

**UNIVERSIDADE FEDERAL FLUMINENSE
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA
VETERINÁRIA - ÁREA DE CONCENTRAÇÃO HIGIENE
VETERINÁRIA E PROCESSAMENTO TECNOLÓGICO
DE PRODUTOS DE ORIGEM ANIMAL**

RAQUEL GOUVÊA

**PESQUISA DE RESÍDUOS DE ENROFLOXACINA EM
OVOS DE GALINHA POR ELISA E CROMATOGRÁFIA
LÍQUIDA ACOPLADA À ESPECTROMETRIA DE MASSAS
SEQUENCIAL (LC-MS/MS)**

Niterói, RJ

2014

**UNIVERSIDADE
FEDERAL
FLUMINENSE**

RAQUEL GOUVÊA

**PESQUISA DE RESÍDUOS DE ENROFLOXACINA EM OVOS DE GALINHA POR
ELISA E CROMATOGRÁFIA LÍQUIDA ACOPLADA À ESPECTROMETRIA DE
MASSAS SEQUENCIAL (LC-MS/MS)**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária da Universidade Federal Fluminense, como requisito parcial para obtenção do grau de Doutora. Área de concentração: Higiene Veterinária e Processamento Tecnológico de Produtos de Origem Animal

Orientadora: Profa. Dra. Virginia Leo de Almeida Pereira

Co-orientadora: Profa. Dra. Maria Helena Cosendey de Aquino

Niterói, RJ

2014

G719 Gouvêa, Raquel

Pesquisa de resíduos de enrofloxacina em ovos de galinha por ELISA e cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas sequencial (LC-MS/MS)/ Raquel Gouvêa; orientadora Virginia Léo de Almeida Pereira. - 2014.

95 f.

Tese (Doutorado em Higiene Veterinária e Processamento Tecnológico de Produtos de Origem Animal)- Universidade Federal Fluminense, 2014.

Orientadora: Virginia Léo de Almeida Pereira

1. Ovo. 2. Qualidade do ovo. 3. Resíduo de antibiótico. 4. Anti-infeccioso. 5. Fluoroquinolona 6. Elisa. 7. Cromatografia líquida. I. Título.

CDD 664.07

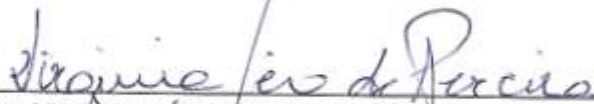
RAQUEL GOUVÊA

PESQUISA DE RESÍDUOS DE ENROFLOXACINA EM OVOS DE GALINHA POR ELISA E CROMATOGRAFIA LÍQUIDA ACOPLADA À ESPECTROMETRIA DE MASSA SEQUENCIAL (LC-MS/MS)

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária da Universidade Federal Fluminense, como requisito parcial para obtenção do Grau de Doutor. Área de Concentração: Higiene Veterinária e Processamento Tecnológico de Produtos de Origem Animal.

Aprovada em 14 de março de 2014.

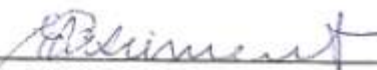
BANCA EXAMINADORA



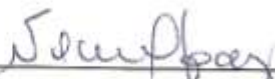
Profa. Dra. VIRGINIA LÉO DE ALMEIDA PEREIRA – Orientadora - UFF



Profa. Dra. MARIA HELENA COSENDEY DE AQUINO - UFF



Prof. Dr. ELMIRO ROSENDO DO NASCIMENTO - UFF



Dra. NILCE MARIA SOARES – INSTITUTO BIOLÓGICO/ UPD BASTOS



Dra. RITA DE CÁSSIA FIGUEIRA SILVA - PESAGRO-RJ

Dedico este trabalho aos meus pais,
Wagner e Vandete, que sempre
primaram pela minha educação.

AGRADECIMENTOS

À Deus.

Aos meus pais por tudo.

Ao meu marido, Italo Calvano Junior, pelo carinho, respeito e compreensão diante de tantas horas e finais de semana dedicados a este trabalho.

À minha orientadora, Virginia Léo de Almeida Pereira, pela sua competência profissional, amizade, otimismo, incentivo e por estar sempre presente e disponível, mesmo quando o momento não lhe era o mais favorável.

À minha co-orientadora, Maria Helena Cosendey de Aquino, pelo acompanhamento, atenção, disponibilidade e cuidado em todas as etapas deste trabalho.

Aos amigos, Felipe Faccini dos Santos e Leandro dos Santos Machado, pela parceria, profissionalismo e amizade, sendo fundamentais na concretização deste trabalho. Ao Leandro, grande amigo, agradeço também pelo convívio, pelo compartilhamento de alegrias e anseios, cumplicidade e pelo seu excelente humor.

Ao professor Elmiro Rosendo do Nascimento, pela disponibilidade e pelos valiosos ensinamentos.

À professora Dayse Lima da Costa Abreu, pela cooperação e amizade.

À professora e amiga, Cristina Kimie Togashi, pela amizade, incentivo e ótimo convívio.

Ao Fiscal Federal Agropecuário Fabiano Barreto e à Cristina Ribeiro, do LANAGRO-RS, pela oportunidade da realização de parte deste estudo e pela disponibilidade para as análises.

Aos colegas, Pedro Panzenhagen e Waldemir Aguiar pela grande ajuda e parceria.

Às amigas: Lídia Marques dos Santos e Camila Serva Pereira, que muito me ajudaram e sempre me apoiaram; Catia Cardoso, Mariza Dinah e Wanda Meira, que sempre que puderam, disponibilizaram-se a ajudar, mesmo com todo trabalho de cada uma delas.

À minha grande amiga e sempre incentivadora, Samira Mantilla.

Aos valiosos estagiários, bolsistas e técnicos: Juliana Maria, Bruna Gama, Vanessa Veloso, Monique Lamhut, Wilker Meneses, Daniela Sabroza, Hugo Peralva, Mariane Verinaud, Liz Rodrigues, Fernanda Eliege, Cristiane Lourenço e Maitê Neves. Alguns já se formaram, mas não deixam de fazer parte deste trabalho.

Aos funcionários da Coordenação de Pós-graduação, pela atenção, cuidado e disponibilidade e a todos os professores do Programa de Pós-graduação.

Ao CNPq, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, pelo apoio financeiro.

SUMÁRIO

LISTA DE ILUSTRAÇÕES p. 8

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS, p. 9

RESUMO, p. 11

ABSTRACT, p. 12

1 INTRODUÇÃO, p. 13

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA, p. 16

2.1 AVICULTURA DE POSTURA INDUSTRIAL E O USO DE ANTIMICROBIANOS,
p. 16

2.2 DESENVOLVIMENTO DAS FLUOROQUINOLONAS, p. 19

2.3 ENROFLOXACINA, p. 21

2.4 RESÍDUOS DE ANTIMICROBIANOS EM PRODUTOS AVÍCOLAS, p. 23

2.5 AVALIAÇÃO DE RISCO DE RESÍDUOS DE ANTIMICROBIANOS EM
ALIMENTOS, p. 24

2.6 LEGISLAÇÃO NACIONAL QUANTO AO CONTROLE DE RESÍDUOS, p. 26

2.7 IMPACTO NA SAÚDE PÚBLICA QUANTO À PRESENÇA DE RESÍDUOS DE
ENROFLOXACINA EM OVOS, p. 28

2.8 MÉTODOS ANALÍTICOS PARA A DETERMINAÇÃO DE RESÍDUOS DE
ANTIBACTERIANOS EM PRODUTOS DE ORIGEM ANIMAL, p. 29

2.8.1 Métodos de triagem, p. 29

2.8.1.1 Ensaio Imunoenzimático do tipo ELISA por kits comerciais, p. 30

2.8.2 Métodos confirmatórios, p. 31

2.8.2.1 Cromatografia Líquida Acoplada à Espectrometria de Massas sequencial
(LC-MS/MS), p. 32

3 DESENVOLVIMENTO, p. 34

3.1 ARTIGO 1: FLUOROQUINOLONAS IN BRAZILIAN POULTRY INDUSTRY,
BACTERIAL RESISTANCE AND RESIDUES: A REVIEW. Enviado à Revista
Brasileira de Ciência Avícola - Brazilian Journal of Poultry Science, p. 34

3.2 ARTIGO 2: DETECÇÃO DE RESÍDUOS DE ENROFLOXACINA POR ENSAIO IMUNOENZIMÁTICO E CROMATOGRAFIA LÍQUIDA ACOPLADA À ESPECTROMETRIA DE MASSAS EM OVOS COMERCIAIS DE GALINHA APÓS TRATAMENTO. Enviado à Revista Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia - ABMVZ, p. 60

3.3 ARTIGO 3: RESÍDUOS DE ENROFLOXACINA EM OVOS DE GALINHA PELA CLAE-EM/EM NO MUNICÍPIO DE NITERÓI, RJ. Manuscrito a ser enviado para publicação, p. 72

4. CONSIDERAÇÕES FINAIS, p. 84

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS, p. 85

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

ARTIGO 1

Fig. 1 Structural formula of fluoroquinolones, p. 59

ARTIGO 2

TABELA 1 - Concentrações dos níveis de fortificação para curva preparada em matriz para amostras de 2g de ovo, p. 65

TABELA 2 - Médias e desvios-padrões dos resíduos conjuntos de enrofloxacin e ciprofloxacina e em $\mu\text{g}/\text{kg}$ em ovos por ELISA e Cromatografia Líquida acoplada à Espectrometria de Massas sequencial, por dia durante e após a medicação das galinhas, p. 67

ARTIGO 3

TABELA 1 - Concentrações dos níveis de fortificação para curva de calibração preparada em matriz para amostras de 2g de ovo, p. 78

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

$\mu\text{g/kg}$	microgramas por quilo
ADI	Acceptable Daily Intake
ANOVA	Analysis of Variance
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
CCRVDF	Codex Committee on Residues of Veterinary Drugs in Foods
$CC\alpha$	Limite de decisão
$CC\beta$	Capacidade de detecção
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CVMP	Comitee for Veterinary Medicinal Products
DNA	Desoxirribonucleic acid
EFSA	European Food Safety Authority
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
EMA	European Medicines Agency
<i>et al.</i>	<i>et alli</i> , (latim) significa e outros
EU	European Union
FAO	Food and Agriculture Organization of the United Nations
FDA	United States Food and Drug Administration
IDA	Ingestão Diária Aceitável
IN	Instrução Normativa
JECFA	Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives
kDa	Kilodalton
LC-MS/MS	Liquid Chromatography–tandem Mass Spectrometry
LMR	Limite Máximo de Resíduos
LOD	Limit of Detection
LOQ	Limit of Quantification

MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
MERCOSUL	Mercado Comum do Cone Sul
mg/kg	miligramas por quilo
MIC	Minimum Inhibitory Concentration
MS	Mass Spectrometry
ng.g ⁻¹	nanogramas por grama
NOEL	No effect level
OIE	World Organization for Animal Health
OMC	Organização Mundial do Comércio
OMS	Organização Mundial de Saúde
PAMvet	Programa Estadual de Controle de Resíduos de Medicamentos Veterinários em Alimentos de Origem Animal
PMRQ	Plasmid-Mediated Resistance to Quinolones
PNCRC	Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes
ppm	parte por milhão
QRDR	Quinolone-Resistance Determinant Region
QRMP	Quinolone Resistance Mediated By Plasmids
SBCAL	Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório
spp.	espécies
SPS	Sanitary and Phytosanitary Agreement
UBABEF	União Brasileira de Avicultura
WHO	World Health Organization

RESUMO

A enrofloxacin é um antimicrobiano da classe das fluoroquinolonas, de uso exclusivo na medicina veterinária e muito utilizada na avicultura industrial. A ciprofloxacina é um importante metabólito ativo da enrofloxacin e é amplamente utilizado na medicina humana. O uso imprudente da enrofloxacin na avicultura exerce pressão seletiva sobre as bactérias, incluindo bactérias zoonóticas importantes para a saúde pública, favorece a contaminação ambiental e a presença de resíduos nos produtos avícolas. Este estudo teve como objetivos pesquisar resíduos de enrofloxacin por meio da Cromatografia Líquida Acoplada à Espectrometria de Massas Sequencial (LC-MS/MS) e de um kit comercial de ELISA (Bioo Scientific®) em ovos de galinhas previamente tratadas com este antibacteriano e pesquisar resíduos de enrofloxacin em ovos do varejo, por LC-MS/MS, coletados em supermercados nas regiões administrativas mais populosas do Município de Niterói, RJ. Para fundamentar e orientar as estratégias de ação, foi feita uma revisão de literatura sobre o uso de fluoroquinolonas na avicultura, a sua relação com a resistência bacteriana e a presença de resíduos em produtos avícolas. Os níveis de resíduos nos ovos alcançaram níveis máximos no quinto dia de tratamento (1065,317 µg/kg no ELISA e 2947,06 µg/kg na LC-MS/MS), declinando gradativamente até não ser detectado a partir do nono dia da suspensão do tratamento. Dentro das condições desse estudo, um período de carência de seis dias seria o mais adequado para utilização dos ovos para consumo humano, considerando o LMR de 100 µg/kg, fixado pela União Europeia para músculo, gordura e pele como um padrão comparativo. Dentre as 55 amostras de ovos do varejo analisadas, em uma amostra foram detectados níveis de resíduos elevados (195 µg/kg de enrofloxacin e 40,5 µg/kg de ciprofloxacina) quando comparados aos LMR estabelecidos para tecidos comestíveis de aves no Brasil. Isto abre a discussão sobre a qualidade dos ovos que são ofertados à população de Niterói e ressalta a necessidade de mais estudos quanto à incidência de resíduos de enrofloxacin em ovos e a ampliação dos programas governamentais de monitoramento de resíduos de enrofloxacin para a matriz ovo.

Palavras-chave: antimicrobianos, fluoroquinolonas, detecção de resíduos

ABSTRACT

Enrofloxacin is a fluoroquinolone antibacterial class for exclusive use in veterinary medicine and widely used in the poultry industry. Ciprofloxacin is a major active metabolite of enrofloxacin and is widely used in human medicine. The reckless use of enrofloxacin in poultry exerts selective pressure on bacteria, including important zoonotic bacteria to human health, promotes environmental contamination and the presence of residues in poultry products. This study aimed to find residues of enrofloxacin by Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry (LC-MS/MS) and a commercial ELISA test kit (Bioo Scientific®) in eggs of chickens previously treated with this antibacterial and search residues of enrofloxacin in retail eggs by LC-MS/MS collected in supermarkets at the most populous regions of Niterói, RJ. To support and guide the strategies of action, a review of literature on the use of fluoroquinolones in poultry and its relation to bacterial resistance and residues in poultry products was taken. The residue levels in eggs reached maximum levels on the fifth day of treatment (1065.317 $\mu\text{g}/\text{kg}$ in ELISA and 2947.06 $\mu\text{g}/\text{kg}$ in LC-MS/MS), declining gradually to not be detected from the ninth day of discontinuation of treatment. Within the conditions of this study, a withdrawal period of six days would be more appropriate to use the eggs for human consumption, considering the MRL of 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ set by the European Union for muscle, fat and skin as a comparative standard. Among the 55 samples of retail eggs analyzed in a sample, high residue levels of residues were detected (195 $\mu\text{g}/\text{kg}$ of enrofloxacin and 40.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ciprofloxacin) when compared to MRLs set for edible tissues of poultry in Brazil. This raises issues about the quality of the eggs that are offered to the population of Niterói and highlights the need for further studies regarding the incidence of residues of enrofloxacin in eggs and the expansion of government monitoring programs of residues of enrofloxacin for egg matrix.

Keywords: antibiotics, fluoroquinolones, residues detection

1 INTRODUÇÃO

O Brasil é o sétimo maior produtor de ovos do mundo (FAO, 2013). A produtividade da avicultura de postura atribuiu-se em grande parte à redução no custo de produção e à favorável qualidade sanitária dos plantéis. Os antimicrobianos impulsionaram a avicultura industrial e contribuíram enormemente para a melhoria da qualidade sanitária das aves, utilizados tanto na prevenção de doenças como melhoradores de desempenho, quanto no tratamento das aves (VAZ, 2012).

O uso dos antimicrobianos, de fato, fez evoluir tanto a medicina veterinária quanto a medicina humana, no entanto, em consequência do seu intenso uso em ambos os setores, houve o surgimento de resistência bacteriana. Inúmeros acordos e encontros internacionais foram traçados desde então no intuito de desenvolver programas, normas e restrições ao uso de determinados antimicrobianos em medicina veterinária, visando evitar essa resistência bacteriana, tanto em relação ao uso de antimicrobianos como melhoradores de desempenho, como para fins terapêuticos (EMEA, 1999).

A enrofloxacin é um antimicrobiano sintético da classe das fluoroquinolonas, exclusivamente utilizado na medicina veterinária e muito empregado na avicultura de postura (GARCÍA-OVANDO *et al.*, 1999). A baixa toxicidade e o amplo espectro de ação da enrofloxacin foram características importantes que a tornaram droga de primeira escolha na antibioticoterapia de muitas doenças nas aves. Este antimicrobiano é rapidamente absorvido, amplamente distribuído e o principal produto da sua biotransformação é a ciprofloxacina, muito utilizada na antibioticoterapia humana (ITO *et al.*, 2005). Uma questão importante relacionada a isto é que as bactérias resistentes à enrofloxacin, geralmente têm resistência cruzada a outras fluoroquinolonas e, portanto, à ciprofloxacina.

Evidências científicas apontaram a associação temporal da introdução das fluoroquinolonas na produção avícola com a emergência de bactérias resistentes, especialmente *Salmonella* spp. e *Campylobacter jejuni* nas aves, com propagação para os produtos de abate e para os seres humanos, principalmente através da cadeia alimentar (WHO, 1998). E desde então, o controle sobre o uso das

fluoroquinolonas na avicultura e na medicina humana foram intensificados e priorizados mundialmente (WHO, 2011).

Uma outra questão igualmente importante é a presença de resíduos de enrofloxacina nos produtos avícolas, que podem ocorrer principalmente devido ao não atendimento às Boas Práticas Veterinárias no uso deste antibacteriano na avicultura. A administração inadvertida, o desrespeito às doses terapêuticas, à duração do tratamento e ao período de carência para liberação dos ovos, em especial, são fatores que além de prejudicar o tratamento dos animais em determinados casos e favorecem o aparecimento de resíduos em ovos de consumo (GONZALES *et al.*, 2005).

Até determinada concentração, os resíduos presentes nos alimentos não promovem nenhum dano à saúde humana, porém se a concentração ultrapassar o Limite Máximo de Resíduo (LMR) estabelecido para o analito em questão, aumentam os riscos de haver comprometimento à saúde humana em virtude do consumo desses alimentos com resíduos. O Brasil segue preferencialmente as determinações do *Codex Alimentarius* quanto aos LMR estabelecidos. A Comissão do *Codex Alimentarius*, no âmbito dos resíduos de antibacterianos em produtos avícolas, estabelece os LMR a partir de avaliações de riscos criteriosas que incluem estudos toxicológicos e microbiológicos sobre o impacto da presença de resíduos de antibacterianos sobre o trato gastrointestinal humano (CODEX ALIMENTARIUS, 2011).

Na determinação de resíduos em produtos de origem animal, os métodos analíticos de triagem, como o ELISA, são úteis na seleção de amostras positivas e são geralmente de baixo custo, práticos e de fácil aplicação. Para a confirmação e quantificação de resíduos, é necessária a realização de métodos analíticos obrigatoriamente validados, tais como os métodos cromatográficos (PACHECO-SILVA, 2013).

O objetivo deste estudo foi pesquisar resíduos de enrofloxacina por meio da Cromatografia Líquida Acoplada à Espectrometria de Massas Sequencial (LC-MS/MS) e/ou de um kit comercial de ELISA (Bioo Scientific®) em ovos de galinhas previamente tratadas com este antibacteriano e em ovos do varejo nas regiões administrativas mais populosas do Município de Niterói, RJ. Para fundamentar e orientar as estratégias de ação, foi feita uma revisão de literatura sobre o uso de

fluoroquinolonas na avicultura e a sua relação com a resistência bacteriana e a presença de resíduos em produtos avícolas.

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 AVICULTURA DE POSTURA INDUSTRIAL E O USO DE ANTIMICROBIANOS

O Brasil está colocado entre os dez maiores produtores mundiais de ovos, ocupando a sétima posição (FAO, 2013). Os baixos custos de produção e o nível elevado de sanidade das aves fortaleceram a produtividade, porém, o consumo interno de ovos ainda é reduzido quando comparado ao de outros países, como o México. O baixo consumo foi atribuído ao desconhecimento da maioria da população sobre as propriedades nutricionais do ovo como fonte proteína de alto valor nutricional, de ferro, vitaminas e fósforo (FAO, 2003); também por ser visto como alimento destinado às classes menos favorecidas da população e pelo julgamento equivocado de ser prejudicial à saúde quanto aos níveis de colesterol (STEFANELLO, 2011). Contudo, estudos da EMBRAPA Suínos e Aves demonstraram que fatores como a melhoria da renda, a participação da mulher no mercado de trabalho e o envelhecimento da população afetam positivamente o consumo de ovos e futuramente esta atividade tende a ser beneficiada pela atual conjuntura econômica e social do país (KRABBE et al., 2014).

A sanidade das aves, em especial, foi de grande importância no avanço da avicultura industrial como um todo, mas a prevenção e o controle de patógenos são desafios permanentes (VAZ, 2012). O uso de antimicrobianos foi um fator muito importante nesta evolução, sendo utilizados tanto no tratamento como na prevenção de doenças, utilizados como melhoradores de desempenho.

A avicultura industrial se fundamenta nos princípios da biossegurança e na prevenção de doenças, pois o uso de medicação terapêutica é sempre anti-econômico, porém em situações de doença no plantel, a terapia medicamentosa é necessária e na maioria das vezes deve ser aplicada rapidamente, de forma eficiente e que seja a mais econômica possível (GONZALES *et al.*, 2005).

A utilização terapêutica dos antimicrobianos em seres humanos se iniciou na década de 1930 com as sulfonamidas. Houve grandes mudanças nos anos seguintes em razão do surgimento de microrganismos resistentes, o que produziu uma incessante busca por alternativas terapêuticas cada vez mais efetivas quanto ao espectro de ação e à toxicidade dos antimicrobianos (JACKSON *et al.*, 1998). A

medicina veterinária começou a empregar os antimicrobianos na década de 50 e isto ocorreu paralelamente aos avanços na medicina humana (EMEA, 1999).

De modo geral, no Brasil, não há muitos dados estatísticos a respeito do uso de antimicrobianos na avicultura. Um estudo foi realizado pela Secretaria de Estado da Saúde do Paraná, em 2004, por meio do Programa Estadual de Controle de Resíduos de Medicamentos Veterinários em Alimentos de Origem Animal (PAMvet), para identificar os medicamentos veterinários mais utilizados na avicultura de corte e de postura. Em 66 granjas de postura, os grupos de antimicrobianos mais citados foram as quinolonas, seguidas das tetraciclínas e das quinoxalinas e os fármacos mais utilizados foram a enrofloxacina (25,8%), oxitetraciclina (21,5%), olaquinox (15,1%), norfloxacina (9,7%), doxiciclina (6,5%), sulfaquinoxalina (6,5%) e bacitracina (6,5%) (MACHINSKI JUNIOR *et al.*, 2005).

