

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

CARLA INÊS SOARES PRAXEDES

“AVALIAÇÃO DA SENSIBILIDADE DE *Enterobacteriaceae* DA
MICROBIOTA INTESTINAL DE FRANGOS DE CORTE
SUBMETIDOS À DIETA COM NITROFURANOS”

UNIVERSIDADE
FEDERAL
FLUMINENSE

NITERÓI
2012

CARLA INÊS SOARES PRAXEDES

“AVALIAÇÃO DA SENSIBILIDADE DE *Enterobacteriaceae* DA
MICROBIOTA INTESTINAL DE FRANGOS DE CORTE
SUBMETIDOS À DIETA COM NITROFURANOS”

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.

Orientador: Prof. Dr. SÉRGIO BORGES MANO – UFF

Co-orientador: Prof. Dr. ROBSON MAIA FRANCO - UFF

Niterói
2012

CARLA INÊS SOARES PRAXEDES

“AVALIAÇÃO DA SENSIBILIDADE DE *Enterobacteriaceae* DA
MICROBIOTA INTESTINAL DE FRANGOS DE CORTE
SUBMETIDOS À DIETA COM NITROFURANOS”

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.

Aprovado em 02/04/2012

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Sérgio Borges Mano
UFF

Prof. Dr. Robson Maia Franco
UFF

Dr^a. Paula Aparecida Martins Borges Bastos
IFF

Prof.^a Dr.^a Karen Signori Pereira
UFRJ

Prof. Dr. Fábio da Costa Henry
UENF

Niterói
2012

Com muito amor e gratidão,

DEDICO à minha mãe Maria Teodorica, a maior expressão do amor de Deus, e a quem devo tudo o que sou.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, que esteve todo tempo ao meu lado.

À minha mãe Maria Teodorica Soares Praxedes e meu pai Amélio Mariano Praxedes (*in memorian*) por todo amor dedicado a mim.

Ao meu irmão Amélio (Juninho) e às minhas irmãs Conceição, Celeste e Carlota, que compreenderam minha ausência e me deram força para que esse sonho se realizasse. Às minhas queridas sobrinhas Maria Rita Praxedes Barretto, Luciana Christine Praxedes Treasure e Marcell Nunes Gonçalves, doce presença em minha vida.

Ao Prof. Dr. Sérgio Borges Mano, meu orientador, pela amizade, pelos ensinamentos, por depositar confiança em mim desde o mestrado, pela paciência em me atender nos momentos que precisei e pela orientação.

Ao Prof. Dr. Robson Maia Franco, meu co-orientador, pela amizade, carinho, competência, por ter me estimulado e pela valiosa orientação, imprescindível na realização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Francisco Radler de Aquino Neto, por ter apoiado esse projeto de pesquisa e por ter disponibilizado os antimicrobianos nitrofuranos para que o trabalho fosse realizado.

À amiga e Médica Veterinária Dra. Paula Aparecida Martins Borges Bastos, que não mediu esforços para me ajudar, sempre solícita, me auxiliou em todos os momentos desta pesquisa, sem seu apoio este trabalho não seria possível.

À Médica Veterinária Nathália Oliveira Cavalcanti Zúniga, pela amizade, por permitir que eu fizesse parte do seu trabalho de pesquisa e por ter me atendido nos momentos de dúvida.

Ao ex-diretor do campus Bom Jesus do Itabapoana do Instituto Federal Fluminense, Prof. Dr. Fernando Antonio Abrantes Ferrara, que apoiou esse projeto e proporcionou efetivamente que o trabalho fosse realizado.

A todos os professores e funcionários do Programa de Pós-Graduação em Higiene Veterinária e Processamento Tecnológico de Produtos de Origem Animal na Universidade Federal Fluminense que contribuíram para o meu crescimento profissional e pessoal.

Ao técnico de laboratório Wagner Ferreira de Oliveira, aos bolsistas do laboratório de microbiologia, em especial Hebert Martins Salotto, que contribuíram para a realização deste trabalho.

À amiga Kênia de Fátima Carrijo, pela amizade e carinho que sempre teve por mim, por ter me motivado a seguir após o mestrado e pelo exemplo a ser seguido.

A todos os amigos em Bom Jesus do Itabapoana que estiveram ao meu lado me dando força ao longo deste trabalho, em especial Patrícia Sobral Silva, Erdelina Maria de Lima e Edinéia Alves Moreira Baião.

À amiga e professora Carolina Relvas Chaves pela contribuição com seus valiosos esclarecimentos, sempre bem-vindos nos momentos que precisei.

À tia e madrinha Sandra Marly Pervidor de Lemos, pelo carinho e pelas palavras de incentivo durante a caminhada.

E não poderia deixar de agradecer... ao meu cão "Milo" que me fez sentir saudades com a distância, mas que também alegrou todos os meus dias quando pude estar presente.

A todos, que direta ou indiretamente, colaboraram com a realização deste trabalho.

À CAPES pelo apoio financeiro à pesquisa.

O meu olhar alcança o longe. Contempla o território que me separa da concretização de meu desejo. O destino final que o olhar já reconhece como recompensa, aos pés se oferece como lonjura a ser vencida. Mas não há pressa que seja capaz de diminuir esta distância. Estamos sob a prevalência de uma imposição existencial, regra que ensina, que entre o ser real e o ser desejado, há o senhorio inevitável do tempo das esperas.

Padre Fábio de Melo
Do livro “Tempo de Esperas”

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS, p. 9

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS, p. 10

RESUMO E PALAVRAS-CHAVE, p. 12

ABSTRACT AND KEYWORDS, p. 13

1 INTRODUÇÃO, p. 14

2 REVISÃO DE LITERATURA, p. 17

2.1 MICROBIOTA INTESTINAL DAS AVES, p. 17

2.2 FAMÍLIA *Enterobacteriaceae*, p. 20

2.2.1 *Citrobacter* spp., p. 22

2.2.2 *Escherichia* spp., p. 23

2.2.3 *Enterobacter* spp., p. 24

2.2.4 *Hafnia* spp., p. 24

2.2.5 *Klebsiella* spp., p. 25

2.2.6 *Morganella* spp., p. 25

2.2.7 *Proteus* spp., p. 26

2.3 FAMÍLIA *Pseudomonadaceae*, p. 26

2.3.1 *Pseudomonas* spp., p. 26

2.4 ANTIMICROBIANOS – ANTIBIÓTICOS E QUIMIOTERÁPICOS, p. 27

2.4.1 Antimicrobianos: terapêutico, preventivo e aditivo alimentar, p. 29

2.4.2 Classes de antimicrobianos, p. 34

2.4.2.1 β Lactâmicos, p. 34

2.4.2.2 Aminoglicosídeos, p. 36

2.4.2.3 Tetraciclina, p. 39

2.4.2.4 Fenicóis, p. 41

2.4.2.5 Quinolonas, p. 42

2.4.2.6 Inibidor da via folato, p. 43

2.4.2.7 Nitrofuranos, p. 45

2.5 RESISTÊNCIA BACTERIANA, p. 50

2.5.1 Mecanismo de transmissão de resistência, p. 51

2.5.2 Forma de aquisição de bactérias resistentes, p. 58

2.5.3 Resistência bacteriana aos Nitrofuranos, p. 67

2.6 LEGISLAÇÃO: BANIMENTO DOS NITROFURANOS, p. 71

3 DESENVOLVIMENTO, p. 75

3.1 IDENTIFICAÇÃO DE *Enterobacteriaceae* DA MICROBIOTA INTESTINAL DE FRANGOS DE CORTE SUBMETIDOS À DIETA COM NITROFURANOS, p. 75

3.2 SENSIBILIDADE DE *Enterobacteriaceae* DA MICROBIOTA INTESTINAL DE FRANGOS DE CORTE SUBMETIDOS À DIETA COM NITROFURANOS, p. 88

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS, p. 99

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS, p. 101

6 APÊNDICES, p. 115

6.1 PERFIL DE RESISTÊNCIA – RAÇÃO CONTENDO FURALTADONA , p. 116

6.2 PERFIL DE RESISTÊNCIA – RAÇÃO CONTENDO FURAZOLIDONA, p. 117

6.3 PERFIL DE RESISTÊNCIA – RAÇÃO CONTENDO NITROFURANTOÍNA, p. 118

6.4 PERFIL DE RESISTÊNCIA – RAÇÃO CONTENDO NITROFUZAZONA, p. 120

6.5 PERFIL DE RESISTÊNCIA – RAÇÃO SEM MEDICAÇÃO, p. 122

LISTA DE TABELAS

1° ARTIGO

TABELA 1 - Microrganismos isolados a partir de suabes cloacais de frangos de corte com 51 dias de idade submetidos à dieta com nitrofuranos, f. 81

APÊNDICES

TABELA 2 - Perfil de resistência de microrganismos isolados de amostras fecais de frangos de corte submetidos à dieta com furazolidona, f. 116

TABELA 3 - Perfil de resistência de microrganismos isolados de amostras fecais de frangos de corte submetidos à dieta com furaltadona, f. 117

TABELA 4 - Perfil de resistência de microrganismos isolados de amostras fecais de frangos de corte submetidos à dieta com nitrofurantoína, f. 118

TABELA 5 - Perfil de resistência de microrganismos isolados de amostras fecais de frangos de corte submetidos à dieta com nitrofurazona, f. 120

TABELA 6 - Perfil de resistência de microrganismos isolados de amostras fecais de frangos de corte sem utilização de antimicrobianos na ração (controle), f. 122

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

AHD	1-aminoidantoína
AMOZ	3-amino-5-morfolinometil-2-oxazolidinona
ANTRES	Controle do uso e resistência de antimicrobianos utilizados por países de baixa renda – um estudo de intervenção na América Latina, do inglês “Towards Controlling Antimicrobial Use and Resistance in Low-income Countries—An Intervention Study in Latin America”
AOZ	3-amino-2-oxazolidinona
APC	Antimicrobiano Promotor de Crescimento
CEE	Comunidade Econômica Europeia, do inglês “European Economic Community - EEC”
CIM	Concentração Inibitória Mínima
DNA	Ácido desoxirribonucléico, do inglês “Deoxyribonucleic acid - ADN”
CE	Comunidade Europeia, do inglês “European Community - EC”
EMBRAPA	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
ESBL	Beta-Lactamase de Espectro Estendido, do inglês “Extended-Spectrum Beta-Lactamase”
FAO	Fundo das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação, do inglês “Food and Agriculture Organization of the United Nations”
FDA	Órgão Federal dos Estados Unidos que supervisiona Alimentos, Medicamentos e Cosméticos, do inglês “Food and Drug Administration”
FTD	Furaltadona
FZD	Furazolidona
IARC	“International Agency for Research on Cancer”
IDA	Ingestão Diária Admissível, do inglês “Admissible Daily Intake - ADI”
JECFA	Comitê Conjunto de Peritos em Aditivos Alimentares, do inglês “Joint Expert Committee on Food Additives”
LMR	Limite Máximo de Resíduo
LPS	Lipopolissacarídeo
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
NAD	Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo, do inglês “Nicotinamide Adenine Dinucleotide”

NADPH	Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Fosfato, do inglês “Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate”
NFT	Nitrofurantoína
NFZ	Nitrofurazona
OIE	Escritório Internacional de Epizootias, do inglês “Office International des Epizooties”
OMS	Organização Mundial de Saúde Animal, do inglês “World Organisation for Animal Health”
PABA	Ácido Para-Aminobenzoico, do inglês “Aminobenzoic Acid”
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase, do inglês “Polymerase Chain Reaction”
RASFF	Sistema de Alerta Rápido para os Gêneros Alimentícios e Alimentos para Animais, do inglês “Rapid Alert System for Food and Feed”
RNA	Ácido Ribonucleico, do inglês “Ribonucleic acid”
RNA_m	RNA mensageiro, do inglês “Messenger RNA - mRNA”
RNA_t	RNA transportador, do inglês “Transfer RNA - tRNA”
SCAN	Comitê Científico da Alimentação Animal, do inglês “Scientific Committee on Animal Nutrition”
SEM	Semicarbazida
SI	Sequência de Inserção, do inglês “Insertion Sequence - IS”
STEC	<i>Escherichia coli</i> produtora de toxina Shiga, do inglês “Shiga toxin-producing <i>Escherichia coli</i> ”
TGI	Trato Gastrointestinal
TMP-SMZ	Trimetropim e Sulfametoxazol
UE	União Europeia, do inglês “European Union - EU”
VM	Vermelho de Metila
VP	Voges-Proskauer

RESUMO

Objetivou-se neste trabalho identificar a microbiota intestinal de frangos de corte e avaliar a frequência da sensibilidade de isolados pertencentes à família *Enterobacteriaceae*, de 52 aves da linhagem Cobb, que foram criadas em galpão experimental e submetidas do 15º ao 23º dia de vida à dieta contendo nitrofuranos. As aves foram divididas em cinco grupos, sendo quatro tratamentos e um grupo controle. No tratamento um, nove aves receberam ração comercial de fase inicial contendo furazolidona, no tratamento dois, 11 aves receberam ração comercial de fase inicial com furaltadona, no tratamento três, 11 aves receberam ração comercial de fase inicial com nitrofurantoína, no tratamento quatro, 12 aves receberam ração comercial de fase inicial com nitrofurazona e no tratamento cinco, nove aves receberam ração comercial de fase inicial sem medicação. Do 1º ao 14º dia da criação os animais receberam ração comercial de fase inicial e após o 23º dia retornando a alimentação com ração comercial, porém de fase de crescimento, que foi administrada até os 42 dias de vida, quando houve a substituição por ração de fase de finalização, administrada até os 51 dias de vida. No 51º dia de vida foi realizada a coleta de amostras através de suabe cloacal para posterior identificação bacteriana, em seguida transportados em meio cary-blair para isolamento e identificação dos gêneros e espécies através das provas bacteriológicas convencionais e, através dos sistemas Bactray I e II. Foram isoladas e identificadas 142 colônias, sendo posteriormente submetidas ao teste de sensibilidade com os antimicrobianos: furazolidona, furaltadona, nitrofurantoína, nitrofurazona, amicacina, amoxicilina/ácido clavulânico, ampicilina, aztreonam, cefalotina, cefepime, ceftoxitina, ceftadizima, ceftriaxona, ciprofloxacina, cloranfenicol, gentamicina, piperacilina/tazobactam sulfazotrim e tetraciclina. Os gêneros e espécies isolados dos frangos tratados com nitrofuranos e do controle foram: *Citrobacter* spp., *Escherichia coli*, *Escherichia fergusonii*, *Escherichia Hermannii*, *Enterobacter aerogenes*, *Enterobacter aminigenus*, *Enterobacter cloacae*, *Enterobacter sakazakii*, *Hafnia alvei*, *Klebsiella oxytoca*, *Klebsiella ozaenae*, *Klebsiella pneumoniae*, *Morganella morganii*, *Proteus* spp e *Pseudomonas luteola*. Entre tratamentos e grupo controle, o maior percentual encontrado foi de *Escherichia coli* (76%) isoladas no grupo controle, sendo este também o que apresentou menor diversidade de microrganismos, com apenas dois gêneros identificados. Quanto à sensibilidade, todos os isolados apresentaram resistência a dois ou mais antimicrobianos com diferentes perfis de resistência. Observou-se grande resistência aos nitrofuranos, especialmente a nitrofurantoína (100%), nitrofurazona (98,5%) e furaltadona (97,8%). Em relação às outras classes de antimicrobianos, a maior resistência foi à tetraciclina (92,5%) e a maior sensibilidade à amoxicilina/ácido clavulânico (48,1%). A alta resistência a antimicrobianos banidos pela legislação para uso na alimentação animal, como os nitrofuranos e a tetraciclina é uma preocupação de grande relevância para a saúde animal, assim como para a saúde coletiva. Reafirmando-se a importância da não utilização destes fármacos em criações avícolas, pois além dos possíveis efeitos tóxicos, sua utilização em animais pode ser ineficaz pela grande resistência da microbiota das aves.

Palavras-chave: *Enterobacteriaceae*; nitrofurano; sensibilidade antimicrobiana

ABSTRACT

This paper aimed identify the poultry tract microbiota, and evaluate the frequency of sensitivity of Enterobacteriaceae isolates from fifty-two Cobb poultry, which were raised in a experimental shed and submitted from the fifteenth to the twenty-third living day to a nitrofurantoin diet. The poultry were divided into five different groups, being four with treatment and one with no medication – named as control group. In the treatment group 1, nine birds received commercial feed for early phase containing furazolidone; treatment group 2, eleven birds received feed with furaltadone; treatment group 3, eleven birds received feed with nitrofurantoin; treatment group 4, twelve birds received feed with nitrofurazone; and treatment group 5, nine birds were fed with no medication. From the first to the fourteenth raising day, the birds received commercial feed for early phase; and after the twenty-third day, the commercial feed was returned, however, with growing phase commercial feed – which was administrated until the forty-second living day, when it was succeeded by the final phase feed (administrated until the fifty-first living day). At this point, fecal samples were collected by cloacal swab for posterior bacterial identification, and then transported by Cary-Blair to isolation and genus/species identification (by conventional bacteriological tests and Bactray I and II systems). Were isolated and identified one hundred forty-two colonies that were submitted to a sensibility test with the following antimicrobials: furazolidone, furaltadone, nitrofurantoin, nitrofurazone, amikacin, amoxicillin / clavulanic acid, ampicillin, aztreonam, cephalosporins, cefepime, cefoxitin, ceftadizima, ceftriaxone, ciprofloxacin, chloramphenicol, gentamicin, piperacillin / tazobactam sulfazotrim and tetracycline. The isolated genera and species from the birds treated with nitrofurantoin and from the control group were: Citrobacter spp., Escherichia coli, Escherichia fergusonii, Escherichia Hermannii, Enterobacter aerogenes, Enterobacter aminigenus, Enterobacter cloacae, Enterobacter sakazakii, Hafnia alvei, Klebsiella oxytoca, Klebsiella ozaenae, Klebsiella pneumoniae, Morganella morganii, Proteus spp and Pseudomonas luteola. Amongst treatment and control groups, the highest rate found was Escherichia coli (76%), isolated in the control group – being also this, the group presenting the lowest microorganism diversity (only two genera identified). Concerning the sensitivity, all the isolates presented resistance to two or more antimicrobials through different profiles. A high resistance to nitrofurans was observed, especially to nitrofurantoin (100%), nitrofurazone (98.5%), and furaltadone (97.8%). Regarding the other classes of antimicrobials, the highest resistance observed was to tetracycline (92.5%), and the highest sensitivity, to amoxicillin/ clavulanic acid (48.1%). The high resistance to antimicrobials banished by the law for use in animal feeding, like the nitrofurans and the tetracycline is a concern of great relevance to the animal health, as well as to the collective health – reassuring the significance of the non-utilization of these pharmaceuticals in the poultry rearing, since beyond the possible toxic effects, your utilization in animals may be ineffective due to the great resistance of the birds' microbiota.

Keywords: *Enterobacteriaceae*; nitrofurantoin; antimicrobial sensitivity

1 INTRODUÇÃO

A carne de aves, especialmente a de frango, vem sendo muito consumida ao longo das últimas décadas, e isso se deve ao reconhecimento da qualidade dessa carne, com características sensoriais e nutricionais desejáveis. Além dessas características importantes, a carne de frango tem se apresentado ao consumidor com preços acessíveis, proporcionando que as diferentes classes sociais e sobretudo a de menor poder aquisitivo, seja beneficiada com esta matriz alimentícia em sua mesa.

A avicultura brasileira é a grande promotora de todos esses benefícios, pois o Brasil tem sido, desde 2004, o maior exportador mundial de carne de frango. No ano de 2011, o Brasil bateu recordes em produção, consumo e exportação. O consumo *per capita* de carne de frango cresceu 7,5% em 2011 e, pela primeira vez, superou os Estados Unidos, alcançando em 2011 47,4 quilos, contra 44 quilos em 2010. Com isso, o consumo por brasileiro foi, em média, de quase quatro quilos mensais ou um quilo a cada semana.

Ressalta-se que esse mérito se deve a todos os produtores e profissionais que estão ligados direta ou indiretamente à cadeia produtiva da carne de frango, contribuindo exemplarmente para que o nosso produto seja oferecido a todos os consumidores de forma segura e com qualidade.

No entanto, uma das maiores preocupações da população brasileira e mundial é o uso de antimicrobianos na produção animal, principalmente em aves. Estes fármacos foram utilizados não somente como agentes terapêuticos e profiláticos de doenças em aves, mas principalmente e em maior escala como aditivos alimentares para melhorar o desempenho de frangos de corte, proporcionando maior sanidade dos plantéis, evitando perdas e aumentando a

produtividade. Por consequência, diversos estudos sobre o uso de antimicrobianos têm sido realizados em todo o mundo, registrando os efeitos da utilização desta tecnologia, porém, com detecção da presença de resíduos na carne e a indução à resistência bacteriana, o que tem levado às proibições de alguns desses fármacos.

