4)</b>	0% (0)	-	-	0% (0)	-	-	0% (0)	-	-	0% (0)	-	-
<b>Supermercado (total) (20)</b>	5% (1)	n.d -4,87	0,24 $\pm$ 1,09	0% (0)	-	-	0% (0)	-	-	0% (0)	-	-
<b>Frango (supermercado) (17)</b>	5% (1)	n.d -4,87	0,29 $\pm$ 1,18	0% (0)	-	-	0% (0)	-	-	0% (0)	-	-
<b>Perú (supermercado) (3)</b>	0% (0)	-	-	0% (0)	-	-	0% (0)	-	-	0% (0)	-	-
<b>Total (54)</b>	3,7% (2)	n.d -4,87	0,13 $\pm$ 0,7	1,9% (1)	n.d -8,30	0,15 $\pm$ 1,13	0% (0)	-	-	1,9% (1)	n.d -11,14	0,21 $\pm$ 1,52

Notas: SD – standart deviation (desvio padrão); n.d – não detectado



**Gráfico 3** - Incidência de cada coccidiostático em amostras caseiras e de supermercado.

### 2.2.1 Frequência

As amostras caseiras apresentaram uma contaminação maior relativamente às amostras adquiridas em supermercados, com uma frequência de detecção de 47,1% (16 das 34 amostras) e 10% (2 de 20 amostras) respectivamente.

Os coccidiostáticos ionóforos foram os que apresentaram frequências de contaminação mais elevadas. A narasina, a lasalocida e a salinomicina apresentaram valores de 27,8% (15 amostras), 25,9% (14 amostras) e 9,3% (5 amostras), respectivamente. Já a monensina e a maduramicina não foram detectadas nas amostras analisadas. A narasina foi detectada em amostras caseiras com uma frequência de 41,2% (14 amostras), sendo que todas as amostras eram de frango. Nas amostras adquiridas no supermercado verificou-se que apenas uma amostra de frango se apresentava contaminada por este coccidiostático. Foram detectados resíduos de lasalocida em amostras caseiras com uma frequência de 41,2% (14 amostras). Destas, 13 amostras de frango (38,3%) e 1 amostra de peru (1,9%) apresentavam-se positivas. Nenhuma amostra obtida nos supermercados foi positiva para este composto. A salinomicina foi detectada apenas em amostras de frango caseiras com uma frequência de 14,7% (5 amostras).

Os coccidiostáticos sintéticos foram detectados com uma menor frequência comparativamente aos coccidiostáticos ionóforos. Os coccidiostáticos sintéticos encontrados foram a halofunginona, o diclazuril e o decoquinato, com frequências de 3,7% (3 amostras) para a halofunginona e 1,9% (1 amostra) para os outros dois compostos. Não foram detectados

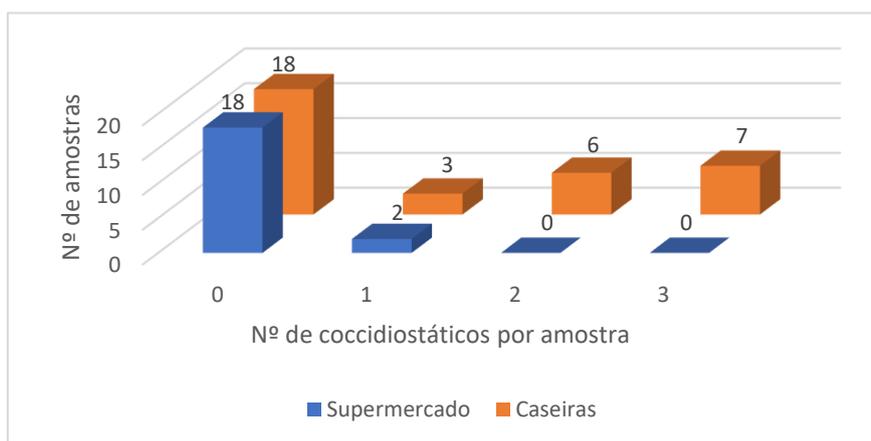
resíduos de robenidina nas amostras. A halofuginona foi detectada apenas em amostras de frango, uma amostra caseira (2,9%) e uma amostra obtida nos supermercados (5%). O diclazuril e o decoquinato foram detectados nas amostras caseiras com uma frequência de 2,9%.

### **2.2.2 Ocorrência**

No que diz respeito aos coccidiostáticos ionóforos, a lasalocida apresentou os valores máximo e médio detectados, 7,15µg/kg, e 1,51 µg/kg, respectivamente. A narasina apresentou um valor máximo de contaminação de 5,84µg/kg e uma média de 1,46µg/kg. Numa amostra de peru obtida em supermercado, este coccidiostático, apresentou uma concentração máxima de 5,13µg/kg, o que corresponde a uma média de 0,30µg/kg. A salinomicina apesar de apresentar um valor máximo de 7,07µg/kg, apresentou uma média total de 0,39µg/kg, pois foi detectada num número menor de amostras.

Nos coccidiostáticos sintéticos as concentrações máximas encontradas foram superiores às concentrações determinadas para os coccidiostáticos ionóforos. O decoquinato foi o composto com maior concentração máxima, 11,14µg/kg, numa amostra de frango caseiro, numa média total de 0,21 µg/kg. O diclazuril apresentou uma concentração máxima de 8,30µg/kg, também numa amostra de frango caseiro, e com uma média total de 0,15µg/kg. A halofuginona apresentou uma concentração máxima de 4,87µg/kg, numa amostra de frango de supermercado, e uma média total de 0,13µg/kg, muito semelhante à média do diclazuril. Na única amostra caseira positiva para halofuginona a concentração detectada foi mais baixa, com um valor de 2,06µg/kg.