Os promotores de crescimento ou também denominados de melhoradores de desempenho são antimicrobianos que são administrados continuamente na ração das aves em doses subterapêuticas (ANDREATTI FILHO; SILVA, 2005). Os seus efeitos foram descobertos na década de 1940, em meio a estudos de isolamento e identificação da vitamina B12 em culturas de fungos, que era considerado um promotor de crescimento, no entanto, descobriu-se que micélio seco de certos fungos como *Streptomyces aureofaciens* continham antimicrobianos que atuavam como potentes melhoradores de desempenho (JONES; RICKE, 2003; CASTANON, 2007).

Em 1951, o uso de antimicrobianos como melhoradores de desempenho sem prescrição veterinária foi aprovado pela agência regulatória do setor nos Estados Unidos, “Food and Drug Administration” (FDA) (JONES; RICKE, 2003). Entre as décadas de 1950 e 1960, cada Estado europeu aprovou os seus próprios regulamentos nacionais sobre o uso de antimicrobianos na alimentação animal.

Segundo Albuquerque (2005), o uso de melhoradores de desempenho na alimentação animal promove melhora da eficiência alimentar, redução na ingestão de alimento até o abate, prevenção de patologias infecciosas e parasitárias e redução na mortalidade, aumentando assim a produtividade. No entanto, os mecanismos de ação dos melhoradores de desempenho não estão totalmente esclarecidos, mas parece haver consenso entre os autores que não seja único, mas múltiplos e complexos. Nas décadas de 1950 e 1960, antimicrobianos como

penicilinas e tetraciclina foram utilizados como melhoradores de desempenho e na década de 1960 surgiram preocupações quanto ao surgimento de cepas bacterianas resistentes.

Em relatório para o governo do Reino Unido em 1969, o “Committee for Veterinary Medicinal Products” (CVMP), Comitê Conjunto sobre a Utilização de Antimicrobianos na Criação Animal e na Medicina Veterinária, relatou que a administração de antimicrobianos em doses subterapêuticas colocaria em risco a saúde humana e a animal. Para evitar tais riscos, os antimicrobianos utilizados como melhoradores de desempenho deveriam ter pouca ou nenhuma aplicação terapêutica no homem ou em animais e não deveriam prejudicar a eficácia das drogas em uso terapêutico por meio do desenvolvimento de cepas resistentes. Na década de 1990, debates sobre a resistência aos antimicrobianos se intensificaram na União Europeia (EMEA, 1999).

A partir de então, a União Europeia suspendeu o uso de avoparcina, virginiamicina, espiramicina, tilosina e bacitracina de zinco como melhoradores de desempenho na tentativa de minimizar a seleção de bactérias resistentes (EUROPEAN COMMUNITY, 1998). Em 2006, a União Europeia suspendeu o uso de qualquer antimicrobiano como promotor de crescimento (EUROPEAN COMMUNITY, 2003).

No Brasil, alguns princípios ativos foram proibidos na fabricação de produtos com finalidade de atuarem sobre a eficiência alimentar como melhoradores de desempenho. Dentre outras proibições, em 2002, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) proibiu o uso de arsenicais e antimoniais por meio da Portaria nº31 (BRASIL, 2002). Cloranfenicol e nitrofuranos foram proibidos pela Instrução Normativa (IN) nº09, de 2003 (BRASIL, 2003a). As substâncias olanquinox e carbadox foram proibidas pelas IN nº11, de 2004 e IN nº35, de 2005, respectivamente (BRASIL, 2004b; 2005). Anfencóis, tetraciclina, beta-lactâmicos (benzilpenicilâmicos e cefalosporinas), quinolonas e sulfonamidas sistêmicas foram proibidos como melhoradores de desempenho na Instrução Normativa nº26, de 2009 (BRASIL, 2009). Em 2012, espiramicina e eritromicina também foram proibidas por meio da IN nº14 (BRASIL, 2012). Atualmente, os antimicrobianos permitidos pelo MAPA como melhoradores de desempenho na avicultura são avilamicina, bacitracina metileno disalicilato, bacitracina de zinco, colistina, clorexidina,

enramicina, flavomicina, halquinol, lincomicina, tilosina, virginiamicina (BRASIL 2013a).

Diante da expectativa da proibição e restrição ao uso dos antimicrobianos como melhoradores de desempenho ser cada vez maior, várias pesquisas passaram a ser desenvolvidas com o objetivo de obter alternativas eficientes para reduzir os microrganismos patógenos das aves (PESSOA *et al.*, 2012). Dentre tais alternativas desenvolvidas, incluem-se os probióticos, prebióticos, enzimas exógenas, extratos vegetais e óleos essenciais.

2.2 DESENVOLVIMENTO DAS FLUOROQUINOLONAS

O desenvolvimento das quinolonas fortaleceu a terapêutica antimicrobiana, em virtude da sua baixa toxicidade e amplo espectro de ação. A primeira quinolona a ser produzida foi o ácido nalidíxico, que é uma naftaridina. Foi descoberta em 1962 por Leshea e colaboradores, ao acaso, quando sintetizavam clorquina, um agente antimalárico com atividade antibacteriana. O ácido nalidíxico apresentou atividade contra alguns aeróbios Gram-negativos e por isso foi utilizado no tratamento de infecções urinárias (JACKSON *et al.*, 1998; SILVA; HOLLENBACH, 2010). No entanto, este antimicrobiano teve seu uso reduzido diante da sua tendência à indução de resistência bacteriana e diante do desenvolvimento e produção de novos compostos com maior espectro de ação e menor toxicidade (ITO *et al.*, 2005).

A descoberta de mudanças na estrutura química das quinolonas modificou de forma importante a sua atividade antimicrobiana, permitindo sintetizar outros compostos desta família. As fluoroquinolonas são denominadas quinolonas de segunda geração, foram introduzidas na década de 1980 e são derivados fluorados das quinolonas, ou seja, possuem flúor na posição n^o6 do anel quinolônico, além disso, apresentam cetona na posição n^o4 e carboxil na posição n^o3, que conferem maior atividade antibacteriana. A adição de ciclopropil, etil ou fluorofenil na posição n^o1 e de piperazina na posição n^o7, aumentaram o espectro de ação antimicrobiana (ANDRIOLE, 2005; SHARMA *et al.*, 2009). Compreendem as fluoroquinolonas: ciprofloxacina, danofloxacina, difloxacina, enrofloxacina, flumequina, marbofloxacina, norfloxacina, ofloxacina e sarafloxacina (BOTSOGLOU; FLETOURIS, 2001)

A presença de flúor na posição n° 6 confere maior atividade contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, pois aumenta a penetrabilidade do antimicrobiano na membrana celular da bactéria. A primeira fluoroquinolona de amplo espectro a ser sintetizada foi a norfloxacin, que foi introduzida em 1980 e possui um anel piperazinil substituindo o grupo metil na posição n° 7. Dessa forma, obteve-se um aumento da atividade contra bactérias Gram-negativas, embora não atuasse sobre anaeróbios (ANDRIOLE, 2005).

A obtenção da ciprofloxacina veio com a substituição do grupo etil da norfloxacin pelo grupo ciclopropil, aumentando o espectro para bactérias Gram-positivas, sem comprometer a ação sobre as Gram-negativas (SHARMA *et al.*, 2009). A enrofloxacin tem estrutura semelhante à ciprofloxacina e também apresenta modificações no grupo etil (ITO *et al.*, 2005).

Todas essas modificações estruturais na molécula das quinolonas levaram a um maior espectro de ação e difusão para os tecidos, uma meia vida maior, redução na toxicidade, aumento da capacidade de penetração na parede bacteriana. Consequentemente possibilitou melhor atividade contra bactérias Gram-negativas, passando a atuar também sobre algumas espécies Gram-positivas. As suas indicações terapêuticas evoluíram desde a aplicação em infecções urinárias a aplicações nas mais variadas infecções. As últimas gerações de quinolonas já possuem atividade contra bactérias anaeróbias (SILVA; HOLLEMBACH, 2010).

Em seres humanos, as fluoroquinolonas são geralmente bem toleradas e seguras. Os efeitos adversos mais comuns ocorrem no trato gastrintestinal e no sistema nervoso central. Reações de nefrotoxicidade e tendinite são raras. As fluoroquinolonas são seguras em pacientes idosos, com neutropenia e portadores do vírus da imunodeficiência humana (HIV), mas em função dos possíveis efeitos sobre a cartilagem articular, não são recomendadas para crianças ou mulheres grávidas (LIPSKY, BAKER, 1998).

No final da década de 1980 e início da década de 1990, deu-se início à utilização das fluoroquinolonas na medicina veterinária. Desde então, novas moléculas de fluoroquinolonas têm sido autorizadas e um vasto número de diferentes medicamentos veterinários já estão disponíveis no mercado (EMEA, 2006).

2.3 ENROFLOXACINA

A enrofloxacin (ácido ciclopropil-7-(4-etil-1-piperazinil)-6-fluoro-1,4-diidro-4-oxo-3-quinoleína carboxílico) é um antimicrobiano bactericida sintético de emprego exclusivo na medicina veterinária (GARCÍA-OVANDO *et al.*, 1999) e bastante utilizado na avicultura industrial.

O mecanismo de ação da enrofloxacin, assim como de todas as fluoroquinolonas, é a inibição da atividade catalítica das enzimas bacterianas DNA girase (ou Topoisomerase II) e Topoisomerase IV, que funcionam em conjunto e são essenciais à replicação e transcrição do DNA bacteriano (SHARMA *et al.*, 2009).

A DNA girase catalisa reações na cadeia de fita dupla do DNA bacteriano que permite o seu superenrolamento, relaxamento, separação e a sua reintegração durante os processos de transcrição e tradução. As quinolonas bloqueiam a reação e DNA girase ou Topoisomerase IV num complexo droga-enzima-DNA, com posterior liberação das quebras “letais” de DNA de fita dupla. A DNA girase é composta pelas subunidades, GyrA (97 kDa) e GyrB (90 kDa) e a Topoisomerase IV é composta pelas subunidades: ParC (75 kDa) e ParE (70 kDa) (JACOBY, 2005).

Após administração, a enrofloxacin é rapidamente absorvida, com pico de concentração no soro após uma a duas horas da administração (MITCHELL, 2006), têm ampla distribuição e baixa ligação às proteínas plasmáticas, têm excreção via urina e bile e seus resíduos podem ser encontrados no fígado e rins (GOETTING *et al.*, 2011; SILVA; HOLLEMBACH, 2010). A biotransformação de enrofloxacin inclui reações de N-dealquilação, conjugação gluconídica ao nitrogênio na posição para do anel piperazinil, oxidação na posição orto em relação ao substituto amina e abertura do anel piperazinil (VANCUTSEM *et al.*, 1990).

Os resíduos produzidos a partir da biotransformação da enrofloxacin, presentes na urina são compostos principalmente por: enrofloxacin, enrofloxacinamida e ciprofloxacina, e, em menor escala, por oxociprofloxacina, dioxociprofloxacina, desetileno-ciprofloxacina, desetileno-enrofloxacin, N-formil-ciprofloxacina, oxoenrofloxacin e hidroxioxoenrofloxacin (BOTSOUGLO; FLETOURIS, 2001). A ciprofloxacina é o principal metabólito da enrofloxacin, pois é muito utilizado na antibioticoterapia humana, é farmacocineticamente ativo, com metade ou menos da metade da biodisponibilidade no organismo da ave (ITO *et al.*,

2005). A ciprofloxacina também é empregada na medicina veterinária no Brasil e em vários países (GARCÍA-OVANDO *et al.*, 1999). A quantidade de ciprofloxacina produzida como resíduo aumenta de acordo com a dose e tempo de uso da enrofloxacina nas aves (ITO *et al.*, 2005).

A enrofloxacina tem excelente atividade contra patógenos Gram-positivos e Gram-negativos e também é utilizada no controle de certos patógenos intracelulares (MITCHELL, 2006), tem efeito intermediário e variável para *Pseudomonas* spp., *Enterococcus* spp., *Clostridium* spp., *Staphylococcus* spp. e *Streptococcus* spp. e bom efeito sobre Enterobactérias, incluindo *Campylobacter* spp., *Enterobacter* spp. e *Serratia* spp. Atua também sobre *Chlamydia* spp. e *Mycobacterium* spp. A enrofloxacina e a ciprofloxacina são indicadas para o tratamento de doenças aviárias, tais como colibacilose, salmonelose, micoplasmose associada ou não à colibacilose, cólera aviária e coriza infecciosa (BAYER, 2014). De modo geral, a dose recomendada para enrofloxacina e ciprofloxacina é de 10 mg/kg (ITO *et al.*, 2005).

A ciprofloxacina, na medicina humana, é indicada no tratamento de infecções do trato urinário causadas por *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Enterobacter cloacae*, *Proteus mirabilis*, entre outros agentes; cistite aguda não complicada causada por *E. coli* ou *Staphylococcus saprophyticus*; prostatite crônica bacteriana causada por *E. coli* ou *P. mirabilis*; infecções no trato respiratório inferior causadas por *E. coli*, *K. pneumoniae*, *P. mirabilis*, entre outros; sinusite aguda causada por *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae* ou *Moraxella catarrhalis*; infecções de pele e estruturas causadas por *E. coli*, *K. pneumoniae*, *E. cloacae*, entre outros; infecções ósseas e articulares causadas por *E. cloacae*, *Serratia marcescens* ou *Pseudomonas aeruginosa*; infecções abdominais complicadas causadas por *E. coli*, *P. aeruginosa*, *P. mirabilis*, *K. pneumoniae* ou *Bacteroides fragilis*; diarreia infecciosa causada por *E. coli* enterotoxigênica, *Campylobacter jejuni*, *Shigella dysenteriae*, entre outros, quando há indicação de antibioticoterapia; febre tifoide causada por *Salmonella typhi* (FDA, 2008)

2.4 RESÍDUOS DE ANTIMICROBIANOS EM PRODUTOS AVÍCOLAS

O uso de antimicrobianos em aves de produção e a possibilidade da presença dos seus resíduos nos produtos avícolas correspondem a uma questão importante de saúde pública quanto aos riscos inerentes ao consumo desses resíduos pela população, quando em níveis elevados. Isto pode advir do desrespeito às Boas Práticas Veterinárias e o significado para a saúde pública é determinado principalmente pelo nível de resíduos no alimento e pela droga que os originou (BOTSOUGLO; FLETOURIS, 2001). Além disso, os resíduos eliminados via urina e fezes representam importantes fontes de contaminação ambiental (REGITANO; LEAL, 2010).

As Boas Práticas Veterinárias quanto ao uso de antimicrobianos devem considerar, entre outros critérios, a necessidade do uso de antimicrobianos para determinado agravo; custos de tratamento; escolha do antimicrobiano específico por meio de avaliações sanitárias periódicas por antibiogramas e que seja direcionado à espécie e à categoria da ave a se medicar; a via de administração mais adequada; seguir as prescrições definidas pelo fabricante quanto à dose, período de uso e período de retirada ou carência; cuidar para não haver contaminação do manipulador e do meio ambiente; cuidar para que o veículo de administração do medicamento esteja em boas condições e seja de boa qualidade (GONZALES *et al.*, 2005).

Resíduos de Medicamentos Veterinários são, por definição, a fração da droga, seus metabólitos e/ou impurezas associadas à droga em qualquer parte comestível do alimento de origem animal (CODEX ALIMENTARIUS, 2011). Existe uma determinada tolerância em relação à concentração de resíduos de antimicrobianos presentes em um produto de origem animal que não causaria danos à saúde do consumidor, o LMR. Por definição, LMR é a concentração máxima de resíduos expressa em mg/kg ou µg/kg e fixada pelo Comitê do *Codex Alimentarius* a ser legalmente permitida em um alimento (CODEX ALIMENTARIUS, 2011).

2.5 AVALIAÇÃO DE RISCO DE RESÍDUOS DE ANTIMICROBIANOS EM ALIMENTOS

No contexto de segurança dos alimentos, a avaliação de risco é um dos três componentes da estrutura de análise de risco. A avaliação de risco é constituída pelas etapas de identificação do perigo, caracterização do perigo, avaliação da exposição e caracterização do risco. Estes aspectos são considerados como princípios de trabalho no âmbito do *Codex Alimentarius* e servem como base para a adoção de normas e padrões sobre a segurança dos alimentos e questões de saúde (BRASIL, 2004a).

A Comissão do *Codex Alimentarius* é um órgão da “Food and Agriculture Organization” (FAO) e Organização Mundial da Saúde (OMS) e é responsável pela criação do *Codex Alimentarius*, um conjunto de normas alimentares designadas a todas as nações do mundo, reconhecido pela Organização Mundial do Comércio (OMC) como padrão de referência internacional para a segurança dos alimentos (BOTSOUGLO; FLETOURIS, 2001).

O *Codex Alimentarius* tornou-se referência no comércio internacional a partir de 1995, a partir da criação da OMC e do Acordo sobre Medidas Sanitárias e Fitossanitárias (Acordo SPS), tornando-se um poderoso instrumento na harmonização de normas para o comércio mundial de alimentos. A adesão ao Programa não significa obrigatoriamente a aceitação às normas e para cada norma aprovada, os países-membros são consultados sobre a sua aceitação ou não (ORTEGA; BORGES, 2012).

A Comissão do *Codex Alimentarius* que trata especificamente de resíduos de medicamentos veterinários em alimentos, “Codex Committee on Residues of Veterinary Drugs in Foods” (CCRVDF), tem seus trabalhos acessorados pelo “Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives” (JECFA) (PALERMO NETO, 2005). O JECFA é um comitê científico internacional de especialistas que se reúnem desde 1956 e atua na avaliação de risco de resíduos de medicamentos veterinários, contaminantes, toxinas naturais e aditivos alimentares nos alimentos. O JECFA, a partir da avaliação de risco, recomenda valores de LMR ao CCRVDF (WHO, 2013).

Para a determinação do LMR, são considerados a análise toxicológica, a farmacocinética da substância e o risco que ela possa representar para a saúde

humana. O risco é calculado por meio da Ingestão Diária Aceitável (IDA), em mg/kg ou µg/kg do medicamento presente no alimento, ao qual é incorporado um fator de segurança (FS) da ordem de até 100 vezes relacionado às variações individuais de sensibilidade. A IDA, por sua vez, é calculada a partir do valor de NOEL (“no effect level” – sem efeito observável) de uma substância, que consiste na maior dose de uma substância química que, se usada, não produz efeitos adversos na espécie testada mais sensível. Ao valor de NOEL também se incorpora um fator de segurança de até 100 vezes (FAO; WHO, 2000). A IDA é um valor estimado da quantidade máxima de um medicamento veterinário em relação ao peso corporal humano que pode ser ingerida diariamente ao longo da vida do indivíduo sem lhe causar risco apreciável à saúde (PALERMO NETO, 2005).

O valor de IDA toxicológico é baseado em uma série de avaliações de segurança toxicológicas relacionadas à exposição aguda e à longo prazo ao medicamento e seu impacto sobre a saúde, tais como como carcinogenicidade, genotoxicidade, toxicidade reprodutiva, teratologia, neurotoxicidade, imunotoxicidade e alergenicidade, toxicidade ocular e toxicidade cardíaca (WHO, 2003). A JECFA também considera um valor de IDA microbiológico, derivado de ensaios relativos a possíveis efeitos adversos que o antimicrobiano possa desempenhar sobre a microbiota do trato gastrointestinal humano e sobre o desenvolvimento de resistência bacteriana. O menor dos dois valores é usado para a fixação da IDA e, conseqüentemente para o cálculo do LMR para esse antimicrobiano (FAO; WHO, 2000).

O JECFA considera também a depleção do medicamento marcado radioativamente para o cálculo da quantidade total de resíduos presentes nos tecidos e também considera dados de consumo de alimentos e hábitos alimentares de uma forma geral para compor a cesta básica, cuja composição para aves é de 300 g de carne, 100 g de fígado, 50 g de gordura, 50 g de rins, 100 g de ovos (FAO; WHO, 2000). Dessa forma, o JECFA estima a quantidade real de resíduos de medicamentos veterinários que pode ser ingerida pelo ser humano para fixar os LMRs (PALERMO NETO, 2005).

Os LMR são dados importantes na determinação do período de carência de um medicamento, que consiste no intervalo de tempo em horas ou dias necessário para que as quantidades teciduais de resíduos ou de metabólitos da droga,

presentes nos alimentos sejam inferiores aos LMR fixados pelo *Codex Alimentarius* para esse medicamento. No entanto, nem todos os antimicrobianos utilizados têm um LMR definido. Alguns não são considerados perigosos, não tendo LMR, outros têm LMR provisórios e outros ainda são proibidos para o uso em animais (PEREIRA, 2009).

Além do JECFA, a avaliação de risco sobre medicamentos e aditivos utilizados na alimentação animal na União Europeia é realizada pelo Comitê para Produtos Veterinários (“Comitee for Veterinary Medicinal Products” – CVMP) e pela Autoridade Europeia de Segurança dos Alimentos (“European Food Safety Authority” - EFSA), respectivamente. O CVMP é órgão da Agência Europeia de Medicamentos (“European Medicines Agency” - EMEA), que é o órgão responsável pelo estabelecimento de LMR de medicamentos veterinários na União Europeia (SPISSO, 2010).

A União Europeia possui LMR fixados para Enrofloxacin, que são calculados com base na soma dos resíduos de Enrofloxacin e Ciprofloxacina. No caso dos tecidos comestíveis de frangos, o LMR fixado é de 100 µg/kg para músculo, gordura e pele, 200 µg/kg para o fígado e 300 µg/kg para os rins. No entanto, a União Europeia não estabelece LMR para ovos e não permite a utilização de enrofloxacin em animais que produzem ovos para consumo humano. (EUROPEAN COMMUNITY, 2010).

2.6 LEGISLAÇÃO NACIONAL QUANTO AO CONTROLE DE RESÍDUOS

O Brasil segue preferencialmente os princípios e limites fixados pelo *Codex Alimentarius* (PALERMO NETO, 2005) e harmonizados no MERCOSUL, os adotados na União Europeia e no FDA, nessa ordem de priorização (BRASIL, 1999). Os métodos analíticos utilizados no Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes (PNCRC) são adotados em função da disponibilidade de métodos validados, principalmente, àqueles recomendados pelo CCRVDF. O Brasil tem se esforçado, através de Planos e Programas do MAPA e da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), no intuito de melhorar a produtividade, qualidade e segurança dos alimentos fornecidos à população brasileira e também em se adequar

quanto ao aspecto sanitário e às regras do comércio internacional de alimentos, preconizadas pela OMC, FAO, OIE e OMS (BRASIL, 1999).