A microbiota presente no trato gastrointestinal (TGI) das aves tem sido alvo de estudo dos pesquisadores, em diversos ambientes; em seres humanos envolvida em distúrbios gastrointestinais, através de processos infecciosos, por vezes sépticos, assim como toxicológicos, causando alta morbidade e em alguns casos à mortalidade.

Pesquisadores, em diversas partes do mundo, têm detectado aumento considerável na proporção de microrganismos resistentes, tanto da microbiota patogênica quanto da comensal, a um ou mais antimicrobianos, apontando que o problema vem se agravando com maior rapidez. Entretanto, a possibilidade de que antimicrobianos usados em avicultura, selecionem bactérias resistentes e que possam comprometer a terapêutica de doenças infecciosas aviárias, é aspecto de extrema importância, uma vez que microrganismos que adquiriram resistência podem contaminar alimentos provenientes desses animais, representando risco à saúde dos consumidores.

Os nitrofuranos são um grupo de fármacos usados como antimicrobianos no combate a doenças infecciosas tanto nos seres humanos como nos animais, sendo farmacologicamente ativos contra bactérias e protozoários. Foram muito utilizados no passado para o tratamento de infecções gastrointestinais causadas pelas enterobacteriaceas em bovinos, suínos e aves, também como promotores de crescimento. A União Europeia proibiu a administração de nitrofuranos na produção de animais para consumo humano na década de 90, e no Brasil em 2003. Esse fato se deve à detecção de resíduos dessas substâncias em produtos alimentares, pois os nitrofuranos sofrem rápida biodegradação e os produtos da metabolização se ligam às proteínas com possíveis efeitos adversos, tais como mutagênicos e oncogênicos em seres humanos.

Devido à utilização ilegal e a grande importância para saúde coletiva, é necessário o monitoramento desses resíduos, assim como a sensibilidade de microrganismos a diversos antimicrobianos, principalmente aos próprios nitrofuranos.

Diante desta realidade, as determinações para a obtenção de um produto que apresente qualidade nutricional e seja seguro, vem crescendo, principalmente a partir do mercado europeu, que após a proibição da utilização de antimicrobianos como promotores de crescimento junto à produção animal nos seus países, vêm realizando várias exigências para importação dos produtos, tomando medidas cada vez mais restritivas.

Estando o Brasil numa posição de destaque na produção de carne de aves, os cuidados devem estar presentes em toda a cadeia produtiva, acompanhando o crescimento e monitorando todos os efeitos advindos da produção avícola, para que assim, o produto brasileiro seja cada vez mais apreciado e valorizado por consumidores de todo o mundo.

Portanto, objetivou-se neste trabalho identificar e avaliar a sensibilidade antimicrobiana de bactérias da família *Enterobacteriaceae* presentes na microbiota intestinal de frangos de corte que foram submetidos à dieta contendo nitrofuranos.

2 REVISÃO DE LITERATURA

A seguir será feito a abordagem com os principais temas pertinentes ao assunto: Microbiota intestinal das aves; Família *Enterobacteriaceae*; Família *Pseudomonadaceae*; Antimicrobianos; Resistência bacteriana; Legislação: banimento dos Nitrofuranos.

2.1 MICROBIOTA INTESTINAL DAS AVES

A microbiota intestinal é uma parte essencial do sistema digestório de todos os animais. O fato de serem organismos vivos significa que os microrganismos têm necessidades nutricionais para sobrevivência dentro de seu “*habitat*” natural. A maioria das bactérias do trato gastrointestinal obtém energia necessária para crescimento e reprodução através dos componentes da dieta (APAJALAHTI et al., 2004).

Durante o desenvolvimento embrionário do pinto não há qualquer microbiota natural intestinal, contudo, se forma a partir da ingestão de microrganismos durante o nascimento, aumentando durante as primeiras semanas de vida até se tornar uma população predominantemente de bactérias anaeróbias. Alguns gêneros e espécies bacterianas que colonizam inicialmente o trato intestinal, geralmente persistem ao longo de toda a vida das aves, passando a compor a microbiota intestinal residente (PALERMO-NETO et al., 2005). A microbiota intestinal das aves é composta de inúmeras espécies de bactérias, formando um sistema complexo e dinâmico (FURLAN et al., 2004). Esses microrganismos adaptam-se a este ecossistema e são resistentes às condições do meio, como baixa tensão de oxigênio, presença de sais biliares, enzimas, pH e tipo de nutrientes disponíveis, entre outras condições (PALERMO-NETO et al., 2005).

Gedek (1986) relatou a existência da microbiota natural no trato gastrointestinal de difícil definição que é composta de aproximadamente 400 espécies em equilíbrio entre si e com o hospedeiro. A presença da microbiota intestinal normal, em equilíbrio é tão necessária quanto benéfica para o bem estar do animal. Estima-se que 90% da microbiota seja constituída por bactérias facultativas (aeróbias/anaeróbias) e produtoras de ácido láctico (*Lactobacillus* spp., *Bifidobacterium* spp.), incluídas as bactérias exclusivamente aeróbias como os *Bacterioides* spp., *Fusobacterium* spp. e *Eubacterium* spp. Os 10% restantes desta microbiota são constituídos de bactérias consideradas potencialmente nocivas ao hospedeiro, entre estas, a *Escherichia coli*, *Enterococos* spp., *Clostridium* spp, *Staphylococcus* spp., *Pseudomonas* spp., *Blastomyces* spp. Outros gêneros também foram citados por Furlan et al. (2004) e Palermo-Neto et al (2005), tais como *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Pediococcus*, *Peptostreptococcus*, *Propionibacterium*, *Ruminococcus*, *Serratia*, *Veillonella* e *Streptococcus*.

No entanto, Apajalahti et al. (2004) utilizando técnicas que caracterizam o DNA microbiano extraídos de colônias do trato gastrointestinal mostraram que 90% das bactérias encontradas são de espécies desconhecidas. Além disso, mais da metade de 640 espécies encontradas, são de gêneros desconhecidos. Apajalahti et al. (2002) relataram que um dia após a eclosão dos ovos a densidade bacteriana no íleo e no ceco alcançaram respectivamente 10^8 e 10^{10} por grama de conteúdo. Segundo Apajalahti et al. (2004) o número de bactérias podem alcançar 10^{11} e 10^9 por grama de conteúdo cecal e ileal, respectivamente, durante os primeiros três dias após eclosão, permanecendo relativamente estável durante os próximos 30 dias.

A mucosa intestinal de seres humanos e animais é colonizada por grande e diversificado número de bactérias, devendo encontrar condições favoráveis para a colonização e sua persistência, como temperatura, pH adequado e oferta de substratos (SANTOS; TURNES, 2005).

O número de microrganismos e composição da microbiota intestinal das aves variam consideravelmente ao longo do trato gastrointestinal. No Inglúvio existe a predominância de lactobacilos, que produzindo ácido láctico e acético reduzem o pH, impedindo o crescimento de bactérias patogênicas. O pH no proventrículo e moela é extremamente baixo, e poucas bactérias são capazes de tolerar esse ambiente. No duodeno, o pH é neutro e os microrganismos colonizam esse segmento do intestino delgado, bem como o jejuno e íleo. O ceco é reconhecido como o segmento de

maior colonização por microrganismos, sendo que grande número de bactérias Gram-positivas e negativas estão presentes neste local. As bactérias no TGI podem encontrar-se, tanto associadas intimamente com o epitélio, ou livres na luz intestinal. As bactérias livres multiplicam-se rapidamente para compensar a eliminação pelo peristaltismo intestinal ou ainda se agregar às demais bactérias que se encontram aderidas na mucosa intestinal (FURLAN et al., 2004).

Esta variada composição da microbiota intestinal pode ser tanto favorável quanto desfavorável para o hospedeiro, dependendo da natureza e da quantidade de microrganismos. Os efeitos maléficos seriam: diarreias, infecções, distúrbios hepáticos, carcinogênicos, putrefação intestinal, redução da digestão e absorção de nutrientes. Já, os benefícios estariam vinculados à inibição do crescimento de bactérias patogênicas, estímulos ao sistema imune, síntese de vitaminas, redução da produção de gases e melhor digestão e absorção dos nutrientes (FURLAN et al., 2004; PALERMO-NETO et al., 2005).

A pouca diversidade da microbiota intestinal de aves recém-nascidas, além de ser considerada como um fator limitante para a digestão, também possibilita a colonização intestinal por patógenos entéricos. A ausência de contato com a microbiota natural logo após o nascimento pode afetar o desenvolvimento do TGI e, por consequência, prejudicar o crescimento das aves (MAIORKA et al., 2001).

Nas aves, sabe-se que a microbiota atua beneficiando o processo digestório favorecendo o metabolismo dos carboidratos, intensificando a digestão do amido; metabolismo das proteínas, recuperando o nitrogênio endógeno; metabolismo dos lipídeos e minerais; síntese de vitaminas e digestão cecal dos componentes fibrosos (LANCINI, 1994). Segundo Forsythe (2007), a presença da população bacteriana no intestino suprime o crescimento de bactérias prejudiciais, sendo em aves responsável pela produção de vitamina K e do complexo B; em humanos é importante para a síntese de quantidades consideráveis de vitaminas do complexo B.

Oliveira et al. (2004) observaram uma ligeira queda no número de enterobactérias isoladas no decorrer da idade da ave, possivelmente devido ao crescimento da microbiota intestinal das aves o qual contribui para inibição de bactérias patogênicas.

A concepção de que o desenvolvimento de microbiota poderia levar a prejuízos em lotes de frangos, seja pela concorrência com o alimento ou devido a

lesões provocadas diretamente na mucosa intestinal pelas bactérias patogênicas, levou a utilização de aditivos, antimicrobianos administrados em doses subterapêuticas, os quais foram erroneamente denominados de promotores de crescimento (FURLAN et al., 2004; MAIORKA et al., 2001).

Com a preocupação de que estes aditivos possam induzir resistência a patógenos importantes para os seres humanos, muitos países proibem ou estão começando a proibir a utilização desses aditivos em ração para frangos. Assim, algumas alternativas têm sido buscadas para promover o equilíbrio da microbiota intestinal dos frangos, a fim de obter um bom desempenho produtivo, sem riscos para a saúde humana. Pesquisadores têm mostrado que é possível estabelecer um sistema de proteção da mucosa intestinal, com proteção contra microrganismos patogênicos, e como consequência manutenção da homeostase do TGI (FURLAN et al., 2004).

Esse sistema de proteção deve-se indiretamente à presença da microbiota equilibrada, particularmente no ceco, contribuindo com a exclusão e/ou competição com bactérias potencialmente patogênicas como *E.coli*, *Clostridium* spp., *Salmonella* spp. e desta forma, melhorando os processos digestórios e absorptivos do trato entérico. Este princípio tem sido modernamente explorado através do uso de probióticos e prebióticos (BERCHIERI JÚNIOR; MACARI, 2000). Desta forma há uma melhora na integridade da parede do trato gastrointestinal que é vital ao sistema de defesa do animal contra uma série de microrganismos patogênicos (REMONATO et al., 2008).

Portanto, os mecanismos com poder de redução ou exclusão de microrganismos patogênicos são: criação de um ambiente hostil a outras bactérias; eliminação da viabilidade de sítios receptores de outras bactérias; produção de secreções que têm ação antimicrobiana e competição por nutrientes na luz do intestino (FURLAN et al., 2004).

2.2 FAMÍLIA *Enterobacteriaceae*

No Domínio Bactéria, as Proteobactérias incluem a maioria das bactérias Gram-negativas quimio-heterotróficas, que presumidamente surgiram de um mesmo ancestral fotossintético, sendo agora o maior grupo taxonômico de bactérias. Os representantes do mundo procariótico compõem um vasto grupo heterogêneo de organismos unicelulares muito pequenos. Assim, dentro desse grupo, milhares de

espécies bacterianas são diferenciadas por muitos fatores, incluindo a morfologia (forma/estrutura), a composição química (frequentemente detectada por reações de coloração), as necessidades nutricionais, as atividades bioquímicas e a fonte de energia (luz solar ou química) (TORTORA et al., 2012). Portanto, caracterizam-se por membros desta família, um grupo relativamente homogêneo, do ponto de vista filogenético, de proteobactérias gama (MADIGAN et al., 2004).

Trabulsi e Althertum (2008) relataram que as enterobacteriaceas são formadas por células que apresentam membrana citoplasmática, espaço periplasmático, peptidoglicano ou mureína e membrana externa. A maior parte apresenta filamento flagelar que nasce no citoplasma e muitas possuem cápsulas ou estrutura tipo capsular conhecidas como antígenos K. A membrana externa contém o Lipopolissacarídeo (LPS), porinas e diversos tipos de fimbrias. Diferentes tipos de plasmídios são transportados por muitas amostras, sendo o cromossomo único e circular.

Entre as possíveis estruturas procarióticas há a parede celular, em sua parte externa estão o glicocálice, os flagelos, os filamentos axiais ou endoflagelos, as fimbrias e os pili; e entre as estruturas internas à parede estão a membrana citoplasmática, nucleóide, ribossomos, inclusões e endósporos (TORTORA et al., 2012).

As enterobactérias foram caracterizadas como microrganismos que se apresentam em forma de bastonetes Gram-negativos, medindo em geral 0,3-1,0 X 1,0-6,0µm, podendo ser imóveis ou móveis, sendo móveis por meio de flagelos peritríquios (HOLT et al., 1994). São anaeróbios facultativos e quimioorganotróficos, tendo tanto o metabolismo aeróbio como o fermentativo. São microrganismos oxidase negativos com exigências nutricionais relativamente simples, fermentando açúcares e originando uma variedade de produtos finais. A maioria das espécies se desenvolve bem a temperatura de 37°C, entretanto algumas têm temperatura ótima entre 25 e 30°C, sendo frequentemente mais ativas metabolicamente a estas temperaturas. Existem gêneros psicotróficos frequentemente encontrados no solo, água e trato gastrointestinal dos seres humanos e outros animais (HOLT et al., 1994; ICMSF, 2000; MADIGAN et al., 2004).

A maioria das enterobactérias encontradas na natureza habitam o intestino de seres humanos e dos animais, seja como membros da microbiota residente ou como

agentes de infecção (MADIGAN et al., 2004; TORTORA et al., 2012; TRABULSI; ALTERTHUM, 2008).

As enterobactérias podem causar infecções intestinais e extra-intestinais. As que causam infecções intestinais são geralmente chamadas de enteropatogênicas, incluindo categorias de *Escherichia coli*, todos os sorovares de *Shigella* spp., quase todos os sorotipos de *Salmonella* spp. e alguns de *Yersinia* spp. As que causam infecções extra-intestinais vivem normalmente nos intestinos, mas são patogênicas para outros órgãos e tecidos. Em Estudos recentes há citação de que *Providencia* spp., *Hafnia* spp. e *Citrobacter* spp., podem ser enteropatogênicas (TRABULSI; ALTERTHUM, 2008).

Diversas espécies de enterobactérias causam doenças que cursam com diarreia, entre as quais estaria a febre tifóide e a disenteria bacilar. As bactérias da família *Enterobacteriaceae* são responsáveis por cerca de 50% das infecções nosocomiais, sendo mais frequentes as causadas por *Escherichia coli*, *Klebsiella* spp., *Enterobacter* spp., *Proteus* spp., *Providencia* spp., e *Serratia marsescens* (HOLT et al., 1994).

O grupo dos coliformes inclui espécies do gênero *Escherichia*, *Klebsiella*, *Enterobacter* e *Citrobacter*, sendo *E. coli*, historicamente, utilizada como microrganismo indicador para servir como uma medida de contaminação fecal e, assim, medir a presença potencial de patógenos entéricos em água fresca (FORSYTHE, 2007). Apesar de o trato intestinal ser o “*habitat*” dessas bactérias, espécies desses gêneros podem persistir por longos períodos e se multiplicar em ambientes (SIQUEIRA, 1995).

2.2.1 *Citrobacter* spp.

São bastonetes, ocorrem isoladamente ou aos pares, com aproximadamente 1,0 µm de diâmetro e 2,0-6,0 µm de comprimento, não possuem cápsula e são móveis por flagelos peritríqueos. São anaeróbios facultativos, com metabolismo respiratório e fermentativo, fermentam glicose com produção de ácido e gás. São oxidase negativa e catalase positiva, reduzem nitratos a nitritos. No teste de Vermelho de Metila (VM) são positivos e no de Voges-Proskauer (VP) são negativos. O gênero *Citrobacter* compreende as espécies *C. freundii*, *C. diversus* e *C. amalonaticus*. A maioria das amostras de *Citrobacter freundii* produz abundância de H₂S que é observada em ágar “triplo sugar iron” (TRABULSI; ALTERTHUM, 2008).

Os membros deste gênero são encontrados no solo, água, esgoto, alimentos e também nas fezes de humanos e animais, provavelmente como habitantes normais do trato intestinal. Frequentemente isolado de espécimes clínicas como patógenos oportunistas (HOLT, et al., 1994).

2.2.2 *Escherichia* spp.

São bastonetes, podendo ocorrer de forma isolada ou aos pares, apresentam 1,1-1,5 µm x 2,0-6,0 µm. São anaeróbios facultativos, sendo na sua maioria móveis por flagelos peritríquios. Muitas estirpes possuem cápsulas ou microcápsulas. Ocorrem na microbiota normal de animais de sangue quente, e no caso de *E. blattae*, no intestino das baratas (HOLT, et al., 1994).

O gênero *Escherichia* compreende as espécies *Escherichia coli*, *E. blattae*, *E. fergusonii*, *E. hermannii* e *E. vulneris*. Sendo *E. coli* a única espécie de importância prática (TRABULSI; ALTERTHUM, 2008).

A espécie *Escherichia coli* predomina entre os diversos microrganismos anaeróbios facultativos que fazem parte da microbiota intestinal de animais de sangue quente. São bastonetes, não esporulados, capazes de fermentar a glicose com produção de ácido e gás, no entanto, a maioria fermenta também a lactose com produção de ácido e gás (FRANCO; LANDGRAF, 2003). De um modo geral se apresenta como um bastonete delgado, pequeno ou comprido (1,1-1,5 µm x 2,6-6,0 µm), isolados, aos pares ou formando cadeias. São oxidase negativa e catalase positiva. No teste Voges-Proskauer é negativo e usualmente citrato positivo, não produzindo H₂S (HOLT et al., 1994).

Apresentam antígenos somáticos O, relacionados com polissacarídeos da membrana externa; antígenos flagelares H, relacionados com proteínas dos flagelos, e ainda antígenos K, relacionados com polissacarídeos capsulares, onde foram descritos 173 antígenos O, 56 antígenos H e 100 antígenos K diferentes (FRANCO; LANDGRAF, 2003).

Segundo Jay (2005), foram reconhecidos cerca de 200 sorotipos para *E. coli*, e como as proteínas do flagelo são menos heterogêneas do que as cadeias laterais de carboidratos que compõem os grupos O, existem consideravelmente menos grupos antigênicos H, cerca de aproximadamente 30.

As estirpes de *Escherichia coli* que produzem enterotoxinas e outros fatores de virulência, incluindo as invasivas e fatores de colonização, causam doenças

diarréicas. É, também, a maior causa de infecções urinárias e nosocomiais incluindo septicemia e meningite. Outras espécies, exceto *E. blattae*, são raramente identificadas como patógenos oportunistas, usualmente associadas com infecções de feridas (HOLT et al., 1994).

2.2.3 *Enterobacter* spp.

Segundo Holt et al. (1994), *Enterobacter* spp. são microrganismos Gram-negativos, com dimensões entre 0,6-1,0 μm x 1,2-3,0 μm , móveis por flagelos peritríquios, anaeróbios facultativos, fermentam glicose com produção de ácido e gás. Os sorotipos possuem em sua maioria reação positiva no teste Voges-Proskauer e Citrato de Simmons, sendo negativas no teste Vermelho de Metila e lisina positiva, com exceção de *Enterobacter gergoviae*.

Estão amplamente distribuídos na natureza, ocorrendo em água doce, solo, esgoto, plantas, vegetais, animais e fezes de seres humanos. Esse gênero é composto por várias espécies, mais notavelmente *E. cloacae*, *E. sakazakii* (atual *Cronobacter sakazakii*), *E. aerogenes*, *E. agglomerans* e *E. gergoviae*, sendo estes patógenos oportunistas de queimaduras e feridas, causando também infecções do trato urinário e ocasionalmente septicemias e meningite (HOLT et al., 1994).