Nas amostras caseiras, ao contrário das amostras de supermercado, detectou-se, geralmente, mais do que um coccidiostático por amostra. Três amostras caseiras estavam contaminadas com apenas um coccidiostático. Seis amostras estavam contaminadas com dois coccidiostáticos e sete estavam contaminadas com três coccidiostáticos. Contrariamente, das 20 amostras obtidas no supermercado apenas duas estavam contaminadas com unicamente um coccidiostático (Gráfico 4).



**Gráfico 4** - Número de coccidiostáticos por amostra.

A combinação de coccidiostáticos mais observada foi a narasina e o lasalocida, ambos compostos ionóforos. Nas amostras em que foram detectados três coccidiostáticos, a combinação encontrada foi de narasina, lasolacida e salinomicina em 57,1% das amostras. Também foram encontrados composto sintéticos em combinação com a narasina e o lasalocida, nomeadamente a halofuginona, decoquinato e diclazuril com uma frequência de 14,3% cada um.

Contrariamente ao expectável, dados os elevados níveis de produção, nas amostras de supermercado não foi encontrado qualquer indício de que a ração consumida pelos animais contivesse mais do que 1 coccidiostático. Pelo contrário, depreende-se que são utilizadas misturas de coccidiostáticos nas rações utilizadas para a criação de frangos caseiros. Os produtores de rações utilizam esta estratégia para diminuir a probabilidade das estirpes de *Eimeria* resistentes aos coccidiostáticos.

Outra forma de diminuir a resistência aos coccidiostáticos consiste na aplicação de um programa de rotação que envolve a mudança rotineira e sistemática de uma classe de coccidiostáticos para outra com um modo de ação diferente (Chapman, 2011). Num estudo realizado no Canadá, entre 2013 e 2015, Agunos *et al.* (2017) verificaram variações sazonais relativamente ao uso de coccidiostáticos. No verão, os coccidiostáticos mais frequentemente relatados foram a salinomicina, a maduramicina e o decoquinato, enquanto que, no inverno, o mais frequentemente encontrado foi a monensina e a nicarbazina (Agunos *et al.*, 2017).

De todas as amostras analisadas apenas duas apresentaram resultados não-conformes, de acordo com a legislação europeia em vigor, uma vez que se encontraram contaminadas com halofuginona a níveis superiores ao LMR estabelecido. O provável desrespeito pelo intervalo de segurança (IS), estabelecido pela legislação europeia, de cinco dias para a

halofuginona, resultou em níveis elevados do composto nestas matrizes alimentares. O IS permite que os compostos sejam eliminados do organismo do animal de forma a manter a segurança do consumidor.

De acordo com uma indústria portuguesa produtora de rações para frangos, relativamente ao mercado rural, são normalmente realizados ciclos completos, até sete dias antes do abate, com lasalocida (125ppm) e, nos últimos sete dias, usam ração sem coccidiostáticos, de forma a respeitar o IS estabelecido pela legislação.

Ainda de acordo com esta indústria, no que respeita ao mercado industrial, na 1ª fase (0-17 dias) usam narazina (50 ppm) e nicarbazina (50ppm). Já na 2ª fase (18 dias - até ao abate) administram narazina (100ppm). Quando se verificam problemas sistemáticos de coccidiose nos bandos realizam um ciclo completo com decoquinato (30ppm). De forma a evitar resistências aos coccidiostáticos são realizados programas de rotação que variam durante o ano, dependendo das resistências que se vão encontrando no campo. Em casos extremos optam pela vacinação durante três ciclos seguidos e depois voltam ao programa *standard*.

Quando se opta pela vacinação, ou seja, imunização dos bandos, usam-se rações sem coccidiostáticos, estas rações são mais baratas, já que rações com estes compostos se tornam dispendiosas. Para terem preços mais competitivos as grandes explorações optam por dar rações sem coccidiostáticos, o que pode ser uma possível explicação para os resultados obtidos neste estudo. A empresa acima referida também explicou que a vacinação também compensaria na criação de frangos de ciclos longos, ou seja, na criação de frangos de campo.

### **2.2.3 Comparação com outros estudos**

Um estudo realizado na Polónia entre 2007 e 2010 analisou 3718 amostras de frango, peru, ovos, água e ração, para o controlo de resíduos de coccidiostáticos verificaram que, tal como no presente estudo, os coccidiostáticos ionóforos foram os mais utilizados na prevenção da coccidiose. Destes, o lasalocida foi o mais frequentemente detectado (32,8% do total de amostras não conformes). Em 2007 e em 2010, estes autores detetaram, nas referidas amostras, lasalocida, salinomicina, nicarbazina e maduramicina, em 2009 a maduramicina não foi detectada. Em 2008 para além dos compostos detectados anteriormente também se detectaram amostras com robenidina (Olejnik *et al.*, 2011).

Em contrapartida num estudo realizado em Itália, entre 2012 e 2017, que analisou 202 amostras de músculo de bovino, suíno, ovino, coelho e de frango, sendo que 82,2% das amostras analisadas eram de frango. As amostras analisadas revelaram frequência de

contaminação que variou entre 14,7% e 48,7%, durante o período considerado e os coccidiostáticos sintéticos foram os mais detectados. Os compostos ionóforos foram detectados em apenas 6 amostras (2,8%), e destes, os coccidiostáticos detectados foram principalmente a lasalocida e a narasina. Os coccidiostáticos sintéticos foram detectados em 66 amostras (31,7%), dos quais os mais detectados foram a nicarbazina e o diclazuril. Em nenhuma amostra de carne foi detectado mais do que um coccidiostático e nenhuma amostra ultrapassou os LMRs estabelecidos (Roila *et al.*, 2019).

Num estudo realizado de acordo com o PNRC da Grécia (Dasenaki e Thomaidis, 2018) analisaram-se 82 amostras de frango e ovos em que apenas uma amostra de frango ultrapassou o LMR. No entanto, foram detectados resíduos de coccidiostáticos em 25 amostras abaixo do CC $\alpha$ . Os compostos que apresentaram maior frequência foram o decoquinato, a salinomicina e a maduramicina. À semelhança deste estudo algumas amostras apresentaram mais do que um coccidiostático, porém a combinação mais frequente foi o decoquinato e a salinomicina.