O PNCRC foi instituído pelo MAPA, na Portaria Ministerial nº51 (BRASIL, 1986) e adequado pela Portaria Ministerial nº527 (BRASIL, 1995). O PNCRC desenvolve suas atividades visando conhecer o potencial de exposição da população aos resíduos nocivos à saúde e impedir o abate para consumo de animais oriundos de criatórios onde se tenha constatado violação dos LMR e impedir o uso de drogas veterinárias proibidas no território nacional. As metas principais do PNCRC são a verificação do uso correto e seguro dos medicamentos veterinários, de acordo com as práticas veterinárias recomendadas e das tecnologias utilizadas nos processos de incrementação da produção e produtividade pecuária. (BRASIL, 1999).

O PNCRC é composto pelos subprogramas setoriais, para o monitoramento em carnes (PNCRC/Bovinos, PNCRC/Aves, PNCRC/Suínos, PNCRC/Equinos e PNCRC/Avestruz) e demais produtos de origem animal (PNCRC/Leite, PNCRC/Mel, PNCRC/Ovos e PNCRC/Pescado) (BRASIL, 1999). As amostras monitoradas pelo PNCRC são coletadas de acordo com o plano de amostragem recomendado pelo comitê do *Codex Alimentarius*. O MAPA publica anualmente os resultados dos programas de monitoramento no Diário Oficial da União (PACHECO-SILVA, 2013).

Os resultados do acompanhamento dos Programas de Controle de Resíduos e Contaminantes dos subprogramas de monitoramento e exploratório em Carnes (Bovina, Suína, de Aves, de Avestruz e Equina), em Leite, Ovos, Mel e Pescado do MAPA do exercício de 2012 foram publicados na Instrução Normativa nº07, de 27 de março de 2013. Em 116 análises em músculo de aves, todas as amostras estavam em conformidade. Os antimicrobianos analisados foram ácido nalidíxico, ácido oxolínico, ciprofloxacina, difloxacina, enrofloxacina, flumequina e sarafloxacina. Em ovos, foram realizadas 33 análises para enrofloxacina e ciprofloxacina e também houve conformidade em todas as análises (BRASIL, 2013b). Portanto, mesmo com a utilização de muitos medicamentos nas aves de produção, não foram encontrados resíduos, no período de análise, nos plantéis brasileiros, indicando respeito aos períodos de carência dos medicamentos.

No Brasil, o LMR fixado para tecidos comestíveis de aves é de 100 µg/kg para enrofloxacin. Quanto à matriz ovo, não foi estabelecido um LMR, mas sim um Limite de Referência (LR) para adoção de medidas regulatórias. Como a enrofloxacin se trata de substância registrada para uso em aves de postura, mas seu respectivo LMR não está estabelecido pela legislação vigente, o Subprograma de Monitoramento de Controle de Resíduos de Contaminantes em Ovos utiliza um limite de referência para tomada de ação regulatória, que é igual a 10 µg/kg ou 10 µg/L para enrofloxacin e ciprofloxacina. Este valor corresponde à menor concentração detectável pelos métodos analíticos recomendados pela legislação (BRASIL, 2013b).

Complementando as ações desenvolvidas pelo MAPA por meio da avaliação do produto pronto para ser apresentado ao consumidor, o PAMvet foi criado na Resolução da Diretoria Colegiada nº 253, de 16 de setembro de 2003, pela ANVISA, em função da necessidade de, dentre outros motivos, avaliar os níveis de resíduos de medicamentos veterinários nos alimentos; desenvolver metodologias analíticas validadas por laboratórios oficiais; verificar se os níveis de resíduos de medicamentos veterinários em alimentos estão excedendo os Limites Máximos de Resíduos autorizados pela legislação em vigor (BRASIL, 2003b). A primeira matriz de análise do PAMvet foi o leite bovino (BRASIL, 2006).

2.7 IMPACTO NA SAÚDE PÚBLICA QUANTO À PRESENÇA DE RESÍDUOS DE ENROFLOXACINA EM OVOS

A presença de resíduos em ovos é motivo de preocupação, pois os ovos podem conter resíduos de uma grande variedade de drogas, que podem ser detectáveis dias a semanas após o término do tratamento das aves (GOETTING *et al.*, 2011). Em relação às fluoroquinolonas, seus resíduos podem aparecer nos ovos de aves tratadas 24 horas após a primeira dose e persistirem principalmente na gema durante vários dias após o término do tratamento (ETCHES, 1998).

No entanto, até então, há poucas evidências científicas quanto aos danos sobre a microbiota do trato gastrointestinal humano causados por resíduos de antimicrobianos presentes em alimentos derivados de animais tratados com os mesmos (BRASIL, 2004a). Um fato alarmante é que no Brasil, entre as formulações

de enrofloxacin para uso em aves de postura registradas no MAPA, não há um consenso entre os fabricantes, de um modo geral, quanto aos períodos de carência descritos nas bulas (SINDAN, 2014). Isto possibilita que haja uma variedade de interpretações e a consequente utilização indevida desses produtos tanto pelo médico veterinário como pelo produtor. Como consequência, o risco de haver níveis elevados de resíduos nos ovos pode ser maior, assim como pode ser maior o risco do consumidor ficar exposto a essas substâncias.

2.8 MÉTODOS ANALÍTICOS PARA A DETERMINAÇÃO DE RESÍDUOS DE ANTIMICROBIANOS EM PRODUTOS DE ORIGEM ANIMAL

Os métodos utilizados na investigação de resíduos de antimicrobianos em produtos de origem animal são classificados em dois grandes grupos: métodos biológicos de triagem e métodos cromatográficos. Como métodos de triagem geralmente são utilizados métodos microbiológicos e métodos imunoquímicos para determinação da presença desses resíduos nos alimentos. Os resultados positivos nos métodos de triagem devem ser confirmados por métodos cromatográficos (PACHECO-SILVA, 2013).

2.8.1 Métodos de triagem

Os métodos de triagem são utilizados para detectar a presença de um analito ou classe de analitos no nível de interesse. Estes métodos têm a capacidade de análise de um número elevado de amostras e são utilizados para detectar amostras não conformes ou positivas e são especialmente utilizados para evitar resultados falso negativos. (DE BRABANDER *et al.*, 2009). Os métodos de triagem mais frequentemente utilizados são o método microbiológico e os imunoquímicos (CHÁFER-PERICÁS *et al.*, 2010)

Os métodos microbiológicos de inibição do crescimento são utilizados em todo o mundo e foram os primeiros métodos utilizados na detecção de resíduos de antibacterianos em alimentos, tendo surgido entre 1945 a 1948. São métodos qualitativos ou semiquantitativos, baseados numa reação específica entre um microrganismo suscetível e o antimicrobiano presente na amostra (BOTSOGLOU;

FLETOURIS, 2001). Entre as vantagens destes métodos incluem a simplicidade, a relação custo-benefício e a possibilidade de detectar qualquer antimicrobiano ou metabólito com atividade antimicrobiana. Entre as desvantagens estão a baixa especificidade e os longos períodos de incubação em alguns casos (CHÁFER-PERICÁS *et al.*, 2010).

2.8.1.1 Ensaio Imunoenzimático do tipo ELISA por kits comerciais

O primeiro método imunoquímico surgiu no final da década de 1950, na detecção de insulina humana por Yalow e Berson, o que lhes rendeu o prêmio Nobel em 1977. A partir de então, os métodos foram sendo aperfeiçoados e desenvolvidos para análise de macromoléculas como enzimas e hormônios e posteriormente para fármacos (NUNES, 2005).

Imunoensaios são métodos semiquantitativos caracterizados pela sensibilidade, praticidade e bom custo-benefício (CHÁFER-PERICÁS *et al.*, 2010). Existem diversos tipos de métodos imunoquímicos e o mais frequentemente utilizado na detecção de antimicrobianos em alimentos são os imunoenzimáticos (BOTSOGLU; FLETOURIS, 2001).

Vários kits de ELISA são comercialmente disponíveis para a detecção de antimicrobianos em alimentos de origem animal. Tal como acontece com os outros formatos de imunoensaio, o sucesso de um kit de ELISA específico depende em grande parte da qualidade do anticorpo em relação à sua capacidade de reconhecer especificamente o analito alvo. Os kits de ELISA comercialmente disponíveis são aplicáveis para a análise de uma grande variedade de matrizes e a maioria dos fabricantes fornecem protocolos básicos e de fácil aplicabilidade para os ensaios. Além disso, geralmente apresentam baixos limites de detecção, simplicidade, tempo de análise reduzido e facilidade de automação (STEAD; STARK, 2012).

Scortichini *et al.* (2009) comparou um kit comercial de ELISA (Euro-Diagnostica®) com um método de extração de fase sólida mais complexo na detecção de enrofloxacin e obteve melhor performance com o método de extração de fase sólida em comparação com a extração rápida recomendada pelo fabricante do kit comercial. Članjak *et al.* (2011) pesquisaram resíduos de Enrofloxacin em tecido muscular e fígado de frangos de corte após o tratamento experimental com o

antimicrobiano, que foi fornecido às aves em doses profiláticas e terapêuticas. Como métodos analíticos para detecção de resíduos, utilizaram o método microbiológico de inibição de crescimento e o kit comercial de ELISA (Bioo Scientific®) e encontraram correlação positiva entre os métodos.

Um dos desafios mais comuns nos ensaios imunoenzimáticos é a interferência da matriz. O método ELISA muitas vezes tem um elevado potencial para ligação inespecífica a substâncias não-alvo. Substâncias presentes na amostra, tais como solventes, gorduras, sais ou outros compostos podem interferir na ligação entre o anticorpo e o analito, reduzindo a sensibilidade do teste (ZHANG *et al.*, 2011). Outro inconveniente é a reatividade cruzada que ocorre quando alguns compostos semelhantes ao composto principal dão uma resposta positiva frente ao ensaio, tendendo a resultados falsamente positivos (NUNES, 2005).

Dependendo do tipo de análise e do analito, os imunoenaios podem ser utilizados como métodos de triagem e também podem fornecer dados quantitativos. Na análise de um elevado número de amostras, entre as quais se esperam encontrar bem poucas amostras contaminadas, recomenda-se realizar ELISA, confirmando-se, posteriormente, as amostras positivas com métodos analíticos mais sofisticados, como espectrofotométricos ou cromatográficos (NUNES, 2005), pois do ponto de vista regulamentar, os métodos imunquímicos não devem ser considerados como definitivos (BOTSOGLOU; FLETOURIS, 2001).

2.8.2 Métodos confirmatórios

Os métodos confirmatórios permitem que o analito seja identificado inequivocamente e quantificados no nível de interesse. Esses métodos devem cumprir os critérios constantes da Diretiva 2002/657/CE da União Europeia (EUROPEAN COMMISSION, 2002) e devem ser baseados em espectrometria molecular fornecendo informações sobre a estrutura molecular da substância analisada (DE BRABANDER *et al.*, 2009)

A Cromatografia é um método físico-químico de separação, identificação e quantificação dos componentes de uma mistura. Esta separação ocorre pela migração diferencial dos componentes da mistura devido a interações entre estes com as fases móvel e estacionária (WANG; TURNISPEED, 2012).

A sua primeira aplicação data de 1903 e foi atribuída ao estudo de Michael S. Tswett, que pesquisou a separação dos componentes de extratos de folhas, utilizando uma coluna de vidro com carbonato de cálcio como fase estacionária e éter dietílico como fase móvel. Como a separação dos extratos resultou em componentes coloridos, foi dado o nome ao método, em 1906, de cromatografia (do grego, “chrom” cor e “grafie”= escrita), apesar de a separação dos extratos não ter sido dependente de cor (COLLINS, 2006).

A Cromatografia líquida é a técnica de separação mais utilizada para a análise de resíduos de medicamentos em produtos de origem animal e pode ser realizada por cromatografia líquida com detecção ultravioleta (GORLA *et al.*, 1997; SAMANIDOU *et al.*, 2005), com detecção por fluorescência (CORNEJO *et al.*, 2005; HASSOUAN *et al.*, 2007) ou por espectrometria de massas (LOLO ET AL., 2005; GAJDA *et al.*, 2012).

No Brasil, a Cromatografia Líquida Acoplada à Espectrometria de Massas Sequencial (LC-MS/MS) é o método oficial de análise de resíduos de fluoroquinolonas em alimentos de origem animal (BRASIL, 2011).

2.8.2.1 Cromatografia Líquida Acoplada à Espectrometria de Massas sequencial (LC-MS/MS)

A cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas sequencial (LC-MS/MS) é a técnica analítica mais utilizada para detecção e quantificação de resíduos, devido a sua alta sensibilidade e seletividade (PACHECO-SILVA, 2013).

Segundo Botsoglou e Fletouris (2000), a Cromatografia Líquida é capaz de detectar várias classes de antibacterianos, incluindo compostos de alto peso molecular. A separação dos componentes ocorre na medida em que a amostra e a fase móvel são bombeados através de uma coluna preenchida com uma fase estacionária. A fase estacionária consiste em uma superfície de partículas porosas de alguns micrômetros, resistente à mobilidade da fase móvel com a amostra. As forças físicas e químicas que atuam sobre os analitos e as fases móvel e estacionária determinam a retenção dos analitos sobre a coluna cromatográfica. Um componente muito solúvel em uma fase estacionária demora mais tempo a passar através dela do que um componente que não é muito solúvel nesta fase, mas muito

solúvel na fase móvel. Os analitos que passam mais rápido irão eluir a partir da coluna em primeiro lugar do que aqueles que passam por ela mais lentamente

A composição da fase móvel é crítica para a eficiência da análise. A seleção de solventes adequados depende dos compostos a serem analisados e das técnicas de ionização e colunas que serão utilizadas. Os solventes mais apropriados para as fases móveis de LC-MS/MS são o metanol e acetonitrila (WANG; TURNIPSEED, 2012)

A instrumentação para cromatografia líquida inclui o injetor, um sistema de bombeamento, a coluna, o detector e um sistema de análise de dados.

Detectores por meio de espectrometria de massa são provavelmente os mais poderosos para a prestação de informações estruturais sobre moléculas. Em geral, todos os espectrômetros de massa partilham pelo menos três estruturas distintas: a fonte de íons, um filtro de massas (m/z – massa/carga) e o detector (MORAES; LAGO, 2003). A fonte é talvez o elemento mais importante do espectrômetro de massa e diferencia os vários tipos de espectrometria de massa. Um composto é carregado ou ionizado na fonte para ser introduzido no sistema de vácuo da espectrometria de massa.

A escolha do método de ionização depende tanto da natureza da amostra quanto do tipo de informação desejada a partir da análise. Existe uma grande variedade de métodos de ionização que podem ser classificados em seis categorias principais: ionização em fase gasosa, ionização e dessorção de campo, bombardeamento de partículas, ionização a pressão atmosférica e dessorção a laser (BOTSOGLOU; FLETOURIS, 2000).

Resumidamente, a ionização por electrospray é um tipo de ionização a pressão atmosférica, na qual a solução, por diferença de potencial, é bombeada através de um capilar, produzindo um “spray” eletrostático, que gera gotículas carregadas, das quais são liberados os íons. Após a ionização, os íons são analisados em um analisador de massas. Dentre os analisadores de massa mais utilizados, destacam-se o Íon-trap, quadrupolo e “Time of Flight” (MORAES; LAGO, 2003). A cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas com tanto triplo-quadrupolo como multi-estágios íon-trap é o método preferido para a pesquisa grande maioria dos medicamentos veterinários (DE BRABANDER *et al.*, 2009).

3 DESENVOLVIMENTO

3.1 ARTIGO 1: FLUOROQUINOLONAS IN BRAZILIAN POULTRY INDUSTRY, BACTERIAL RESISTANCE AND RESIDUES: A REVIEW. Enviado à Revista Brasileira de Ciência Avícola - Brazilian Journal of Poultry Science.

Fluoroquinolones in Brazilian poultry industry, bacterial resistance and residues: a review

Raquel Gouvêa^{1*}, Leandro dos Santos Machado¹, Felipe Faccini dos Santos¹, Maria Helena Cosendey de Aquino², Elmiro Rosendo do Nascimento², Virginia Léo de Almeida Pereira²

¹ Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária (Doutorado) - Higiene Veterinária e Processamento Tecnológico de Produtos de Origem Animal – Faculdade de Medicina Veterinária – Universidade Federal Fluminense.

² Departamento de Saúde Coletiva Veterinária e Saúde Pública da Faculdade de Medicina Veterinária - Universidade Federal Fluminense.

ABSTRACT

Fluoroquinolones are antibiotics commonly used in the poultry industry and also in the human medicine. The use of these antibiotics must follow certain safety criteria such as the withdrawal period, dosage and duration of treatment because their injudicious and inadvertently use may result in bacterial resistance and accumulation of residues in edible tissues. Accordingly, the consumption of these products by humans may cause the

transmission of resistant bacteria and health problems through ingestion of active metabolites of fluoroquinolones, if the levels of residues in food are beyond tolerable limits. The objective of this paper is to present a review on the use of fluoroquinolone antibiotic class in the poultry farms, directed towards the development of bacterial resistance to these drugs and the presence of residues in poultry products.

Keywords: Fluoroquinolones, bacterial resistance, residues, poultry products

INTRODUCTION

The Brazilian poultry industry reached a high stage of development in recent years and has been growing at impressive levels each year (UBABEF, 2011). Brazil is a major producer and the world's largest exporter of chicken meat and the seventh largest producer of eggs. The quality and competitiveness of Brazilian poultry products are confirmed by the increase in domestic consumption and the export volume (Turra, 2012).

The development of productivity was built by management, poultry health, nutrition, breeding, upgrade facilities and integrated production. It was stimulated largely by the partnership between industry and producers, resulting in high quality and low trading costs (Brasil, 2012). The development highlighted concerns about hygiene and sanitary aspects of products, as demonstrated by the standards adopted for the production of poultry meat, eggs and products. Both government and private sector invested in the implementation of programs to ensure the quality of these products (Brasil, 1986; 1995; 1998). The attention to the poultry health, in particular, was of great importance in Brazilian poultry industry evolution.

The prevention and control of pathogens are permanent challenges. The administration of antibiotics in husbandry animals is usual throughout the world in the treatment and prevention of diseases, or even as growth promoters or performance enhancers. There is a growing concern that the use of these drugs in veterinary medicine and especially in animal production could endanger human health through the selection of resistant bacteria in animals and subsequent transmission to humans through food chain or by their dispersion in the environment (Castanon, 2007).

Bacterial resistance to antibiotics has become a matter of scientific and public interest over the last decade. There is no agreement on the degree of influence on the use of antimicrobials in animals on the emergence of antibiotic-resistant bacteria and their spread to humans. However, experimental evidence and molecular epidemiological studies point to a relationship between antimicrobial use and the emergence of resistant bacterial strains in animals, spreading to humans primarily through the food chain.

Besides the risks of antimicrobial therapy on the selection pressure that favors the emergence of resistant bacteria, there is also the possibility of residue accumulation of these drugs in animal products. Consumption of these products with residues can cause harm to human health, including the occurrence of bone marrow aplasia, hypersensitivity, induction of tumors and changes in normal bacterial flora (WHO, 1995; Kowalski *et al.*, 2005; WHO, 2009).

This paper is a review on the use of the fluoroquinolone class of antibiotics in poultry production, directed towards to the development of bacterial resistance to these drugs and the presence of residues of these drugs in poultry products.

The Use of Antibiotics in the Poultry Industry

Antibiotic therapy was one of the most important factors in the development of human and veterinary medicine in general (Finch, 2007). The poultry industry had undeniable gains in productivity with its use, either in prophylaxis, therapy or used as a performance enhancer (Gonzales *et al.* 2005).

The therapeutic use of antibiotics in humans began in the 1930s with the sulfonamides. There have been major changes in the following years due to the emergence of resistant organisms, which led to a continual search for therapeutic alternatives increasingly effective on the spectrum of action and antibiotics toxicity (Jackson *et al.*, 1998). Veterinary medicine began to use antibiotics in the 50s and this occurred in parallel with advances in human medicine (EMEA, 1999).

Besides the use of antimicrobial agents in veterinary medicine in the treatment and prevention of diseases, they are also used as growth promoters and performance enhancers in animal production. These substances are continuously used in the poultry feed at subtherapeutic doses (Andreatti Filho & Silva, 2005). Their effect was discovered in the 1940s, during isolation and identification of vitamin B12 in fungi cultures, which was considered a growth promoter, however, it was found that dry mycelium of certain fungi such as *Streptomyces aureofaciens* contained antimicrobial acting as potent growth promoters (Jones & Ricke, 2003; Castanon, 2007).

The use of antibiotics as growth promoters without veterinary prescription has been approved by the regulatory agency in the United States, Food and Drug Administration (FDA), in 1951 (Jones & Ricke, 2003). Also in the 1950s and 1960s, every European state has adopted its own regulations on the use of antibiotics in animal feed.

The use of growth promoters in animal nutrition improves feed efficiency, reduces food intake, reduces infectious and parasitic diseases, prevents and reduces mortality, thus increasing productivity. The growth promotion mechanism of action is not entirely clear, but there seems to be an agreement among the researchers that it is not a single but a multiple and complex mechanism (Albuquerque, 2005). In the 1950s and 1960s, penicillins and tetracyclines were used as growth promoters and in the 1960s, concerns have arisen regarding the emergence of resistant bacterial strains.

In a report for the UK government in 1969, the Joint Committee on the Use of Antibiotics in Animal Husbandry and Veterinary Medicine said that the administration of antibiotics at sub therapeutic doses endanger human and animal health. To avoid these risks, the antibiotics used as growth promoters should have little or no therapeutic application in human or animals, therefore not influencing the effectiveness of drugs in therapeutic use through the selection of resistant strains. In the 1990s, debates on antimicrobial resistance intensified in the European Union (EU) (EMEA, 1999). Since then, the EU suspended the use of avoparcin, virginiamycin, spiramycin, tylosin and zinc bacitracin as growth promoters (European Community, 1998). In 2006, the EU suspended the use of any antibiotic as a growth promoter (European Community, 2003).

In Brazil, some drugs have been banned in the manufacture of products with the purpose of growth promoters. Among other prohibitions, in 2002, the Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) (Ministry for Agriculture, Livestock Farming and Supplies) banned the use of arsenic and antimony (Brasil, 2002). Chloramphenicol and nitrofurans were banned in 2003 (Brasil, 2003a). Olanquinox and carbadox were prohibited in 2004 and 2005, respectively (Brasil, 2004; 2005a). Anfenicols, tetracyclines, beta-lactam (benzilpenicylamics and cephalosporins), systemic quinolones and sulfonamides were banned as growth promoters

in 2009 (Brasil, 2009). In 2012, spiramycin and erythromycin were also prohibited (Brasil, 2012).

As the expectations of prohibition and restriction on the use of antibiotics as growth promoters is increasing, many researches are being developed with the aim of obtaining efficient alternatives, in particular the use of probiotics, prebiotics and other ways to reduce pathogenic microorganisms of birds (Person *et al.*, 2012).