Enterobacter cloacae tem resistência natural a ampicilina. Algumas estirpes são resistentes a cefalosporinas, cloranfenicol, tetraciclina e sulfonamidas. A maioria é sensível aos aminoglicosídeos (exceto estreptomicina), ácido nalidíxico e aos nitrofuranos (HOLT et al., 1994).

2.2.4 *Hafnia* spp.

São microrganismos com aproximadamente 1,0 μm de diâmetro e 2,0-5,0 μm de comprimento. São móveis por flagelos peritríquios, mas estirpes podem aparecer não se movendo. Oxidase negativa e catalase positiva. São quimiorganotróficos. A maioria das estirpes utiliza citrato, acetato e malonato como única fonte de carbono. Fermenta glicose com produção de ácido e gás; nitrato é reduzido a nitrito. É positivo no teste para vermelho de metila. Ocorre nas fezes de humanos e outros animais incluindo pássaros, ocorrendo também no meio ambiente, em resíduos, no solo, água e produtos lácteos (HOLT et al., 1994).

2.2.5. *Klebsiella* spp.

Este gênero compreende as *Klebsiella pneumoniae*, *K. pneumoniae* subespécie *pneumoniae*, *K. oxytoca*, *K. terrigena*, dentre outras. São microrganismos, bastonetes curtos medindo 0,3 µm de diâmetro e 0,6-6,0 µm de comprimento, sozinhos ou aos pares. São anaeróbios facultativos, oxidase negativa, fermentam a glicose com produção de ácido e gás, positivos no teste Voges-Proskauer, hidrolisam a uréia e produzem ornitina decarboxilase ou H₂S. As espécies de *Klebsiella* são fortemente capsuladas e, com base nestes antígenos (K), mais de 80 sorotipos já foram caracterizados. (HOLT et al., 1994).

Klebsiella pneumoniae é normalmente encontrada no trato intestinal dos seres humanos e de animais, porém em menor número que *Escherichia coli*. *Klebsiella oxytoca* também faz parte do trato intestinal dos seres humanos e animais, podendo ser isolada de vários processos patológicos e também em ambientes aquáticos e plantas (HOLT et al., 1994).

Klebsiella pneumoniae, *K. oxytoca* e ocasionalmente outras espécies são patógenos oportunistas que podem causar bacteremia, pneumonia, infecções do trato urinário e outras infecções em humanos. Frequentemente causam infecções nosocomiais urológicas, neonatais, em pacientes geriátricos ou em tratamento intensivo (HOLT et al., 1994). No entanto, a importância da *Klebsiella* spp. como agente patogênico vem crescendo nos últimos anos, e essa bactéria vem se equiparando a *E. coli* no que se refere a saúde coletiva (MENEZES et al., 2008; PETERSON, 2006).

2.2.6 *Morganella* spp

São bastonetes retos, medindo 0,6-0,7 µm de diâmetro e 1,0-1,7 µm de comprimento. São anaeróbios facultativos, móveis por flagelos peritríqueos. Ocorrem em fezes de humanos, cães, outros mamíferos e répteis. São microrganismos oportunistas, isolados de bacteremias do trato respiratório, feridas e infecções do trato urinário. Produzem urease e fenilalanina desaminase. Fermentam glicose e manose com produção de ácido (HOLT, et al., 1994). São conhecidas duas subespécies de *Morganella morganii*, ambas envolvidas com infecções urinárias (TRABULSI; ALTERTHUM, 2008). Estirpes de *Morganella* spp. são geralmente resistentes a colicistina, eritromicina, penicilina, ampicilina e cefalotina, e são

geralmente suscetíveis ao ácido nalidíxico, carbenicilina, aminoglicosídeos e cloranfenicol (HOLT, et al., 1994).

Foi diagnosticado por Zhao et al. (2011) o primeiro caso de morte com infecção por *Morganella morganii* em aves numa experimentação animal.

2.2.7 *Proteus* spp.

São bastonetes curtos, com 0,4-0,8 µm de diâmetro e 1,0-3,0 µm de comprimento. São móveis por flagelos peritríqueos, anaeróbios facultativos, hidrolisam a uréia, oxidase negativos, catalase positivos, produzem H₂S, lactose e lisina descarboxilase negativos. Entre as espécies ocorrem variações nos testes de indol, Voges-Proskauer e Citrato de Simmons. O gênero *Proteus* passou a incluir somente *P. mirabilis* e *P. vulgaris*. A espécie *P. morganii* foi incluída no gênero *Morganella* e a espécie *P. rettgeri* passou a integrar o gênero *Providencia* (HOLT et al., 1994).

Encontra-se no intestino de seres humanos e em um grande número de animais, em dejetos, solo e águas poluídas. Em humanos causam infecções no trato urinário, invasões secundárias, lesões septicêmicas e frequentemente em queimaduras de pacientes (HOLT, et al., 1994).

2.3 FAMÍLIA: *Pseudomonadaceae*

2.3.1 *Pseudomonas* spp.

Pseudomonas é o gênero mais importante da ordem *Pseudomonales*. São bastonetes Gram-negativos aeróbios que se locomovem por um único flagelo polar ou por meio de tufo. Embora sejam classificadas como aeróbias algumas são capazes de substituir o oxigênio pelo nitrato como aceptor final de elétrons (TORTORA et al., 2012).

Presente no meio ambiente, *Pseudomonas aeruginosa* é ubiqüitária da água e solo, podendo formar biofilmes em algumas superfícies ou substratos. É reconhecido como pertencente à microbiota normal da superfície de plantas, pele dos seres humanos e animais, porém, sua relevância está em seu papel como patógeno oportunista, ocasionando infecções quando da redução dos mecanismos de defesa do hospedeiro (MAIA et al., 2009).

Sob certas condições, particularmente em hospedeiro debilitado, esse organismo pode infectar o trato urinário, queimaduras e feridas e causar septicemia,

abscessos e meningite. Sua resistência à maioria dos antimicrobianos também tem sido uma fonte de preocupação médica. Essa resistência está provavelmente relacionada com as características das porinas da parede celular, que controlam a entrada de moléculas através da parede. Muitas *Pseudomonas* podem crescer a temperaturas de refrigerador. Essa característica, combinada com sua capacidade de utilizar proteínas e lipídeos, faz com que sejam um participante importante na deterioração de alimentos (TORTORA, et al., 2012).

2.4 ANTIMICROBIANOS – ANTIBIÓTICOS E QUIMIOTERÁPICOS

Em 1928 Alexander Fleming descobriu a penicilina (PEREIRA; PITA, 2005), amplamente utilizada durante a segunda Guerra Mundial com o escopo de prevenir mortes causadas por ferimentos infectados. Nascia à verdadeira antibioticoterapia, pois outros antimicrobianos foram descobertos e passaram a ser utilizados de forma intensiva na terapia humana contra doenças bacterianas (GHADBAN, 2002; KHARDORI, 2006).

Mais de 5000 moléculas são conhecidas, sendo aproximadamente mil dessas cuidadosamente investigadas, e cerca de 100 são frequentemente utilizadas no tratamento de infecções. Sendo a maioria produzida por actinomicetos e bactérias, muitos dos quais são quimicamente modificados (semi-sintéticos), outros são completamente sintetizados (KHARDORI, 2006).

Andrade (2007) afirmou que foram detectadas mais de 8000 moléculas com ação antibiótica, pesquisadas e comercializadas, provocando uma verdadeira revolução no tratamento das infecções.

O aumento da produtividade através da intensificação da pecuária favoreceu a propagação de doenças, ao mesmo tempo incentivou o desenvolvimento de fármacos para tratar primeiro as doenças; em seguida para prevenir as doenças e mais tarde para estimular o crescimento e melhorar a conversão alimentar. A indústria, inicialmente, se concentrou sobre antimicrobianos, na sequência sobre coccidiostáticos, seguido por hormônios e outras substâncias químicas (PRICE, 2009). A avicultura moderna, segundo Palermo-Neto (2005), não pode prescindir do uso de antimicrobianos. Cerca de 50% de todos os antimicrobianos utilizados no mundo são para fins veterinários (TEUBER, 2001).

Substâncias medicamentosas são adicionadas na ração animal por três razões: para tratamento e prevenção de doenças, e para melhorar a conversão

alimentar promovendo o crescimento. O uso de fármacos terapêuticos deve ser feito sob supervisão Médico-Veterinária e não deve gerar resíduos nos alimentos. No entanto, problemas podem ocorrer quando o intervalo de segurança adequado não é observado (PRICE, 2009).

Os antimicrobianos podem ser subdivididos em dois grupos: inespecíficos e específicos. Os antimicrobianos inespecíficos atuam sobre todos os microrganismos, quer sejam patogênicos ou não, pertencem a esse grupo os anti-sépticos e desinfetantes. Já os antimicrobianos específicos atuam sobre microrganismos responsáveis pelas doenças infecciosas que acometem os animais, tais como antibióticos e os quimioterápicos. O termo quimioterápico foi introduzido no início do século XX referindo-se à substância química produzida por síntese laboratorial que, introduzida no organismo animal age de maneira seletiva sobre o agente causador do processo infeccioso, sem causar efeito nocivo sobre o hospedeiro. O termo antibiótico foi inicialmente empregado para definir substâncias químicas produzidas por microrganismos, que têm a capacidade de, em pequenas doses, inibir o crescimento ou destruir microrganismos causadores de doenças. Posteriormente, houve necessidade de ampliar este conceito, pois tornou-se possível obtê-los por síntese laboratorial parcial (antibióticos semi-sintéticos ou biossintéticos) ou total (sintobióticos) (PALERMO-NETO et al., 2005).

Os antibióticos são substâncias químicas produzidas pelo metabolismo de determinadas estirpes bacterianas, fungos e actinomicetos. Contribuem para impedir temporária ou definitivamente as funções vitais de outras bactérias, determinando os conhecidos efeitos bacteriostático e bactericida (PRATA; FUKUDA, 2001). Além do uso desses fármacos para o tratamento terapêutico das doenças, são utilizados também em doses mínimas nas rações de animais, principalmente na avicultura, com finalidade profilática de controlar as doenças sub-clínicas e como promotor do crescimento em práticas veterinárias (FUKUDA, 2001; KASZANYITZKY, 2007).

A utilização de antimicrobianos na criação de animais de produção, além de proporcionar um risco direto ao consumidor, representa uma fonte importante de contaminação e desequilíbrio ambiental. Os riscos ambientais decorrentes do uso excessivo de antimicrobianos se dão através do impacto indireto na saúde dos humanos via possibilidade de seleção de microrganismos resistente, o impacto direto de danos ao seu organismo e a interferência na biota do meio ambiente (KEMPER, 2008).

2.4.1 Antimicrobianos: terapêutico, preventivo e aditivo alimentar

O regime antimicrobiano terapêutico inclui o tratamento, controle e prevenção da doença. Tratamento é a administração de um antimicrobiano a um animal ou grupo de animais que exibam doença clínica (ANTIMICROBIAL RESISTANCE: IMPLICATIONS FOR THE FOOD SYSTEM, 2006), podendo ser amplamente empregado, com antimicrobianos a serem aplicados isoladamente ou associados, no intuito de se aproveitar a ação sinergizante. (PARDI et al., 2001). Sua utilização como tratamento terapêutico e mesmo profilático contra doenças também é uma prática comum na avicultura (PALERMO-NETO et al., 2005).

O controle de doença sub-clínica ou de doenças causadas por bactérias oportunistas como *Clostridium perfringens* causador da enterite necrótica, é outro modo de ação pelos quais os antimicrobianos melhoram o desempenho da ave (GONZALES, 2004).

Na prevenção ou profilaxia de doenças, é procedida a administração de um antimicrobiano para animais saudáveis de alto risco (ANTIMICROBIAL RESISTANCE: IMPLICATIONS FOR THE FOOD SYSTEM, 2006), sendo os níveis subterapêuticos de medicamentos continuamente adicionados a ração para prevenir a doença ou para controlar a sua propagação (PRICE, 2009).

Assim, como por exemplo, o uso profilático de antimicrobianos na alimentação de bovinos para evitar infecções intestinais, tem resultado no desenvolvimento de estirpes de salmonelas resistentes aos fármacos. O tratamento da população humana com antimicrobianos é comprometido quando estirpes de Salmonelas resistentes aos antimicrobianos são transmitidas dos animais para os alimentos destinados ao consumo humano. Além disso, a resistência pode ser transferida para outros organismos causando infecções humanas (HOBBS; ROBERTS, 1998).

Os aditivos alimentares consistem em antimicrobianos ofertados em pequenas doses na ração animal por tempo prolongado. Os aditivos não devem ser confundidos com o uso terapêutico ou preventivo dos antimicrobianos. Sua origem remonta a 1946, com a observação de que aves criadas intensivamente tinham maior eficiência alimentar quando recebiam Antimicrobianos Promotores de Crescimento (APC) na ração. Sendo assim, são considerados bioestimulantes,

visando ao crescimento, ao desenvolvimento e ao aumento da produtividade (EMBRAPA AVES E SUÍNOS, 2005; PARDI et al., 2001).

A utilização de antimicrobianos na ração animal não permite que os microrganismos patogênicos invadam e se multipliquem no trato gastrointestinal, permitindo dessa forma que os nutrientes presentes na dieta sejam aproveitados para o desenvolvimento muscular ao invés do sistema imune (ARAÚJO et. al., 2007; CORNELI, 2004). As alterações na microbiota beneficiariam os animais através de controle de doenças subclínicas, economia de nutrientes, efeito protetor contra a produção de toxinas no trato gastrointestinal e efeito metabólico (ENGLERT, 1982; MENTEM, 1995).

Após a aprovação da utilização dos primeiros antimicrobianos para uso nas dietas animais como promotores do crescimento pelo “Food and Drug Administration” (FDA), surgiram preocupações sobre seus efeitos na saúde humana, principalmente em decorrência de duas contestações, a presença de resíduos dos antimicrobianos na carne, nos ovos e no leite e a indução de resistência cruzada para bactérias patogênicas (MENTEM, 2001). Durante os anos, evidências têm sido acumuladas apontando que, também, há uma ligação entre o risco de doenças zoonóticas e utilização de antimicrobianos como promotores de crescimento em bovinos e aves (EDENS, 2003). Com isso, pesquisadores têm buscado alternativas que venham a substituir o uso de antimicrobianos (MENTEM, 2001).

O uso de probióticos, prebióticos e simbióticos na alimentação de aves vêm sendo utilizado como alternativa à utilização de antimicrobianos. Com o intuito de melhorar o ganho de peso, a conversão alimentar e atender às exigências das instituições de saúde e do meio ambiente, na última década houve um crescimento da sua utilização (REMONATO et al., 2008).

O uso contínuo de Antimicrobiano Promotor de Crescimento (APC) origina maior eficiência alimentar por agir diretamente na microbiota do trato digestório. Esta noção está fundamentada no fato de que alguns APC não são absorvidos e porque animais gnotobióticos não se beneficiam de seus efeitos. Os mecanismos de ação dos APC são difíceis de esclarecer completamente porque há, provavelmente, uma sobreposição de efeitos. Porém, é geralmente aceito que os APC diminuem a competição da microbiota por alguns nutrientes e que reduzem a ocorrência de infecções subclínicas que alteram a integridade da mucosa intestinal (EMBRAPA AVES E SUÍNOS, 2005). Assim, acredita-se que a atuação simultânea de alguns

destes mecanismos geram os ganhos de desempenho verificados em frangos de corte e outros animais domésticos (MENTEM, 1995).

Segundo Pardi et al. (2001) e Fukuda (2001), várias são as teorias que procuram explicar o mecanismo de ação dos antimicrobianos como bioestimulantes. Alguns pesquisadores colocam em evidência a capacidade seletiva do antimicrobiano quanto aos microrganismos gastrointestinais, resultando melhor aproveitamento dos alimentos. Outros destacam sua ação sobre determinadas bactérias do aparelho digestório, cujos resíduos metabólicos sejam prejudiciais ao processo de digestão. E outros, ainda, explicam o mecanismo de atividade de promoção daqueles estímulos, atribuindo-o à ação específica desenvolvida por determinados antimicrobianos.

Corroborando essas teorias, foi relatado que frangos criados até 40 dias com rações contendo APC podem pesar até 50g a mais que seus equivalentes criados na ausência de APC. Essa afirmação foi comprovada quando dinamarqueses retiraram APC da produção de frangos na Dinamarca e agravou-se a conversão alimentar média em 0,016Kg de ração por quilograma de frango vivo (EMBRAPA AVES E SUÍNOS, 2005). A proibição pelos europeus está relacionada com os agentes antimicrobianos que têm atividade profilática importante, principalmente a virginiamicina, lincomicina e a bacitracina de zinco que foram utilizadas contra a ocorrência de enterite necrótica (CASEWELL et al., 2003; GONZALES, 2004). Entretanto, sua retirada está associada à degradação da saúde animal, incluindo diarreia aumentada, perda de peso e mortalidade por *E. coli* e *Lawsonia intracellularis* no início do pós-desmame em porcos e enterite necrótica clostridial em frangos de corte (CASEWELL et al., 2003).

Berchieri Júnior e Macari (2000) descreveram a forma como os aditivos alimentares agem na avicultura, principalmente em frangos de corte que, é através do combate aos efeitos maléficos da microbiota intestinal, que possuem efeitos negativos no desempenho das aves por induzirem aumento do “turnover” de células, por competirem por nutrientes essenciais como os aminoácidos e comprometerem a digestão. Ainda segundo os mesmos autores, a presença de bactérias nocivas pode induzir o aumento do trânsito intestinal e também promover o afluxo de células mononucleares na parede intestinal, ou então, como no caso do *Streptococcus faecium* decompor os ácidos biliares e, assim, prejudicar a digestão. Contudo, a “manipulação” inadequada da microbiota nociva através do uso de antimicrobianos

em doses preventivas pode induzir ao desequilíbrio da microbiota e desencadear processos entéricos devido às interações indesejáveis com outros patógenos.

Fukuda (2001) relatou que para se obter resultados econômicos satisfatórios, é preciso que a ração oferecida seja tecnicamente balanceada e que haja boas condições de criação.

Fukuda (2001) e Remonato et al. (2008) concluíram que, o uso indiscriminado e indevido dos antimicrobianos leva ao desenvolvimento de microrganismos resistentes, principalmente os patogênicos, dificultando a ação da antibioticoterapia. Remonato et al. (2008) citaram haver necessidade da utilização de antimicrobianos com princípio ativo cada vez mais potente, causando diversos efeitos indesejáveis do organismo humano.

Pesquisas são extensivamente realizadas no decorrer das últimas décadas para confirmar o efeito melhorador do desempenho dos antimicrobianos (MAIORKA et al., 2001) e também do uso de probióticos, prebióticos e simbióticos (FLEMMING; FREITAS, 2005; RIGOBELLO et al., 2011)

O primeiro país a banir a utilização de antimicrobianos como promotores de crescimento na alimentação de aves foi a Suécia em 1986 e a seguir os Estados Unidos, Dinamarca, Alemanha e Finlândia. Pesquisadores desses países, concluíram que o uso destes fármacos na alimentação animal pode contribuir para o aumento da resistência microbiana nas terapias humanas tornando microrganismos patogênicos resistentes (REMONATO et al., 2008).

Em 1997 a União Europeia proibiu o uso da avoparcina e, em 1998/1999, de bacitracina, espiramicina, virginiamicina e tilosina (ALBERTON, 2004; CASEWELL et al., 2003). A bacitracina de zinco é um antimicrobiano muito comumente utilizado na avicultura e suinocultura como fator bioestimulante, principalmente por sua ação limitada no trato intestinal (FUKUDA, 2001). Em seres humanos, três anos após a proibição, o único efeito atribuível têm sido uma diminuição na resistência adquirida em enterococos isolados de amostras fecais de seres humanos. No entanto, em animais de produção, houve um aumento na utilização de antimicrobianos como terapêuticos, incluindo a tetraciclina, aminoglicosídeos, trimetoprima/sulfonamida, macrolídeos e lincosamidas, os quais têm importância direta na medicina humana (CASEWELL et al., 2003).

Os produtores europeus podem recorrer a apenas quatro promotores de crescimento: monensina, salinomicina, avilamicina e flavomicina; os dois primeiros

são ionóforos bastante utilizados como agentes anticoccidianos para aves, restando apenas os dois últimos como promotores de crescimento para frangos de corte e outras aves (ALBERTON, 2004).