De acordo com PNCR de 2018 na UE, 0,17% das amostras de músculo de frango foram não-conformes. O composto com maior frequência de detecção foi o lasalocida, seguido pela monensina, maduramicina e salinomicina. Assim verificou-se que na UE, em 2018, os compostos mais utilizados foram os coccidiostáticos ionóforos. No relatório de 2017 os coccidiostáticos ionóforos também foram os mais utilizados, mas o composto detectado com maior frequência foi a salinomicina (EFSA (European Food Safety Authority), 2019).

Em Espanha um estudo analisou músculo de frango, músculo de bovino e seus derivados: rim e fígado, ovos, leite e gordura de suíno. Os coccidiostáticos monensina e salinomicina ultrapassaram o valor do LMR na gordura de suíno; a narasina nos ovos e a salinomicina em rim de bovino. Os valores de concentração máxima detectados neste estudo foram de 11,14 $\mu$ g/kg para o decoquinato, este valor é inferior aos observados nos estudos acima referidos, principalmente quando comparado com às concentrações máximas de 2800 $\mu$ g/kg encontradas no músculo de frango. Os ovos não foram considerados como matriz para a realização deste estudo, mas são importantes pois são um derivado da indústria avícola, indicando assim problemas a nível das galinhas poedeiras que recebem rações com coccidiostáticos e não respeitam o intervalo de segurança dos coccidiostáticos, como definido pela legislação, colocando em risco a saúde do consumidor (González-Rubio *et al.*, 2020).

A Tabela 14 compara a frequência e os níveis de coccidiostáticos, dos estudos referidos acima, nos diferentes países.

**Tabela 14** - Frequência (%) e níveis (µg/kg) de coccidiostáticos em carnes brancas reportados na literatura científica.

País	Tipo de amostra	N.º de amostras	Frequência (%)	Teores (µg/kg) Min-Máx	Referência
Polónia	Fígado de frango	2011	2,4	8,5-2800	(Olejnik <i>et al.</i> , 2011)
Polónia	Fígado de peru	307	0,3	580	(Olejnik <i>et al.</i> , 2011)
Polónia	Ovos	312	4,5	n.d-320	(Olejnik <i>et al.</i> , 2011)
Grécia	Músculo de frango	29	3,4	53.5	(Dasenaki e Thomaidis, 2018)
União Europeia	Músculo de frango	13736	0,2	-	(EFSA (European Food Safety Authority), 2020)
Itália	Músculo de frango	166	41,0	n.d-516	(Roila <i>et al.</i> , 2019)
Itália	Ovos	151	15,9	n.d-1002	(Roila <i>et al.</i> , 2019)
Espanha	Vários	14	21,4	n.d- 5,6	(González-Rubio <i>et al.</i> , 2020)

### 2.3 Avaliação de Risco

A ingestão diária estimada (EDI) foi calculada através de um método determinístico (IPCS, 2009), utilizando a equação

$$EDI \text{ (mg/kg p.c./dia)} = (\Sigma c) (CN^{-1}D^{-1}K^{-1}),$$

onde  $\Sigma c$  é a soma de coccidiostáticos no total das amostras (mg/kg), C é o consumo anual estimado por pessoa, N é o número total de amostras analisadas, D é o número de dias num ano e K é o peso corporal (kg).

Na Tabela 15 apresentam-se os resultados do cálculo da ingestão diária estimada (EDI), para as diferentes populações, e sua comparação com os valores recomendados para a ingestão diária aceitável (ADI) (Dorne *et al.*, 2013). Foram efetuadas duas avaliações da EDI tendo por base dois cenários diferentes. No primeiro cenário foi tomado em consideração o nível médio de consumo de carne branca, pelas diferentes populações, e o segundo teve por base o pior cenário de consumo, ou seja, o consumo mais elevado.

De acordo com o último relatório do “Inquérito Nacional de Alimentos e Atividade Física, IAN-AF 2015-2016”, as populações adulta e adolescente destacaram-se como os principais consumidores de carnes brancas, em média, 17,2 e 17,5kg/ano, respectivamente. Quanto às crianças e aos idosos os valores de consumo médio são inferiores, 12,0kg/ano e 10,2kg/ano, respectivamente (Lopes *et al.*, 2017). Quando tomamos em consideração o

consumo mais elevado de carne branca, os valores aumentam para 27,0kg/ano para as crianças, 42,3kg/ano para os adolescentes, 45,3kg/ano para os adultos e 33,6kg/ano para os idosos. (Lopes *et al.*, 2017)

O peso corporal médio considerado para a população adulta e idosa portuguesa foi de 69 kg (Arezes, Barroso, Cordeiro, Costa & Miguel, 2006). Para crianças (2-12 anos) e adolescentes (13 a 18 anos) o peso corporal médio considerado foi de 24 e 51kg, respectivamente (Direcção-Geral da Saúde, 2006).

**Tabela 15** - Comparação da ADI e EDI (mg/kg peso por dia), usando as abordagens de consumo médio e pior cenário (wcs) de consumo, para o total dos coccidiostáticos, selecionados para as diferentes populações.