Probiotics are dietary supplements composed of pure or mixed culture of live microorganisms which benefit the health of the host through the intestinal microbiota balance (Andreatti Filho & Silva, 2005). The mechanisms of action of probiotics is not yet fully understood but it is known that competitive exclusion may act by binding to sites on the intestinal mucosa, thereby preventing the binding of pathogenic bacteria; by the production of antibacterial substances as bacteriocins, organic acids and hydrogen peroxide; by competing for nutrients and for stimulating the immune system of the host (Andreatti Filho & Silva, 2005). The efficacy of probiotics may be affected by factors such as age of the animal, type of probiotic, viability of microorganisms, storage conditions, handling conditions and health challenge (Souza *et al.*, 2010).

Prebiotics are substances introduced to the poultry feed alone or associated with probiotics. These substances do not undergo the action of digestive enzymes and benefit the health of the host by selectively stimulating the growth and metabolism of a group of intestinal bacteria (Andreatti Filho & Silva, 2005).

Other important additives used in poultry feed are exogenous enzymes that act on food improving digestion, releasing more nutrients to give more appropriate way for the absorption while destroying harmful substances to the body (Lima, 2005). There are also substances like

plant extracts and essential oils, which are substances that influence the performance of poultry. It is known that herbal extracts can improve digestibility and have antifungal and antimicrobial activity and essential oils increase the palatability, stimulate secretion of endogenous enzymes, modify the intestinal micro flora and helps in reducing subclinical infections (Bonato *et al.*, 2008).

In Brazil, there is little statistical data regarding the use of antibiotics in animal production. A study was conducted by the Secretaria de Saúde of Paraná in 2004, through the State Program for Control of Residues of Veterinary Drugs in Foods of Animal Origin (Programa Estadual de Controle de Resíduos de Medicamentos Veterinários em Alimentos de Origem Animal - PAMvet), to identify the most commonly used veterinary drugs in broilers and laying hens and in poultry laying. In 28 broiler establishments, groups of drugs cited as preventive used in finishing broilers were enrofloxacin, avilamycin, lasalocid, ciprofloxacin, fosfomicin, chlortetracycline, sulfatiazina+trimethoprim, acid3-nitro, virginiamycin, lincomycin, norfloxacin and tylosin. Norfloxacin, enrofloxacin, monensin, sulfadiazine+trimethoprim, avilamycin, amoxicillin, chlortetracycline, sulfaclorperidazine+trimethoprim, maduramycin, nicarbazin, neomycin, tiamulin and tilmicosin (Brasil, 2005b) were cited as therapeutic. In 66 laying hens establishments, quinolones were the most cited group of antimicrobials, followed by tetracyclines and quinoxalines. The most used drugs were enrofloxacin (25.8 %), oxytetracycline (21.5 %), olaquinox (15.1%), norfloxacin (9.7%), doxycycline (6.5%), sulphaquinoxaline (6.5%) and bacitracin (6.5%) (Machinski Junior *et al.* 2005).

Development of Fluoroquinolones

The development of quinolones strengthened antimicrobial therapy, due to their low toxicity and broad spectrum of action. The first quinolone to be produced was nalidixic acid, which is

a naftaridine. It was discovered in 1962 by Leshea and colleagues by accident while synthesizing clorquine, an antimalarial agent with antibacterial activity. Nalidixic acid showed some activity against aerobic Gram-negative and so was used in the treatment of urinary tract infections (Jackson *et al.*, 1998; Silva & Hollenbach, 2010). However, this antimicrobial agent had its use reduced due to its tendency to induce bacterial resistance. As a result, there were synthesis of new compounds with larger spectrum of action and lower toxicity (Ito *et al.*, 2005).

The discovery of modifications in the chemical structure of quinolones changed significantly its antimicrobial activity, allowing the synthesis of other compounds of this group. The fluoroquinolones are fluorinated derivatives of quinolones and were introduced in the 1980's. They have fluorine in position #6 of quinolone ring and also presents ketone in position #4 and carboxyl in #3 position (Figure 1), which give greater antibacterial activity. The addition of cyclopropyl, ethyl or fluorophenyl in position #1 and piperazine in position #7 increased the spectrum of antimicrobial activity of fluoroquinolones (Andriole, 2005; Sharma *et al.*, 2009).

The presence of fluorine in position #6 confers a higher activity against Gram-positive and Gram-negative bacteria, because it increases the penetration of the antimicrobial agent in the cell membrane of the bacteria. The first broad spectrum fluoroquinolone to be synthesized was norfloxacin, which was introduced in 1980 and has a piperazinyl ring by replacing the methyl group in position #7. Thus, there were obtained an increased activity against Gram-negative, but did not acted on anaerobes (Andriole, 2005).

The development of ciprofloxacin came with the substitution of the ethyl group by the group cyclopropyl, increasing the Gram-positive spectrum without compromising the effect on

Gram-negative bacteria (Sharma *et al.* 2009). Enrofloxacin has a similar structure to ciprofloxacin and also has changes in the ethyl group (Ito *et al.* 2005).

All these structural changes in the molecule of quinolones led to a broader spectrum of action and distribution in the tissues, greater half-life, reduction in toxicity and increased ability to penetrate the bacterial cell wall. Consequently, allowed more activity against Gram-negative bacteria, also starting to act on some Gram-positive species. Its indications have evolved from application in the urinary tract infections to various applications. The latest generation of quinolones already have activity against anaerobic bacteria (Silva & Hollembach, 2010).

In the late 1980s and early 1990s, the use of fluoroquinolones in veterinary medicine has begun. Since then, new fluoroquinolones molecules have been authorized and a vast number of different veterinary drugs are already available on the market (EMEA, 2006).

Pharmacodynamics and pharmacokinetics

Fluoroquinolones, as all quinolones, are bactericidal and act by inhibiting the catalytic activity of the bacterial enzymes DNA gyrase (or topoisomerase II) and topoisomerase IV, which work together and are essential for replication and transcription of bacterial DNA (Sharma *et al.* 2009).

The DNA gyrase catalyzes chain reactions in the bacterial double-stranded chain DNA that allows their supercoiling, relaxation, separation and reintegration during the processes of transcription and translation. Quinolones block this reaction and DNA gyrase and topoisomerase IV are locked in a complex drug-enzyme-DNA, with subsequent release of breaks "lethal" to the double-stranded DNA (Jacoby, 2005).

After administration, fluoroquinolones are rapidly absorbed, widely distributed and have low plasma protein binding. They are excreted through urine and bile and their residues can be found in liver and kidneys (Goetting *et al.*, 2011; Hollembach & Silva, 2010). One of the most used fluoroquinolones, enrofloxacin, has its biotransformation by reactions that include N-dealkylation, gluconidic combination with nitrogen in para position of the piperazinyl ring, oxidation in position ortho in relation to the amine substitute and piperazinyl ring opening (Vancutsem *et al.*, 1990). Ciprofloxacin is a metabolite of enrofloxacin and is pharmacokinetically different with half or less than half of bioavailability in the body of the bird (Ito *et al.*, 2005)

Enrofloxacin has an intermediate and variable effect for *Pseudomonas* spp., *Enterococcus* spp., *Clostridium* spp., *Staphylococcus* spp. and *Streptococcus* spp. and good effect on Enterobacteriaceae, including *Campylobacter* spp., *Enterobacter* spp., and *Serratia* spp. It also acts on *Chlamydia* spp. and *Mycobacterium* spp. In general, the dose recommended for ciprofloxacin and enrofloxacin is 10 mg/kg, since ciprofloxacin is a metabolite of enrofloxacin. It is important to note that the amount of ciprofloxacin increases with dose and time of use of enrofloxacin. Enrofloxacin are given to treat *E. coli* infections on chickens and *Pasteurella multocida* on turkeys (Ito *et al.* 2005).

Bacterial Resistance to Fluoroquinolones

International organizations such as the World Health Organization (WHO), Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO) and the World Organization for Animal Health (OIE), and others are concerned about the development of resistance by pathogenic microorganisms to humans and animals, including zoonotic microorganisms,

particularly *Campylobacter* spp. and *Salmonella* spp. to certain classes of antibiotics such as fluoroquinolones (EMA, 2006).

Bacterial resistance is a possibility inherent in any therapy with antimicrobial agents (Bayer, 1999). In most bacterial species, the quinolone resistance occurs due to mutations in the target of quinolones, DNA gyrase and topoisomerase IV and mutations that alter the permeability of the outer membrane, leading to the ejection of the drug by active transport (Jacoby, 2005). The Plasmid-mediated resistance occurs, though less frequently (Bayer, 1999; Vetting *et al.*, 2011).

The resistance to quinolones of *Campylobacter* spp., a microorganism commonly found in the intestinal tract of birds, occurs mainly due to individual mutations in DNA gyrase (*gyrA* gene) and occasionally in topoisomerase IV (*parC* gene). There is also evidence, though rare, of resistance because of changes in outer membrane permeability, leading to the ejection of the drug by active transport, with subsequent cross-resistance to a variety of antimicrobial agents (EFSA, 2009).

Mc Dermott *et al.* (2002) and Van Boven *et al.* (2003) conducted a study on the impact of fluoroquinolone use in development of *Campylobacter jejuni* resistance in chickens, which is the main bacterial agent of gastroenteritis in the United States. As a result, the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) for enrofloxacin rose during treatment and maintained steady after treatment. In addition to the bacterial resistance, some studies suggest the probable resemblance between clones of fluoroquinolone-resistant *Campylobacter jejuni* isolated in samples of poultry and in samples from humans (Endtz *et al.*, 1991; Notario *et al.*, 2011).

Salmonella spp. can develop chromosome mediated resistance and plasmid-mediated resistance (RQMP) to fluoroquinolones. The resistance mediated by chromosomes occurs

under antimicrobial pressure by point mutations that leads to amino acid substitutions in the DNA gyrase and topoisomerase IV in genes *gyrA*, *gyrB*, *parC* or *parE*, by decreasing the expression of outer membrane porins or changes on lipopolysaccharide (LPS) and by overexpression of the multidrug efflux pumps. The mutations in *gyrA*, *gyrB*, *parC*, or *parE* in regions that form the binding site to fluoroquinolones called "quinolone-resistance determinant region" (QRDR) alter the structure of topoisomerase so that the fluoroquinolones become unable to bind to these sites. At first, mutations affecting only the older quinolones such as nalidixic acid occur. Additional mutations are necessary to reduce susceptibility to other fluoroquinolones, such as ciprofloxacin, danofloxacin, difloxacin, enrofloxacin, marbofloxacin and levofloxacin. These additional mutations result in development of "clinical resistance" with MIC over than 2 mg/L. The quinolone resistance mediated by plasmids (QRMP) occurs when genes (*qnr*) encode protective proteins of DNA gyrase. The level of quinolone resistance offered by *qnr* genes is low. Its clinical importance lies in increasing the MIC of quinolone-resistant *Salmonella* spp. strains to levels that are clinically relevant (EFSA, 2009).

In many countries, fluoroquinolones are considered as drugs of first choice in the treatment of human acute gastrointestinal infections caused by *Salmonella* spp. (EMEA, 1999) and resistance to this group of antibiotics has been commonly reported, especially to nalidixic acid. In a study conducted from 1996 to 2003, among 12.252 isolates of *Salmonella* spp. analyzed for antimicrobial susceptibility, 203 (1.6%) were resistant to nalidixic acid and 14 (0.1%) to ciprofloxacin. Resistance to nalidixic acid increased significantly from 0.4% in 1996 to 2.3% in 2003. All ciprofloxacin-resistant isolates had at least one mutation in the QRDR of *gyrA*, not hosting *qnr* or had point mutations in the QRDR of *gyrB*, *parC*, or *parE* (Stevenson *et al.*, 2007).

Antimicrobial residues in Poultry Products

Another important concern about the use of antibiotics in animal production is the possibility of antimicrobial residues in animal products and the risks associated with such to the population.

Residues of Veterinary Drugs are, by definition, the fraction of the drug, its metabolites and/or drug-related impurities in any edible portion of food of animal origin (Codex Alimentarius, 2011). In human medicine, allergic reactions to drugs are the side effects of therapeutic use of antibiotics, especially to β -lactams. Residues of these substances in food may also be responsible for risks to humans associated with the carcinogenic action of chloramphenicol, nitrofurans and sulfamethazine and selection of bacteria resistant to common antibiotics (Machinski Junior *et al.*, 2005; Goetting *et al.*, 2011).

Maximum Residue Limit (MRL) is the maximum concentration of residue in mg/kg or $\mu\text{g}/\text{kg}$ recommended by the Codex Alimentarius Commission to be legally permitted in food (Codex Alimentarius, 2011). To determine the MRL, the toxicological analysis, the pharmacokinetics of the substance and the risk it may pose to human health must be considered. The risk is calculated by the acceptable daily intake (ADI) in mg/kg or $\mu\text{g}/\text{kg}$ of the drug present in the food. ADI, in turn, is calculated from the NOEL ("No Effect Level") value of a substance which is at the highest dose of a chemical substance that does not produce adverse effects.

To calculate MRLs for an antimicrobial for poultry, "Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives" (JECFA), considers the value of toxicological ADI derived from toxicity calculations and other microbiological, that comes from tests on possible adverse effects of the antimicrobial on the human gastrointestinal tract and the development of bacterial

resistance. The lesser of the two values is used for fixing the ADI, and consequently to calculate the MRL for this antimicrobial (Palermo Neto, 2005).

JECFA is an international scientific committee of experts who meet since 1956, to discuss specifically food additives and is administered by FAO and WHO. Their work includes the evaluation of contaminants, toxins and residues of veterinary drugs in food, serves as a scientific advisory body to FAO, WHO, governments and the Codex Alimentarius Commission and is a reliable source of advice for some countries that use their information in formulating their own regulations (WHO, 2013).

MRLs are important data in determining the withdrawal period of a drug, which is the time interval, in hours or days, required for quantities of drug or its metabolites in food being below the MRLs set by the *Codex Alimentarius* for that product (Palermo Neto, 2005). However, not all antimicrobial agents have an MRL set. Some are not considered dangerous, having no MRL, others have provisional MRLs and others are banned for use in animals (Pereira, 2009).

The European Union has MRLs for Enrofloxacin, for example, and those are calculated based on the sum of Enrofloxacin and Ciprofloxacin residues. In the case of chickens, the MRL set is 100 µg/kg for muscle, fat and skin, 200 µg/kg for liver and 300 µg/kg for kidney, not allowed their use in animals which eggs are produced for human consumption. Higher MRLs in liver and kidney agree with the pharmacokinetics of the fluoroquinolones, concentrates in these organs (European Community, 2002).

In Brazil, the MRL set for poultry is 100 µg/kg for enrofloxacin (Brasil, 2013a). The limit established for enrofloxacin and ciprofloxacin in eggs is 10 µg/kg. As this substance is registered for use in laying hens, but their respective MRL or Maximum Contaminant Content

is not established by law, the limit for taking regulatory action adopted is 10 µg/kg or 10 µg/L, because it is the lowest concentration detectable by the tests accepted by the legislation (Brasil, 2013a).

In Brazil, the MRLs are established by the Ministry of Health, and in the cases that are not established, MRLs used are the ones set by international organizations such as MERCOSUR, Codex Alimentarius, European directives and FDA are used. The analytical methods used in the National Residue and Contaminants Control (Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes - PNCRC) are adopted, depending on the availability of validated methods, especially those recommended by the Codex Committee on Residues of Veterinary Drugs in Foods. Brazil has been engaged, through plans and programs of MAPA and the National Agency for Sanitary Surveillance (Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA), in order to improve productivity, quality and safety of food supplied to the Brazilian population, as well as to suit the health aspects and rules of food international trade, recommended by the World Trade Organization, FAO, OIE and WHO (Brasil, 1999).

In broilers, antibiotics and antiparasitics are used extensively in the prevention and treatment of diseases and, because of that, residues of these drugs may be found in edible tissues such as muscle and liver. In laying hens, the presence of residues in eggs are of concern because eggs may contain residues of a variety of drugs that can be detected days or weeks after the treatment (Goetting *et al.*, 2011). Fluoroquinolones residues appear in eggs about 24 hours after the first administration and persist in the yolk and albumen for several days after cessation of treatment (Etches, 1998).

In Brazil, there are laws that regulate and inspect the presence of residues in food (Brasil, 1986; 1995; 1999; 2003b; 2006). The Instrução Normativa nº 07 of MAPA, published in 2013, made public the results of monitoring programs of PCRC (beef, pork, poultry, ostrich

and equine) in milk, eggs, honey and fish on the year 2012. In 116 analyzes in poultry muscle, none had detectable residues. Antibiotics analyzed were nalidixic acid, oxolinic acid, ciprofloxacin, difloxacin, enrofloxacin, flumequine and sarafloxacin. In 33 eggs analyzed to enrofloxacin and ciprofloxacin, none had residues as well (Brasil, 2013b). Therefore, even with the use of many drugs in poultry production, no residues were found in the period of analysis in Brazilian flocks, indicating respect to withdrawal periods of medicines.

Fluoroquinolones Residues Studies in Poultry Products

Studies that verify the depletion curve of fluoroquinolone residues in the edible tissues and/or eggs are especially important to determine the withdrawal period. Also assists in the monitoring of residues in products of animal origin and improve methodologies of residues analysis.

Given the importance of enrofloxacin and ciprofloxacin in poultry production, studies related to the detection of residues of these antibiotics have been conducted so far.

Anadón *et al.* (2001) treated broilers orally with daily doses of 8 mg/kg of ciprofloxacin for three days. They analyzed liver, kidney, muscle and skin with fat. A withdrawal period of 10 days was determined, in which levels of ciprofloxacin and its metabolites were below the MRLs set by the EU for enrofloxacin in the matrices analyzed. Jelena *et al.* (2006) investigated enrofloxacin in poultry muscle and liver after oral administration at a dose of 10 mg/kg for five days. A withdrawal period of four days was enough to reduce the levels of enrofloxacin and ciprofloxacin residues to acceptable levels.

Considering the egg matrix, Gorla *et al.* (1997) investigated hens treated orally on two separate occasions with ciprofloxacin and enrofloxacin with a dose of 5 mg/kg for five days. Withdrawal periods of six days to enrofloxacin and five days to ciprofloxacin were

appropriate to avoid antimicrobial residues in eggs, considering the same MRL of 100 µg/kg for muscle, fat and skin used as a comparative standard. Lolo *et al.* (2005) performed a similar study in which hens were treated with enrofloxacin for five consecutive days orally at a dose of 12 mg/day. A withdrawal period of eight days to enrofloxacin and seven days to ciprofloxacin were proposed. In a study of Cornejo *et al.* (2011), enrofloxacin was administered orally at a dose of 10 mg/kg for five days, eight days were sufficient so that the ciprofloxacin and enrofloxacin levels were reduced to below the MRL 100 µg/kg.

The variability between propositions of withdrawal periods can be attributed to variability in the methods of analysis of residues and the conditions of treatment of hens in each experiment.

In Brazil, there are 16 registered formulations of enrofloxacin in the MAPA and most of them recommend a withdrawal period of seven days before slaughtering of chickens. Regarding eggs, some manufacturers recommend not to use this antimicrobial for hens which eggs are intended for human consumption, while others do not report any withdrawal period for this animal. Therefore, there is no consensus among manufacturers, in general, about the withdrawal periods, allowing that a variety of interpretations and misuse of these products. As a result, the risk of violative levels of residues in edible tissues and eggs may be larger, as can be greater the risk of the consumer being exposed to such substances.

CONCLUSIONS

The use of fluoroquinolones in poultry farms is frequent and is indicated for the treatment of many diseases, however it is essential to be done by prudence, ethics and professionalism. The risks inherent to the inappropriate use of antibiotics in poultry can range from induction of bacterial resistance to environmental contamination and the buildup of residue in poultry

products. The resistance to this class of antibiotics of zoonotic bacteria such as the genera *Salmonella* and *Campylobacter* should be considered and prevented, as there is the possibility of transfer of these microorganisms to humans through the consumption of poultry products. Also, the supply of poultry products with residues of fluoroquinolones offers a risk to human health through adverse effects that may occur, such as hypersensitivity reactions, imbalance in gut flora, selection of resistant micro-organisms, as well as drug interactions, damaging treatment of bacterial infections.

ACKNOWLEDGEMENTS

The Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico supported the doctoral fellowships of Raquel Gouvêa, and Felipe Faccini dos Santos and the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior supported the doctoral fellowship of Leandro dos Santos Machado.

REFERENCES

Albuquerque, R.: Antimicrobianos como promotores de crescimento. In: Palermo Neto, J; Spinosa, H. S.; Górnaiak, S. L. (Eds) Farmacologia Aplicada á Avicultura. Roca, São Paulo, (1ª ed), Cap. 09, 2005, p. 149-159.

Anadón, A.; Martínez-Larrañaga, M. R.; Iturbe, J.; Martínez, M.A.; Díaz, M. J.; Frejo, M. T.; Martínez, M. Pharmacokinetics and residues of ciprofloxacin and its metabolites in broiler chickens. Research in Veterinary Science, v. 71. P. 101-109, 2001.

Andreatti Filho, R. L.; Silva, E. N. Pré-bióticos e correlatos na produção avícola. In: Palermo Neto, J; Spinosa, H. S.; Górnaiak, S. L. (Eds) Farmacologia Aplicada á Avicultura. Roca, São Paulo, (1ª ed), Cap. 15, 2005, p. 225-237.

Andriole, V. T. The quinolones: past, present and future. Clinical Infectious Diseases. Supplement Article, v.41, p.S113-S119, 2005

Bayer. Resistance. 1999. Available at: <http://www.animalhealth.bayer.com/5168.0.html>

Bonato, M. A.; Sakomura, N. K.; Piva, G. H.; Barbosa, N. A. A.; Mendonça, M. O.; Fernandes, J. B. K. Efeito de acidificantes e extratos vegetais sobre o desempenho e qualidade de ovos de poedeiras comerciais. *Ars Veterinaria*, Jaboticabal, SP, v.24, n.3, 186-192, 2008

Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Portaria nº51, de 6 de fevereiro de 1986. Instituição do Plano Nacional de Controle de Resíduos Biológicos em Produtos de Origem Animal - PNCRB. *Diário Oficial da República Federativa do Brasil*, Brasília, DF, 07 jul. 1986, Seção 1

Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Portaria nº 527, de 15 de agosto de 1995. Adequa o Plano Nacional de Controle de Resíduos Biológicos em Produtos de Origem Animal - PNCRB, de que trata a Portaria Ministerial nº 51, de 06 de fevereiro de 1986. *Diário Oficial da República Federativa do Brasil*, Brasília, DF, 16 ago. 1995, Seção 1

Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Portaria nº 46, de 10 de Fevereiro de 1998. Instituir o Sistema de Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle - APPCC a ser implantado, gradativamente, nas indústrias de produtos de origem animal sob o regime do Serviço de Inspeção Federal. *Diário Oficial da República Federativa do Brasil*, Brasília, DF, 16 mar. 1998, Seção 1

Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº42 de 20 de dezembro de 1999. Altera o Plano Nacional de Controle de Resíduos em Produtos de Origem Animal - PNCR e os Programas de Controle de Resíduos em Carne - PCRC, Mel – PCRM, Leite – PCRL e Pescado – PCRP. *Diário Oficial da República Federativa do Brasil*, Brasília, DF, 22 dez. 1999, Seção 1, 213p.

Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Portaria nº31, de 29 de janeiro de 2002. Entre outras determinações, proíbe o uso de princípios ativos à base de arsenicais e antimoniais, na fabricação de produtos destinados à alimentação animal, com finalidade de promotores de crescimento ou melhoradores de desempenho animal. *Diário Oficial da República Federativa do Brasil*, Brasília, DF, 05 fev. 2002, Seção 1

Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº09, de 27 de junho de 2003. Entre outras determinações, proíbe a fabricação, a manipulação, o fracionamento, a comercialização, a importação e o uso dos princípios ativos cloranfenicol nitrofuranos e os produtos que contenham estes princípios ativos, para uso veterinário e suscetível de emprego na alimentação de todos os animais e insetos. *Diário Oficial da República Federativa do Brasil*, Brasília, DF, 30 jun. 2003a, Seção 1

Brasil. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução da Diretoria Colegiada nº253, de 16 de setembro de 2003. Institui o Programa de Análise de Resíduos de Medicamentos Veterinários em Alimentos de Origem Animal (PAMvet). Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 16 set. 2003b, Seção 1

Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº11, de 24 de novembro de 2004. Entre outras determinações, proíbe a fabricação, a importação, a comercialização e o uso da substância química denominada Olaquinox, como aditivo promotor de crescimento em animais produtores de alimentos. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 25 nov. 2004, Seção 1

Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº35, de 14 de novembro de 2005. Entre outras determinações, proíbe a fabricação, a importação, a comercialização e o uso de produtos destinados à alimentação animal contendo a substância química denominada Carbadox, como aditivo promotor de crescimento de animais de produção. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 17 nov. 2005a, Seção 1

Brasil. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Programa Estadual de Controle de Resíduos de Medicamentos Veterinários em Alimentos de Origem Animal (PAMvet-PR). Levantamento do Uso e Comercialização de Medicamentos Veterinários em Frango de Corte. 23p, 2005b. Available at:
<http://www.saude.pr.gov.br/arquivos/File/vigilancia%20sanitaria/Relatorio%20levantamento%20frango.pdf>

Brasil. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Programa de Análise de Resíduos de Medicamentos Veterinários em Alimentos de Origem Animal (PAMvet). Relatório 2004/2005. Monitoramento de Resíduos em Leite Exposto ao Consumo. 46p., 2006. Available at: http://www.anvisa.gov.br/alimentos/pamvet/relat%F3rio_leite_2004-05.pdf

Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 26, de 9 de julho de 2009. Aprova o Regulamento Técnico para a fabricação, o controle de qualidade, a comercialização e o emprego de produtos antimicrobianos de uso veterinário, na forma dos Anexos da presente Instrução Normativa. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 10 jul. 2009, Seção 1

Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 14, de 17 de maio de 2012. Dentre outras determinações, proíbe em todo o território nacional a importação, fabricação e o uso das substâncias antimicrobianas espiramicina e eritromicina com finalidade de aditivo zootécnico melhorador de desempenho na alimentação animal. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 18 maio 2012, Seção 1

Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº17, de 31 de maio de 2013. Publicar o Subprograma de Monitoramento em Carnes (Bovina, Aves, Suína, Equina, Caprina e Ovina, e de Avestruz), Leite, Pescado, Mel e Ovos para o exercício de 2013, referente ao Plano Nacional de Controle de Resíduos Biológicos em Produtos de Origem Animal – PNCRB, na forma dos Anexos I e II à presente Instrução Normativa. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 31 maio 2013, Seção 1, 2013a.

Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº07, de 27 de março de 2013. Publicar os resultados do acompanhamento dos Programas de Controle de Resíduos e Contaminantes dos subprogramas de monitoramento e exploratório em Carnes (Bovina, Suína, de Aves, de Avestruz e Equina), em Leite, Ovos, Mel e Pescado do exercício de 2012, na forma dos Anexos à presente Instrução Normativa. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 27 março 2013, Seção 1, 2013b

Castanon, J. I. R. History of the use of antibiotic as growth promoters in European poultry feeds. *Poultry Science*, v. 86, n. 11, p. 2466-2471, 2007.

Codex Alimentarius. Joint FAO/WHO Food Standards Programme Codex Alimentarius Commission. Procedural Manual Twentieth Edition World Health Organization, Food and Agriculture Organization of the United Nations, Roma, 2011. Available at: http://www.codexalimentarius.net/web/procedural_manual.jsp

Cornejo, J.; Lapiere, L.; Iragüen, D.; Cornejo, S.; Cassus, G.; Richter, P.; San Martin, B. Study of enrofloxacin and flumequine residues depletion in eggs of laying hens after oral administration. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, v. 35, p. 67-72, 2011.

EFSA. European Food Safety Authority, European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC), European Medicines Agency (EMA), Scientific Committee on Emerging and Newly Identified Health Risks (SCENIHR) Joint Opinion on antimicrobial resistance (AMR) focused on zoonotic infections. *EFSA Journal*, Brussels, Belgium. v.7, n.11, 78 p., 2009.

EMA. European Medicines Agency. The European Agency for the Evaluation of Medicinal Products. Antibiotic Resistance in the European Union Associated with Therapeutic Use of Veterinary Medicines. Report and Qualitative Risk Assessment by the Committee for Veterinary Medicinal Products, 1999, 158p. Available at: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Report/2009/10/WC500005166.pdf

EMA. European Medicines Agency. Veterinary Medicines and Inspections. Committee for Medicinal Products For Veterinary Use (CVMP). Reflection Paper on the Use of Fluoroquinolones in Food-Producing Animals in the European Union: Development of Resistance and Impact on Human and Animal Health. London, 2006, 23p. Available at: <http://www.ema.eu.int/htms/vet/swp/srantimicrobial.htm>

Endtz, H. P.; Ruijs, G. J.; Van Klingeren, B.; Jansen, W. H.; Van Der Reyden, T.; Mouton, R. P. Quinolone Resistance in *Campylobacter* Isolated from Man and Poultry Following the Introduction of Fluoroquinolones in Veterinary Medicine. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. n.27; p.199-208, 1991.

Etches, R. J. *Reproduction in Poultry*. CAB International, Wallingford, RU, (1^a. ed), 1998, 318 p.

European Community. Council Regulation (EC) N° 2821/98 of 17 December 1998 amending, as regards withdrawal of the authorisation of certain antibiotics, Directive 70/524/EEC concerning additives in feedingstuffs. *OJ L351*, 4p., 1998.

European Community. Commission Regulation (EC) N° 1181/2002 of 1 July 2002 amending Annex I of Council Regulation (EEC) N° 2377/90 laying down a Community procedure for the establishment of maximum residue limits of veterinary medicinal products in foodstuffs of animal origin. *Official Journal of the European Communities*. L 172, p.13-20, 2002.

European Community. Regulation (EC) N° 1831/2003 of the European Parliament and of the Council of 22 September 2003 on additives for use in animal nutrition. *Official Journal of the European Union*, L 268, p. 29-43, 2003.

Finch, R. Innovation - drugs and diagnostics. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. n.60, Suppl. 1, p.79 – 82, 2007

Goetting, V.; Lee, K. A; Tell, L. A. Pharmacokinetics of veterinary drugs in laying hens and residues in eggs: a review of the literature. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, v.34, Issue 6, p. 521-556, 2011.

Gonzales, E.; Café, M. B.; Leandro, N. S. M. Boas Práticas no uso de medicamentos pela indústria avícola. Cap. 18. In: Palermo-Neto, J.; Spinosa, H.; Górnaiak, S.L. (Eds) *Farmacologia Aplicada á Avicultura*. Roca, São Paulo, (1^a ed), 2005, cap. 18, p. 266-285

Gorla, N.; Chiostrri, E.; Ugnia, L.; Weyers, A.; Giacomelli, N.; Davicino, R.; Ovando, H. G. HPLC residues of enrofloxacin and ciprofloxacin in eggs of laying hens. *International Journal of Antimicrobial Agents*. V. 8, p. 253–256, 1997

Ito, N. M. K.; Miyaji, C. I.; Lima, E. A.; Okabayashi, S. Antimicrobianos: usos preventivos e curativos em avicultura. In: Palermo Neto, J; Spinosa, H. S.; Górnaiak, S. L. (Eds) *Farmacologia Aplicada á Avicultura*. Roca, São Paulo, (1^a ed), Cap. 08, 2005, p. 115-147.

Jackson, L. C.; Reyes, L. A. M.; Cordiés, M. L. H. Quinolonas y terapia antimicrobiana. *Acta Medica*, v. 8, n. 1, p. 58-65, 1998.

Jacoby, G. A. Mechanisms of Resistance to Quinolones. *Clinical Infectious Diseases*. v. 41, p. 120 – 126, Supplement 2, 2005.

Jelena, P.; Baltić, M.; Čupić, V.; Stefanović; Stojanović, D. Residues of enrofloxacin and its main metabolite ciprofloxacin in broiler chickens. *Acta Veterinaria*. Belgrado, Sérvia, v. 56, n. 5-6, p. 497-506, 2006.

Jones, F. T.; Ricke, S. C. Observations on the history of the development of antibiotics and their use in poultry feeds. *Poultry Science*, v. 82, p. 613–617, 2003.

Kowalski, T. J.; Henry, M. J.; Zlabek, J. A. Furazolidone-Induced Pulmonary Hypersensitivity. *The Annals of Pharmacotherapy*, v. 39, p. 377-379, 2005.

Lima, F. R. Aditivos zootécnicos: Enzimas. In: Palermo Neto, J; Spinosa, H. S.; Górnaiak, S. L. (Eds) *Farmacologia Aplicada á Avicultura*. Roca, São Paulo, (1ª ed), Cap. 16, 2005, pp 239-248.

Lolo, M.; Pedreira, S.; Fente, C.; Vázquez, B. I.; Franco, C. M.; Cepeda, A. Study of Enrofloxacin Depletion in the Eggs of Laying Hens Using Diphasic Dialysis Extraction/Purification and Determinative HPLC-MS Analysis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, p. 2849-2852, 2005.

Machinski Junior, M.; Benini, A.; Netto, D. P.; Nunes, M. P.; Vedovello Filho, D.; Benatto, A.; Scucato, E. S.; Machado, E.; Belmonte, I. L.; Alberton, M.; Lopes, M. O.; Bosquiroli, S. L. Medicamentos Veterinários Utilizados na Avicultura de Postura no Estado do Paraná PAMvet-PR, 24p., 2005.

Mc Dermott, P.F., Bodies, S.M., English, L.L., White, D.G. And Walker, R.D., Zhao, S., Simjee, S. And Wagner, D.D. Ciprofloxacin resistance in *Campylobacter jejuni* evolves rapidly in chickens treated with fluoroquinolones. *The Journal of Infectious Diseases*, p. 837-840, 2002.

Notario, R.; Borda, N.; Gambandé, T.; Bermejo, J.; Ponessa, A.; Toledo, V. Quinolone resistant *Campylobacter jejuni* strains isolated from humans and from poultry. *Medicina (B Aires)*. v.71, n.4, p. 331-335, 2011.

Palermo Neto, J. Resíduos de medicamentos veterinários em carne de frango e ovos. In: Palermo Neto, J; Spinosa, H. S.; Górnaiak, S. L. (Eds) Farmacologia Aplicada á Avicultura. Roca, São Paulo, (1ª ed), Cap. 19, 2005, p. 287-302.

Pereira, A. M. P. T. Determinação de Resíduos de Fluoroquinolonas em Amostras de Tecido Muscular de Frangos e Respectivo Impacto na Saúde Humana. Dissertação (Mestrado em Saúde Pública). Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra, Portugal, 129f. 2009.

Pessoa, G. B. S.; Tavernari, F. C.; Vieira, R. A.; Albino; L. F. T. Novos conceitos em nutrição de aves. Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal, Salvador, v.13, n.3, p.755-774, 2012

Sharma, P. C.; Jain, A.; Jain, S. Fluoroquinolone antibacterials: a review on chemistry, microbiology and therapeutic prospects. Acta Poloniae Pharmaceutica - Drug Research, v.66, n.6, p.587-604, 2009.

Silva, J. M. B.; Hollembach, C. B. Fluoroquinolonas X Resistência Bacteriana na Medicina Veterinária. Arquivos do Instituto Biológico de São Paulo, v.77, n.2, p.363-369, 2010.

Souza, L. F. A.; Araújo, D. N.; Astolphi, J. L. L.; Dias, L. B. M.; Ambiel, A. C.; Santos, L. S.; Carmo, A. J.; Silva, P. C. G. Probiótico e antibiótico como promotores de crescimento para frangos de corte. Colloquium Agrariae, v. 6, n.2, p. 33-39, 2010.

Stevenson, J. E.; Gay, K.; Barrett, T. J.; Medalla, F.; Chiller, T. M.; Angulo, F. J. Increase in Nalidixic Acid Resistance among Non-Typhi *Salmonella enterica* isolates in the United States from 1996 to 2003. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, v. 51, n. 1, p. 195–197, 2007.

Turra, F. Mensagem do Presidente Executivo. Relatório Anual 2012. UBABEF, São Paulo, 2012. Available at: <http://www.abef.com.br/ubabef/exibenoticiaubabef.php?notcodigo=3293>

UBABEF. União Brasileira de Avicultura. Notícia de 20 de dezembro de 2011. Available at: <http://www.abef.com.br/ubabef/exibenoticiaubabef.php?notcodigo=3113>.

Van Boven, M.; Veldman, K. T.; De Jong, C. M. M.; Mevius, D. J. Rapid selection of quinolone resistance in *Campylobacter jejuni* but not in *Escherichia coli* in individually housed broilers. Journal of Antimicrobial Chemotherapy. v. 52, p. 719-723, 2003.

Vancutsem, P. M.; Babish, J. G.; Schwark, W. S. The fluoroquinolone antibiotics: structure, antimicrobial activity, pharmacokinetics, clinical use in domestic animals and toxicity. Cornell Vet, v.80, p.173-186, 1990.

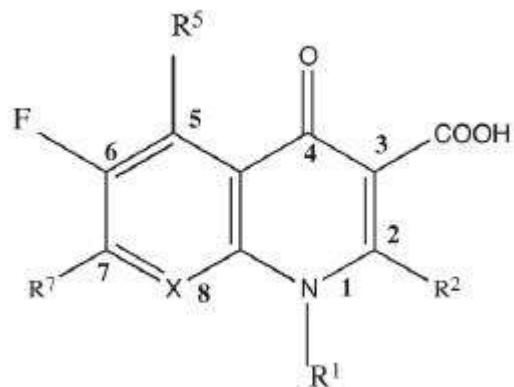
Vetting M. W.; Hedge, S. S.; Wang, M.; Jacoby, G. A.; Hooper, D. C.; Blanchard, D. C. Structure of QnrB1, a Plasmid-mediated Fluoroquinolone Resistance Factor. *The Journal of Biological Chemistry*, v.286, n.28, p.25265–25273, 2011.

WHO. World Health Organization. Forty-second report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives Evaluation of Certain Veterinary Drug Residues in food. WHO Technical Report Series 851. Who Library Cataloguing in Publication Data : Geneve. 1995, 42p.

WHO. World Health Organization. Seventieth report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives Evaluation of certain veterinary drug residues in food. WHO Technical Report Series 954. Who Library Cataloguing in Publication Data: Geneve, 2009, 135p.

WHO. World Health Organization. About the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA), 4p., 2013. Available at:
<http://www.who.int/foodsafety/chem/jecfa/about/en/index.html>

Figure 1. Structural formula of fluoroquinolones



(include this figure on line 159, page 8)

3.2 ARTIGO 2: DETECÇÃO DE RESÍDUOS DE ENROFLOXACINA POR ENSAIO IMUNOENZIMÁTICO E CROMATOGRAFIA LÍQUIDA ACOPLADA À ESPECTROMETRIA DE MASSAS EM OVOS COMERCIAIS DE GALINHA APÓS TRATAMENTO. Enviado à Revista Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia - ABMVZ

Detecção de resíduos de enrofloxacin por ensaio imunoenzimático e cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas em ovos comerciais de galinha após tratamento

Investigation of enrofloxacin residues through enzyme-linked immunosorbent assay and liquid chromatography–tandem mass spectrometry in eggs of laying hens after treatment

Raquel Gouvêa^{I*}, Felipe Faccini dos Santos^I, Leandro dos Santos Machado^I, Pedro Henrique Nunes Panzenhagen^I, Maria Helena Cosendey de Aquino^{II}, Elmiro Rosendo do Nascimento^{II}, Cristina Belíssimo Dias Ribeiro^{III}, Virginia Léo de Almeida Pereira^{II}

^IPrograma de Pós-graduação em Medicina Veterinária, Higiene Veterinária e Processamento Tecnológico de Produtos de Origem Animal, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal Fluminense (UFF), 24230-340, Niterói, RJ, Brasil.

*E-mail: quelgouvea@yahoo.com.br

^{II}Departamento de Saúde Coletiva Veterinária e Saúde Pública, Faculdade de Veterinária, UFF, Niterói, RJ, Brasil

^{III}Laboratório de Análise de Resíduos de Pesticidas e Medicamentos Veterinários - Laboratório Nacional Agropecuário (LANAGRO), 91780-580, Porto Alegre, RS, Brasil.

RESUMO

A enrofloxacin é um dos antimicrobianos mais utilizados na avicultura industrial e a deposição de resíduos em produtos avícolas como os ovos são de grande importância para saúde pública. Na legislação brasileira não existe padronização do período de carência para o seu uso na produção avícola e não há Limite Máximo de Resíduo (LMR) fixado para enrofloxacin em ovos. Nesse estudo, foi utilizado o kit de ELISA comercial (Bio

Scientific®) e a LC-MS/MS na pesquisa de enrofloxacin em ovos de 30 galinhas tratadas previamente via água de bebida, com 10 mg/kg de enrofloxacin durante cinco dias. Seis ovos foram coletados diariamente e analisados durante o tratamento e após a sua suspensão, durante 15 dias. A deposição de resíduos obteve níveis máximos no quinto dia de tratamento das aves, declinando gradativamente até não ser detectada a partir do nono dia de suspensão do tratamento. Considerando como base o LMR de 100 µg/kg fixado pelo Brasil para tecidos comestíveis de aves e pela União Europeia para músculo, gordura e pele, após seis dias de suspensão do tratamento, os níveis de resíduos foram inferiores a esse limite, tendo como médias, 37,43 µg/kg na LC-MS/MS e 14,731 µg/kg no ELISA. Dentro das condições desse estudo, um período de carência de seis dias seria mais adequado para utilização dos ovos para consumo humano. Foram detectados valores de resíduos nos ovos menores no ELISA em relação à LC-MS/MS para a mesma amostra, mas os dois métodos apresentaram concordância estatística entre si. A LC-MS/MS é o teste recomendado pela legislação brasileira para a análise de resíduos em alimentos, entretanto pelos resultados obtidos, o kit de ELISA utilizado também pode ser aplicado na detecção de resíduos de enrofloxacin em ovos, com as vantagens de rapidez e simplicidade.

Palavras-chave: enrofloxacin, resíduos, ovos, LC-MS/MS, ELISA

ABSTRACT

Enrofloxacin is one of the most used antibiotics in the poultry industry and the deposition of residues in poultry products, such as eggs, are of great concern to public health. In Brazilian law there is no standard withdrawal period for enrofloxacin in eggs and there is no Maximum Residue Limit (MRL) is established for this antimicrobial in eggs. In this study, (Bio Scientific®) commercial ELISA kit and LC-MS/MS were used to investigate enrofloxacin in eggs of 30 hens pretreated via drinking water at 10 mg/kg of enrofloxacin for five days. Six eggs were collected daily and analyzed during treatment and after the end of treatment, for 15 days. Residues has obtained maximum levels on the fifth day of treatment, declined gradually and was no longer detected from the ninth day after the end of treatment. Based on the MRL of 100 µg/kg established for edible tissues of poultry by Brazillian law and for muscle, fat and skin, by the European Union, after six days of treatment withdrawal, the residue levels were below that limit, with the average, 37.43 µg/kg in LC-MS/MS and 14.731 µg/kg in ELISA. Within the conditions of this study, a withdrawal period of six days would be more appropriate to use the eggs for human consumption. The values obtained by ELISA for

residues in eggs were lower than those obtained in LC-MS/MS for the same sample, however both methods showed agreement between them statistically. LC-MS/MS is the recommended method by Brazilian legislation for analysis of residues in food, however, by the results, the ELISA kit used also can be applied to the detection of enrofloxacin residues in eggs, with the advantages of speed and simplicity.

Keywords: enrofloxacin, residues, eggs, LC-MS/MS, ELISA

INTRODUÇÃO

A enrofloxacina é um antimicrobiano bactericida de uso exclusivo em Medicina Veterinária, bastante utilizada na avicultura industrial e atua através da inibição da atividade catalítica das enzimas bacterianas DNA girase (ou Topoisomerase II) e Topoisomerase IV, que são essenciais à replicação e transcrição do DNA bacteriano (Sharma *et al.*, 2009). A ciprofloxacina é um dos metabólitos da enrofloxacina, farmacocineticamente diferente, com metade ou menos da metade da biodisponibilidade no organismo da ave e é utilizada na medicina humana (Ito *et al.*, 2005).

Além do uso de antibacterianos em animais ter suscitado questões como a resistência bacteriana, outra preocupação importante é a possibilidade da presença de resíduos nos produtos avícolas e os riscos inerentes ao consumo destes resíduos pela população. A Comissão do *Codex Alimentarius* recomenda um Limite Máximo de Resíduos (LMR) a ser legalmente permitido em um alimento, que é a concentração máxima de resíduos expressa em mg/kg ou µg/kg (*Codex Alimentarius*, 2011) e são parâmetros importantes na determinação do período de carência de um medicamento (Palermo Neto, 2005). Entre as formulações de enrofloxacina existentes no país, de um modo geral não há um padrão de recomendação quanto aos períodos de carência descritos nas bulas, o que permite interpretações variadas e a utilização indevida desse medicamento nas aves. Como consequência, o risco de haver níveis elevados de resíduos nos ovos pode ser maior, assim como pode ser maior o risco do consumidor ficar exposto a essas substâncias.

A União Europeia proíbe o uso de enrofloxacina em aves cujos ovos destinam-se ao consumo humano e possui como LMR fixados para músculo, gordura e pele de aves, 100 µg/kg, 200 µg/kg para fígado e 300 µg/kg para rins (European Community, 2002). No Brasil, o LMR fixado para tecidos comestíveis de aves é de 100 µg/kg para ciprofloxacina + enrofloxacina (Brasil, 2013). Quanto à matriz ovo, o limite de referência usado pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) no Subprograma de Monitoramento de

Controle de Resíduos de Contaminantes em Ovos é de 10 µg/kg para enrofloxacin e ciprofloxacina. Como se trata de substância registrada para uso em aves de postura, mas seu respectivo LMR não está estabelecido pela legislação vigente, o limite de referência para tomada de ação regulatória gerencialmente adotado é igual a 10 µg/kg ou 10 µg/L, pois é a menor concentração detectável pelos testes aceitos pela legislação (Brasil, 2013).