No Brasil, as substâncias utilizadas como melhoradores do desempenho seguem as normas estabelecidas pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) e pelo *Codex Alimentarius*, que estabelecem o Limite Máximo de Resíduos (LMR) de um antimicrobiano na alimentação animal, sendo este a quantidade de uma substância química que pode estar presente em 1 Kg de alimento e que, se ingerida por um indivíduo durante toda sua vida não produza efeitos indesejáveis ou tóxicos (AVEWORLD, 2005).

Em 1992, no Brasil, consta na Portaria nº 159 do MAPA, o impedimento do uso de antimicrobianos para ração como aditivos sistêmicos, promotores de crescimento ou conservantes como tetraciclinas, penicilina, cloranfenicol e sulfonamidas. No Ofício Circular 19/98 de 16/11/98 do MAPA, há suspensão do uso de avoparcina (ALBERTON, 2004) e a Portaria 448 de 10/09/98 proíbe a fabricação, importação e uso de cloranfenicol, furazolidona e nitrofurazona (BRASIL, 1998).

Segundo o MAPA, os aditivos (antimicrobianos) autorizados como promotores de crescimento de frangos de corte são: ácido 3-nitro, ácido arsanílico, avilamicina, bacitracina metileno disalicato, bacitracina de zinco, sulfato de colistina, cloridrato de clorexidina, enramicina, espiramicina, flavomicina, halquinol, lincomicina, tilosina, virginamicina (BRASIL, 2011b).

O benefício teórico e político da proibição generalizada de antimicrobianos como promotores de crescimento precisa ser mais cuidadosamente ponderado contra as consequências adversas cada vez mais evidentes (CASEWELL et al., 2003). No entanto, pesquisadores também têm buscado outras opções para os APC e uma nova linha de pesquisa teve início recentemente na Embrapa Suínos e Aves em Concórdia/SC, surgindo como alternativa e oportunidade às cadeias de produção animal. Trata-se da avaliação de plantas ativas para substituição dos APC visando à melhoria do desempenho de suínos e aves (EMBRAPA AVES E SUÍNOS, 2008). Uma das grandes preocupações da sociedade é em relação à segurança dos alimentos (EMBRAPA AVES E SUÍNOS, 2008; KHARDORI, 2006) e os pesquisadores devem estar atentos a todas as possibilidades, apontando a atividade de plantas para fins terapêuticos, profiláticos ou melhorador do desempenho de

animais como pouco explorada com a devida abordagem científica (EMBRAPA AVES SUÍNOS, 2008).

2.4.2 Classes de antimicrobianos

Serão apresentadas as classes de antimicrobianos (antibióticos e quimioterápicos) para controle de bactérias Gram-negativas.

2.4.2.1 β -Lactâmicos

Um dos principais grupos de antimicrobianos, tanto do ponto de vista histórico quanto médico, corresponde ao grupo dos β -lactâmicos (MADIGAN et al., 2004). Os antimicrobianos β -lactâmicos impedem a formação da parede celular das bactérias porque inibem as enzimas transpeptidase, carboxipeptidase e endopeptidase, localizadas abaixo da parede celular, chamadas proteínas de ligação à penicilina, impedindo a ligação cruzada do peptidoglicano (KHARDORI, 2006).

A presença dessas proteínas de ligação à penicilina, com afinidades distintas nas diversas espécies de bactérias Gram-positivas e negativas é a causa de variação do espectro de ação dos diferentes antimicrobianos β -lactâmicos. Os β -lactâmicos têm em comum a presença de um componente estrutural característico, o anel β -lactâmico, chamado de núcleo. As bactérias Gram-negativas podem possuir até sete diferentes proteínas de ligação que podem se unir ao anel β -lactâmico e induzir a formação de uma parede bacteriana defeituosa osmoticamente instável. Portanto, o efeito dos antimicrobianos β -lactâmicos é inicialmente bactericida (MADIGAN et al. 2004; PALERMO-NETO et al., 2005). Em conjunto, as penicilinas e as cefalosporinas correspondem a mais da metade de todos os antimicrobianos produzidos e utilizados no mundo. A penicilina é produzida pelo fungo *Penicillium chrysogenum*, enquanto a cefalosporina é produzida pelo fungo *Cephalosporium acremonium*. Inclui-se também neste grupo as cefamicinas (MADIGAN et al., 2004).

As cefamicinas são cefalosporinas de segunda geração obtidas a partir de culturas de *Streptomyces* spp. ou obtidas por síntese (PALERMO-NETO et al., 2005). Para Koneman et al. (2006) e Palermo-Neto et al. (2005) os β -lactâmicos podem ser classificados em cinco grupos: penicilinas, cefalosporinas, inibidores de β -lactamases, tienamicinas e monobactâmicos (Aztreonam). Na avicultura são mais utilizadas as penicilinas e cefalosporinas, e pode ser promissor o uso combinado com os inibidores de β -lactamases, tais como ácido clavulânico, tazobactam e

sulbactam. Tortora et al., (2012) relataram que os inibidores de β -lactamase são utilizados juntamente ao antimicrobiano, porém sem qualquer ação antimicrobiana própria.

O termo penicilina se refere a um grupo que engloba mais de 50 antimicrobianos quimicamente relacionados. Moléculas de penicilina se diferenciam pelas cadeias laterais conectadas aos seus núcleos. Podem ser produzidas de forma natural ou semissintética. As penicilinas naturais apresentam algumas desvantagens, pelo estreito espectro de atividade e sua suscetibilidade a penicilinasas. Penicilinasas são enzimas produzidas por muitas bactérias, mais notadamente espécies de estafilococos, que clivam o anel β -lactâmico da molécula de penicilina. Devido a essa característica, as penicilinasas são chamadas de β -lactamases (TORTORA et al., 2012).

Com o objetivo de resolver o problema do espectro restrito de atividade das penicilinas naturais, penicilinas semissintéticas de amplo espectro foram desenvolvidas. As primeiras dessa categoria foram as aminopenicilinas, como a ampicilina e amoxicilina (TORTORA et al., 2012). Outras penicilinas resultantes da modificação da ampicilina foram desenvolvidas, entretanto, a busca por modificações ainda mais eficientes na penicilina continua. Outro método de evitar os efeitos da penicilinase foi o desenvolvimento do aztreonam, primeiro membro de uma nova classe de antimicrobianos. Trata-se de um antimicrobiano sintético que possui apenas um anel simples do convencional anel duplo dos antimicrobianos β -lactâmicos (KHARDORI, 2006; TORTORA, et al., 2012).

O espectro antimicrobiano do aztreonam deve-se a maior afinidade pelas proteínas de ligação à penicilina por bastonetes aeróbios, semelhante ao dos aminoglicosídeos, no entanto, não é nefrotóxico, apenas fracamente imunogênico, por isso é uma alternativa em pacientes com hipersensibilidade às penicilinas (KHARDORI, 2006). O termo Beta-Lactamase de Espectro Estendido (ESBL) refere-se às beta-lactamases produzidas principalmente por *Klebsiella* spp. e *E. coli* que apresentam resistência aos beta-lactâmicos de amplo espectro, os quais normalmente possuem atividade contra bastonetes, tais como cefotaxima, ceftazidima, aztreonam e ceftodoxima (SILVA, 2000).

O anel β -lactâmico das cefalosporinas difere um pouco daquele das penicilinas, porém as bactérias já desenvolveram β -lactamases que são capazes de inativá-lo. O agrupamento diferencial das cefalosporinas é mais comumente feito

referente às gerações do medicamento, o que reflete seu contínuo desenvolvimento. A cefalotina é uma cefalosporina de 1ª geração, sendo mais ativos contra aeróbios, cocos Gram-positivos. Os fármacos de 2ª geração são mais ativos contra seletos organismos Gram-negativos, como *Klebsiella* spp., *E. coli* e *Proteus* spp. Cefoxitina é ativa contra bactérias anaeróbias. Os fármacos de 3ª geração, como a ceftriaxona e ceftazidima são mais ativas contra bactérias Gram-negativas, essa última contra *Pseudomonas aeruginosa*, porém a maioria é injetável. Os fármacos de 4ª geração, como a cefepime, devem ser administradas pela injetável, mas em contrapartida apresentam o espectro de atividade mais amplo, contra Gram-negativo e positivo, incluindo *P. aeruginosa* (KHARDORI, 2006).

As aminopenicilinas (ampicilina e amoxicilina) foram desenvolvidas devido à necessidade de antimicrobianos com atividade contra bactérias Gram-negativas. As aminopenicilinas inicialmente foram efetivas contra *E. coli*, *Proteus mirabilis*, *Shigella* spp., *Salmonella* spp., *Hemophilus* spp. e *Neisseria* spp. Algumas bactérias Gram-negativas, incluindo as *Enterobacteriaceae* são resistentes à penicilina devido a produção de beta-lactamase. Os inibidores de beta-lactamase (ácido clavulânico, sulbactam e tazobactam) inibem um grupo de beta-lactamases de bactérias resistente. Estes inibidores estão disponíveis como combinações de amoxicilina-clavulanato, ampicilina-sulbactam, ticarcilina-clavulanato e piperacilina-tazobactam (KHARDORI, 2006).

Palermo-Neto et al. (2005) citaram que as penicilinas comercializadas para uso na avicultura são a fenoximetilpenicilina (penicilina V) e as aminobenzilpenicilinas (ampicilina, amoxicilina) . Estes produtos são disponíveis para uso na ração (premix) ou via água de bebida.

2.4.2.2 Aminoglicosídeos

Os aminoglicosídeos são antimicrobianos produzidos de *Streptomyces* spp., *Micromonospora* spp. e *Bacillus* spp. Considerando sua estrutura química são denominados também de aminociclítóis. Os aminoglicosídeos formam um grupo de antimicrobianos em que os aminoaçúcares se encontram ligados por pontes glicosídicas ao núcleo de hexose. São ativos contra bactérias Gram-negativas, principalmente *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas* spp. e *Serratia* spp., e têm ação limitada e variável contra bactérias Gram-positivas e micoplasmas (PALERMO-NETO et al., 2005).

Antimicrobianos aminoglicosídicos, como a estreptomicina e a gentamicina, interferem nas etapas iniciais da síntese protéica pela alteração conformacional da porção 30S do ribossomo 70S procariótico. Essa interferência leva a leitura incorreta do código genético impresso no RNAm. Foram os primeiros antimicrobianos a apresentar atividade significativa contra bactérias Gram-negativas. A gentamicina é especialmente útil no tratamento de infecções por *Pseudomonas* spp. (TORTORA, et al., 2012).

Todos os aminoglicosídeos são antimicrobianos de ação bactericida rápida, dose-dependentes e que apresentam um efeito residual após interrupção de seu uso. Os aminoglicosídeos são inibidores irreversíveis da síntese de proteínas. Inicialmente, ocorre a difusão passiva do antimicrobiano pelos canais de porina presentes na parede celular e, a seguir, o aminoglicosídeo é ativamente transportado através da membrana celular para o citoplasma. Após ter penetrado na célula bacteriana, o aminoglicosídeo liga-se às proteínas ribossomais específicas da subunidade 30S inibindo a síntese protéica e conseqüentemente a morte da bactéria (PALERMO-NETO et al., 2005). A ligação irreversível pode explicar o efeito bactericida dos aminoglicosídeos em comparação a outros inibidores da síntese de proteínas. Baixo pH e condições anaeróbias inibem a energia e o mecanismo de transporte dependente de oxigênio, que é um pré-lúdio essencial para a ligação dos aminoglicosídeos ao ribossomo (KHARDORI, 2006).

Os aminoglicosídeos correspondem apenas a cerca de 3% do total de todos os antimicrobianos produzidos e utilizados. O uso de aminoglicosídeos no tratamento de infecções Gram-negativas diminuiu a partir do desenvolvimento das penicilinas semi-sintéticas e das tetraciclina. Também teve seu uso diminuído devido ao rápido desenvolvimento de resistência e seus efeitos tóxicos, podendo afetar a audição ao causar danos permanentes ao nervo auditivo e danos renais (MADIGAN et al., 2004; TORTORA et al., 2012). A ototoxicidade dos aminoglicosídeos pode causar toxicidade auditiva em cães e aves, e também toxicidade vestibular em gatos (COSTA, 1999). Essa toxicidade depende tanto do tempo quanto de concentração sérica máxima e mínima, dose cumulativa, dose média diária (KHARDORI, 2006; PALERMO-NETO et al., 2005), estado de doença subjacente e exposição prévia ao tratamento com o aminoglicosídeo (SPOO, REVIERE, 2003), por essa razão o seu uso em doses elevadas ou contínuas por via

parenteral deve ser efetuado com cautela (KHARDORI, 2006; PALERMO-NETO et al., 2005).

Khardori (2006) relatou que o efeito após administração do fármaco é prolongado e pode continuar destruindo as bactérias, mesmo depois da redução de concentrações séricas abaixo da concentração inibitória mínima.

Os aminoglicosídeos têm baixa absorção intestinal e, por essa razão, são ineficientes quando administrados por via oral em aves visando ao tratamento de infecções sistêmicas (PALERMO-NETO et al., 2005). São considerados antibiogramas-reserva, utilizados principalmente quando outros antimicrobianos falham (MADIGAN et al., 2004).

Os aminoglicosídeos mais utilizados na avicultura são a neomicina, apramicina, gentamicina e a espectinomicina associada à lincomicina, apesar da canamicina e a diidroestreptomicina também estarem disponíveis no mercado. As indicações de uso de cada um destes antimicrobianos estão relacionados com a forma de apresentação (pó solúvel ou suspensão oral ou injetável), eficiência para patógenos específicos e riscos de indução de resistência ou toxicidade (PALERMO-NETO, et al., 2005). Khardori (2006), concluiu que a maioria dos pesquisadores notou pouca mudança nos padrões de bastonetes resistentes aos aminoglicosídeos, apesar dos aumentos alarmantes de *Enterococcus* spp. resistentes a aminoglicosídeos.

Palermo-neto et al. (2005), relataram que a amicacina é um derivado semi-sintético da canamicina, é menos tóxica e tem atividade antibacteriana maior que a canamicina, mas não está disponível para uso em avicultura. Este aminoglicosídeo é comercializado para uso parenteral em seres humanos, mas pode ser utilizado em aves ornamentais. A Concentração Inibitória Mínima (CIM) é menor ou igual a 16µg/mL para bactérias suscetíveis. Khardori (2006) informou que pode ser usada no combate aos bastonetes resistentes à gentamicina e é usada no tratamento de infecções causadas por *Nocardia* e micobactérias não causadoras da tuberculose.

A amicacina, e possivelmente a canamicina, são incompatíveis ou compatíveis em situações específicas com a anfotericina B, ampicilina sódica, eritromicina, nitrofurantoína, oxacilina, oxitetraciclina, tetraciclina, penicilina, complexo vitamínico B e vitamina C. Não é recomendável associar amicacina com cefalosporinas, podendo causar desequilíbrio da microbiota bacteriana intestinal e respiratória. Quando do uso parenteral pode provocar bloqueio neuromuscular,

edema facial, dor e inflamação no ponto de injeção, neuropatia periférica e reações de hipersensibilidade (PALERMO-NETO et al., 2005).

A captação dos aminoglicosídeos é facilitada na presença de inibidores da síntese da parede celular, tais como beta-lactâmicos e glicopeptídeos (KHARDORI, 2006).

A gentamicina é menos tóxica que a neomicina e a estreptomicina, mas como todos os aminoglicosídeos, dependendo da dose e tempo de uso por via parenteral causa nefrotoxicidade. Podendo causar também desequilíbrio da microbiota intestinal. A gentamicina injetável é utilizada em pintos e perus por via sub-cutânea para prevenção ou controle da transmissão horizontal de *Pseudomonas aeruginosa*, *Arizona* spp., *Salmonella* spp., *E. coli*, *Mycoplasma gallisepticum*, *Mycoplasma synoviae* e *Mycoplasma meleagridis*. Geralmente é aplicada junto com a vacina contra a doença de Marek (PALERMO-NETO et al., 2005).

2.4.2.3 Tetraciclina

As tetraciclinas compreendem um grupo de antimicrobianos que foram isolados de culturas do *Streptomyces* spp. A clortetraciclina e a tetraciclina foram obtidas de culturas de *S. aureofaciens* e a oxitetraciclina (terramicina) de *S. rimosus*. A doxiciclina e a minociclina são derivados semi-sintéticos. Há ainda, outras tetraciclinas, porém de menor emprego em Medicina Veterinária (PALERMO-NETO et al., 2005).

Os agentes que constituem esse grupo se classificam segundo a duração da sua ação: curta ação (tetraciclina, oxitetraciclina e clortetraciclina); ação intermediária (demeclociclina e metaciclina) e ação prolongada (doxiciclina e minociclina) (VALDERAS; MARTÍN, 2006).

O baixo custo, toxicidade reduzida e excelentes propriedades farmacocinéticas da doxiciclina, torna esse agente de escolha entre as tetraciclinas (KHARDORI, 2006).

A estrutura básica das tetraciclinas consiste em um sistema de anel naftaceno. Essa estrutura pode ser substituída em várias posições, originando novos análogos em tetraciclina. As tetraciclinas, clortetraciclina e oxitetraciclina são produzidos microbiologicamente, embora também existam tetraciclinas semi-sintéticas que apresentam substituições sintéticas no sistema do anel naftaceno (MADIGAN et al., 2004).

As tetraciclinas são antimicrobianos bacteriostáticos, de amplo uso medicinal em humanos, que à semelhança dos aminoglicosídeos atuam na fração 30S do ribossomo, bloqueando a ligação do aminoacil do RNAt ao complexo ribossomo-RNA mensageiro, comprometendo a multiplicação bacteriana. Todas as tetraciclinas são consideradas antimicrobianos de amplo espectro, atuando contra Gram-positivas e negativas, clamídias, micoplasmas, rickettsias, anaeróbios e alguns protozoários (PALERMO-NETO et al., 2005). As tetraciclinas não interferem na atividade dos ribossomos de mamíferos por não entrarem de forma eficiente nas células eucarióticas intactas. Entretanto, pelo menos pequenas quantidades do fármaco podem entrar nas células do hospedeiro, o que justifica o fato de que patógenos intracelulares como clamídias e rickettsias são sensíveis às tetraciclinas (TORTORA et al., 2012).

Muitas bactérias como estafilococos, estreptococos, *Enterobacteriaceae*, micoplasmas aviários e anaeróbios têm apresentado suscetibilidade variável ou intermediária em vista de ocorrência de resistência adquirida. Pode-se considerar bactérias naturalmente resistentes às tetraciclinas *Mycobacterium* spp., *Proteus* spp., *Pseudomonas aeruginosa* e *Serratia* spp (PALERMO-NETO et al., 2005).

Tortora et al. (2012) relataram que a oxitetraciclina e a tetraciclina tem sido extensivamente utilizadas na avicultura como promotor de crescimento, que resultou em ganho de peso e aumento da produção de ovos. Palermo-neto et al. (2005) também afirmaram que é utilizada na prevenção ou tratamento de diversas doenças, e associada com a furazolidona (não recomendada para animais produtores de alimentos) tem efeito sinérgico no controle de salmoneloses, coccidioses e outras infecções. Frota et al. (2005) e Machado et al. (2008) revelaram que em seres humanos a tetraciclina é utilizada juntamente à furazolidona para erradicação de infecção pela bactéria *Helicobacter pylori*.

Pardi et al. (2001) informaram que a *Salmonella* Typhimurium é a mais disseminada das espécies da microbiota intestinal dos animais e aquela que adquire mais facilmente resistência à tetraciclina. Pantozzi et al. (2010) isolaram *Salmonella* entérica em animais de produção que se apresentavam clinicamente sadios, se mostrando sensíveis a diversos antimicrobianos de uso humano e animal, inclusive a tetraciclina. Foram isoladas *Salmonella* spp. de criação de poedeiras sadias apresentando apenas 6,7% das estirpes como intermediárias e 3,3% resistentes à tetraciclina (RUIZ B; SUÁREZ, 2006).

Pantozzi et al. (2010) ao estudar o perfil de resistência de *E. coli*, *Enterococcus* spp. e *Campylobacter* spp. isoladas de fezes de grupos de animais saudáveis (equinos, bovinos, suínos, aves poedeiras, ovinos e cães), encontraram maior percentual de resistência e multirresistência em aves e suínos, e observaram maior resistência à tetraciclina e outros antimicrobianos de uso em seres humanos e animais, tais como: ampicilina, ácido nalidíxico e estreptomicina. A tetraciclina é o antimicrobiano mais antigo usado no tratamento e como promotor de crescimento em rações de animais, apesar de terem sido banidas no Brasil em 1992, continuam sendo utilizadas (ROSSI, 2005).