Composto	ADI (mg/kg peso por dia)	Crianças		Adolescentes		Adultos		Idosos	
		EDI (wcs) (mg kg <sup>-1</sup> dia <sup>-1</sup> )	(EDI/ADI) x 100 (wcs) (%)	EDI (wcs) (mg kg <sup>-1</sup> dia <sup>-1</sup> )	(EDI/ADI) x 100 (wcs) (%)	EDI (wcs) (mg kg <sup>-1</sup> dia <sup>-1</sup> )	(EDI/ADI) x100 (wcs) (%)	EDI (wcs) (mg kg <sup>-1</sup> dia <sup>-1</sup> )	(EDI/ADI) x100 (wcs) (%)
Decoquinato	0,075	2,88x10 <sup>-7</sup> (6,47x10 <sup>-7</sup> )	0,00 (0,00)	1,97x10 <sup>-7</sup> (4,77x10 <sup>-7</sup> )	0,00 (0,00)	1,43x10 <sup>-7</sup> (3,79x10 <sup>-7</sup> )	0,00 (0,00)	8,51x10 <sup>-8</sup> (2,80x10 <sup>-7</sup> )	0,00 (0,00)
Diclazuril	0,029	2,05x10 <sup>-7</sup> (4,62x10 <sup>-7</sup> )	0,00 (0,00)	1,41x10 <sup>-7</sup> (3,41x10 <sup>-7</sup> )	0,00 (0,00)	1,02x10 <sup>-7</sup> (2,71x10 <sup>-7</sup> )	0,00 (0,00)	6,08x10 <sup>-8</sup> (2,00x10 <sup>-7</sup> )	0,00 (0,00)
Halofuginona	0,00003	1,78x10 <sup>-7</sup> (4,01x10 <sup>-7</sup> )	0,59 (1,34)	1,22x10 <sup>-7</sup> (2,95x10 <sup>-7</sup> )	0,41 (0,98)	8,88x10 <sup>-8</sup> (2,35x10 <sup>-7</sup> )	0,30 (0,78)	5,27x10 <sup>-8</sup> (1,73x10 <sup>-7</sup> )	0,18 (0,58)
Lasalocida	0,005	2,07x10 <sup>-6</sup> (4,65x10 <sup>-6</sup> )	0,04 (0,09)	1,42x10 <sup>-6</sup> (3,43x10 <sup>-6</sup> )	0,03 (0,07)	1,03x10 <sup>-6</sup> (2,73x10 <sup>-6</sup> )	0,02 (0,05)	6,12x10 <sup>-7</sup> (2,01x10 <sup>-6</sup> )	0,01 (0,04)
Narasina	0,005	2,00x10 <sup>-6</sup> (4,50x10 <sup>-6</sup> )	0,04 (0,09)	1,37x10 <sup>-6</sup> (3,32x10 <sup>-6</sup> )	0,03 (0,07)	9,97x10 <sup>-7</sup> (2,64x10 <sup>-6</sup> )	0,02 (0,05)	5,91x10 <sup>-7</sup> (1,95x10 <sup>-6</sup> )	0,01 (0,04)
Salinomicina	0,005	5,34x10 <sup>-7</sup> (1,20x10 <sup>-6</sup> )	0,01 (0,02)	3,67x10 <sup>-7</sup> (8,86x10 <sup>-7</sup> )	0,01 (0,02)	2,66x10 <sup>-7</sup> (7,05x10 <sup>-7</sup> )	0,01 (0,01)	1,58x10 <sup>-7</sup> (5,20x10 <sup>-7</sup> )	0,00 (0,01)

Analisando a Tabela 15, as EDIs foram inferiores às ADIs para todos os coccidiostáticos analisados, mesmo quando se utilizou a abordagem do pior cenário de consumo. As EDIs calculadas para o consumo médio de carne branca variaram entre  $5,27 \times 10^{-8} \text{ mg kg}^{-1} \text{ dia}^{-1}$ , para a ingestão de halofuginona pelos idosos, e  $2,07 \times 10^{-6} \text{ mg kg}^{-1} \text{ dia}^{-1}$ , para a ingestão de lasolacida pelas crianças. Na abordagem de pior cenário as EDIs oscilaram entre  $2,35 \times 10^{-7} \text{ mg kg}^{-1} \text{ dia}^{-1}$ , para a ingestão de halofuginona pelos adultos, e  $4,65 \times 10^{-6} \text{ mg kg}^{-1} \text{ dia}^{-1}$ , para a ingestão de lasolacida pelas crianças.

Uma vez que o menor valor de ADI,  $3,00 \times 10^{-5} \text{ mg kg}^{-1} \text{ dia}^{-1}$ , está recomendado para a halofuginona (Dorne *et al.*, 2013), de entre todos os coccidiostáticos, este é o composto que representa um maior risco para os diferentes grupos etários. As crianças são a faixa etária com risco mais elevado, quer quando se considera o consumo médio de carne branca, 0,59%, quer quando se considera o pior cenário de consumo, 1,34%. Para os restantes grupos populacionais o risco relativo aos cenários I e II foi: para os adolescentes 0,41% (wcs 0,98%), para os adultos 0,30% (wcs 0,78%), e para os idosos 0,18% (wcs 0,58%).

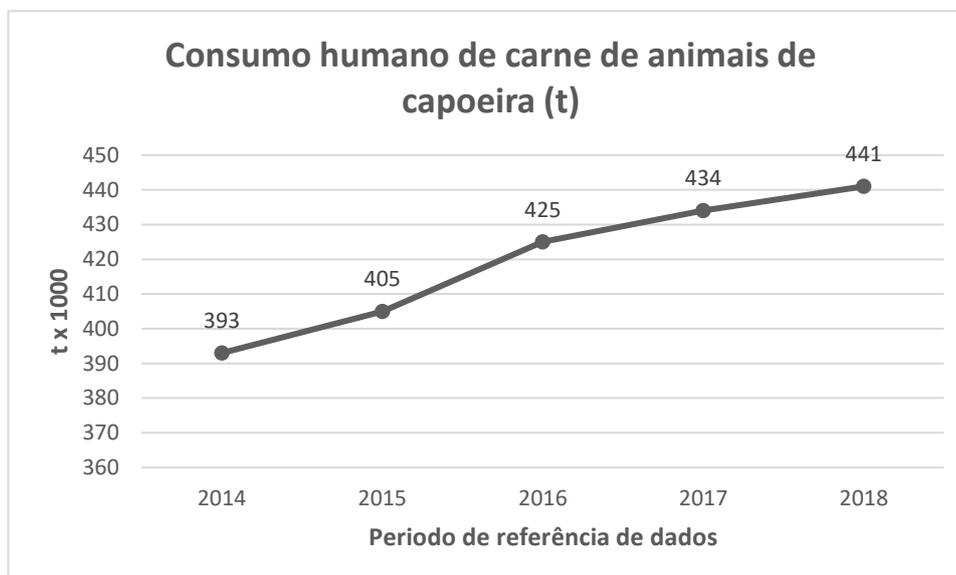
A narasina e o lasalocida apresentaram o mesmo risco para todas as faixas etárias: para as crianças o risco foi de 0,04% (wcs 0,09%), para os adolescentes foi de 0,03% (wcs 0,07%), para os adultos foi 0,02% (wcs 0,05%) e para os idosos 0,01% (wcs 0,04%).