Em aves de postura, a presença de resíduos em ovos é motivo de preocupação, pois os ovos podem conter resíduos de uma grande variedade de drogas, que podem ser detectáveis dias a semanas após o término do tratamento das galinhas (Goetting *et al.*, 2011). Resíduos de fluoroquinolonas aparecem nos ovos após cerca de 24 horas da primeira dose e persistem na gema e no albúmen durante vários dias após o término do tratamento (Etches, 1998).

Oficialmente, a análise de resíduos de fluoroquinolonas em alimentos é realizada por meio da Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC) acoplada à espectrometria de massas (LC-MS/MS) (Brasil, 2011), utilizada na quantificação em análises de alimentos por sua alta especificidade, sensibilidade e ampla aplicabilidade, dando-lhe a capacidade de analisar múltiplos resíduos em um único procedimento (Arkin, 2005). No entanto, é uma técnica sofisticada que demanda pessoal altamente capacitado e equipamento de elevado custo. As técnicas imunológicas, especialmente o Ensaio Imunoenzimático (ELISA, do inglês “Enzyme-linked immunosorbent assay”), estão cada vez mais sendo utilizadas como métodos alternativos e/ou complementares na análise de resíduos em função de sua rapidez, custo-benefício, portabilidade e aplicabilidade principalmente como métodos de triagem (Zhang, 2011).

Este estudo teve como objetivo pesquisar resíduos de enrofloxacin e ciprofloxacina em ovos de galinhas previamente tratadas com este antimicrobiano por meio do ELISA e da LC-MS/MS.

MATERIAL E MÉTODOS

Animais

Foram utilizadas neste estudo um total de 30 galinhas brancas, da linhagem Lohmann LSL, com 18 meses de idade e média de peso de 1520g, provenientes de criação de postura comercial localizada na região Serrana do Estado do Rio de Janeiro. As aves foram mantidas separadas em instalação própria por 40 dias e receberam acesso *ad libitum* à água e à ração durante esse período. Os animais foram tratados de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal da Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório

(SBCAL) e o projeto foi certificado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal Fluminense, sob o número de processo 291.

As aves receberam uma dose de 10 mg/kg de peso vivo de enrofloxacin, administrada via água de bebida durante cinco dias consecutivos. O período de carência do medicamento utilizado no experimento era de três dias para o consumo de ovos.

Coleta e preparo de amostras

Antes do tratamento foi feita uma análise dos ovos postos para assegurar que não havia resíduos de enrofloxacin. Posteriormente, os ovos foram coletados nos seguintes momentos: do primeiro ao quinto dia de tratamento (seis ovos por dia) e do primeiro ao 15º dia subsequentes ao tratamento (seis ovos por dia). As amostras foram então transportadas em bandejas próprias para ovos, ao laboratório de Sanidade Avícola da Faculdade de Medicina Veterinária da UFF, onde foi realizado o ELISA e o preparo e acondicionamento das amostras para envio ao LANAGRO-RS, onde se realizou a LC-MS/MS. Cada unidade amostral consistiu no homogeneizado de um ovo íntegro, ou seja, gema e clara.

Ensaio Imunoenzimático (ELISA)

O ELISA foi realizado no Laboratório de Sanidade Avícola, na Faculdade de Veterinária da Universidade Federal Fluminense, por meio do kit comercial “Enrofloxacin ELISA Test Kit” (Max Signal® Enrofloxacin ELISA test kit #1017-03, Bioo Scientific, Estados Unidos da América) que detecta a soma de resíduos de enrofloxacin + ciprofloxacina e o seu método baseia-se no ELISA competitivo. O teste apresenta reação cruzada com ciprofloxacina (100%), danofloxacin (32%), enoxacin (14%), ácido pipemídico (11%), ofloxacin (7%), benofloxacin (3%), ácido oxonílico (4%) e ácido nalidíxico (2%).

O kit apresentou como controles internos as seguintes concentrações de enrofloxacin: 0 µg/kg, 0,35 µg/kg, 1,0 µg/kg, 2,5 µg/kg, 7,5 µg/kg e 22,5 µg/kg. O limite de detecção do teste nas matrizes analisadas foi de 3,5 µg/kg, utilizou-se o fator de diluição 10 e a metodologia seguiu as recomendações do fabricante.

Resumidamente, 1,0g das amostras homogeneizadas foram submetidas à extração com metanol 70%. Após homogeneização e centrifugação a 4000 g por cinco minutos a temperatura ambiente, 0,5 mL dos sobrenatantes foram transferidos para microtubos em polipropileno, nos quais foram adicionados 0,5 mL de solução de extração fornecido pelo kit e homogeneizados. Para o teste foram utilizadas alíquotas de 50 µL de cada amostra.

A leitura espectrofotométrica foi realizada a 450 nm em leitor de microplaca TP-reader® (Thermo Plate, China).

Cromatografia Líquida acoplada à Espectrometria de Massas (LC-MS/MS)

A LC-MS/MS foi realizada no Laboratório de Análise de Resíduos de Pesticidas e Medicamentos Veterinários do Laboratório Nacional Agropecuário (LANAGRO) no Estado do Rio Grande do Sul. Foi utilizada metodologia de determinação de Fluoroquinolonas em ovos por LC-MS/MS validada de acordo com a Diretiva 2002/657/EC (European Commission, 2002).

Os limites de detecção (LOD) de todos os analitos foi de 10 µg/kg e o de quantificação (LOQ) foi 20 µg/kg. O limite de decisão ($CC\alpha$) na matriz ovo para ciprofloxacina foi de 10,93 µg/kg e 10,86 µg/kg para enrofloxacin. A capacidade de detecção ($CC\beta$) foi de 11,53 µg/kg para ciprofloxacina e 11,42 µg/kg para enrofloxacin, na matriz ovo.

Foram utilizados como reagentes a acetonitrila e ácido fórmico grau HPLC, água ultra-pura e os padrões de ciprofloxacina, norfloxacina, enrofloxacin, enrofloxacin-D5 (deuterado), sarafloxacino, difloxacino, flumequina, ácido nalidíxico, ácido oxolínico e danofloxacino com pureza mínima de 95%. Todos os analitos foram pesquisados, mas somente enrofloxacin + ciprofloxacina foram reportados.

A curva de calibração foi preparada por meio da adição das soluções de fortificação diretamente sobre matriz branca (Tab. 1).

Tabela 1. Concentrações dos níveis de fortificação para curva preparada em matriz para amostras de 2g de ovo.

Níveis de fortificação	Soluções de Fortificação 1 e 2 (µL)	PI 10 µg.mL ⁻¹ (µL)	Concentração amostra ng.g ⁻¹	Concentração amostra ng.g ⁻¹
Ponto 1	0	20	0	0
Ponto 2	4	20	2	20
Ponto 3	10	20	5	50
Ponto 4	20	20	10	100
Ponto 5	30	20	15	150
Ponto 6	40	20	20	200

PI – padrão interno

Para o preparo das amostras, 2,0 ± 0,1 g de cada amostra de ovo previamente homogeneizado foi acondicionado em tubo cônico em polipropileno de 50 mL de capacidade. Para a extração das amostras, foram adicionados 10 ± 0,5 mL de acetonitrila acidificado com 1% de ácido fórmico em cada tubo contendo a amostra. As amostras foram homogeneizadas e mantidas sob agitação em mesa agitadora por aproximadamente 20 minutos. Em seguida, foram submetidas à centrifugação sob refrigeração a 2.000 g, por aproximadamente 10 minutos. O sobrenadante foi então transferido para tubo cônico em polipropileno de 50 mL e 1mL do

extrato foi transferido para microtubo em polipropileno. Para o preparo de amostras tipo TS (“Tissue Standard”), foram transferidos 996 µL do extrato para microtubo fortificando com 2 µL das soluções de fortificação (PI e Pool). As amostras foram então mantidas sob congelamento por 60 minutos e então centrifugadas a 10.000 g, por aproximadamente 10 minutos. Foram então transferidos 800 µL de fase móvel A (Água 0,1% ácido fórmico) para os *vials* e adicionados 200 µL de extrato. A análise foi submetida em sistema LC-MS/MS API5000.

A cromatografia foi realizada em Sistema Agilent 1100 Series, fluxo de fase móvel em 0,3 mL/min, coluna C18, Xterra endcapped 3.5 µm 125Å 100 X 2,1 mm. A fonte de ionização foi *Electrospray* em modo positivo (ESI+). Os dados foram obtidos por meio do Software Analyst® (Applied Biosystems, Canadá). O tempo de equilíbrio da coluna foi de 4 minutos ao final de cada corrida e o volume de injeção foi 10 µL.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O primeiro pico de concentração de enrofloxacin foi observado após 24 horas do primeiro dia de administração do medicamento às aves (Tab. 2). As médias encontradas de resíduos nos ovos foram 828,902 µg/kg e 1620,828 µg/kg, no ELISA e na LC-MS/MS, respectivamente e se elevaram gradativamente até obterem pico máximo ao quinto dia de tratamento, alcançando 1065,317 µg/kg no ELISA e 2947,06 µg/kg na LC-MS/MS. Com o fim do tratamento, as médias de resíduos continuaram elevadas no primeiro dia pós-tratamento, ou seja, 772,9 µg/kg no ELISA e 1725,33 µg/kg na LC-MS/MS e a depleção ocorreu de forma gradativa até não ser mais detectado a partir do nono dia de suspensão.

Tabela 2. Médias e desvios-padrões dos resíduos conjuntos de ciprofloxacina e enrofloxacina em µg/kg em ovos por LC-MS/MS e ELISA, por dia durante e após a medicação das galinhas

Momento de coleta dos ovos	LC-MS/MS ²		ELISA ²	
	Média ¹	Desvio padrão	Média ¹	Desvio padrão
Dias Durante o Tratamento	1	<LOD*	<LOD**	
	2	1620,82	828,90	320,60
	3	1997,33	747,13	187,43
	4	1692,5	1381,22	212,50
	5	2947,06	358,98	1065,31
Dias Após o Tratamento	1	1725,33	772,95	349,06
	2	1297,17	693,99	220,39
	3	644,23	258,23	134,34
	4	530,13	133,38	41,42
	5	249,77	85,84	47,57
	6	169,35	74,76	92,24
	7	37,43	17,89	14,73
	8	18,52	2,94	11,59
	9	9,62	4,73	4,67
	10	<LOD*	5,42	4,61
	11	<LOD*	3,78	3,29
	12	<LOD*	<LOD**	
	13	<LOD*	<LOD**	
	14	<LOD*	<LOD**	
	15	<LOD*	<LOD**	
Média Global	849,35		362,70	

LOD – Limite de detecção; LOD* - 10 µg/kg; LOD** - 3,5 µg/kg

¹Kruskal-Wallis, p<0,05; Teste de Dunn, p>0,05

²Correlação de Pearson, r=0,79; p<0,05

A cinética da depleção dos resíduos de enrofloxacina nos ovos pode ser atribuída à formação e composição dos ovos. Proteínas solúveis da clara são formadas e secretadas no magnum e este processo leva de um a dois dias. A gema é principalmente composta por lipoproteínas produzidas no fígado e sua formação leva de oito a 10 dias, no mínimo (Kan e Petz, 2000). Desse modo, a deposição de resíduos na gema continua ocorrendo mesmo após a descontinuidade do tratamento e por isso é possível detectar resíduos nos ovos em altas concentrações dias após o término do tratamento, como foi verificado neste trabalho. Este comportamento na curva de depleção de resíduos de enrofloxacina em ovos também foi verificado em estudos de Gorla *et al.* (1997), Lolo *et al.* (2005) e Cornejo *et al.* (2011).

Embora o período de carência recomendado na bula do antimicrobiano utilizado no tratamento das aves fosse de três dias, ao quarto dia pós-tratamento, a média no ELISA foi de 133,38 µg/kg e na LC-MS/MS, 530,13µg/kg (Tab. 2). Estes resultados indicam que os ovos estavam inapropriados para o consumo humano após a carência de três dias, considerando o LMR de 100 µg/kg fixado para tecidos comestíveis de aves, pelo Brasil (Brasil, 2013) e para músculo, gordura e pele de aves, pela União Europeia (European Community, 2002) como um padrão comparativo para os ovos.

Nesse mesmo raciocínio, após seis dias de carência, os níveis de resíduos foram inferiores ao LMR de 100 µg/kg, tendo como médias, 37,43 µg/kg na LC-MS/MS e 14,731 µg/kg no ELISA (Tab. 2). Dentro das condições deste estudo, um período de carência de seis dias seria o mais adequado para a utilização dos ovos para consumo humano.

Gorla *et al.* (1997) também compararam seus resultados ao LMR de 100 µg/kg estabelecido pela UE de para músculo, gordura e pele, e propuseram um período de carência para ovos de seis dias para enrofloxacin e cinco para ciprofloxacina após tratarem aves com a metade da dose terapêutica de enrofloxacin utilizada no presente estudo. Utilizando dose de enrofloxacin superior, ou seja, 12 mg/kg durante cinco dias, Lolo *et al.* (2005) trataram galinhas poedeiras por via oral e, pelos de seus resultados, com nove dias de carência, os níveis de resíduos de enrofloxacin e ciprofloxacina estavam inferiores ao LMR. Em estudo de Cornejo *et al.* (2011), sete dias de carência foram suficientes para que os resíduos de enrofloxacin e ciprofloxacina estivessem aquém ao LMR de 100 µg/kg. Em contrapartida, em estudo de Elkholy *et al.* (2009) em apenas quatro dias já não foi mais possível detectar resíduos de enrofloxacin nos ovos e isto se deveu ao uso de uma metodologia com sensibilidade inferior para detecção dos resíduos, que foi a microbiológica. Esta variabilidade entre as depleções de resíduos de enrofloxacin pode ser atribuída à variabilidade entre as condições de tratamento das aves de cada experimento e aos métodos e condições analíticas.

Pela análise dos dados do ELISA e da LC-MS/MS, as variâncias obtidas foram desiguais (ANOVA). Os valores obtidos para os resíduos foram diferentes ($p < 0,05$) em cada método de detecção, sendo essas diferenças assinaladas pelo Teste de Kruskal-Wallis, entretanto essas diferenças foram consideradas não significativas ao Teste de Dunn. Ao comparar o desempenho dos métodos de detecção de resíduos pela Correlação de Pearson, houve grande concordância entre eles ($r = 0,79$, $p < 0,05$).

Pela legislação brasileira, a LC-MS/MS é o teste recomendado para a análise de resíduo em alimentos, entretanto pelos resultados obtidos neste estudo, o kit de ELISA utilizado também

pode ser aplicado na detecção de resíduos de enrofloxacinina em ovos, com as vantagens de rapidez e simplicidade.

CONCLUSÕES

A deposição de resíduos de enrofloxacinina em ovos obteve níveis máximos ao quinto dia de tratamento das aves e a depleção ocorreu de forma gradual, não sendo detectado a partir do nono dia de carência. Assim se conclui que o período de carência descrito na bula do medicamento de três dias foi insuficiente para a eliminação do resíduo a um nível seguro, considerando o LMR de 100 µg/kg como base. Seria então, pelas condições estudadas, mais adequado utilizar um período de carência de seis dias para o consumo dos ovos, considerando o LMR de 100 µg/kg como padrão comparativo. Ao ELISA foram detectados valores de resíduos nos ovos menores em relação à LC-MS/MS para a mesma amostra, mas os dois métodos apresentaram concordância entre si, pela análise estatística. O ELISA testado pode ser utilizado para análise de resíduos de enrofloxacinina em ovos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARKIN, R. CVM Researchers Use Latest Science to Develop Methods for Detecting Animal Drug Residues. *FDA Veterinarian Newsletter*. v.20, n.1, 2005. Disponível em: <http://www.fda.gov/AnimalVeterinary/NewsEvents/FDAVeterinarianNewsletter/ucm092045.html>

Acessado em: 20 jan. 2014

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Análise de resíduos e contaminantes em alimentos. Brasília: MAPA/ACS, 2011, 32p.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº17, de 31 de maio de 2013. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 2013, Seção 1.

CODEX ALIMENTARIUS. Joint FAO/WHO Food Standards Programme Codex Alimentarius Commission. Procedural Manual 20th Edition World Health Organization, Food and Agriculture Organization of the United Nations, Roma, 2011. Disponível em:

http://www.codexalimentarius.net/web/procedural_manual.jsp> Acessado em: 30 out. 2012

CORNEJO, J.; LAPIERRE, L.; IRAGUEN, D. *et al.* Study of enrofloxacin and flumequine residues depletion in eggs of laying hens after oral administration. *J. Vet. Pharmacol. Ther.*, v.35, p.67-72, 2011. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21392039> Acessado em: 02 out. 2012

ELKHOLY, H.M.; ELKOMY, A.A.; AWIDAT, S.K. *et al.* Tissue and Egg Residues and Adverse Effect of Two Oral Enrofloxacin Preparations; Baytril® and Enrotryl®. *Global Veterinaria*, v.3, n.5, p.363-368, 2009. Disponível em: [http://www.idosi.org/gv/gv3\(5\)09/2.pdf](http://www.idosi.org/gv/gv3(5)09/2.pdf) Acessado em: 24 out. 2012

ETCHES, R.J. *Reproduction in Poultry*. 1.ed. Wallingford: CAB International, 1998, 318p.

EUROPEAN COMMUNITY. Commission Regulation (EC) N°1181/2002 of 1 July 2002. *Official Journal of the European Communities*. L172, p.13-20, 2002a.

EUROPEAN COMMUNITY. Commission Decision 2002/657/EC of 12 august 2002. *Official Journal of the European Communities*, L221/8, 2002b.

GOETTING, V.; LEE K.A.; TELL, L.A. Pharmacokinetics of veterinary drugs in laying hens and residues in eggs: a review of the literature. *J. Vet. Pharmacol. Ther.* v.34, p.521-556, 2011. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21679196> Acesso em: 15 abr. 2012

GORLA, N.; CHIOSTRI, E.; UGNIA, L. *et al.* HPLC residues of enrofloxacin and ciprofloxacin in eggs of laying hens. *Int. J. Antimicrob. Agents*. v.8, p.253-256, 1997. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18611811>. Acessado em: 02 out. 2012

ITO, N.M.K.; MIYAJI, C.I.; LIMA, E.A. *et al.* Antimicrobianos: usos preventivos e curativos em avicultura. In: PALERMO NETO, J. *et al.* *Farmacologia Aplicada à Avicultura*. 1.ed. São Paulo: Roca, 2005. Cap.8, p.115-147.

KAN, C.A.; PETZ, M. Residues of Veterinary Drugs in Eggs and Their Distribution between Yolk and White. *J. Agric. Food Chem.* v.48, p.6397-6403, 2000. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11141291> Acessado em: 02 abr. 2012

LOLO, M.; PEDREIRA, S.; FENTE, C. *et al.* Study of Enrofloxacin Depletion in the Eggs of Laying Hens Using Diphasic Dialysis Extraction/Purification and Determinative HPLC-MS Analysis. *J. Agric. Food Chem.*, v.53, p.2849-2852, 2005. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15826029> Acessado em: 02 out. 2012

PALERMO NETO, J. Resíduos de medicamentos veterinários em carne de frango e ovos. In: PALERMO NETO, J. *et al.* Farmacologia Aplicada à Avicultura. 1.ed. São Paulo: Roca, 2005. Cap.19, p.287-302.

SHARMA, P.C.; JAIN A.; JAIN S. Fluoroquinolone antibacterials: a review on chemistry, microbiology and therapeutic prospects. *Acta Pol Pharm.*, v.66, n.6, p.587-604, 2009. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20050522> Acessado em: 13 out. 2012

ZHANG, HAI-TANG; JIANG, JIN-QING; WANG, ZI-LIANG *et al.* Development of an indirect competitive ELISA for simultaneous detection of enrofloxacin and ciprofloxacin. *J Zhejiang Univ-Sci B (Biomed & Biotechnol)*, v.12, n.11, p.884-891, 2011. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3208167/> Acessado em: 27 ago. 2013

3.3 ARTIGO 3: RESÍDUOS DE ENROFLOXACINA EM OVOS DE GALINHA PELA LC-MS/MS NO MUNICÍPIO DE NITERÓI, RJ. Manuscrito a ser enviado para publicação.

Pesquisa de Resíduos de enrofloxacinina pela Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada à Espectrometria de Massas Sequencial em ovos de galinha no varejo em Niterói, RJ

Raquel Gouvêa^{*}, Felipe Faccini dos Santos^I, Leandro dos Santos Machado^I, Pedro Henrique Nunes Panzenhagen^I, Maria Helena Cosendey de Aquino^{II}, Elmiro Rosendo do Nascimento^{III}, Cristina Belíssimo Dias Ribeiro^{III}, Virginia Léo de Almeida Pereira^{II}

^IPrograma de Pós-graduação em Medicina Veterinária, Higiene Veterinária e Processamento Tecnológico de Produtos de Origem Animal, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal Fluminense (UFF), 24230-340, Niterói, RJ, Brasil.

*E-mail: quelgouvea@yahoo.com.br

^{II}Departamento de Saúde Coletiva Veterinária e Saúde Pública, Faculdade de Veterinária, UFF, Niterói, RJ, Brasil

^{III}Laboratório de Análise de Resíduos de Pesticidas e Medicamentos Veterinários - Laboratório Nacional Agropecuário (LANAGRO), 91780-580, Porto Alegre, RS, Brasil.

RESUMO

A enrofloxacinina é uma fluoroquinolona de uso exclusivo na medicina veterinária e muito empregada na avicultura industrial. O uso de antibacterianos, como a enrofloxacinina em aves de postura de maneira inadvertida e imprudente e sem respeitar o período de carência possibilita o acúmulo de resíduos deste antibacteriano nos ovos. Sob determinada concentração de resíduos de enrofloxacinina em ovos, a saúde do consumidor não ficaria exposta ao risco. No entanto, no Brasil, não há LMR fixado para enrofloxacinina em ovos e não há padronização quanto aos períodos de carência sugeridos pelos fabricantes do medicamento para aves de postura. O objetivo deste trabalho foi avaliar, por meio da Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada à Espectrometria de Massas

Sequencial (LC-MS/MS), a presença de resíduos de enrofloxacin e ciprofloxacina em ovos comercializados no varejo nas regiões administrativas mais populosas do Município de Niterói, RJ. Foram coletadas 55 dúzias, em um total de 660 ovos brancos no período de julho de 2012 a dezembro de 2013 e submetidas à detecção de resíduos de enrofloxacin e ciprofloxacina pela LC-MS/MS, em *pool* por dúzia. Dentre as 55 amostras analisadas, em uma amostra foram detectados níveis de resíduos elevados: 195 µg/kg de enrofloxacin e 40,5 µg/kg de ciprofloxacina, quando comparados aos LR adotado pelo MAPA para tomada de ações regulatórias e aos LMR estabelecidos para tecidos comestíveis de aves no Brasil. Isto abre a discussão sobre a realidade da qualidade dos ovos que são ofertados à população de Niterói, pois apesar de não haver LMR fixado para enrofloxacin em ovos no Brasil, foram encontrados níveis elevados deste antibacteriano nos ovos analisados. Mais estudos quanto à incidência de resíduos de enrofloxacin em ovos são necessários, assim como a ampliação do Programa de Análise de Resíduos de Medicamentos Veterinários em Alimentos de Origem Animal (PAMvet) para a pesquisa de antimicrobianos na matriz ovo deve ser atendida.