Populações bacterianas também foram isoladas de tilápias em três sistemas diferentes de cultivo, sendo 50% de todos os isolados resistentes à tetraciclina (CARNEIRO et al., 2007).

Depois da amoxicilina e eritromicina, a tetraciclina continua sendo a classe mais amplamente prescrita por todo mundo (KHARDORI, 2006).

2.4.2.4. Fenicóis

Os fenicóis (cloranfenicol e tianfenicol) pertencem a uma família de fármacos que surgiu a mais de 60 anos (EPAULARD; BRION, 2010), isolado pela primeira vez em 1947 de *Streptomyces venezuelae*, mas todo o cloranfenicol produzido é sintético (PALERMO-NETO et al., 2005).

O cloranfenicol inibe a formação de ligações peptídicas nas cadeias nascentes de polipeptídeos pela reação com a porção 50S do ribossomo procarionte 70S. É um antimicrobiano bacteriostático, ativo contra bactérias Gram-positivas aeróbias e anaeróbias e micoplasmas, tendo efeito variável para Gram-negativos. Como sua estrutura é relativamente simples, é mais vantajoso para a indústria farmacêutica sintetizá-lo quimicamente do que isolá-lo de *Streptomyces* (TORTORA et al., 2012).

O antimicrobiano é relativamente barato e tem um amplo espectro de ação, de forma que é utilizado com frequência quando baixos custos são essenciais. O pequeno tamanho molecular o caracteriza como um fármaco de boa disponibilidade, promovendo sua difusão para áreas do corpo normalmente inacessíveis a muitos fármacos (EPAULARD; BRION, 2010). Entretanto, devido à sua toxicidade hematológica, causa sérios efeitos adversos, sendo mais importante a supressão da atividade da medula óssea, o que afeta a formação de células do sangue

(EPAULARD; BRION, 2010; TORTORA et al., 2012) e insuficiência respiratória fetal, a chamada síndrome cinza (MONTECINOS, 2009). Devendo ser unicamente empregados em infecções graves, tais como: febre tifóide, meningites bacterianas e infecções por anaeróbios, quando não há outra alternativa disponível (VALDERAS; MARTÍN, 2006).

Em seres humanos, o cloranfenicol tem sido utilizado no tratamento da doença meningocócica e febre tifóide em todo o mundo, ao mesmo tempo, devido à crescente resistência têm exigido o uso de outros fármacos (EPAULARD; BRION, 2010). A resistência ao cloranfenicol se desenvolve mediante uma enzima chamada acetiltransferase, codificada por plasmídeo, que reduz a afinidade do cloranfenicol pelo ribossoma bacteriano (VALDERAS; MARTÍN, 2006).

O uso do cloranfenicol em preparação de insumos utilizados na pecuária foi proibido em vista de seu elevado risco para a saúde humana (BRASIL, 1998). O florfenicol injetável está aprovado para uso em bovinos. O cloranfenicol pode ser utilizado em cães e outros animais de estimação (PALERMO-NETO et al., 2005).

2.4.2.5 Quinolonas

No início da década de 1960, o fármaco ácido nalidíxico foi desenvolvido, sendo o primeiro do grupo antimicrobiano denominado quinolonas (TORTORA et al., 2012), sendo considerado como a primeira geração de fluoroquinolona (quinolona sintética) (KHARDORI, 2006; TORTORA et al., 2012) e como quinolona protótipo (KHARDORI, 2006; MADIGAN et al., 2004).

Embora o ácido nalidíxico tenha sido utilizado de forma limitada, sua manipulação levou ao desenvolvimento, na década de 1980, de um grupo prolífico de fluoroquinolonas, cada um apresentando um espectro de atividade progressivamente mais amplo (TORTORA et al., 2012). A segunda geração de fluoroquinolonas, tais como norfloxacin, ciprofloxacina e ofloxacina, tem atividade predominantemente contra bactérias Gram-negativas (KHARDORI, 2006).

As quinolonas são antimicrobianos bactericidas, que inibem a replicação do DNA bacteriano e a sua transcrição ao bloquear a ação da DNA girase (topoisomerase II) e da topoisomerase IV (presente em bactérias como *Staphylococcus* spp. e *Streptococcus* spp.). A DNA girase catalisa reações na cadeia de fita dupla do DNA bacteriano que permite o seu superenrolamento, relaxamento, separação e a sua reintegração que ocorre durante os processos de

transcrição e tradução vistos quando há replicação bacteriana. As quinolonas atuam interrompendo a separação e a reitegração mediada pela girase; inibem também a ocorrência do relaxamento do DNA superenrolado para que ocorra a replicação, como também aumenta a quebra do DNA de fita dupla. As quinolonas são, pois quimioterápicos bactericidas, cujo mecanismo de ação é complexo e multifásico (TORTORA et al., 2012).

Para Palermo-Neto et al. (2005), todas as quinolonas têm um bom espectro de ação para bactérias Gram-negativas aeróbias e microaerófilas, particularmente *Enterobacteriaceae*. As quinolonas são menos ativas para bactérias Gram-positivas (exceto *Staphylococcus* spp.) e anaeróbios. As quinolonas comercializadas no Brasil para uso na avicultura são: ácido oxolínico, flumequina, enrofloxacin, ciprofloxacina e norfloxacina.

A norfloxacina e ciprofloxacina são utilizadas rotineiramente no tratamento de infecções do trato urinário em seres humanos. A ciprofloxacina é o fármaco de escolha no tratamento de infecções causadas por linhagens de *Bacillus anthracis* resistentes à penicilina (MADIGAN, et al., 2004), sendo também a fluoroquinolona mais ativa contra *Pseudomonas aeruginosa*. Em contraste, a terceira e quarta geração de fluoroquinolonas como levofloxacina, gatifloxacina e moxifloxacina, tem melhor atividade contra microrganismos Gram-positivos, particularmente *S. pneumoniae*, incluindo também estirpes resistentes à penicilina (KHARDORI, 2006).

A ciprofloxacina é administrada via água de bebida ou ração, para o controle da coriza infecciosa das galinhas, infecções por *Ornithobacterium rhinotracheale*, celulite por Gram-negativos, estafilococose, salmoneloses e outras infecções causadas por patógenos suscetíveis (PALERMO-NETO et al., 2005).

2.4.2.6 Inibidor da via folato

As sulfas foram descobertas na década de 1930 (VICENTE; PÉREZ-TRALLERO, 2010), sendo os primeiros análogos de fatores de crescimento amplamente utilizados na inibição específica do crescimento bacteriano (MADIGAN et al., 2004), sendo os primeiros agentes antimicrobianos eficazes empregadas no tratamento de infecções em seres humanos (VICENTE; PÉREZ-TRALLERO, 2010).

As sulfonamidas (sulfonamídicos ou sulfas) são compostos sintéticos derivados de um corante, a sulfamidocrisoidina que foi patenteada como Prontosil rubrum. No organismo animal, a sulfamidocrisoidina se desdobra pela ruptura da

ponte N = N em uma molécula de paraminobenzeno sulfonamida ou sulfonilamida que apresenta efeito antimicrobiano (PALERMO-NETO et al., 2005).

A sulfa mais simples corresponde à sulfanilamida, um análogo do ácido paraminobenzóico (PABA), um componente da vitamina ácido fólico. A sulfanilamida é bacteriostática, bloqueia a síntese do ácido fólico, um precursor de ácidos nucléicos (MADIGAN, et al., 2004). Microrganismos sensíveis às sulfas precisam sintetizar o PABA, ao passo que seres humanos obtêm essa molécula em sua dieta (TORTORA, et al., 2012). A resistência aos derivados da sulfanilamida (as sulfonamidas) é geralmente muito comum, porque certas espécies de bactéria resistentes desenvolveram a capacidade de utilizar fontes exógenas de ácido fólico pré-formado (MADIGAN, et al., 2004).

A resistência às sulfamidas é um fenômeno crescente e generalizado, e quando se apresenta afeta a todos os componentes do grupo. Algumas vezes a resistência se deve a mutações, em outras, mais frequentemente, a aquisição de plasmídeos e outros elementos genéticos móveis, que além de promover a resistência portam genes de resistência a outros antimicrobianos (VICENTE; PÉREZ-TRALLERO, 2010).

Provavelmente, a sulfa mais utilizada hoje é a combinação de trimetropim (diaminopirimidina) e sulfametoxazol (TMP-SMZ). As diaminopiridinas também interferem na via de biossíntese do ácido fólico. Enquanto as sulfonamidas inibem o metabolismo intermediário da bactéria porque interferem na fase inicial da biossíntese do ácido fólico (competição pela diidropteroato sintetase), as diaminopiridinas interferem numa etapa subsequente impedindo a formação do ácido tetraidrofólico por inibição fermentativa da diidrofolato redutase produzida pela bactéria. As diaminopirimidinas são antimicrobianos bacteriostáticos assim como as sulfonamidas, porém quando associados, a combinação tem efeito bactericida (PALERMO-NETO et al., 2005).

Quando usadas em combinação, apenas 10% da concentração de cada fármaco são necessários, se comparado a concentração necessária quando cada fármaco é usado individualmente. Este sinergismo também amplia o espectro de atividade e reduz muito o surgimento de estirpes resistentes (TORTORA, et al., 2012). Essa associação tem sido utilizada para obtenção de uma melhor eficiência terapêutica contra *Enterobacteriaceae* e bactérias que acometem o sistema respiratório (KUENZEL et al., 2004), reduzindo também a dosagem e diminuindo o

risco de aparecimento de efeitos colaterais (MAGALHÃES et al., 1985). No entanto, é importante considerar que o sinergismo entre as sulfonamidas e as diaminopirimidinas só pode ocorrer quando o microrganismo é suscetível aos dois antimicrobianos associados. Micoplasmas, *Pseudomonas aeruginosa* e *Campylobacter jejuni* são resistentes à associação, mas bactérias Gram-positivas e Gram-negativas de suscetibilidade moderada às sulfonamidas tornam-se suscetíveis à associação (PALERMO-NETO et al., 2005).

As sulfonamidas comumente encontradas para uso na avicultura são sulfadimetoxina, sulfametazina, sulfaquinoxalina, sulfamerazina, sulfatiazol e sulfadiazida (WASSENAAR, 2005). A via preferencial de administração de sulfas e associações com diaminopirimidinas em aves é através da água de bebida e da ração (JONES et al., 1983; SPENSER, 2004).

As sulfonamidas têm sido extensivamente utilizadas como agentes terapêuticos, principalmente para o controle da coccidiose, pulorose, tifo aviário, cólera aviária e coriza infecciosa das galinhas. Quanto ao uso terapêutico, deve-se respeitar o tempo de retirada, aproximadamente cinco dias antes do abate e em poedeiras descartar os ovos nos dez primeiros dias após o término do tratamento (JONES et al., 1983).

2.4.2.7 Nitrofuranos

Os derivados nitrofurânicos são compostos sintéticos (quimioterápicos) que possuem atividade antimicrobiana. São produtos do furano, no qual se fizeram algumas substituições (JONES et al., 1983). São compostos estáveis, cristalinos, de coloração amarelada ou verde e solúveis em água, de amplo espectro de ação contra microrganismos Gram-positivos e Gram-negativos (incluindo espécies de Salmonelas), micoplasmas, clamídeas, protozoários (*Coccídeas*, *Trichomonas*, *Histomonas*) e fungos (JONES et al., 1983; MADRP, 2003; MAGALHÃES et al., 1985; OPH, 2010).

Sua ação farmacológica (antimicrobiana e antiparasitária) deve-se ao radical nitro ($-\text{NO}_2$) na posição 5 do anel furano (BOSQUESI et al., 2008; DODD; STILLMAN, 1944; MAGALHÃES et al., 1985; PAULA et al., 2009) e sua mutagenicidade e a possível carcinogenicidade devem-se, provavelmente, à presença do grupo nitro na posição 5 e também dos substituintes (R) na posição 2 do anel furano (BOSQUESI et al., 2008; PAULA et al., 2009).

Os primeiros compostos nitroheterocíclicos utilizados na quimioterapia foram os nitrofuranos. Três dos quais, a nitrofurazona, furazolidona e nitrofurantoína, são utilizados no tratamento de vários tipos de infecções bacterianas por mais de 50 anos (BOSQUESI et al., 2008). No entanto, os nitrofuranos mais comuns são: a furazolidona, furaltadona, nitrofurantoína e nitrofurazona, que, como a maioria dos nitrofuranos, são rapidamente metabolizados *in vivo*, ocorrendo uma diminuição significativa dos seus níveis plasmáticos. Com este evento ocorre o surgimento e acúmulo de seus metabólitos, respectivamente 3-amino-2-oxazolidinona (AOZ), 3-amino-5-morfolinometil-2-oxazolidinona (AMOZ), 1-aminoidantoína (AHD), semicarbazida (SEM) e, os quais podem ser detectados no tecido durante um longo período de tempo (BARBOSA et al., 2007; MOTTIER et al., 2005).

Magalhães et al. (1985) afirmaram que os nitrofuranos interferem nas fases precoces do Ciclo de Krebs inibindo a formação anaeróbia da acetilcoenzima A. Além disso, os mesmos autores relataram que esses favorecem a imunidade natural, não são tóxicos, não se acumulam nos tecidos e possuem atividade em presença de pus, sangue e tecido necrosado.

Palermo-Neto et al. (2005) relataram que os nitrofuranos são bacteriostáticos que bloqueiam a descarboxilação oxidativa do piruvato para-acetilcoenzima A, privando os microrganismos suscetíveis das vias vitais de produção de energia e, também, rompem as interações códon e anticódon, impedindo a tradução do RNA mensageiro. A formação de radicais ânion nitro inibem a tradução genética, o processo ribossômico do RNAm (OPH, 2010).

Sua ação citotóxica ou mutagênica como antimicrobiano depende da ativação do grupamento nitro, a partir da ação de nitroreduases presentes em bactérias suscetíveis (PETERSON et al., 1979; SISSON et al., 2002; SQUELLA et al., 1996). Essa ação mutagênica de compostos nitrofurânicos é a redução promovida por, no mínimo, três nitroreduases. Estas reduções resultam de reações em cadeia, que levam à formação de espécies eletrofílicas que podem reagir com o DNA (BOSQUESI et al., 2008).

Apresentam, ainda, maior eficiência contra bactérias anaeróbias, devido ao sistema enzimático de redução do grupamento nitro altamente eficiente dos microrganismos (HOF, 1989).

Marshall et al. (1988) relataram que anaeróbios tem a capacidade redutora para ativar esses nitrocompostos, enquanto que bactérias aeróbias e células de

mamífero não possuem. No entanto, a *Helicobacter pylori*, um microaerófilo, foi suscetível a cinco 5-nitroimidazóis, sendo essa a primeira indicação de que o metabolismo desta bactéria teria sido único. Smith; Edwards (1997) e Jorgensen et al. (1998) em seus estudos forneceram evidências para a redução intracelular do metronidazol em isolados suscetíveis e níveis reduzidos em isolados resistentes.

As nitroredutases podem metabolizar compostos nitro através de enzimas produzidas pelos microrganismos da microbiota intestinal (incluindo aqueles envolvidos no metabolismo de carboidratos) e por enzimas presentes no citoplasma de células de mamíferos, como as xantinas oxidases, ou ainda, pelo citocromo P450 (NOVOTNY et al., 2006; OPH, 2010). Enzimas do fígado e de outros órgãos de mamíferos podem também catalisar a nitroredução, porém as nitroredutases da microbiota intestinal desempenham um papel mais importante nesse tipo de metabolismo (SWEENEY et al., 1994; UMBUZEIRO et al., 2005).

Pesquisadores têm mostrado que a presença de enzimas bacterianas capazes de reduzir os nitrofuranos tem sido o ponto crítico para suas ativações. Estirpes bacterianas sensíveis aos nitrofuranos tem apresentado uma flavoproteína, (pyruvate flavodoxin oxidoreductase), capaz de catalisar a redução desses fármacos (EDWARDS et al., 1993; RACE et al., 2005), e desde então, essa atividade de redução não tem estado presente em estirpes bacterianas resistentes às nitrofurazonas. Assim, tem-se concluído que esta enzima é quem converte a nitrofurazona para um composto capaz de danificar a célula (RACE et al., 2005).

O mecanismo de ação em nível molecular ainda não está totalmente estabelecido, uma vez que pode variar de acordo com diferenças estruturais dos compostos. A passagem transmembrana destas moléculas ocorre por difusão passiva e aumenta à medida que os radicais livres provenientes do processo de biorredução desestabilizam a membrana celular (PAULA et al., 2009).

Race et al. (2005) relataram que os produtos tóxicos formados após a redução da nitrofurazona e da nitrofurantoína permanecem desconhecidos. Alguns pesquisadores têm apontado em seus estudos que a reação pode prosseguir para redução do grupo nitro, formando hidroxilamina. Esta hidroxilamina produzida poderia reagir com as proteínas e com o DNA. Paula et al. (2009) revelaram que a redução completa destes compostos envolve seis elétrons até o derivado amino, embora o intermediário hidroxilamina, envolvendo quatro elétrons, seja o produto final da biorredução de alguns nitrocompostos.

Em meio anaeróbio, o nitro radical aniônico e a hidroxilamina formados são os principais intermediários ou metabólitos do processo de redução enzimática do grupo nitro até amino, podendo interagir com o DNA celular, resultando nos efeitos biológicos observados. Em meio aeróbio, o nitro radical aniônico gerado no processo de redução enzimática interage com o oxigênio presente no meio formando o radical O_2^- . Esse radical sofre ação de enzimas formando peróxido de hidrogênio, podendo ao final desestruturar membranas biológicas, liberando espécies reativas que são tóxicas para as células bacterianas e parasitárias (PAULA et al., 2009).

As propriedades tóxicas e químicas dos nitrofuranos têm limitado sua utilização como fármacos antinfeciosos sistêmicos. Após administração parenteral, têm ocorrido vômito, diarreia, sangramento do trato gastrointestinal, eosinofilia, perturbações oculares, sensibilização e outros efeitos indesejáveis (JONES et al., 1983). Segundo OPH (2010), os nitrofuranos são usados oralmente, topicamente e raramente por via parenteral. Estes variam na sua toxicidade e características de solubilidade, o que limita sua utilização clínica. A fim de se evitar hipersensibilização, Jones et al. (1983) revelaram que deve haver cuidado no tratamento de lesões cutâneas ulcerativas crônicas.

Os derivados nitrofurânicos são pró-carcinogênicos e mutagênicos e, em aves, seu principal efeito é a ocorrência de cardiomiopatia biventricular. Alguns nitrofuranos foram utilizados como quimioterápicos com atividade antimicrobiana na avicultura para tratamento e prevenção da coccidiose, salmonelose, infecções por *Mycoplasma gallisepticum* e enterites inespecíficas (PALERMO-NETO et al., 2005; PRATA; FUKUDA, 2001). Segundo o Ministério da Saúde (2003) em Lisboa/Portugal, a grande utilização dos nitrofuranos em animais para consumo humano ao longo dos anos, levou diversos comitês reconhecidos internacionalmente, como “International Agency for Research on Cancer” (IARC), “Joint Expert Committee on Food Additives” (JECFA) e “Scientific Committee on Animal Nutrition” (SCAN), a avaliarem os riscos oferecidos pela ingestão desses compostos.

Ainda em conformidade com o Ministério da Saúde (2003), após as avaliações, a nitrofurazona foi considerada um cancerígeno secundário, ou seja, não genotóxico, exercendo os seus efeitos em órgãos de resposta endócrina; a furazolidona com efeitos carcinogênicos e genotóxicos, a furaltadona um agente

possivelmente carcinogênico para humanos e a nitrofurantoína não sendo classificável quanto à carcinogenicidade.

Contrariamente à proibição total da utilização de nitrofuranos na produção animal, estes fármacos estão facilmente disponíveis para utilização na terapêutica veterinária e humana. A nitrofurazona é usada para tratamentos tópicos em queimaduras, infecções da pele e como antichagásico; a furazolidona é utilizada oralmente no combate a cólera e no combate a bactéria *Helicobacter pylori*, e a nitrofurantoína é comumente usada no tratamento de infecções do trato urinário (BENVENGO, 2005; VASS et al., 2008).