A salinomicina foi o coccidiostático que representou menor risco. Para as crianças, adolescentes e adultos apresentou risco de 0,01%, e para os idosos não apresentou risco. Quando se considerou o pior cenário de consumo, para as crianças e adolescentes o risco foi de 0,02%, enquanto que para os adultos e idosos o risco foi de 0,01%. Os compostos decoquinato e diclazuril, não apresentam qualquer risco para os consumidores.

De forma semelhante, em estudos similares os dados revelam que a exposição aos coccidiostáticos pelo consumo de carne representa menos de 1% das ADIs para os coccidiostáticos autorizados na UE e para as categorias de idade lactentes / crianças (0 a 2 anos), crianças (3 a 9 anos), adolescentes (10 a 17 anos), adultos (18-64 anos) e idosos (65-97 anos) (Roila *et al.*, 2019).

O risco associado à presença de resíduos de coccidiostáticos nas amostras diminui à medida que a idade aumenta. Assim, as crianças estão sujeitas a um risco maior e os idosos a um risco menor. O menor consumo de carne branca por parte dos idosos faz com que estes estejam menos expostos a estes compostos nesta matriz alimentar, o que conduz a uma menor ingestão diária de coccidiostáticos.

Assim, neste estudo as crianças são o grupo de maior risco, pois têm maior vulnerabilidade a componentes tóxicos quer devido à relação entre a sua massa corporal e consumo de alimentos quer devido ao seu desenvolvimento fisiológico (Pereira *et al.*, 2018). Sabendo que o consumo humano de carne de animais de capoeira, em Portugal, tem vindo a aumentar ao longo dos anos, segundo o Instituto Nacional de Estatística (INE), o risco tenderá a ser cada vez maior com o passar do tempo.



**Gráfico 5** - Consumo humano de carne de animais de capoeira (t) fornecido pelo Instituto Nacional de Estatística que pode ser consultado no seguinte site: [https://www.ine.pt/xportal/xmain?xpid=INE&xpgid=ine\\_indicadores&indOcorrCod=0000210&contexto=bd&selTab=tab2](https://www.ine.pt/xportal/xmain?xpid=INE&xpgid=ine_indicadores&indOcorrCod=0000210&contexto=bd&selTab=tab2).

Em síntese, os resultados obtidos nesta avaliação de risco indicam que este é inferior a 0,60%. No entanto, não se avaliaram todas as matrizes alimentares nas quais os coccidiostáticos podem estar presentes, tais como outros tipos de carne e seus derivados (fígado, rim, gordura, leite, ovos), assim como em peixes de aquacultura. Deste modo, o risco aqui calculado será inferior à realidade.

Por outro lado, embora tenham sido registados alguns casos de toxicidade aguda em humanos, devido à ingestão de moléculas puras, a grande preocupação prende-se com a toxicidade crónica devido à exposição de longo prazo a baixos níveis de coccidiostáticos (Roila *et al.*, 2019). Assim, são necessários mais estudos para uma avaliação completa do risco e para avaliar possíveis efeitos de toxicidade crónica.

# CONCLUSÃO

Os coccidiostáticos são amplamente utilizados de forma profilática na indústria avícola com o objectivo de controlar as coccidioses, diminuir as perdas e assegurar a saúde e bem-estar dos animais. Consequentemente, é primordial o seu controlo em amostras de aves, uma vez que podem constituir um factor de risco para a saúde humana.

Tendo como objectivo garantir a segurança do consumo de carne de aves, foi desenvolvida uma metodologia analítica para a determinação da presença de resíduos de nove coccidiostáticos em músculo de aves, monensina, maduramicina, halofuginona, lasalocida, narasina, salinomicina, robenidina, decoquinato e diclazuril) recorrendo à cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa sequencial (LC-MS/MS).

Foram recolhidas e analisadas amostras de origem caseira e adquiridas em supermercado. Das 54 amostras analisadas, as de origem caseiras apresentaram uma contaminação maior relativamente às amostras adquiridas nos supermercados. Do total de amostras de músculo de frango e peru analisadas, verificou-se que duas se encontravam contaminadas com resíduos acima dos permitidos pelo Regulamento (CE) n.º 1831/2003 do Parlamento Europeu e do Conselho, de 22 de Setembro de 2003. Destas, uma amostra foi adquirida no supermercado e uma amostra tinha origem caseira. Ambas se encontravam contaminadas com halofuginona, o que evidência a falta de cumprimento dos intervalos de segurança por parte tanto da indústria avícola como dos produtores domésticos.

Em relação à avaliação da exposição humana aos coccidiostáticos, através da ingestão de carnes de aves de capoeira que contêm coccidiostáticos, verificou-se que a EDI é inferior à ADI estabelecida. A avaliação do risco permitiu concluir que os coccidiostáticos não apresentam risco significativo para o consumidor. No entanto, conclui-se que as crianças constituem a população mais vulnerável, devido ao maior consumo de carne branca em relação ao peso corporal e à imaturidade dos seus sistemas em desenvolvimento, embora os estudos científicos sejam ainda insuficientes para a avaliação dos efeitos a longo prazo.