Palavras-chave: enrofloxacin, resíduos, ovos, Niterói

ABSTRACT

Enrofloxacin is a fluoroquinolone for exclusive use in veterinary medicine and frequently used in the poultry industry. The inadvertent use of antibacterials, such as enrofloxacin in laying hens and without regard to the withdrawal period allows the accumulation of enrofloxacin residues in eggs. Under certain concentration of residues of enrofloxacin in eggs, consumer health would not be at risk. However, in Brazil, there is no MRL for enrofloxacin in eggs and no standardization regarding withdrawal periods suggested by the manufacturers of the drug for laying hens. The objective of this study was to investigate, through the High Performance Liquid Chromatography tandem Mass Spectrometry (LC-MS/MS), the presence of of enrofloxacin and ciprofloxacina residues in eggs marketed at retail in the most populous regions of Niterói County, RJ. 55 dozen of white eggs were collected from July 2012 to December 2013 and submitted to LC-MS/MS, pooled per dozen. High

levels of residues were detected in a sample: 195 µg/kg of enrofloxacin and 40.5 µg/kg of ciprofloxacin, compared to LR adopted by MAPA for taking regulatory actions and MRLs for tissues established in edible tissue of birds in Brazil. This opens the discussion about the quality of the eggs that are offered to the population of Niterói, because although there is no MRL for enrofloxacin in eggs in Brazil, high levels of this antibacterial were found in the analyzed eggs. Further studies regarding the incidence of residues of enrofloxacin in eggs are needed, as well as the expansion of the Residue Analysis Program of Veterinary Drugs in Foods of Animal Origin (PAMvet) for the detection of antimicrobials in egg matrix.

Keywords: enrofloxacin, residues, eggs, Niterói

INTRODUÇÃO

A enrofloxacin é um antibacteriano da classe das fluorquinolonas de uso exclusivo na medicina veterinária e bastante utilizado na avicultura industrial. A biotransformação da enrofloxacin produz, dentre outros metabólitos, a ciprofloxacin, que é um antibacteriano bastante utilizado na medicina humana e farmacocineticamente diferente da enrofloxacin com metade ou menos da metade da biodisponibilidade no organismo da ave (ITO *et al.*, 2005).

A enrofloxacin atua por meio da inibição da atividade catalítica das enzimas bacterianas DNA girase (ou Topoisomerase II) e Topoisomerase IV, que funcionam em conjunto e são essenciais à replicação e transcrição do DNA bacteriano (SHARMA *et al.*, 2009). Após administração, a enrofloxacin é rapidamente absorvida, tem ampla distribuição e baixa ligação às proteínas plasmáticas, têm excreção via urina e bile e seus resíduos podem ser encontrados no fígado e rins (SILVA; HOLLEMBACH, 2010; GOETTING *et al.*, 2011).

O uso desses antibacterianos em aves de postura de maneira inadvertida, imprudente e não conforme às Boas Práticas Veterinárias proporciona a seleção de bactérias resistentes, especialmente bactérias zoonóticas, como *Campylobacter* spp. e *Salmonella* spp., e para a presença de resíduos de enrofloxacin e ciprofloxacin nos ovos. Por definição, resíduos de medicamentos veterinários são a fração da

droga, seus metabólitos e/ou impurezas associadas à droga em qualquer parte comestível do alimento de origem animal (*CODEX ALIMENTARIUS*, 2011).

Existe determinada concentração de resíduos de antibacterianos em produtos de origem animal que, por inúmeros estudos de toxicidade, são comprovadamente isentos de causar danos à saúde humana e por isso são legalmente permitidos. Esta concentração é denominada Limite Máximo de Resíduos (LMR), que é expresso em mg/kg ou µg/kg e estabelecido pela Comissão do Codex Alimentarius (*CODEX ALIMENTARIUS*, 2011).

No Brasil, a enrofloxacinina é uma substância registrada para uso em aves de postura, mas seu LMR não está estabelecido pela legislação vigente. O Ministério da Agricultura utiliza o limite de referência de 10 µg/kg ou 10 µg/L para enrofloxacinina e para ciprofloxacina para tomada de ação regulatória, pois é a menor concentração detectável pelos testes aceitos pela legislação (BRASIL, 2013a).

Quanto aos tecidos comestíveis de aves, os LMRs fixados são: 100 µg/kg para ciprofloxacina + enrofloxacinina, 100 µg/kg para ácido oxonílico, 300 µg/kg para difloxacina, 20 µg/kg para ácido nalidíxico, 20 µg/kg para sarafloxacinina, e 200 µg/kg para danofloxacinina. Com relação às análises sobre ácido nalidíxico, sarafloxacinina e danofloxacinina, os resultados sobre estes analitos não são necessariamente utilizados para a adoção de ações regulatórias, mas sim para orientação quanto ao real risco de determinada substância ou a melhor forma de gerenciamento do risco. Estes analitos fazem parte do Subprograma Exploratório do Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes (PNCRC) do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), o qual é estabelecido em situações de demandas especiais (BRASIL, 2013a).

O Programa de Análise de Resíduos de Medicamentos Veterinários em Alimentos de Origem Animal (PAMvet) foi criado pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e complementa as ações do MAPA, tendo como objetivo avaliar os níveis de resíduos de medicamentos veterinários nos produtos prontos para serem apresentados ao consumidor. A primeira matriz de análise do PAMvet foi o leite bovino e o Programa não contempla a análise em ovos (BRASIL, 2006).

Existem cerca de 16 formulações de produtos à base de enrofloxacinina registradas no MAPA (SINDAN, 2014) para tratamento de aves de postura e entre elas, não há um consenso entre os fabricantes, de um modo geral, quanto aos

períodos de carência descritos nas bulas. A variabilidade entre as formulações possibilita que haja uma variedade de interpretações e a utilização indevida desses produtos tanto pelo médico veterinário como pelo produtor. Como consequência, o risco de haver níveis elevados de resíduos nos ovos pode ser maior, assim como pode ser maior o risco do consumidor ficar exposto a essas substâncias. Apesar de haver poucas as evidências científicas quanto ao risco sobre a microflora do trato gastrointestinal humano causado por resíduos de antimicrobianos em alimentos derivados de animais tratados com os mesmos (BRASIL, 2004a).

A Cromatografia Líquida, em suas várias modalidades, é a técnica de separação mais utilizada para a análise de resíduos de medicamentos em produtos de origem animal. A Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada à Espectrometria de Massas Sequencial (LC-MS/MS) é caracterizada pela alta sensibilidade e seletividade (PACHECO-SILVA, 2013) e é o método oficial de análise de resíduos de fluoroquinolonas em alimentos no Brasil (BRASIL, 2011).

Este estudo teve como objetivo pesquisar a presença de resíduos de enrofloxacin em ovos de galinhas coletados em estabelecimentos comerciais de varejo nas regiões administrativas mais populosas do Município de Niterói, RJ. O Município de Niterói localiza-se a 13 km do Município do Rio de Janeiro, apresenta cerca de 487 mil habitantes, o que corresponde a 4,11% do total da população da Região Metropolitana do Estado do Rio de Janeiro. Apresenta uma concentração de 3640,8 habitantes por km² e a população é caracteristicamente urbana (IBGE, 2010). As regiões administrativas mais populosas do Município compreendem a região do Litoral da Baía e a Região Norte, que juntas totalizam aproximadamente 350 mil habitantes, o que representa 71% da população do Município (NITERÓI, 2012).

MATERIAL E MÉTODOS

Coleta de amostras

No período de julho de 2012 a dezembro de 2013, foram coletadas 55 dúzias, totalizando 660 ovos brancos *in natura* do tipo grande, de galinhas, com diferentes registros junto ao MAPA, caracterizando lotes de aves e granjas diferentes neste período de coleta. As coletas foram realizadas em supermercados

em Niterói mais frequentemente utilizados pela população, localizados nas regiões administrativas mais populosas do município: Litoral da Baía e região Norte.

Cada amostra compreendeu em um “pool” de 12 ovos (clara + gema) homogeneizados em homogeneizador elétrico do tipo “mixer”. As análises foram realizadas a partir de alíquotas de 2,0g de cada amostra (“pool”). No total, foram analisadas 55 amostras.

Análises Laboratoriais

Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada à Espectrometria de Massas Sequencial (LC-MS/MS)

A Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada à Espectrometria de Massas Sequencial (LC-MS/MS) foi realizada no Laboratório de Análise de Resíduos de Pesticidas e Medicamentos Veterinários do Laboratório Nacional Agropecuário (LANAGRO) no Estado do Rio Grande do Sul. Foi utilizada metodologia de determinação de fluoroquinolonas em ovos por CLAE-EM/EM validada de acordo com a Diretiva 2002/657/EC (EUROPEAN COMMUNITY, 2002).

Os limites de detecção (LOD) de todos os analitos foi de 1,0 µg/kg e o de quantificação (LOQ) foi 2,0 µg/kg. O cálculo do LOD e LOQ foi realizado de forma experimental testando concentrações que atendessem as razões sinal ruído superiores a 3 e 10, respectivamente.

O limite de decisão ($CC\alpha$) na matriz ovo para ciprofloxacina foi de 10,93 µg/kg e 10,86 µg/kg para enrofloxacin. A capacidade de detecção ($CC\beta$) foi de 11,53 µg/kg para ciprofloxacina e 11,42 µg/kg para enrofloxacin, na matriz ovo.

Foram utilizados como reagentes a acetonitrila e ácido fórmico (AF) grau HPLC, água ultra-pura e os padrões de ciprofloxacina, norfloxacina, enrofloxacin, enrofloxacin-D5 (deuterado), sarafloxacino, difloxacino, flumequina, ácido nalidíxico, ácido oxolínico e danofloxacino com pureza mínima de 95%.

A curva de calibração foi preparada por meio da adição das soluções de fortificação diretamente sobre matriz branca (Tabela1).

TABELA 1. Concentrações dos níveis de fortificação para curva de calibração preparada em matriz para amostras de 2g de ovo.

Níveis de fortificação	Soluções de Fortificação 1 e 2 (µL)	PI 10 µg.mL ⁻¹ (µL)	Concentração amostra ng.g ⁻¹	Concentração amostra ng.g ⁻¹
Ponto 1	0	20	0	0
Ponto 2	4	20	2	20
Ponto 3	10	20	5	50
Ponto 4	20	20	10	100
Ponto 5	30	20	15	150
Ponto 6	40	20	20	200

PI – padrão interno

A equação de regressão e o coeficiente de regressão (r^2) da curva de calibração foram, respectivamente, Ciprofloxacina: $Y=0,00736x+0,00221$, $r^2=0,9982$ e enrofloxacin: $Y=0,0182x+0,003$, $r^2=0,9938$.

Para o preparo das amostras, $2,0 \pm 0,1$ g de cada amostra de ovo previamente homogeneizado foi acondicionado em tubo cônico em polipropileno de 50 mL de capacidade.

Para a extração das amostras, foram adicionados $10 \pm 0,5$ mL de acetonitrila acidificado com 1% de ácido fórmico em cada tubo contendo a amostra. As amostras foram homogeneizadas por meio do sistema tipo Ultra Turrax[®] e mantidas sob agitação em mesa agitadora por aproximadamente 20 minutos. Em seguida, foram submetidas à centrifugação refrigerada a 2.000 g, por aproximadamente 10 minutos. O sobrenadante foi transferido para tubo cônico em polipropileno de 50 mL e mantido em congelamento por 60 minutos para então ser centrifugado a 4.000 g por aproximadamente 20 minutos. O sobrenadante foi transferido para tubo cônico em polipropileno de 50 mL e o conteúdo evaporado sob fluxo de nitrogênio a $45^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$. Em seguida foram adicionados 2 mL de hexano, homogeneizado e adicionados 2 mL de fase móvel A, agitando brandamente para evitar emulsificação. Aguardados cinco minutos, 1 mL da fase inferior foi transferido para vial.

A análise foi submetida em sistema LC-MS/MS API5000. A cromatografia foi realizada em Sistema Agilent 1100 Series, fluxo de fase móvel em $0,3 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$, coluna C18, Xterra endcapped $3.5 \mu\text{m}$ 125Å 100 X 2,1 mm. A fonte de ionização foi *Electrospray* em modo positivo (ESI+). Os dados foram obtidos por meio do Software

Analyst Applied Biosystems®.

O tempo de equilíbrio da coluna foi de quatro minutos ao final de cada corrida e o volume de injeção foi 10 µL.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Das 55 amostras analisadas, em uma, foram detectados níveis de resíduos de 195 µg/kg de enrofloxacin e 40,5 µg/kg de ciprofloxacina, totalizando 235,5 µg/kg de enrofloxacin + ciprofloxacina. Os níveis de resíduos encontrados foram muito superiores ao Limite de Referência adotado pelo MAPA de 10 µg/kg, desse modo, esta amostra estaria sujeita às medidas regulatórias no âmbito do Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes em Alimentos. Estes níveis também foram superiores ao LMR fixado para tecidos comestíveis de aves, que é 100 µg/kg e que se baseia no somatório dos resíduos de enrofloxacin e ciprofloxacina (BRASIL, 2013).

Em três outras amostras foram encontrados níveis de resíduos de enrofloxacin e de outras fluoroquinolonas mais baixos. Na primeira, enrofloxacin (3,97 µg/kg) e ácido nalidíxico (14,2 µg/kg), na segunda, difloxacina (5,5 µg/kg) e na terceira, enrofloxacin (1,37 µg/kg). Os níveis encontrados nessas amostras foram bastante inferiores aos LMR fixados para tecidos comestíveis de aves pelo MAPA para cada analito e por isso o consumo destes ovos provavelmente não representaria alto risco à saúde do consumidor.

Em estudo de Cho *et al.* (2008), em 120 ovos coletados nas seis maiores cidades da República da Coreia, o analito mais encontrado dentre as amostras positivas foi a enrofloxacin. Inicialmente foi realizado teste de triagem por meio do teste de inibição do crescimento com cepa de *Escherichia coli* (ATCC 11303). Na sequência, as amostras positivas foram confirmadas por meio de HPLC. O analito mais encontrado dentre as amostras positivas foi a enrofloxacin, assim como no presente estudo e as concentrações foram de 0,43 a 1,02 ppm.

Pelo subprograma de monitoramento exploratório em ovos, em 33 análises realizadas no exercício de 2012 para enrofloxacin e ciprofloxacina, em nenhuma das análises foram encontrados resíduos acima dos permitidos pela legislação (BRASIL, 2013b), mas diante dos resultados obtidos nesse estudo, ressalta-se a

importância de maior monitoramento e controle de resíduos pelo PAMvet também sobre os ovos *in natura* fornecidos à população.

Poucos estudos conduzidos no país pesquisam a incidência de resíduos de enrofloxacina em ovos e a grande preocupação está na possibilidade de haver níveis bastante elevados de enrofloxacina e outros antimicrobianos nos ovos expostos ao consumo, como foi verificado em uma das amostras deste trabalho.

Estudos experimentais por meio do tratamento de aves com enrofloxacina por via oral comprovaram que resíduos deste antimicrobiano são esperados nos ovos, muitas vezes por um período superior ao período de carência descrito pelo fabricante do medicamento (GORLA *et al.*, 1997; CORNEJO *et al.*, 2011). Este é um dado importante, pois a variabilidade entre as proposições de períodos de carência descritos nas bulas deste antimicrobiano no Brasil abre a possibilidade para erros de interpretação e de utilização, aumentando assim os riscos quanto ao consumo de ovos com níveis bastante elevados de enrofloxacina.

CONCLUSÃO

Diante dos níveis elevados de enrofloxacina encontrados em uma das amostras analisadas neste estudo, mais estudos quanto à incidência de resíduos de enrofloxacina em ovos são necessários para traçar um perfil quanto à qualidade dos ovos que estão sendo fornecidos à população do Município de Niterói. Da mesma forma, a ampliação do Programa de Análise de Resíduos de Medicamentos Veterinários em Alimentos de Origem Animal (PAMvet) para a pesquisa de antimicrobianos na matriz ovo no Brasil deve ser implementada.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Programa de Análise de Resíduos de Medicamentos Veterinários em Alimentos de Origem Animal (PAMvet). Relatório 2004/2005. Monitoramento de Resíduos em Leite Exposto ao Consumo. 46p., 2006. Disponível em:

http://www.anvisa.gov.br/alimentos/pamvet/relat%F3rio_leite_2004-05.pdf

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Análise de resíduos e contaminantes em alimentos. Brasília: MAPA/ACS, 2011, 32p.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº17, de 31 de maio de 2013. Publicar o Subprograma de Monitoramento em Carnes (Bovina, Aves, Suína, Equina, Caprina e Ovina, e de Avestruz), Leite, Pescado, Mel e Ovos para o exercício de 2013, referente ao Plano Nacional de Controle de Resíduos Biológicos em Produtos de Origem Animal – PNCRB, na forma dos Anexos I e II à presente Instrução Normativa. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 31 maio 2013, Seção 1, 2013a.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº07, de 27 de março de 2013. Publicar os resultados do acompanhamento dos Programas de Controle de Resíduos e Contaminantes dos subprogramas de monitoramento e exploratório em Carnes (Bovina, Suína, de Aves, de Avestruz e Equina), em Leite, Ovos, Mel e Pescado do exercício de 2012, na forma dos Anexos à presente Instrução Normativa. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 27 março 2013, Seção 1, 2013b

CHO, HEE-JUNG; ABD EL-ATY, A. M.; AYMAN GOUDAH *et al.* Monitoring of fluoroquinolone residual levels in chicken eggs by microbiological assay and confirmation by liquid chromatography. *Biomedical Chromatography*, v.22, p. 92–99, 2008.

NITERÓI. Prefeitura de Niterói. Plano Municipal de Resíduos Sólidos de Niterói, 2012, 115p. Disponível em:

http://www.clin.rj.gov.br/pdf/plano_de_gestao_integrada_de_residuos_solidos.pdf

Codex Alimentarius. Joint FAO/WHO Food Standards Programme Codex Alimentarius Commission. Procedural Manual Twentieth Edition World Health Organization, Food and Agriculture Organization of the United Nations, Roma, 2011.

Available at:

http://www.codexalimentarius.net/web/procedural_manual.jsp

CORNEJO, J.; LAPIERRE, L.; IRAGÜEN, D.; CORNEJO, S.; CASSUS, G.; RICHTER, P.; SAN MARTIN, B. Study of enrofloxacin and flumequine residues depletion in eggs of laying hens after oral administration. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, v. 35, p. 67-72, 2011.

EUROPEAN COMMUNITY. Commission Decision 2002/657/EC of 12 august 2002. *Official Journal of the European Communities*, L221/8, 2002.

GOETTING, V.; LEE, K. A; TELL, L. A. Pharmacokinetics of veterinary drugs in laying hens and residues in eggs: a review of the literature. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, v.34, Issue 6, p. 521-556, 2011.

GORLA, N.; CHIOSTRI, E.; UGNIA, L.; WEYERS, A.; GIACOMELLI, N.; DAVICINO, R.; OVANDO, H. G. HPLC residues of enrofloxacin and ciprofloxacin in eggs of laying hens. *International Journal of Antimicrobial Agents*. V. 8, p. 253–256, 1997

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Resultados do Censo 2010.

Disponível em: <http://www.censo2010.ibge.gov.br/>

ITO, N. M. K.; MIYAJI, C. I.; LIMA, E. A.; OKABAYASHI, S. Antimicrobianos: usos preventivos e curativos em avicultura. In: PALERMO NETO, J; SPINOSA, H. S.; GÓRNIAC, S. L. (Eds) *Farmacologia Aplicada à Avicultura*. Roca, São Paulo, (1ª ed), Cap. 08, 2005, p. 115-147.

SHARMA, P. C.; JAIN, A.; JAIN, S. Fluoroquinolone antibacterials: a review on chemistry, microbiology and therapeutic prospects. *Acta Poloniae Pharmaceutica - Drug Research*, v.66, n.6, p.587-604, 2009.

SILVA, J. M. B.; HOLLEMBACH, C. B. Fluoroquinolonas X Resistência Bacteriana na Medicina Veterinária. *Arquivos do Instituto Biológico de São Paulo*, v.77, n.2, p.363-369, 2010.

WHO. Joint FAO/OIE/WHO Expert Workshop on Non-Human Antimicrobial Usage and Antimicrobial Resistance: Scientific assessment. Geneva, 38p. December 1 – 5, 2003 Disponível em: <http://www.who.int/foodsafety/publications/micro/en/amr.pdf>

4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Na pesquisa de resíduos de enrofloxacinina em ovos de aves previamente tratadas, os níveis de resíduos declinaram gradativamente com a suspensão do tratamento e, após seis dias desta, os níveis foram inferiores ao LMR fixado para tecidos comestíveis de aves pelo Brasil e para músculo, gordura e pele pela União Europeia. Nesse sentido e dentro das condições desse estudo, um período de carência de seis dias seria mais adequado para utilização dos ovos para o consumo humano.

Ao ELISA foram detectados valores de resíduos nos ovos menores em relação à LC-MS/MS para a mesma amostra, mas os dois métodos apresentaram concordância entre si, pela análise estatística. As legislações brasileira e internacional adotam a LC-MS/MS como método analítico para a determinação de resíduos em alimentos, entretanto pelos resultados obtidos, o kit de ELISA utilizado também pode ser aplicado na detecção de resíduos de enrofloxacinina em ovos como método de triagem.

A detecção de níveis elevados de resíduos de enrofloxacinina, comparados ao Limite de Referência para adoção de medidas regulatórias e ao LMR fixado para tecidos comestíveis de aves no Brasil, em uma das amostras de ovos coletados do varejo no Município de Niterói, RJ, indicam falhas no atendimento às Boas Práticas Veterinárias por parte de alguns produtores. Portanto, mais pesquisas quanto à incidência de resíduos de enrofloxacinina em ovos precisam ser conduzidas no Brasil, assim como a ampliação dos programas governamentais de monitoramento de resíduos para a pesquisa de antimicrobianos na matriz ovo deve ser implementada.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBUQUERQUE, R. Antimicrobianos como promotores de crescimento. In: PALERMO NETO, J.; SPINOSA, H. S.; GÓRNIK, S. L. (Eds) Farmacologia Aplicada à Avicultura. Roca, São Paulo, (1ª ed), Cap. 09, 2005, p. 149-159.

ANDRIOLE, V. T. The quinolones: past, present and future. *Clinical Infectious Diseases*. Supplement Article, v.41, p.113-119, 2005.