Algumas características dos fármacos nitrofurânicos utilizados nesta pesquisa foram relatadas para maior conhecimento. A Furazolidona N-(5-nitro-2-furfurilideno)-3-amino-2-oxazolidona é um pó cristalino amarelo que pode ser misturado com a ração. É eficaz contra *Salmonella* spp. que infecta o trato digestivo, entretanto algumas estirpes de *Salmonella gallinarum* são resistentes *in vivo* à furazolidona. Num surto tifóide em aves domésticas em reprodução, observou-se aumento da resistência no período de 39 dias. Administra-se furazolidona a frangos, perus e suínos para controlar diversas infecções do trato digestivo. O fármaco é usado no tratamento da enterite bacteriana, disenteria e giardíase. A absorção é incompleta e aparecem traços do fármaco na urina. A furazolidona é ativa como auxiliar na prevenção da coccidiose nos frangos (JONES et al., 1983).

A furazolidona é ativa contra as espécies de *Escherichia*, *Clostridium*, *Salmonella*, *Shigella*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Eimeria* e *Histomonas*. Este composto pode ser administrado tanto por via oral ou tópica. Em alguns países, em seres humanos, constitui uma alternativa no combate à bactéria *Helicobacter pylori* (OPH, 2010). Segundo Abadi et al. (2010), tem sido identificada alta taxa de estirpes de *Helicobacter pylori* resistentes à furazolidona no Irã, isso tem preocupado a classe médica, pois esse medicamento foi introduzido recentemente no país, não tendo sido a *H. pylori* amplamente exposta a este antimicrobiano

A Furaltadona possui espectro mediano de atividade antibacteriana e é prontamente absorvida pelo trato gastrointestinal. A distribuição metabólica do fármaco é desconhecida e aparecem na urina quantidades relativamente pequenas. Já se observam efeitos tóxicos indesejáveis em seres humanos após administração oral da furaltadona (JONES et al., 1983). É administrada para mastites e na prevenção de infecções intestinais (OPH, 2010).

A Nitrofurantoína N-(5-nitro-2-furfurilideno)-1-aminohidantoína é um pó amargo, amarelo, com leve odor e praticamente insolúvel na água. A Nitrofurantoína possui ampla ação antibacteriana contra organismos Gram-positivos e Gram-negativos; é rápida e completamente absorvida pelo trato gastrointestinal, não afeta a microbiota intestinal em qualquer grau significativo. Cerca de 40% do fármaco são eliminados na urina e as concentrações excretadas na urina são bactericidas (JONES et al., 1983). É utilizada por via oral no tratamento de infecções urinárias de origem bacteriana (*E. coli*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes* e *Enterobacter aerogenes*) (OPH, 2010).

A Nitrofurazona (5-nitro-2-furaldeído semicarbazona) é um antimicrobiano utilizado desde 1945 para tratamentos de infecções da pele e no combate ao tripanossoma (IARC, 2009). É um pó cristalino, amarelo, sem odor ou sabor, termoestável e levemente solúvel em água. Foi utilizada localmente, mas tem pouco valor como fármaco quimioterápico sistêmico, tendo sido utilizada para tratar feridas e doenças da pele, ouvido, olho e trato reprodutor (JONES et al., 1983). Possui espectro de ação similar à nitrofurantoína, mas é utilizada primariamente para tratamento de mastite, metrite e feridas em bovinos. Também como APC para o controle de infecção bacteriana e coccidiose (OPH, 2010).

Atentando-se às informações pertinentes ao Ministério da Agricultura (2003), as avaliações efetuadas pela União Europeia que resultaram na proibição dos nitrofuranos em animais para produção de alimentos, foram efetuadas para definir LMR (Limite Máximo de Resíduo). É revelado como o teor de resíduo que pode estar presente num determinado alimento sem colocar em risco a saúde do consumidor, considerando a ingestão diária de cada substância ao longo de toda sua vida (aproximadamente 70 anos). Partindo desse pressuposto, para nenhuma das substâncias em causa foi estabelecido à respectiva Ingestão Diária Admissível - IDA ("Admissible Daily Intake") e conseqüentemente o seu Limite Máximo de Resíduos.

2.5 RESISTÊNCIA BACTERIANA

Os mecanismos da resistência bacteriana são complexos, variados e não completamente conhecidos (KONEMAN et al., 2006; PALERMO-NETO et al., 2005). No entanto, para compreender os mecanismos da resistência bacteriana é necessário compreender a fisiologia das bactérias, o mecanismo de ação dos

fármacos antimicrobianos e a biologia molecular dos agentes infecciosos (KONEMAN et al., 2006).

Três condições devem ser preenchidas para que um antimicrobiano iniba ou destrua uma bactéria: a existência de um alvo, ter a capacidade de atingir o alvo e não pode ser inativado antes de atingi-lo (TRABULSI; ALTERTHUM, 2008).

Segundo Palermo-Neto et al. (2005), os principais mecanismos de resistência aos antimicrobianos englobam a inativação enzimática, alteração do seu alvo celular e redução do nível intracelular do antimicrobiano. A inativação enzimática consiste na atuação de enzimas bacterianas sobre o princípio ativo do antimicrobiano e também o que se refere a alterações induzidas no local de ação dos antimicrobianos. A segunda estratégia de resistência consiste em alteração do alvo celular, alterando o alvo do antimicrobiano. E finalmente, através de bombas de efluxo capazes de expulsar o antimicrobiano para fora da célula bacteriana, reduzindo rapidamente seu nível intracelular.

2.5.1 Mecanismo de transmissão de resistência

As bactérias podem ser classificadas em sensíveis e resistentes aos antimicrobianos. Em geral, classificam-se como resistentes as bactérias que crescem *in vitro*, nas concentrações que os antimicrobianos atingem no sangue quando administrados nas recomendações de uso clínico (TRABULSI; ALTERTHUM, 2008).

A resistência pode ser natural ou adquirida, a natural (resistência primária) corresponde a uma característica da espécie bacteriana e todas as amostras desta espécie têm esta propriedade. Somente concentrações inviáveis *in vivo* exerceriam algum efeito sobre as estirpes bacterianas. Na adquirida (resistência secundária), sob exposição continuada a antimicrobianos, somente parte das amostras é resistente (FUCHS; WANNMACHER, 1999; TRABULSI; ALTHERTUM, 2008) podendo ocorrer por acaso (mutação) (DECAMP; MORIARTY, 2006) ou por transferência de genes de resistência, podendo ser cromossômica como extracromossômica (PALERMO-NETO et al., 2006b). Quando o microrganismo é resistente a um só antimicrobiano denomina-se resistência simples, porém, quando é simultaneamente a dois ou mais antimicrobianos, denomina-se resistência múltipla (TAVARES, 2001).

O estudo do genoma através do sequenciamento do cromossomo e de vários plasmídios de enterobactérias tem delineado um quadro, mediante análises comparativas dos genomas sequenciados, revelando a constituição de um cerne comum a todas as espécies o qual é marcado por sequência de inserção, do inglês “Insertion Sequence” (IS), fagos, ilhas de patogenicidade, pseudogenes, sequências repetidas, mutações e deleções que explicariam as diferenças entre as espécies (TRABULSI; ALTHERTUM, 2008)

O antimicrobiano não induz a resistência, e sim um selecionador dos mais resistentes existentes no meio de uma população (TRABULSI; ALTHERTUM, 2008). É consenso na comunidade internacional que o uso de antimicrobianos em seres humanos, em animais, plantas, ou até mesmo em processamento de alimentos pode contribuir para a resistência microbiana (PALERMO-NETO et al., 2006b; PHILLIPS et al., 2004), entretanto, o surgimento e a própria magnitude da resistência variam em função do microrganismo que está sob pressão seletiva, do antimicrobiano e, também, do hospedeiro (PALERMO-NETO et al., 2006b).

Miranda et al. (2008) avaliaram a resistência de estirpes de enterobactérias isoladas de carne de frango orgânico, carne de frango criado no sistema convencional e carne de peru criado no sistema convencional. Os autores encontraram maior número de enterobacteriaceae em carne de frango criado no sistema orgânico, porém, as estirpes isoladas da carne de frango orgânico foram mais sensíveis que as estirpes isoladas dos outros tipos de carne. Estirpes multi-resistentes foram encontradas em todos os grupos, porém foram mais altas em frangos criados no sistema convencional. Assim, tendo em vista os dados obtidos para resistência antimicrobiana, os autores defendem a teoria de que embora as amostras analisadas de carne de frango orgânico possuíssem maior contaminação por enterobacteriaceae, a prática de criação orgânica contribui para o decréscimo de resistência antimicrobiana.

A aquisição de resistência por uma célula bacteriana sensível é sempre decorrência de uma alteração genética que se expressa bioquimicamente (TRABULSI; ALTHERTUM, 2008), que pode ser originada de mutação cromossômica ou, pela aquisição de material genético (plasmídios de resistência ou por transposons): a denominada transferência de genes de resistência (transferência horizontal ou lateral) (PALERMO-NETO et al., 2006a; TRABULSI; ALTHERTUM, 2008).

Ozgumus et al. (2008) identificaram aleatoriamente em um hospital universitário na Turquia 20 estirpes de enterobactérias de pacientes com resistência a múltiplos fármacos e disseminação por plasmídios de resistência. Foram identificadas *Escherichia coli* (n=9), *Klebsiella pneumoniae* (n=7), *Klebsiella oxytoca* (n=2) e *Enterobacter aerogenes* (n=2), e a detecção de plasmídios epidêmicos foi realizada por análise do plasmídio R com a enzima de restrição EcoRI (enzima endonuclease isolada de estirpes de *E. coli*). Estes autores observaram que a maioria dos plasmídios carregavam genes derivados de TEM e SHV. Mediante evidências epidemiológicas, indicaram que havia uma aparente transferência horizontal dos plasmídios R conjugativos entre as enterobactérias multirresistentes neste hospital.

Silva e Duarte (2002) sugeriram que genes de resistência aos fármacos podem estar associados à virulência ou, pelo menos, as estirpes humanas têm apresentado um perfil de resistência mais elevado do que aquele encontrado nas amostras não-humanas, o que torna a situação ainda mais preocupante do ponto de vista de saúde coletiva.

Mediante incertezas, Perfeito et al. (2007), determinaram o percentual de mutação genômica que gerou mutações benéficas e seus efeitos sobre a forma física em *Escherichia coli* em comparação com condições em que o efeito da competição entre linhagens levando diferentes mutações benéficas é minimizado. Foi encontrado o percentual na ordem de 10^{-5} por genoma por geração, que é 1000 vezes maior que a previsão estimada, e mediante um benefício na seleção de 1%. Semelhante percentual de evolução adaptativa tem implicações na evolução de resistência a antimicrobianos e patogenicidade. Os autores ainda concluíram que a evolução pela seleção natural está direcionada para a geração contínua de mutações adaptativas.

Aquisição de resistência devido às alterações na estrutura química ou física do DNA é denominada mutação, a qual pode ser ocasionada por agentes genotóxicos. O organismo não exposto a um mutágeno é chamado tipo selvagem, enquanto o organismo com alterações resultantes da ação destes agentes é um mutante. As mutações são fonte de uma grande variabilidade genética, e sem as quais o processo de adaptação não seria possível. Portanto, existe tendência a uma variabilidade herdada de uma geração a outra. Conforme o agente, as mutações podem ser espontâneas ou induzidas. As espontâneas podem ser causadas por

erros durante a replicação do DNA ou pela exposição do organismo a influências extracelulares do meio ambiente, como radiações ou agentes químicos. As mutações induzidas são produto de uma ação deliberada na qual o organismo é exposto à ação de um agente genotóxico. Foram descobertos em *E. coli* genes mutadores, que elevam a frequência de mutação, por exemplo, o gene que produz a RNA polimerase termolábil. Essa enzima insere nucleotídeos incorretamente durante a replicação a uma taxa maior que a da enzima da linhagem selvagem. Quando a mutação permanece estável, pode ser transferida a outras gerações (TRABULSI; ALTHERTUM, 2008).

Quanto à transferência de genes de resistência, tanto os genes de resistência cromossômica como extracromossômica podem ser transferidos por quatro mecanismos: Conjugação, Transdução, Transposição e Transformação (KHARDORI, 2006; PALERMO-NETO et al., 2005; TRABULSI; ALTHERTUM, 2008).

Segundo Koneman et al. (2006), os genes para o mecanismo de resistência podem estar localizados no cromossomo ou em um elemento extracromossomal denominado plasmídio. Os plasmídios são fragmentos circulares de DNA que atuam independentemente do cromossomo. A importância clínica da diferença é que o DNA cromossômico é relativamente estável, enquanto o DNA do plasmídio é facilmente mobilizado de uma estirpe para outra, uma espécie para outra. Além disso, a ligação de genes de resistência para múltiplos agentes antimicrobianos em um plasmídeo permite a transferência volumosa da resistência que caracteriza muitos dos microrganismos recentemente resistentes.

Uma das maiores dificuldades da terapêutica no combate às infecções causadas por bactérias surge devido à transferência dos plasmídios que possuem genes de resistência. Estes plasmídios podem não estar presentes em números expressivos, mas, no caso de haver uma pressão seletiva, produz-se uma seleção das estirpes aumentando o seu número. Um único plasmídio pode conter vários genes codificadores de resistência e conferir um fenótipo multirresistente à estirpe onde se insere (SÁENZ, 2004).

O mecanismo mais comum pelo qual os genes de resistência são transferidos é o da Conjugação, visto que um fator de transferência genética adicional é necessário antes que o plasmídio que carrega um gene de resistência se mova de um microrganismo para outro (KHARDORI, 2006; KONEMAN et al., 2006). A transferência de resistência por conjugação é feita por ponte citoplasmática

estabelecida entre duas bactérias, e uma das quais deve possuir o fator da fertilidade (Fator F) para que este processo ocorra (PALERMO-NETO et al., 2006b).

Essa transferência foi observada na década de 70 por Magalhães e Vêras (1975), que através de amostras polirresistentes de *Salmonella typhimurium* isoladas de crianças com menos de dois anos de idade transferiam determinante R através do processo de conjugação para a *Escherichia coli* K12, e todas as culturas foram resistentes à ampicilina, cloranfenicol, neomicina, estreptomicina, sulfas e tetraciclina, e mais da metade das culturas apresentou também outros determinantes de resistência a cefalosporina, furazolidona, ácido nalidíxico e gentamicina.

A transferência direta de material genético entre duas bactérias ocorre de modo que esse material não entre em contato com o ambiente, sendo necessário um contato físico (ROE; PILLAI, 2006).

Esse contato físico entre duas células bacterianas permite que os genes de resistência contidos em plasmídios sejam transferidos entre as bactérias, de maneira que a célula doadora mantenha algumas cópias do plasmídio, e a célula receptora torne-se uma doadora em potencial. Na transdução o gene de resistência é transferido de uma bactéria para outra por um bacteriófago (vírus de bactérias). Para tanto, o bacteriófago introduz o seu material genético numa bactéria que possui um gene de resistência. O material genético torna-se desorganizado e passa a produzir o material genético e a cápsula do bacteriófago. A bactéria é destruída e libera no meio os bacteriófagos que vão infectar outras bactérias. O bacteriófago que capturou o gene de resistência infecta uma bactéria sensível ao antimicrobiano e lança no seu interior o gene de resistência que pode ser incorporado ao seu material genético ou ao plasmídio (PALERMO-NETO et al., 2006b).

Em relação à transposição há participação de transposons, que são segmentos de DNA que podem ser transferidos de uma molécula de DNA para outra por meio de transferência conjugal (transposon conjugativo ou “gene saltador”). O resultado pode ser um mosaico do material genético provenientes da bactéria doadora e receptora (KONEMAN et al., 2006).

Os elementos móveis foram compreendidos pela primeira vez durante o estudo molecular de determinadas mutações na *E. coli* causadas pela inserção espontânea de uma sequência de DNA de aproximadamente 1 a 2 Kb de comprimento no meio de um gene. Esses segmentos de DNA inseridos são chamados de sequência de inserção ou elementos IS. Mais de 20 elementos IS

foram descobertos na *E. coli* e em outras bactérias. Uma característica importante nos elementos IS é a presença de uma pequena sequência de repetição direta, contendo de cinco a 11 pares de base, imediatamente adjacente as duas extremidades do elemento de inserção. A duplicação da sequência do sítio-alvo, originando a segunda repetição direta adjacente à Sequência de Inserção, ocorre durante o processo de inserção. Assim, a transposase cliva com precisão o elemento IS (Sequência de Inserção) do doador de DNA, produz clivagens em pequena sequência do DNA alvo, e liga a extremidade. Finalmente a DNA polimerase da célula hospedeira preenche os intervalos de fita simples, produzindo as pequenas sequências de repetição direta que flanqueiam os elementos IS, e a DNA ligase une as extremidades livres (LODISH et al., 2007).

A transferência de genes de resistência pode ocorrer por cromossomo para um plasmídeo ou para um bacteriófago, de um plasmídeo para o cromossomo ou para outro plasmídeo, contudo, diferentemente do plasmídeo, os transposons não são capazes de replicar-se independentemente. Ao se incorporarem ao cromossomo bacteriano ou ao plasmídeo, podem manter-se estáveis e replicar-se junto com o DNA bacteriano (LODISH et al., 2007; PALERMO-NETO et al., 2005). A transformação é um processo pelo qual o DNA na forma livre é incorporado por uma célula receptora, que pode passar a apresentar alterações genéticas. Uma única célula normalmente incorpora apenas um ou poucos fragmentos de DNA, de maneira que uma pequena proporção dos genes de uma célula é transferida a outra, em um único evento de transformação (MADIGAN et al., 2004).

Apesar das taxas de transformação *in vitro* serem elevadas, as taxas *in vivo* ocorrem em menor intensidade devido à sensibilidade do material genético ao meio, e pelo fato de que nem toda célula possui o “maquinário metabólico” capaz de absorver o material (COURVALIN, 2006; EDENS, 2003; ROE; PILLAI, 2006).

A célula capaz de captar a molécula de DNA e ser transformada é chamada de competente. Essa capacidade é determinada geneticamente, sendo que proteínas especiais desempenham papel na captação e no processamento do DNA. As bactérias exibem diferenças em relação à forma do DNA captado, embora em ambos os casos, apenas moléculas de DNA de fita simples penetrem no citoplasma. Em bactéria Gram-negativa, há evidência indicando que o DNA de fita dupla é degradado à forma de fita simples no espaço periplasmático, sendo somente uma fita simples transportada ao citoplasma. Enquanto que em Gram-positiva, o DNA é

captado na forma de fita simples, sendo a fita complementar simultaneamente degradada durante o processo. Entretanto, moléculas de fita dupla se ligam com maior eficiência às células. As bactérias tornam-se competentes em seus ambientes naturais, desempenhando papel na transferência de genes na natureza (MADIGAN et al., 2004).

Os Integrons são pequenos sistemas genéticos modulares móveis envolvidos na aquisição e disseminação de genes de resistência aos antimicrobianos em bactérias Gram-negativas, particularmente entre enterobactérias. Um integron é uma estrutura genética que inclui os determinantes de um sistema de recombinação sítio-específica capaz de capturar e mobilizar genes contidos em elementos genéticos móveis denominados cassetes de genes. Os componentes essenciais de um integron são: o gene *int*, localizado no segmento 5', que codifica uma recombinase sítio-específica; a integrase, um sítio adjacente *att*, localizado na extremidade do segmento conservado 5', que é reconhecido pela integrase, para a integração de cassetes de genes de resistência e um promotor orientado para a expressão do cassete de genes (TRABULSI; ALTHERTUM, 2008).

Segundo os mesmos autores, cassetes de genes são elementos móveis de DNA que contêm um sítio específico de recombinação, um elemento conhecido como "59 – base" e é reconhecido pelo sistema de recombinação sítio-específico do integron. O segmento 5' codifica uma recombinase sítio-específica (integrase) e promotor ou promotores fortes que asseguram a expressão dos cassetes integrados. A integrase é responsável pela inserção de genes de resistência aos antimicrobianos. Genes que constituem os cassetes tiveram, provavelmente, suas origens num "pool" de genes de resistência que, acredita-se, surgiram há centenas de milhões de anos de bactérias do solo produtoras de antimicrobianos; podendo ter sido originários também de bactérias resistentes ou mesmo de moléculas de DNA codificando resistência, encontradas no meio ambiente.

Sáenz et al. (2004) confirmaram uma dessas hipóteses ao verificarem que 17 estirpes não patogênicas de *Escherichia coli* isoladas de seres humanos, animais e alimentos foram resistentes a múltiplos antimicrobianos, alguns dos quais eram portadores de integrons da classe 1 e classe 2. Foram identificados aminoácidos trocados e mutação para quinze e quatorze estirpes de *E. coli* respectivamente.