A vacinação constitui um papel muito importante no controlo da coccidiose podendo ser o factor chave para a diminuição, e talvez erradicação, da utilização profilática de coccidiostáticos em aves, diminuindo o risco associado à presença de resíduos de coccidiostáticos nas matrizes alimentares.

Com a elaboração deste estudo realça-se a importância do controlo dos coccidiostáticos, de acordo com os PNCRs estabelecidos pela legislação europeia, de forma a garantir a sua correcta utilização, tendo como objectivo principal a protecção da saúde humana.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGUNOS, Agnes *et al.* - Antimicrobial use surveillance in broiler chicken flocks in Canada, 2013-2015. **PLOS ONE**. . ISSN 19326203. 12:6 (2017) 2013–2015. doi: 10.1371/journal.pone.0179384.

AHMAD, Tarek A.; EL-SAYED, Bassant A.; EL-SAYED, Laila H. - Development of immunization trials against *Eimeria* spp. **Trials in Vaccinology**. . ISSN 18794378. 5:2016) 38–47. doi: 10.1016/j.trivac.2016.02.001.

BACILA, Danniele Miranda *et al.* - Current research, regulation, risk, analytical methods and monitoring results for nicarbazin in chicken meat: a perspective review. **Food Research International**. . ISSN 0963-9969. 2017). doi: 10.1016/j.foodres.2017.07.011.

BARBOUR, EK *et al.* - A Review of Approaches Targeting the Replacement of Coccidiostat Application in Poultry Production. **Revista Brasileira de Ciência Avícola**. . ISSN 1516-635X. 17:4 (2015) 405–418. doi: 10.1590/1516-635x1704405-418.

BARRETO, Fabiano *et al.* - A simple and high-throughput method for determination and confirmation of 14 coccidiostats in poultry muscle and eggs using liquid chromatography – quadrupole linear ion trap - tandem mass spectrometry ( HPLC – QqLIT- MS / MS ): Validation according to. **Talanta**. 168:February (2017) 43–51. doi: 10.1016/j.talanta.2017.02.007.

BIENENMANN-PLOUM, Monique E. *et al.* - Development of a five-plex flow cytometric immunoassay for the simultaneous detection of six coccidiostats in feed and eggs. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**. 404:1831 (2012) 1361–1373. doi: 10.1007/s00216-012-6214-1.

BLAKE, Damer P. *et al.* - Recombinant anticoccidial vaccines - a cup half full? **Infection, Genetics and Evolution**. . ISSN 15677257. 55:July (2017) 358–365. doi: 10.1016/j.meegid.2017.10.009.

CHANG, Shun-Hsien *et al.* - Multi-residue analysis using liquid chromatography tandem mass spectrometry for detection of 20 coccidiostats in poultry , livestock , and aquatic tissues. **Journal of Food and Drug Analysis**. . ISSN 1021-9498. 27:3 (2019) 703–716. doi: 10.1016/j.jfda.2019.02.004.

CHAPMAN, H. D. - Coccidiosis in the turkey. **Avian Pathology**. 37:3 (2008) 205–224. doi: 10.1080/03079450802050689.

CHAPMAN, H. D. - Rotation program for coccidiosis control. **International Poultry Production**. 15:1 (2011) 14–15.

CHAPMAN, H. David *et al.* - A Selective Review of Advances in Coccidiosis Research. **Advances in Parasitology**. . ISSN 0065-308X. 83:2013) 93–171. doi: 10.1016/B978-0-12-407705-8.00002-1.

CLARKE, L. *et al.* - Determination of 20 coccidiostats in milk , duck muscle and non-avian muscle tissue using UHPLC-MS / MS. **Food Additives & Contaminants: Part A**. 30:6 (2013) 958–969. doi: 10.1080/19440049.2013.794306.

CLARKE, Lesa *et al.* - A review of coccidiostats and the analysis of their residues in meat and other food. **Meat Science**. . ISSN 0309-1740. 97:3 (2014) 358–374. doi: 10.1016/j.meatsci.2014.01.004.

COMISSÃO DAS COMUNIDADES EUROPEIAS - Directiva da Comissão de 20 de Julho de 1990 que altera os anexos da Directiva 70/524/CEE do Conselho relativa aos aditivos na alimentação para animais. **Jornal Oficial das Comunidades Europeias**. 1990) 25–26.

COMISSÃO DAS COMUNIDADES EUROPEIAS - Decisão da Comissão de 27 de Outubro de 1997 que fixa o nível e a frequência de amostragem previstos pela Directiva 96/23/CE do Conselho para a pesquisa de determinadas substâncias e seus resíduos em certos produtos de origem animal. **Jornal Oficial das Comunidades Europeias**. 1997) 12–15.

COMISSÃO DAS COMUNIDADES EUROPEIAS - Decisão da Comissão de 12 de agosto de 2002 que dá execução ao disposto na Directiva 96/23/CE do Conselho relativamente ao desempenho de métodos métodos analíticos e à interpretação de resultados. **Jornal Oficial da Comunidade Europeia**. 2002) 1–29.

COMISSÃO DAS COMUNIDADES EUROPEIAS - Regulamento (CE) N.º 124/2009 da Comissão de 10 de Fevereiro de 2009 que define limites máximos para a presença de coccidiostáticos ou histomonostáticos em géneros alimentícios resultante da contaminação cruzada inevitável destas substâncias em alimentos . **Jornal Oficial da União Europeia**. 2009) 7–11.

COMISSÃO DAS COMUNIDADES EUROPEIAS - Directiva 2009/8/CE Da Comissão de 10 de Fevereiro de 2009 que altera o anexo I da Directiva 2002/32/CE do Parlamento Europeu e do Conselho no que se refere aos limites máximos da contaminação cruzada inevitável por coccidiostáticos e histomonostáticos. **Jornal Oficial da União Europeia**. 2009) 19–25.