BAYER. *General Efficacy of Baytril® in Poultry Infections*. Disponível em: <http://www.animalhealth.bayer.com/5205.0.html>. Acesso em 12 janeiro de 2014

BOTSOGLU, N. A; FLETOURIS, D. J. *Drug Residues In Foods: Pharmacology, Food Safety, and Analysis*. New York: Marcel Dekker, 2001, 154p.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Portaria nº51, de 6 de fevereiro de 1986. Instituição do Plano Nacional de Controle de Resíduos Biológicos em Produtos de Origem Animal - PNCRB. *Diário Oficial da República Federativa do Brasil*, Brasília, DF, 07 jul. 1986. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/animal/qualidade-dos-alimentos/residuos-e-contaminantes>.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Portaria nº 527, de 15 de agosto de 1995. Adequa o Plano Nacional de Controle de Resíduos Biológicos em Produtos de Origem Animal - PNCRB, de que trata a Portaria Ministerial nº 51, de 06 de fevereiro de 1986. *Diário Oficial da República Federativa do Brasil*, Brasília, DF, 16 ago. 1995. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/animal/qualidade-dos-alimentos/residuos-e-contaminantes>.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº42 de 20 de dezembro de 1999. Altera o Plano Nacional de Controle de Resíduos em Produtos de Origem Animal - PNCR e os Programas de Controle de Resíduos em Carne - PCRC, Mel – PCRM, Leite – PCRL e Pescado – PCRP. *Diário Oficial da República Federativa do Brasil*, Brasília, DF, 22 dez. 1999, Seção 1, 213p.

Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/animal/qualidade-dos-alimentos/residuos-e-contaminantes>.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Portaria nº31, de 29 de janeiro de 2002. Entre outras determinações, proíbe o uso de princípios ativos à base de arsenicais e antimoniais, na fabricação de produtos destinados à alimentação animal, com finalidade de promotores de crescimento ou melhoradores de desempenho animal. *Diário Oficial da República Federativa do Brasil*, Brasília, DF, 05 fev. 2002. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/animal/qualidade-dos-alimentos/residuos-e-contaminantes>.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº09, de 27 de junho de 2003. Entre outras determinações, proíbe a fabricação, a manipulação, o fracionamento, a comercialização, a importação e o uso dos princípios ativos cloranfenicol nitrofuranos e os produtos que contenham estes princípios ativos, para uso veterinário e suscetível de emprego na alimentação de todos os animais e insetos. *Diário Oficial da República Federativa do Brasil*, Brasília, DF, 30 jun. 2003a. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/animal/qualidade-dos-alimentos/residuos-e-contaminantes>.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução da Diretoria Colegiada nº253, de 16 de setembro de 2003. Institui o Programa de Análise de Resíduos de Medicamentos Veterinários em Alimentos de Origem Animal (PAMvet). *Diário Oficial da República Federativa do Brasil*, Brasília, DF, 16 set. 2003b. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/alimentos/pamvet/index.htm>.

BRASIL. Relatório Técnico à Portaria do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, nº 808, de 06 de novembro de 2003. Brasília, 05 de maio de 2004a. 28p. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/animal/qualidade-dos-alimentos/comunicados>.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº11, de 24 de novembro de 2004. Entre outras determinações, proíbe a fabricação, a importação, a comercialização e o uso da substância química denominada Olaquinox, como aditivo promotor de crescimento em animais produtores de

alimentos. *Diário Oficial da República Federativa do Brasil*, Brasília, DF, 25 nov. 2004b. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/animal/qualidade-dos-alimentos/residuos-e-contaminantes>.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº35, de 14 de novembro de 2005. Entre outras determinações, proíbe a fabricação, a importação, a comercialização e o uso de produtos destinados à alimentação animal contendo a substância química denominada Carbadox, como aditivo promotor de crescimento de animais de produção. *Diário Oficial da República Federativa do Brasil*, Brasília, DF, 17 nov. 2005. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/animal/qualidade-dos-alimentos/residuos-e-contaminantes>.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Programa de Análise de Resíduos de Medicamentos Veterinários em Alimentos de Origem Animal (PAMvet). Relatório 2004/2005. Monitoramento de Resíduos em Leite Exposto ao Consumo. 46p., 2006. Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/alimentos/pamvet/relat%F3rio_leite_2004-05.pdf.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 26, de 9 de julho de 2009. Aprova o Regulamento Técnico para a fabricação, o controle de qualidade, a comercialização e o emprego de produtos antimicrobianos de uso veterinário, na forma dos Anexos da presente Instrução Normativa. *Diário Oficial da República Federativa do Brasil*, Brasília, DF, 10 jul. 2009. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/animal/alimentacao/legislacao>.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Análise de resíduos e contaminantes em alimentos. Brasília: MAPA/ACS, 2011, 32p. Disponível em: [http://www.agricultura.gov.br/arq_editor/file/Aniamal/Laborat%C3%B3rios/RCA/An%C3%A1lise%20de%20Res%C3%ADduos%20e%20Contaminantes%20em%20Alimentos\(1\).pdf](http://www.agricultura.gov.br/arq_editor/file/Aniamal/Laborat%C3%B3rios/RCA/An%C3%A1lise%20de%20Res%C3%ADduos%20e%20Contaminantes%20em%20Alimentos(1).pdf).

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 14, de 17 de maio de 2012. Dentre outras determinações, proíbe em todo o território nacional a importação, fabricação e o uso das substâncias antimicrobianas espiramicina e eritromicina com finalidade de aditivo zootécnico melhorador de

desempenho na alimentação animal. *Diário Oficial da República Federativa do Brasil*, Brasília, DF, 18 maio 2012. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/animal/qualidade-dos-alimentos/residuos-e-contaminantes>

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Divisão de aditivos/CPAA/DFIP/DAS. Tabela de aditivos antimicrobianos, anticoccidianos e agonistas com uso autorizados na alimentação animal. Atualizado em 25 nov. 2013a. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/animal/alimentacao/aditivos/aditivos-autorizados>.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº17, de 31 de maio de 2013. Publicar o Subprograma de Monitoramento em Carnes (Bovina, Aves, Suína, Equina, Caprina e Ovina, e de Avestruz), Leite, Pescado, Mel e Ovos para o exercício de 2013, referente ao Plano Nacional de Controle de Resíduos Biológicos em Produtos de Origem Animal – PNCRB, na forma dos Anexos I e II à presente Instrução Normativa. *Diário Oficial da República Federativa do Brasil*, Brasília, DF, 31 maio 2013b. Disponível em: [http://www.agricultura.gov.br/arq_editor/file/CRC/IN%2017-2013\(FINAL\).pdf](http://www.agricultura.gov.br/arq_editor/file/CRC/IN%2017-2013(FINAL).pdf).

CASTANON, J. I. R. History of the use of antibiotic as growth promoters in European poultry feeds. *Poultry Science*, v. 86, n. 11, p. 2466-2471, 2007.

CHÁFER-PERICÁS, C.; MAQUIEIRA, A.; PUCHADES, R. Fast screening methods to detect antibiotic residues in food samples. *Trends in Analytical Chemistry*, v.29, n.9, 2010.

ČLANJAK, E., M. SMAJLOVIĆ, F. ČAKLOVICA, D. ALAGIĆ, K. ČAKLOVICA, A. SMAJLOVIĆ. Detection of enrofloxacin residues in chicken meat by microbiological (growth inhibition test) and ELISA method after experimental prophylactic and therapeutic application. *Meso*. v. 13, n. 3, 2011.

CODEX ALIMENTARIUS. Joint FAO/WHO Food Standards Programme Codex Alimentarius Commission. Procedural Manual Twentieth Edition World Health

Organization, Food and Agriculture Organization of the United Nations, Roma, 2011.

Disponível em: http://www.codexalimentarius.net/web/procedural_manual.jsp

COLLINS, C. H. Cem anos das palavras *cromatografia* e *cromatograma*. Carta ao Editor. *Química Nova*, v.29, n.4, 2006.

CORNEJO, J.; LAPIERRE, L.; IRAGÜEN, D.; CORNEJO, S.; CASSUS, G.; RICHTER, P.; SAN MARTIN, B. Study of enrofloxacin and flumequine residues depletion in eggs of laying hens after oral administration. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, v. 35, p. 67-72, 2011.

DE BRABANDER, H. F.; NOPPE, H.; VERHEYDEN, K.; BUSSCHE, J. V.; WILLE, K.; OKERMAN, L.; VANHAECKE, L.; REYBROECK, W.; OOGHE, S.; CROUBLES, S. Residue analysis: Future trends from a historical perspective. *Journal of Chromatography A*, v.1216, p. 7964-7976, 2009.

EMA. European Medicines Agency. The European Agency for the Evaluation of Medicinal Products. Antibiotic Resistance in the European Union Associated with Therapeutic Use of Veterinary Medicines. Report and Qualitative Risk Assessment by the Committee for Veterinary Medicinal Products, 14 Jul. 1999, 158p. Disponível em:

http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Report/2009/10/WC500005166.pdf

EMA. European Medicines Agency. Veterinary Medicines and Inspections. Committee for Medicinal Products For Veterinary Use (CVMP). Reflection Paper on the Use of Fluoroquinolones in Food-Producing Animals in the European Union: Development of Resistance and Impact on Human and Animal Health. London, 18 Jan. 2006, 23p.. Disponível em: <http://www.emea.eu.int/htms/vet/swp/srantimicrobial.htm>

ETCHES, R.J. *Reproduction in Poultry*. 1.ed. Wallingford: CAB International, 1998, 318p.

EUROPEAN COMMUNITY. Council Regulation (EC) N° 2821/98 of 17 December 1998 amending, as regards withdrawal of the authorisation of certain antibiotics,

Directive 70/524/EEC concerning additives in feedingstuffs. OJ L351, 4p., 1998.

Disponível em:

<http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=CELEX:31998R2821:en:NOT>

EUROPEAN COMMUNITY. Commission Decision 2002/657/EC of 12 august 2002.

Official Journal of the European Communities, L221/8, 2002. Disponível em: [http://eur-](http://eur-lex.europa.eu/smartapi/cgi/sga_doc?smartapi!celexapi!prod!CELEXnumdoc&lg=EN&numdoc=32002D0657&model=guichett)

[lex.europa.eu/smartapi/cgi/sga_doc?smartapi!celexapi!prod!CELEXnumdoc&lg=EN&numdoc=32002D0657&model=guichett](http://eur-lex.europa.eu/smartapi/cgi/sga_doc?smartapi!celexapi!prod!CELEXnumdoc&lg=EN&numdoc=32002D0657&model=guichett)

EUROPEAN COMMUNITY. Regulation (EC) N° 1831/2003 of the European

Parliament and of the Council of 22 September 2003 on additives for use in animal

nutrition. *Official Journal of the European Union*, L 268, p. 29-43, 2003. Disponível

em: <http://irmm.jrc.ec.europa.eu/SiteCollectionDocuments/EC-1831-2003.pdf>

EUROPEAN COMMUNITY. Commission Regulation (EU) n° 37/2010 of 22

December 2009 on pharmacologically active substances and their classification

regarding maximum residue limits in foodstuffs of animal origin. *Official Journal of the*

European Union, L15, 72 p., 2010. Disponível em:

http://ec.europa.eu/health/files/eudralex/vol-5/reg_2010_37/reg_2010_37_en.pdf

FAO. Food and Drug Administration. Egg marketing: A guide for the production and

sale of eggs. *FAO Agricultural Services Bulletin*, 150. Roma, 2003. Disponível em:

<http://www.fao.org/docrep/005/y4628e/y4628e04.htm>

FAO. Food and Drug Administration. *FAO Estatistical yearbook 2013*. Roma, 289p.

Disponível em: <http://www.fao.org/docrep/018/i3107e/i3107e00.htm>.

FAO/WHO. Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. Procedures

Recommending Maximum Residue Limits – Residues of Veterinary Drugs in Food

(187-1999) Roma, 2000. Disponível em:

[http://www.fao.org/fileadmin/templates/agns/pdf/jecfa/2000-06-](http://www.fao.org/fileadmin/templates/agns/pdf/jecfa/2000-06-30_JECFA_Procedures_MRLVD.pdf)

[30_JECFA_Procedures_MRLVD.pdf](http://www.fao.org/fileadmin/templates/agns/pdf/jecfa/2000-06-30_JECFA_Procedures_MRLVD.pdf)

FDA. Food and Drug Administration. Cipro (ciprofloxacin) Prescribing Information and

Medication Guide. 2008. Disponível em:

<http://www.fda.gov/downloads/Drugs/EmergencyPreparedness/BioterrorismandDrugPreparedness/UCM130802.pdf>

GAJDA, A.; POSYNIAK, A.; ZMUDZKI, J.; GBYLIK, M.; BLADEK, T. Determination of (fluoro)quinolones in eggs by liquid chromatography with fluorescence detection and confirmation by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Food Chemistry*. v.135, n. 2, p. 430–439, 2012.

GARCÍA-OVANDO, H.; GORLA, N.; LUDERS, C.; POLONI, G.; ERRECALDE, C.; PRIETO, G.; PUELLES, I. Comparative pharmacokinetics of enrofloxacin and ciprofloxacin in chickens. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*. v.22, n.3, p.209-212, 1999.

GOETTING, V.; LEE, K. A; TELL, L. A. Pharmacokinetics of veterinary drugs in laying hens and residues in eggs: a re view of the literature. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, v.34, n.6, p. 521-556, 2011.

GONZALES, E.; CAFÉ, M. B.; LEANDRO, N. S. M. Boas práticas no uso de medicamentos pela indústria avícola. In: PALERMO NETO, J.; SPINOSA, H.; GÓRNIK, S. L. (Eds.) *Farmacologia Aplicada à Avicultura*. São Paulo: Roca, (1ª ed), Cap. 18, 2005, p. 266-285.

GORLA, N.; CHIOSTRI, E.; UGNIA, L.; WEYERS, A.; GIACOMELLI, N.; DAVICINO, R.; OVANDO, H. G. HPLC residues of enrofloxacin and ciprofloxacin in eggs of laying hens. *International Journal of Antimicrobial Agents*. v. 8, p. 253–256, 1997.

HASSOUAN, M. K.; BALLESTEROS, O.; TAOUFIKI, J.; VÍLCHEZ, J. L.; CABRERA-AGUILERA, M.; NAVALÓN, A. Multiresidue determination of quinolone antibacterials in eggs of laying hens by liquid chromatography with fluorescence detection. *Journal of Chromatography B*, v.852, p. 625–630, 2007.

ITO, N. M. K.; MIYAJI, C. I.; LIMA, E. A.; OKABAYASHI, S. Antimicrobianos: usos preventivos e curativos na avicultura. In: PALERMO NETO, J.; SPINOSA, H.; GÓRNIK, S. L. (Eds) *Farmacologia Aplicada à Avicultura*. Roca, São Paulo, (1ª ed), Cap. 08, 2005, p. 115-147.

JACKSON, L. C.; REYES, L. A. M.; CORDIÉS, M. L. H. Quinolonas y terapia antimicrobiana. *Acta Medica*, v. 8, n. 1, p. 58-65, 1998.

JACOBY, G. A. Mechanisms of Resistance to Quinolones. *Clinical Infectious Diseases*. v.41, Supplement 2, p. 120–126, 2005.

JONES, F. T.; RICKE, S. C. Observations on the history of the development of antibiotics and their use in poultry feeds. *Poultry Science*, v. 82, p. 613–617, 2003.

KRABBE, E. L.; SANTOS FILHO, J. I.; MIELE, M.; MARTINS, F. M. Cadeias produtivas de suínos e aves. Tópicos atuais na produção de suínos e aves. Embrapa Suínos e Aves, p.09-32, 2014. Disponível em: <http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/96729/1/final7180.pdf>. Acesso em: 19 março 2014

LIPSKY, B. A.; BAKER, C. A. Fluoroquinolone toxicity profiles: a review focusing on newer agents. *Clinical Infectious Diseases*, v.28, n.2, p.352-361, 1999.

LOLO, M.; PEDREIRA, S.; FENTE, C.; VÁZQUEZ, B. I.; FRANCO, C. M.; CEPEDA, A. Study of Enrofloxacin Depletion in the Eggs of Laying Hens Using Diphasic Dialysis Extraction/Purification and Determinative HPLC-MS Analysis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, p. 2849-2852, 2005.

MACHINSKI JUNIOR, M.; BENINI, A.; NETTO, D. P.; NUNES, M. P.; VEDOVELLO FILHO, D.; BENATTO, A.; SCUCATO, E. S.; MACHADO, E.; BELMONTE, I. L.; ALBERTON, M.; LOPES, M. O.; BOSQUIROLI, S. L. Medicamentos Veterinários Utilizados na Avicultura de Postura no Estado do Paraná PAMvet-PR, 24p., 2005. Disponível em:

<http://www.saude.pr.gov.br/arquivos/File/vigilancia%20sanitaria/relatorio%20avicultra.pdf>

MITCHELL, M. A. Enrofloxacin. Therapeutic Review. *Journal of Exotic Pet Medicine*, v.15, n.1, p. 66-69, 2006.

MORAES, M. C. B.; LAGO, C. L. Espectrometria de massas com ionização por "electrospray" aplicada ao estudo de espécies inorgânicas e organometálicas. *Química Nova*. v.26, n.4, 2003.

NUNES, G. S. Métodos imunquímicos para análise de contaminantes ambientais: conceitos, estado da arte e perspectivas. *Química Nova*, v.28, n.3, p.462-471, 2005.

ORTEGA, A. C.; BORGES, M. S. *Codex Alimentarius*: a segurança alimentar sob a ótica da qualidade. *Segurança Alimentar e Nutricional*, v.19, n.1, p.71-81, 2012.

PACHECO-SILVA, E.; SOUZA, J. R.; CALDAS, E. D. Resíduos de medicamentos veterinários em leite e ovos. *Química Nova*, v.37, n.1, p.111-122, 2013.

PALERMO NETO, J. Resíduos de medicamentos veterinários em carne de frango e ovos. In: PALERMO NETO, J.; SPINOSA, H.; GÓRNIK, S. L. (Eds) *Farmacologia Aplicada à Avicultura*. São Paulo: Roca, (1ª ed), Cap. 19, 2005, pp 287-302.

PEREIRA, A. M. P. T. *Determinação de Resíduos de Fluoroquinolonas em Amostras de Tecido Muscular de Frangos e Respectivo Impacto na Saúde Humana*. Dissertação (Mestrado em Saúde Pública). Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra, Portugal, 129p. 2009. Disponível em: <https://estudogeral.sib.uc.pt/handle/10316/13478>

PESSÔA, G. B. S.; TAVERNARI, F. C.; VIEIRA, R. A.; ALBINO; L. F. T. Novos conceitos em nutrição de aves. *Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal*, Salvador, v.13, n.3, p.755-774, jul./set., 2012.

REGITANO, J. B.; LEAL, R. M. P. Comportamento e impacto ambiental de antibióticos usados na produção animal brasileira. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, v.34, p.601-616, 2010.

SAMANIDOU, V. F.; CHRISTODOULOU, E. A.; PAPADOYANNIS, I. N. Direct determination of five fluoroquinolones in chicken whole blood and in veterinary drugs by HPLC. *Journal of Separation Science*. v. 28, p. 325–331, 2005.

SCORTICHINI, G.; ANNUNZIATA, L.; DI GIROLAMO, V.; BURATTI, R.; GALARINI, R. Validation of an enzyme-linked immunosorbent assay screening for quinolones in egg, poultry muscle and feed samples. *Analytica Chimica Acta*, v.637, n.1-2, p. 273-278, 2009.

SHARMA, P. C.; JAIN, A.; JAIN, S. Fluoroquinolone antibacterials: a review on chemistry, microbiology and therapeutic prospects. *Acta Poloniae Pharmaceutica - Drug Research*, v.66, n.6, p.587-604, 2009.

SILVA, J. M. B.; HOLLEMBACH, C. B. Fluoroquinolonas x Resistência Bacteriana na Medicina Veterinária. *Arquivos do Instituto Biológico de São Paulo*, v.77, n.2, p.363-369, 2010.

SINDAN. Sindicato Nacional da Indústria de Produtos para Saúde Animal. Compêndio de Produtos Veterinários. Disponível em: <http://www.cpv.com.br/cpv/pesquisar.aspx>. Acessado em 20 jan. 2014

SPISSO, B. F. *Inocuidade de alimentos de origem animal: determinação de resíduos de ionóforos poliéteres, macrolídeos e lincosaminas em ovos e de tetraciclina em leite por CLAE-EM/EM*. Rio de Janeiro, 2010. Tese (Doutorado em Vigilância Sanitária) – Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2010. Disponível em: <http://www.teses.icict.fiocruz.br/lildbi/docsonline/get.php?id=306>

STEAD, S.; STARK, J. Bioanalytical Screening Methods *In*: WANG, J.; MacNEIL, J. D.; KAY, J. F. *Chemical Analysis of Antibiotic Residues in Food*. Nova Jersey, EUA: John Wiley & Sons, 1ª. ed., Cap.5., 2012, p. 153-186.

STEFANELLO, C. Análise do sistema agroindustrial de ovos comerciais. *Revista Agrarian*, v.4, n.14, p.375-382, 2011.

VANCUTSEM, P. M.; BABISH, J. G.; SCHWARK, W. S. The fluoroquinolone antibiotics: structure, antimicrobial activity, pharmacokinetics, clinical use in domestic animals and toxicity. *Cornell Vet*, v.80, p.173-186, 1990.

VAZ, C. S. L. *Campylobacter* na segurança dos alimentos e na avicultura. *Estudos da Embrapa*. [s.d.] Disponível em:

http://file.aviculturaindustrial.com.br/Material/AI_0308Embrapa.pdf. Acesso em fev. 2012

WANG, J.; TURNIPSEED, S. B. Chemical Analysis: Quantitative and Confirmatory Methods. *In*: WANG, J.; MacNEIL, J. D.; KAY, J. F. *Chemical Analysis of Antibiotic Residues in Food*. Nova Jersey, EUA: John Wiley & Sons. 1ª.ed., cap.6, 2012, p. 187-226.

WHO. World Health Organization. Division of Emerging and other Communicable Diseases, Surveillance and Control. Use of quinolones in food animals and potential impact on human health. Report and Proceedings of a WHO Meeting. Geneva, Suíça, 136p.. junho, 1998. Disponível em:

<http://whqlibdoc.who.int/hq/1998/WHO EMC ZDI 98.10.pdf>

WHO. Joint FAO/OIE/WHO Expert Workshop on Non-Human Antimicrobial Usage and Antimicrobial Resistance: Scientific assessment. Geneva, 38p. December 1–5, 2003 Disponível em: <http://www.who.int/foodsafety/publications/micro/en/amr.pdf>

WHO. Report of the 3rd meeting of the WHO advisory group on integrated surveillance of antimicrobial resistance, 14-17 June 2011, Oslo, Norway. Disponível em:

http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/75198/1/9789241504010_eng.pdf

WHO. World Health Organization. About the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA), 4p., 2013. Disponível em:

<http://www.who.int/foodsafety/chem/jecfa/about/en/index.html>

ZHANG, H.; JIANG, J.; WANG, Z.; CHANG, X.; LIU, X.; WANG, S.; ZHAO, K.; CHEN, J. Development of an indirect competitive ELISA for simultaneous detection of enrofloxacin and ciprofloxacin. *Journal of Zhejiang University-SCIENCE B (Biomedicine & Biotechnology)*, 2011.