Integrons também foram detectados através de PCR em 59 de 120 *Enterobacteriaceae* isoladas do trato urinário usando degenerado "primers" alvo para

conservar regiões de classe 1, 2 e 3 da integração de genes. A PCR seqüenciou a análise de uma variedade de cassetes revelando uma predominância de cassetes que conferem resistência a aminoglicosídeos e trimetoprim (WHITE et al., 2001)

2.5.2 Forma de aquisição de bactérias resistentes

Os alimentos contêm potencial para veicular grande número de microrganismos, em sua maior parte inofensivos aos seres humanos, e, nem todo alimento que alberga um ou mais microrganismos patogênicos ou oportunistas causará necessariamente uma doença se for consumido (FRANCO; LANDGRAF, 2003), até porque algumas bactérias patogênicas constituem parte da microbiota intestinal, salvo se superarem barreiras orgânicas, como o pH e as enzimas gástricas, o muco, a microbiota normal do trato gastrointestinal e a ação de leucócitos do sistema imune, podendo, assim, causar infecção e intoxicação (PALERMO-NETO et al., 2005).

O trato intestinal de humanos e animais é o principal reservatório de agentes etiológicos. A matéria fecal animal é de maior importância que a de seres humanos, e animais podem tornar-se contaminados por meio de fontes fecais (JAY, 2005).

Mais de 74% dos incidentes de toxinfecções alimentares em que um veículo alimentar é estabelecido, pratos à base de carne ou frango são os incriminados (HOBBS; ROBERTS, 1998), e de acordo com os últimos dados da Secretaria de vigilância em Saúde do Ministério da Saúde, no período de 2000 a 2011, aproximadamente 50% dos alimentos envolvidos em surtos alimentares são carnes bovina, suína, aves e principalmente ovos e derivados (MS, 2011).

Segundo Palermo-Neto et al. (2006a), a maior preocupação se refere à ingestão de alimentos contaminados com bactérias resistentes, uma vez que a terapia antimicrobiana pode ser ineficaz. No entanto, as consequências do uso indevido de antimicrobianos na produção animal, cujos resíduos além de apresentarem um impacto indireto, via a possibilidade de indução do surgimento de resistência bacteriana, apresentaram efeitos tóxicos diretos para o consumidor, e causam transtornos na microbiota do meio ambiente. Na OMS e OIE são considerados que as bactérias prioritárias para monitorização da presença de resistência em animais de produção e em seus respectivos alimentos são: *Salmonella* spp., *Campylobacter* spp., *Escherichia coli* e *Enterococcus* spp.

Al-Ghamdi et al. (1999) descreveram que a resistência de isolados de *Escherichia coli* tem sido alarmantemente alta, associada a diversos fármacos, relatada através de isolados de trabalhadores de matadouros de aves, pacientes hospitalizados e em frangos com altos índices de *E. coli*. Estes autores também relataram que os antimicrobianos na Arábia Saudita são utilizados para uso veterinário de forma limitada, no entanto, dentre os sorotipos isolados e resistentes, a *Escherichia coli* foi isolada em 27% dos pacientes hospitalizados, sendo coincidentes com 10,9% de isolados de frangos, indicando assim a possibilidade das aves serem a fonte da resistência bacteriana em humanos.

Pesquisadores alertam que as infecções do trato urinário em humanos estão cada vez mais difíceis de tratar devido ao aumento das resistências aos atuais antimicrobianos. O problema, segundo os especialistas, tem origem no uso excessivo de antimicrobianos na pecuária, que depois entram na cadeia alimentar. Em trabalho da equipe de cientistas da Universidade de Hong Kong foi revelado que a resistência aos antimicrobianos é transmitida dessa forma, dos animais para humanos. O foco do trabalho foi a *Escherichia coli*, responsável pela maioria das infecções urinárias em humanos, sendo detectado um gene idêntico responsável pela resistência aos antimicrobianos, tanto em humanos como nos animais. O gene, designado por *aacC2*, codifica a resistência à gentamicina, um antimicrobiano de uso comum, e foi identificado em cerca de 80% das 249 análises de animais e de humanos (AVICULTURA INDUSTRIAL, 2010).

Silva e Duarte (2002) concluíram que estirpes de *Salmonella* Enteritidis podem desenvolver resistência pelo uso indiscriminado de fármacos no seu país de origem ou através da importação de alimentos contaminados com bactérias transportando genes de resistência ou de pessoas infectadas que retornam de viagens internacionais.

Segundo Lourenço et al. (2007), ao avaliarem a susceptibilidade antimicrobiana de enterobactérias presentes em água salgada, observaram um perfil significativo, especialmente com relação à gentamicina, netilmicina e ciprofloxacina. A amoxicilina/ácido clavulânico e ampicilina foram responsáveis pelo maior percentual de estirpes resistentes, ocorrendo a predominância de bactérias resistentes ao fármaco β -lactâmico.

A transferência de bactérias resistentes para humanos via cadeia alimentar, é uma preocupação importante para a saúde. Em comparação com estudos de

alimentos de animais de produção de ambiente terrestre, existem menos estudos sobre resistência de antimicrobianos que em bactérias de ambientes aquícolas. Os pesquisadores usam estes estudos como base para proporcionar uma melhor visualização do risco que existe de transferência de microrganismos resistentes para o meio-ambiente e principalmente para humanos através do consumo de produtos aquícolas (AKINBOWALE et al., 2006)

Os microrganismos podem se mover com grande facilidade entre os ecossistemas de seres humanos e animais para o solo e a água e vice-versa. Portanto, genes resistentes adquiridos por organismos num ecossistema podem ser facilmente transferidos entre organismos em diferentes ecossistemas (NWOSU, 2001).

Compostos antimicrobianos veterinários utilizados podem também contaminar solos agricultáveis via fertilização com estrume de animais que foram submetidos à antimicrobianoterapia através de antimicrobianos que possuem uma baixa metabolização no corpo do animal (KARCI et al., 2009). Quando dejetos oriundos da produção animal (suínos, bovinos e aves) não são tratados corretamente, constitui-se num sério risco a contaminação do meio ambiente, principalmente da água (PETERSEN et al., 2002).

Espigares et al. (2006) isolaram 21 sorotipos de *Salmonella* spp. de águas residuais de uma indústria de alimentos, sendo 11 sorotipos da água sem tratamento e 10 da água tratada, que foram comparadas antes e depois de tratamento convencional de detritos (lodo ativado). Os pesquisadores objetivaram determinar se o tratamento afetou todos os sorotipos, e se causou efeito na composição plasmídica, seleção de sorotipos resistentes a antimicrobianos e desinfetantes. Os pesquisadores demonstraram não haver diferença significativa nas amostras isoladas antes e depois do tratamento, indicando assim que o tratamento convencional de detritos não constitui um fator de risco na seleção de sorotipos de *Salmonella* spp. com grande potencial patogênico.

Schneider et al. (2009) relataram que em ambientes aquáticos, os perfis de resistência encontrados em amostras de *Escherichia coli* apresentam grande variabilidade, segundo a origem da água, pois dos 205 isolados de *Escherichia coli* de água superficial e água subterrânea, verificaram que 86,14% das linhagens de *E. coli* isoladas, foram resistentes a pelo menos um antimicrobiano. Mckeon et al. (1995) encontraram também elevados índices de resistência em coliformes isolados

de águas subterrâneas, e comprovaram a transferência *in vitro* de resistência à ampicilina entre amostras ambientais resistentes e sensíveis. Mais de 90% de todos os isolados foram resistentes a pelo menos um antimicrobiano.

Segundo Franco (2006), as aves podem contaminar-se de três maneiras diferentes, através dos pais e avós (transmissão vertical), pelo contato com superfícies contaminadas, insetos, aves silvestres, roedores etc., e através do consumo de ração contaminada (transmissão horizontal). E concluiu que a maioria dos sorovares de *Salmonella* spp. pode ser encontrada no conteúdo intestinal das aves e excretada pelas fezes, podendo contaminar ovos durante a postura e distribuindo o microrganismo pelo incubatório.

Foram isoladas bactérias da família *Enterobacteriaceae* em adultos de *A. diaperinus* (cascudinho) e também na cama de frango de granjas avícolas do oeste do Paraná. Não foram isoladas *Salmonella* spp. do inseto e nem da cama, e *Proteus vulgaris* foi predominante. *E. coli* foi frequente nas granjas, tanto na cama como nos insetos, podendo contribuir na disseminação da colibacilose em aviários (CHERNAKI-LEFFER, 2002).

O Problema é extremamente preocupante, sendo considerado como alerta às autoridades devido ao surgimento de bactérias comensais resistentes a antimicrobianos. Um grupo de pesquisadores do projeto ANTRES (Controle do uso e resistência de antimicrobianos utilizados por países de baixa renda – um estudo de intervenção na América Latina), do inglês, ANTRES (Towards Controlling Antimicrobial Use and Resistance in Low-income Countries—An Intervention Study in Latin America), identificaram alta taxa de transmissão de *E. coli* fecal comensal em crianças da pré-escola em 2002 na Bolívia e no Peru, resistentes a diversos antimicrobianos, especialmente fármacos antigos. Em 2005 foi avaliada a evolução de fármacos antimicrobianos resistentes nas mesmas áreas. O mesmo estudo foi realizado em 2005 com crianças de idade entre seis e 72 meses de idade, nas mesmas quatro áreas. Não houve diferença significativa entre sexo e idade, entre crianças nos estudos de 2002 e 2005. Comparando a resistência aos antimicrobianos nos dois anos estudados, ocorreu limitada relevância epidemiológica no resultado, porém houve extraordinário aumento na taxa de resistência das fluoroquinolonas e cefalosporinas de espectro expandido. O aumento da resistência à cefalosporinas de espectro expandido se deve a transmissão da enzima do tipo CTX-M determinante de β -lactamase de espectro expandido. Essa taxa de aumento

de resistência tem sido observada em diversas partes do mundo, dificultando o tratamento infeccioso. Esse tipo de resistência de bactérias comensais originadas de pessoas não hospitalizadas tem sido descrito como um fenômeno emergente. Embora não tenha sido esclarecido claramente o fenômeno, isso se torna uma ameaça à saúde coletiva nas comunidades e hospitais. O aumento da prevalência de resistência das estirpes de *E. coli* em crianças na pré-escola provavelmente reflete o aumento da exposição entre familiares contaminados e a cadeia alimentar, ou ambos (BARTOLONI et al., 2008).

A transferência de bactérias resistentes é muito importante, principalmente porque sabe-se da existência da relação íntima entre ecossistemas humanos, suínos, bovinos, aves e cadeias produtivas de alimentos, que deve-se levar em conta não só o consumo de alimentos, como também o caráter ocupacional dessa infecção (WHITE et al., 2006).

É conhecida a ocorrência de epidemia de *E. coli* na Europa e segundo Mangia (2011) a estirpe STEC (produtora de toxina Shiga) incriminada adquiriu sequências específicas que parecem ser semelhantes às envolvidas na patogênese da colite hemorrágica e síndrome hemolítica urêmica. Pesquisadores revelaram ainda que a bactéria é carreadora de diversos genes codificadores de resistência para antimicrobianos. Diferentemente dos demais patótipos de *E. coli*, as STEC tem potencial zoonótico e geralmente os animais portadores desses microrganismos são assintomáticos. As STEC podem ser encontradas no trato gastrointestinal de uma variedade de animais como, suínos, ovinos, aves e até entre cães e gatos; entretanto, os bovinos representam o principal reservatório. Conseqüentemente, o contato direto ou indireto com amostras fecais desses animais é identificado como a principal via de transmissão desses patógenos. A contaminação ambiental de STEC em terras de pastagens e em águas de irrigação justificariam a detecção desses patógenos em produtos variados como legumes, verduras e frutas. Neste surto os pesquisadores com base nos indícios epidemiológicos têm sustentado a hipótese de que o consumo de vegetais crus contaminados por STEC seja a origem da infecção. Nos relatos mais recentes os brotos de feijão cultivados em uma fazenda de produtos orgânicos no norte da Alemanha foram apontados como a provável fonte da infecção. Uma vez esclarecida a principal fonte de contaminação alimentar, esforços serão concentrados no sentido de identificar a procedência do gado bovino para a tomada de ações mais específicas no controle da infecção.

Segundo Pessanha e Gontijo Filho (2001), foi evidenciada a presença de bactérias Gram negativas da família *Enterobacteriaceae* resistentes e multirresistentes em frangos de corte, que eram prevalentes quando das primeiras coletas de fezes na granja, observando-se pouca variação nas suas frequências ao longo do ciclo de criação. Neste estudo foi demonstrado que os frangos de corte podem funcionar como reservatórios de genes de resistência a antimicrobianos importantes em medicina veterinária e humana, embora a situação possa estar mais relacionada com as condições sanitárias da granja investigada, o uso do promotor de crescimento na ração pode contribuir para a prevalência de isolados multirresistentes.

Assim, envolvidos com o mecanismo de transmissão de resistência antimicrobiana, a *Escherichia coli* é um dos principais patógenos presentes na produção animal e se caracteriza pela alta resistência aos agentes antimicrobianos (COSTA et al., 2009). Ainda segundo os autores, a habilidade deste patógeno na transmissão horizontal da resistência aos antimicrobianos decorre de vários mecanismos genéticos e possui sérias implicações à saúde coletiva, e dentre os problemas associados à disseminação da resistência múltipla aos antimicrobianos, cita-se a contaminação dos seres humanos e dos animais por bactérias patogênicas de difícil controle terapêutico, principalmente por meio dos alimentos e de ambientes contaminados

Hernández et al. (2004) verificaram que o problema da resistência microbiana está aumentando e a perspectiva para o uso de fármacos antimicrobianos no futuro é ainda indecisa. Portanto, ações devem ser tomadas para reduzir esse problema, como desenvolver pesquisas para a melhor compreensão do mecanismo genético de resistência, e dar continuidade aos estudos para o desenvolvimento de novos fármacos. A propósito, nas últimas décadas o uso de componentes das plantas na área farmacêutica tem gradualmente aumentado no Brasil, assim, seria a melhor fonte segundo a OMS para obter-se uma variedade de fármacos.

Bactérias resistentes a antimicrobianos existem naturalmente em qualquer população e são selecionadas pelo uso do antimicrobiano, que elimina apenas aquelas sensíveis. O uso continuado destes compostos seleciona clones resistentes a vários antimicrobianos, chegando ao ponto em que apenas um antimicrobiano permanece eficiente, como é o caso de algumas amostras de estafilococos sensíveis apenas à vancomicina. Estas amostras, por sua vez, poderão ser selecionadas para

resistência inclusive a este antimicrobiano, deixando as infecções por aquela bactéria sem opção de tratamento (EMBRAPA AVES E SUÍNOS, 2005).

No entanto, se a microbiota possui genes de resistência e a comunidade utiliza o fármaco persistentemente, bactérias capazes de sobreviver ao fármaco irão emergir e se multiplicar. A administração de antimicrobianos afeta as bactérias que estão no ambiente, nas pessoas e nos animais. Assim, a resistência aos antimicrobianos que emerge em um lugar ou organismo pode se disseminar de forma ampla (LEVY, 1999)

Berchieri Júnior et al. (1987) confirmaram que os níveis de resistência aos antimicrobianos denotam o efeito nocivo da utilização indiscriminada dos fármacos antimicrobianos no combate as bactérias patogênicas nas granjas.

Em estudos norte americanos foram mencionados que do total de fármacos antimicrobianos produzidos, 40% desses são utilizados como aditivos na alimentação animal, principalmente em suínos (PETERSEN et al., 2002). Andrade (2007) estimou que mais de 50% dos antimicrobianos usados como APC sejam também usados na medicina humana.

A resistência bacteriana é um fenômeno biológico que vem sendo observado desde a introdução dos agentes antimicrobianos nas áreas médica e médico-veterinária. Entretanto, pesquisadores têm detectado um aumento considerável na proporção de microrganismos resistentes a um ou mais antimicrobianos, mostrando que nos últimos anos o problema vem se agravando com maior rapidez, em comparação ao ocorrido em décadas anteriores (PALERMO-NETO et al., 2006b).

Os principais obstáculos no enfrentamento à resistência a antimicrobianos são: a indicação injustificada de antimicrobianos por médicos no tratamento de infecções respiratórias agudas causadas por vírus sincicial respiratório; o número limitado de novos antimicrobianos para tratar infecções bacterianas graves, particularmente no ambiente hospitalar; o comércio ilegal de antimicrobianos e a falsificação de medicamentos. A auto-medicação, muito comum em países da América Latina, assim como o uso indiscriminado por médicos, dentistas e veterinários, também são importantes fatores (SOSA, 2006).

Para Levy (1999), a utilização de antimicrobianos em doses baixas como a utilizada em rações de aves é a fórmula perfeita para a seleção crescente de bactérias resistentes nas aves tratadas, as quais podem passar os microrganismos resistentes aos profissionais da avicultura ou para as pessoas que preparam e

consomem matrizes alimentícias avícolas. Dessa forma, Al-Ghamdi et al. (1999) concluíram que devam banir o uso de antimicrobianos como promotores de crescimento e recomendam o uso restrito para tratamento infeccioso em aves.

Apenas 10% do total de antimicrobianos produzidos no planeta são usados como APC. Porém, o seu uso contínuo é que representa um problema por selecionar constantemente as bactérias com genes de resistência, que podem inclusive ser transferidos para outras bactérias nos animais, e, mesmo que pese a controvérsia, às bactérias do trato digestivo humano. Há evidências de que o uso de APC em animais acarretam a seleção de genes que passam à microbiota humana. Também existem, entretanto, problemas inerentes ao método científico que colaboram com a controvérsia. Mesmo que duas amostras de bactérias, isoladas de um frango e de um consumidor, tenham o mesmo perfil de resistência a antimicrobianos e se comportem de maneira semelhante em várias análises de laboratório, sempre restará a possibilidade de que tenham tido origens diferentes. Um problema mais sério, para quem vive da produção, é que não há dúvidas que o uso de APC acarreta resistência na microbiota do próprio animal (EMBRAPA AVES E SUÍNOS, 2005).

Palermo-Neto (2006a) apresentou em conferência a avaliação de risco no desenvolvimento da resistência aos antimicrobianos em Medicina Veterinária. O especialista defendeu que o uso desses fármacos em animais pode não representar a única fonte de risco e que a proibição de seu uso nem sempre é a melhor solução. O autor ainda relatou que houve o banimento do uso de antimicrobianos para fins preventivos e aditivos em animais na Dinamarca, onde a Organização Mundial de Saúde avaliou as consequências dessa proibição e constatou que o uso para fins terapêuticos aumentou.

Contra-pondo-se a este perigo é recomendável o emprego de antimicrobianos não utilizados em medicina humana, ainda que alguns antimicrobianos sejam para ambas as finalidades, como a clortetraciclina e a oxitetraciclina (FUKUDA, 2001; PARDI et al.; 2001).

A ocorrência de bactérias resistentes a antimicrobianos em alimentos de origem animal é a maior ameaça à saúde coletiva. Informações sobre a prevalência de resistência para fármacos específicos em bactérias e espécies animais, juntamente com mudanças ocorridas durante o tempo, são necessárias para entender a magnitude dos problemas e estabelecer princípios para a tomada de

ações (CAPRIOLI et al., 2000). Segundo os autores existem diversas razões para monitoramento do fármaco resistente, onde uma é para obtenção de dados que ajudariam os médicos a escolher o fármaco correto para o paciente, a outra razão objetiva o aspecto da saúde coletiva para proteção dos consumidores frente aos microrganismos resistentes aos fármacos.

Numerosas organizações governamentais e não-governamentais tem discutido em detalhes a questão da resistência bacteriana com especialistas e empresas interessadas. A conclusão do resultado dessas conferências é que os fármacos antimicrobianos e o desenvolvimento de resistência em humanos e animais são inter-relacionados e métodos devem ser estabelecidos para monitorar a resistência antimicrobiana em bactérias patogênicas e comensais de origem animal (CAPRIOLI et al., 2000).

No Brasil, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária trabalha na ampliação das ações de monitoramento desenvolvidas pelo Programa Nacional de Monitoramento da Prevalência e da Resistência Bacteriana em Frango - PREBAF. NO PREBAF (Fase II) há pretensão de desenvolver e implantar metodologias nos laboratórios de saúde pública para respaldar a base científica em análises de prevalência e de perfis de susceptibilidade aos antimicrobianos de quatro microrganismos em carne de frango comercializada no Brasil. Além da *Salmonella* spp, *Enterococcus* spp. já analisadas no PREBAF (Fase I), o novo programa irá monitorar a *Listeria monocytogenes* e a *Campylobacter* spp. (ANVISA, 2009).

Outra forma de monitoramento da utilização de antimicrobianos no país foi implementada pela ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) através da Resolução da Diretoria Colegiada – RDC N° 20 de 5 de maio de 2011, onde foi publicada norma quanto aos procedimentos relativos à dispensação e controle de medicamentos à base de substâncias classificadas como antimicrobianos, de uso sob prescrição médica, isoladas ou em associação (BRASIL, 2011a).