COMISSÃO EUROPEIA - Regulamento (UE) N° 37/2010 da Comissão de 22 de Dezembro de 2009 relativo a substâncias farmacologicamente activas e respectiva classificação no que respeita aos limites máximos de resíduos nos alimentos de origem animal. **Jornal Oficial da União Europeia**. 2010) 11–36.

COMISSÃO EUROPEIA - Regulamento (UE) N. o 610/2012 da comissão de 9 de julho de 2012 que altera o Regulamento (CE) n. o 124/2009, de 10 de fevereiro de 2009, que define limites máximos para a presença de coccidiostáticos ou histomonostáticos em géneros alimentícios resultant. **Jornal Oficial da União Europeia**. 2012) 3.

CONSELHO DA UNIÃO EUROPEIA - Directiva 96/23/CE do Conselho de 29 de Abril de 1996 relativa às medidas de controlo a aplicar a certas substâncias e aos seus resíduos nos animais vivos e respectivos produtos e que revoga as Directivas 85/358/CEE e 85/358/CEE e 86/469/CEE e as Decisões. **Jornal Oficial das Comunidades Europeias Europeias**. 1996) 1–23.

CONSELHO DAS COMUNIDADES EUROPEIAS - Regulamento (CEE) N.o 2377/90 do conselho de 26 de Junho de 1990 que prevê um processo comunitário para o estabelecimento de limites máximos de resíduos de medicamentos veterinários nos alimentos de origem animal. **Jornal Oficial da Comunidade Europeia**. 1990) 1–54.

CVMP (COMMITTEE FOR MEDICINAL PRODUCTS FOR VETERINARY USE) - Guideline for demonstration of efficacy for VMPs containing anticoccidial substances. **European Medicines Agency, 2018**. 2018) 1–20.

DASENAKI, Marilena E.; THOMAIDIS, Nikolaos S. - Multi-residue methodology for the determination of 16 coccidiostats in animal tissues and eggs by Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography - Tandem Mass Spectrometry. **Food Chemistry**. . ISSN 0308-8146. 275:2019 (2018) 668–680. doi: 10.1016/j.foodchem.2018.09.138.

DELAHAUT, Ph *et al.* - Multi-residue method for detecting coccidiostats at carry-over level in feed by HPLC – MS / MS. **Food Additives and Contaminants**. 27:6 (2010) 801–809. doi: 10.1080/19440040903552408.

DORNE, J. L. C. M. *et al.* - Risk assessment of coccidostatics during feed cross-contamination : Animal and human health aspects. **Toxicology and Applied Pharmacology**. . ISSN 0041-008X. 270:3 (2013) 196–208. doi: 10.1016/j.taap.2010.12.014.

EFSA (EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY) - Report for 2017 on the results from the

monitoring of veterinary medicinal product residues and other substances. **EFSA Supporting Publications 2019: EN-1578**. 2019). doi: 10.2903/sp.efsa.2019.EN-1578.

EFSA (EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY) - Report for 2018 on the results from the monitoring of veterinary medicinal product residues and other substances in live animals and animal products. **EFSA Supporting Publications 2020: EN-1775**. . ISSN 2397-8325. 2020). doi: 10.2903/sp.efsa.2020.en-1775.

EL-SHERRY, S. *et al.* - Cecal coccidiosis in turkeys: Comparative biology of Eimeria species in the lower intestinal tract of turkeys using genetically typed, single oocyst-derived lines. **Parasitology Research**. . ISSN 14321955. 118:2 (2019) 583–598. doi: 10.1007/s00436-018-6147-5.

EUROPEAN MEDICINES AGENCY - Guideline on the approach to establish a pharmacological. **Committee for Medicinal Products for Veterinary Use (CVMP)**. 2012) 1–6.

EUROPEAN UNION - **European Union Register of Feed Additives pursuant to Regulation (EC) No 1831/2003**

FATOBA, Abiodun Joseph; ADELEKE, Matthew Adekunle - Diagnosis and control of chicken coccidiosis: a recent update. **Journal of Parasitic Diseases**. . ISSN 09750703. 42:4 (2018) 483–493. doi: 10.1007/s12639-018-1048-1.

FEIA, Chenzhong *et al.* - Anticoccidial effects of a novel triazine nitromezuril in broiler chickens. **Veterinary Parasitology**. . ISSN 03044017. 198:1–2 (2013) 39–44. doi: 10.1016/j.vetpar.2013.08.024.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS - **Gateway to poultry production and products** [Em linha] [Consult. 11 jun. 2020]. Disponível em WWW:<URL:<http://www.fao.org/poultry-production-products/en/>>.

GALARINI, Roberta *et al.* - Development and validation of a multi-residue liquid chromatography – tandem mass spectrometry confirmatory method for eleven coccidiostats in eggs. **Analytica Chimica Acta**. . ISSN 0003-2670. 700:1–2 (2011) 167–176. doi: 10.1016/j.aca.2011.02.032.

GONZÁLEZ-RUBIO, S. *et al.* - A new sample treatment strategy based on simultaneous supramolecular solvent and dispersive solid-phase extraction for the determination of ionophore coccidiostats in all legislated foodstuffs. **Food Chemistry**. . ISSN 18737072.

326:May (2020) 126987. doi: 10.1016/j.foodchem.2020.126987.

HUET, Anne-Catherine *et al.* - Screening methods and recent developments in the detection of anticoccidials. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**. 405:24 (2013) 7733–51. doi: 10.1007/s00216-013-7035-6.

INE (INSTITUTO NACIONAL DE ESTATÍSTICA) - **Balança Alimentar Portuguesa 2012-2016** [Em linha] Disponível em WWW:<URL:www.ine.pt>.

JONES, P. J. *et al.* - A review of the financial impact of production diseases in poultry production systems. **Animal Production Science**. . ISSN 18365787. 59:9 (2019) 1585–1597. doi: 10.1071/ANI8281.

KADYKALO, Author Stefanie *et al.* - The Value of Anticoccidials for Sustainable Global Poultry Production. **International Journal of Antimicrobial Agents**. . ISSN 0924-8579. 51:3 (2017) 304–310. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2017.09.004.

LOPES, Carla *et al.* - **Inquérito Alimentar Nacional e de Atividade Física IAN-AF, 2015-2016** [Em linha] Disponível em WWW:<URL:www.ian-af.up.pt>.

MATUS, Johanna L.; BOISON, Joe O. - A multi-residue method for 17 anticoccidial drugs and ractopamine in animal tissues by liquid chromatography-tandem mass spectrometry and time-of-flight mass spectrometry. **Drug Testing and Analysis**. 8:5–6 (2019). doi: 10.1002/dta.2019.

NOACK, Sandra; CHAPMAN, H. David; SELZER, Paul M. - Anticoccidial drugs of the livestock industry. **Parasitology Research**. 118:2009–2026 (2019). doi: <https://doi.org/10.1007/s00436-019-06343-5>.

OLEJNIK, Małgorzata *et al.* - Residue control of coccidiostats in food of animal origin in Poland during 2007 – 2010. **Food Additives and Contaminants: Part B**. 4:4 (2011) 259–267. doi: 10.1080/19393210.2011.637238.

PARLAMENTO EUROPEU E CONSELHO DA UNIÃO EUROPEIA - Regulamento (CE) n.º 1831/2003 - Relativo aos aditivos destinados à alimentação animal. **Jornal Oficial da União Europeia**. 268:2003) 29–43.

PARLAMENTO EUROPEU E O CONSELHO DA UNIÃO EUROPEIA - Regulamento N.º 178/2002 do Parlamento Europeu e do Conselho de 28 de Janeiro de 2002 que determina os princípios e normas gerais da legislação alimentar, cria a Autoridade Europeia para a Segurança

dos Alimentos e estabelece procedimentos em matéria de se. **Jornal Oficial das Comunidades Europeias**. 31:2002) 1–24.

PARLAMENTO EUROPEU E O CONSELHO DA UNIÃO EUROPEIA - Regulamento (CE) N.º 1831/2005 do Parlamento Europeu e do Conselho de 12 de Janeiro de 2005 que estabelece requisitos de higiene dos alimentos para animais. **Jornal Oficial da União Europeia** L. 2005) 1–22.

PARLAMENTO EUROPEU E O CONSELHO DA UNIÃO EUROPEIA - Regulation (EC) No 470/2009 do Parlamento Europeu e do Conselho de 6 de Maio de 2009 que prevê procedimentos comunitários para o estabelecimento de limites máximos de resíduos de substâncias farmacologicamente activas nos alimentos de origem animal, que r. **Jornal Oficial da União Europeia**. 2009) 11–22.

PEEK, Herman - **Resistance to anticoccidial drugs : alternative strategies to control coccidiosis in broilers coccidiosis in broilers**. [S.l.] : Utrecht, 2010

PEREIRA, André M. P. T. *et al.* - Risk assessment of fluoroquinolones from poultry muscle consumption: Comparing healthy adult and pre-school populations. **Food and Chemical Toxicology**. . ISSN 18736351. 118:December 2017 (2018) 340–347. doi: 10.1016/j.fct.2018.05.035.

QUIROZ-CASTAÑEDA, Rosa Estela; DANTÁN-GONZÁLEZ, Edgar - Control of Avian Coccidiosis: Future and Present Natural Alternatives. **BioMed Research International**. 2015:2015) 11. doi: 10.1155/2015/430610.

RADIČEVIĆ, T. *et al.* - Coccidiostats in unmedicated feedingstuffs for poultry. **IOP Conference Series: Earth and Environmental Science**. 85:2017). doi: 10.1088/1755-1315/85/1/012080.

REIG, Milagro; TOLDRA, Fidel - Veterinary drug residues in meat: Concerns and rapid methods for detection. **Meat Science**. 78:1–2 (2008) 60–67. doi: 10.1016/j.meatsci.2007.07.029.

RODRIGUES, Ana Lúcia - **Desenvolvimento e validação de uma metodologia analítica para a detecção simultânea de de Dissertação Desenvolvimento e validação de uma metodologia analítica para a detecção simultânea de de**. [S.l.] : Universidade de Lisboa, 2014

ROILA, Rossana *et al.* - Occurrence and Residue Concentration of Coccidiostats in Feed and

Food of Animal Origin; Human Exposure Assessment. **Foods**. 8:10 (2019) 1–16. doi: <https://doi.org/10.3390/foods8100477>.

RUBERT, J. *et al.* - Application of hybrid linear ion trap-high resolution mass spectrometry to the analysis of mycotoxins in beer. **Food Additives and Contaminants - Part A**. . ISSN 19440049. 28:10 (2011) 1438–1446. doi: 10.1080/19440049.2011.595015.

RUSKO, Janis *et al.* - Development and optimization of confirmatory liquid chromatography—Orbitrap mass spectrometry method for the determination of 17 anticoccidials in poultry and eggs. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**. . ISSN 0731-7085. 164:2019) 402–412. doi: 10.1016/j.jpba.2018.10.056.

UNITED NATIONS - **World population prospects 2019** [Em linha] Disponível em WWW:<[URL:http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12283219](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12283219)>.

ZHAO, Xia *et al.* - Development and comparison of HPLC-MS/MS and UPLC-MS/MS methods for determining eight coccidiostats in beef. **Journal of Chromatography B**. . ISSN 1873376X. 1087–1088:2018) 98–107. doi: 10.1016/j.jchromb.2018.04.044.