A indústria farmacêutica levou 30 anos para produzir quatro novas classes de antimicrobianos para a resistência de bactérias a infecções (SOSA, 2006), e a partir de então nenhuma nova classe foi descoberta, tendo as existentes representantes sendo usados tanto em animais como em humanos (EMBRAPA AVES E SUÍNOS, 2005). Segundo Sosa (2006), se o uso desses fármacos não for controlado, as bactérias criarão resistência a esses novos antimicrobianos e as consequências para a população serão numerosas, onde tratamentos poderão se tornar ineficazes e

aumentará a morbidade e mortalidade de certas doenças; o custo de tratamentos será elevado e o custo do sofrimento humano também crescerá.

2.5.3 Resistência bacteriana aos Nitrofuranos

Através do baixo custo e efeito eficaz contra uma série de bactérias patogênicas, como a *Escherichia coli* e *Salmonella* spp., os nitrofuranos foram muito administrados como profilático, terapêutico e como aditivo zootécnico antibacteriano e antiprotozoário em aves e suínos (BARBOSA et al., 2007; GOTTSCHALL; WANG, 1995; McCracken et al.; 1995; MOTTIER et al., 2005; PRICE, 2009).

Segundo Palermo-Neto et al. (2005) os mecanismos de ação pelos quais agem os quimioterápicos são interferência em vias metabólicas da célula do microrganismo (inibição de enzima) e inibição da síntese ou dano no DNA bacteriano. Como exemplos de quimioterápicos que inibem a síntese de DNA têm-se as quinolonas (inibição da enzima DNA girase) e as quinoxalinas, enquanto os derivados nitrofurânicos e o metronidazol acredita-se que promovam dano no DNA bacteriano.

O uso de antimicrobianos na Medicina Veterinária contribuiu para o rápido aumento da prevalência de microrganismos resistentes aos antimicrobianos em humanos. De fato, muitos dos antigos antimicrobianos tornaram-se ineficazes (Price, 2009).

Os mecanismos de resistência aos antimicrobianos são desenvolvidos em função do agente utilizado contra o microrganismo, dessa forma, em *E. coli* pode-se ter uma ampla variedade de mecanismos de resistência, visto que antimicrobianos de diversas classes são utilizados no tratamento das enfermidades por ela determinadas (PALERMO-NETO, et al., 2005). Os autores revelaram que os principais mecanismos de resistência aos antimicrobianos desenvolvidos pelas bactérias englobam a inativação enzimática, alteração do seu alvo celular e redução do nível intracelular do antimicrobiano.

A resistência bacteriana aos nitrofuranos se desenvolve, porém não na mesma magnitude observada com os outros fármacos anti-infecciosos (JONES et al., 1983). Segundo o mesmo autor, os nitrofuranos têm a vantagem de provocar resistência bacteriana *in vivo* lentamente e em grau limitado, e embora os nitrofuranos possam inibir um processo enzimático oxidativo, o mecanismo exato de

sua ação é desconhecido. Aparentemente, a atividade bacteriostática resulta de uma inibição reversível de enzimas que participam na degradação do piruvato.

Sweeney et al. (1994) relataram que o uso de fármacos nitroheterocíclicos aumentaram em resposta a resistência a outros antimicrobianos que comumente eram usados, que tem por sua vez resultado em fármacos resistentes a um número de fármacos nitroheterocíclicos. No entanto, para o OPH (2010), a resistência de genes mutantes são raros e o surgimento de resistência aos nitrofuranos geralmente são lentos, e podem apresentar resistência cruzada com outros nitrofuranos, mas resistência cruzada com outros antimicrobianos não ocorre.

Para Race et al. (2005), as enzimas responsáveis pela ativação da nitrofurazona e da nitrofurantoína em *E. coli* são tipo 1 oxygen-insensitive nitroreductases, codificada pelos genes *nfsA* e a *nfnB* respectivamente. O primeiro passo para resistência à nitrofurazona é a mutação do *nfsA*. Essas mutações conservam 40% de sensibilidade a nitrofurazona, no entanto, na falta dos dois genes mutantes são resistentes a nitrofurazona, sendo visto como um importante papel do gene *nfsB* na ativação da nitrofurazona.

A furazolidona e o metronidazol são compostos classificados como nitroheterocíclicos ou nitroaromáticos e possuem mecanismos de ação similares. O metronidazol foi muito usado como componente de terapias contra *Helicobacter pylori* em humanos, no entanto, o metronidazol é um composto mutagênico e a resistência a esse antimicrobiano é muito comum. Isso estimulou o interesse em antimicrobianos que tivessem resistência incomum para *H. pylori*. No Brasil, onde o índice de resistência para metronidazol foi determinado em 42%, a furazolidona passou a ser usada nas terapias de erradicação (BENVENGO, 2005; TOWNSON et al., 1994).

A bactéria *Helicobacter pylori* é geralmente sensível a furazolidona e nitrofurantoína, no entanto, alguns isolados vem sendo caracterizados pela mais alta concentração inibitória mínima. O mecanismo desta resistência é desconhecido, e os determinantes de resistência do metronidazol difere dos nitrofuranos (OPH, 2010).

O mecanismo de resistência da *H. pylori* ao metronidazol foi relacionado com alterações nos genes NAD(P)H nitroreductase oxigênio insensível (*rdxA*) e NAD(P)H flavina-oxidoreductase(*frxA*) produtores de nitroreductases que reduzem o metronidazol gerando produtos intermediários os quais tem ação tóxica. Devido a algumas linhagens apresentarem resistência simultânea para metronidazol e

furazolidona foi sugerido que os mecanismos de resistência para esses fármacos poderiam ser os mesmos. Entretanto, linhagens construídas em laboratório com os genes *rdxA* e *frxA* inativados não apresentaram resistência a furazolidona. Nesse estudo foi utilizado o método de transformação natural, feitos com os produtos de PCR dos genes *rdxA* e *frxA* de oito amostras brasileiras resistentes simultaneamente aos dois antimicrobianos para verificar o envolvimento dos genes *rdxA* e *fdxA* com a resistência ao metronidazol e a furazolidona. Das oito amostras utilizadas foram obtidos seis transformantes de diferentes produtos de PCR do gene *rdxA*, resistentes ao metronidazol. Não foram obtidos transformantes com o gene *frxA* resistentes ao metronidazol, nem transformantes resistentes a furazolidona com nenhum dos dois genes. Foi concluído que a resistência ao metronidazol está relacionada ao gene *rdxA*, mas não ao *frxA*, e que o gene *rdxA* influencia a concentração inibitória mínima de furazolidona, mas não confere resistência (BENVENGO, 2005).

Algumas enterobactérias também tem sido resistentes aos nitrofuranos. Estirpes foram isoladas de carcaças de frango de diferentes fornecedores e provenientes de diversos Estados no Brasil. Para o teste de sensibilidade foram utilizados antimicrobianos de uso humano e veterinário, incluída a nitrofurazona. Os índices de resistência, simples ou múltipla aos fármacos, foram 75,6%, 29,7% e 20,3%, respectivamente para *Enterococcus* spp., *E. coli* e *Salmonella* spp. Em relação à nitrofurazona, a *Salmonella* spp. não foi resistente, no entanto, *E. coli* foi resistente num percentual de 8,6% e *Enterococcus* spp. com resistência de 93%. No teste observou-se elevado índice de resistência aos fármacos entre as bactérias examinadas, tanto para os de uso humano como os de uso veterinário e, também, as usadas como promotores de crescimento em rações (VESSONI, 2003).

Segundo Vessoni (2003) as carcaças de frangos podem funcionar como veículo de bactérias patogênicas ao homem, e as infecções humanas têm tornado frequentes a partir desta via e sua gravidade estreitamente relacionada com seu perfil de resistência aos fármacos.

Dentro do ecossistema aquícola, Costa et al. (2008) delinearam o perfil de sensibilidade dos agentes bacterianos causadores de enfermidades em peixes, isolaram de *Rhamdia quelen* (Jundiá), 51 estirpes de dos gêneros *Acinetobacter* spp., *Aeromonas* spp., *Edwardsiella* spp., *Enterobacter* spp., *Klebsiella* spp., *Plesiomonas* spp., *Pseudomonas* spp., *Staphylococcus* spp. e *Vibrio* spp. Estes

foram testados frente aos antimicrobianos utilizados no tratamento de enfermidades em peixes. Dos 51 isolados bacterianos obtidos, 51 (100%) foram sensíveis a gentamicina, 49 (96,08%) ao sulfazotrim, 47 (92,16%) ao cloranfenicol, 43 (84,31%) a tetraciclina, 43 (84,31%) ao ácido nalidíxico, 31 (60,78%) à nitrofurantoína, 22 (43,14%) à eritromicina, 22 (43,14%) à ampicilina, 14 (29,41%) à espiramicina, 13 (25,50%) à colistina e 5 (3%) foram sensíveis a penicilina G. Com exceção de um isolado do gênero *Staphylococcus* spp., as bactérias analisadas no estudo foram resistentes a um ou mais agentes antimicrobianos testados. Conhecendo esse perfil de sensibilidade, técnicos poderão adotar uma antimicrobiano-terapia racional que contribuirá para o controle das enfermidades, sem causar grandes riscos à saúde pública e ao meio ambiente.

Cox et al. (1996) com objetivo de investigar a sensibilidade a nitrofurantoína e furazolidona de isolados de *Salmonella* Enteritidis, particularmente PT4 em carne de frango, compararam com isolados Britânicos, permitindo uma maior especulação nas relações entre resistência aos nitrofuranos e colonização em aves. Dos isolados em carne de frango na Grã Bretanha, 95% foram resistentes à nitrofurantoína, e num outro estudo 97% dos PT4 isolados em fezes humanas foram também resistentes à nitrofurantoína, além disso, muitos dos isolados possuíam resistência cruzada a furazolidona. Foi determinada a sensibilidade de isolados australianos, 66 e 62 isolados de *Salmonella enteritidis* à nitrofurantoína e furazolidona, respectivamente. A maioria dos isolados australianos foi sensível a ambos, porém, a resistência cruzada foi baixa em todos os isolados, mais alta entre o sub-grupo dos fago tipo 4 (PT4). A sensibilidade entre isolados australianos de *Salmonella* Enteritidis é de certa forma, fundamentada ao argumento que os nitrofuranos podem ter desempenhado um papel na seleção e reforçado a colonização de aves por *Salmonella* Enteritidis na Grã Bretanha, pois na Austrália, antimicrobianos não são utilizados na produção animal.

Akinbowale et al. (2006) efetuaram avaliações preliminares de ocorrências de bactérias resistentes a antimicrobianos isolados de uma variedade de espécies da aquicultura (peixes, crustáceos) de diferentes regiões da Austrália. Após o teste de sensibilidade frente a 19 antimicrobianos, múltipla resistência foi observada e 74,4% dos isolados resistentes, tiveram entre um e dez plasmídios, alcançando dimensões com 2-51 Kbp. Na Austrália nenhum antimicrobiano é autorizado para utilização na

aquicultura, mas esses resultados levam à interpretação de que os antimicrobianos têm sido utilizados mesmo não sendo permitidos.

2.6 LEGISLAÇÃO: BANIMENTO DOS NITROFURANOS

O amplo uso de Antimicrobianos Promotores de Crescimento (APC) e as implicações na saúde coletiva resultaram na criação pelo Conselho de Ministros da Inglaterra, da Comissão Mista sobre o Uso de Antibióticos na Criação Animal e Medicina Veterinária “Joint Committee on the Use of Antibiotics in Animal Husbandry and Veterinary Medicine”, sobre a presidência do Professor M.M. Swann. Os membros desta comissão publicaram relatório em Novembro de 1969, que ficou conhecido internacionalmente como o Relatório Swann e fixou as primeiras regras sobre o uso de APC (ANDRADE, 2007).

O primeiro questionamento envolvendo APC surgiu ainda em 1969 devido ao aumento na ocorrência de amostras de *Salmonella* Typhimurium resistentes a vários antimicrobianos. O Relatório Swann foi apresentado por cientistas ao Parlamento Inglês recomendando que fármacos como as tetraciclina e as penicilinas, úteis para tratamentos em humanos, fossem banidas como APC (EMBRAPA AVES E SUÍNOS, 2005; KASZANYITZKY, 2007).

O uso de tetraciclina e penicilina como APC foi banido em vários países da Europa entre 1972 e 1974, porém continua permitido nos Estados Unidos e outros países. Na década de 1980, a ocorrência de amostras de bactérias multirresistentes em geral foi alarmante, levando a Suécia a banir voluntariamente de forma inovadora os APC em 1986. Esta atitude foi pioneira no uso de princípio de precaução, do qual a Comunidade Europeia tem se valido mais que os Estados Unidos, em geral adeptos de tomadas de atitudes frente a conclusões definitivas (EMBRAPA AVES E SUÍNOS, 2005). No ano de 1993, o comitê da JECFA “Joint Expert Committee on Food Additives” publicou relatório que descrevia sobre resíduos de fármacos veterinários em alimentos, levando em consideração a nitrofurazona e furazolidona, revelando a impossibilidade de determinar Ingestão Diária Admissível (IDA) e um Limite Máximo de Resíduo (LMR) para esses fármacos.

O uso de todos os nitrofuranos, com exceção da furazolidona foi proibido na UE em 1993, devido a preocupações com a carcinogenicidade destes produtos, sendo dois anos após a proibição estendida a furazolidona (KENNEDY, 2003). Portanto, a partir de estudos de alterações cromossômicas e neoplásicas destes

compostos (DELATOUR, et al., 2003), a classe dos nitrofuranos passou a fazer parte do Anexo IV do Regulamento 2377/90/EC, onde são incluídas substâncias às quais não pode ser designado um Limite Máximo de Resíduo (LMR) a ser utilizado na alimentação animal (UNIÃO EUROPEIA, 1990).

Em 1997 novos itens foram adicionados a diretiva 70/524 EEC, e vários aditivos foram proibidos (EC diretiva 97/6/EG e a Comissão de Regulação EC 2821/98) na Comunidade Europeia (KASZANYITZKY, 2007).

Em 1999 a Comunidade Europeia baniu o uso de tilosina, virgiamicina, espiramicina e bacitracina de zinco como APC. Esta atitude foi parte de um plano para o banimento total do uso de APC em 2006 (EMBRAPA AVES E SUÍNOS, 2005).

Em janeiro de 2000 a Comunidade Europeia fez a recomendação para continuar retirando e proibindo o uso de antimicrobianos como promotores de crescimento (KASZANYITZKY, 2007). Ainda no ano de 2000, a Organização Mundial da Saúde (OMS) recomendou que classes de antimicrobianos usados em humanos como terapia não devam ser usados como APC, permeando uma fronteira entre a postura europeia, de precaução, e a norte-americana, de liberação, enquanto uma conclusão definitiva não seja obtida (EMBRAPA AVES E SUÍNOS, 2005).

No Brasil o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), regulamentou a Portaria nº 448 de 10/09/1998, que proibiu a fabricação, a importação, a comercialização e o emprego de preparações farmacêuticas de uso veterinário, de rações e de aditivos alimentares contendo cloranfenicol, furazolidona e nitrofurazona, em animais cujos produtos fossem destinados à alimentação humana. No entanto, ainda permitia o uso dessas substâncias em animais de companhia, peixes ornamentais e de todas as demais espécies cujos produtos não se destinassem ao consumo humano (BRASIL, 1998).

Em 2002 a Portaria nº 448 de 10/09/1998 foi revogada pela Instrução Normativa nº 38 de 08/05/2002, a qual, além de proibir a fabricação, a importação e a comercialização de cloranfenicol, de nitrofuranos e de produtos que contivessem esses princípios ativos, para uso em preparação de insumos utilizados na pecuária nacional, suspendeu também os registros aos insumos pecuários que continham essas substâncias, estabelecendo um prazo de 90 dias para que os mesmos fossem retirados da comercialização, podendo haver substituição do princípio ativo por outro de ação semelhante (BRASIL, 2002). Em 2003 revogou-se essa última e publicou-se

a Instrução Normativa nº 9 de 27/06/2003, estendendo a proibição para a alimentação de todos os animais e insetos, não somente referente à pecuária nacional (BRASIL, 2003).

No início de 2002 foram encontrados resultados positivos em uma ampla escala de aves e produtos da aquacultura em um espectro muito grande de países, inclusive a Tailândia e o Brasil. Naquele momento mais de 60% de camarões tailandeses testados na UE continham resíduos de nitrofuranos, 10% de amostras de aves/patos tailandeses também continham resíduos, e as aves brasileiras cerca de 20%. Assim, em 2002 a Comissão Europeia baixou uma medida preventiva para a Tailândia e para o Brasil, onde exigiram para todos os Estados Membros da UE que detivesse cada lote de aves, camarões tailandeses e frangos brasileiros no Porto de Inspeção de Fronteira. Dependendo do resultado dos testes a carga seria permitida na cadeia alimentícia ou seria destruída. Em ambos os países a taxa de violação caiu dramaticamente, porém, ainda estão sendo encontrados metabólitos de nitrofuranos em produtos de aquacultura e avícolas da Tailândia e do Brasil. O desenvolvimento de novos métodos analíticos para detectar os resíduos ligados dos nitrofuranos, revelou o difundido uso indevido destes compostos através do Sul e Sudeste da Ásia, Brasil e Portugal. A probabilidade de uso indevido destes produtos é fortalecida porque eles são baratos, efetivos e até recentemente difíceis de detectar (KENNEDY, 2003).

Foi realizado em Bangcoc, na Tailândia o workshop sobre resíduos veterinários, conjuntamente pela Organização Mundial de Saúde (OMS) e pelo Fundo das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação, do inglês “Food and Agriculture Organization of the United Nations” (FAO), que objetivou proporcionar às duas entidades e ao *Codex Alimentarius* os primeiros indicadores dos reais efeitos da detecção, no comércio internacional de alimentos, de resíduos significativos de cloranfenicol e nitrofuranos em produtos de origem animal. Os participantes do encontro foram incumbidos de identificar os problemas científicos, técnicos e regulatórios relacionados à detecção de resíduos de medicamentos veterinários em alimentos, além de sugerir os próximos passos a serem adotados pelas entidades de segurança alimentar (AVISITE, 2004).

No Brasil, para se controlar os resíduos de substâncias de uso na agropecuária, bem como de poluentes ambientais em produtos de origem animal, criou-se a Portaria nº 86/79 (BRASIL, 1979) o Programa Nacional de Controle de

Resíduos Biológicos em Carnes (PNCRBC) do Ministério da Agricultura. A Portaria nº 86 foi revogada em 1986 pela Portaria nº 51 (BRASIL, 1986), instituindo o Plano Nacional de Controle de Resíduos em Produtos de Origem Animal (PNCR), e adequada mais tarde pela Portaria nº 527/95 (BRASIL, 1995). Em 1999, o PNCR foi nomeado para Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes (PNCRC) através da IN nº 42 (BRASIL, 1999).

Em relatório da penúltima visita da missão europeia ao Brasil, em 2005, para avaliação do controle de resíduos e contaminantes em animais vivos e produtos animais, no que diz respeito aos nitrofuranos, o único relato foi a não aprovação pela União Europeia de um plano de resíduos em ovos, apesar da exportação. No entanto, na Coordenação de Controle de Resíduos e Contaminantes (CCRC) da Secretaria de Defesa Agropecuária (SDA) foi esclarecida que a testagem de nitrofuranos e cloranfenicol em ovos foi iniciada no final de 2005 e o escopo de substâncias monitoradas seriam ampliadas em 2006 (SPISSO, 2009).

Segundo o Sistema de Alerta Rápido para os Gêneros Alimentícios e Alimentos para Animais, do inglês “Rapid Alert System for Food and Feed” (RASFF) em 2009, a maioria das notificações apresentadas sobre resíduos de fármacos veterinários era de metabólitos de nitrofuranos em crustáceos, no entanto, houve notificações de pescados, mel, carne de frango e outras carnes. Para outros tipos de resíduos veterinários houve uma diminuição, porém, para nitrofuranos, houve um significativo aumento, e os países envolvidos nessas ocorrências são Bangladesh, Índia e Sri Lanka.

Em 2010, a maioria das notificações foi de ivermectina em carnes e produtos cárneos, no entanto, houve um significativo aumento de notificações em crustáceos (RASFF 2010). No Brasil, das 19.235 amostras coletadas em produtos de origem animal (carnes bovina, suína, equina e de aves, leite, ovos, mel e pescado), apenas 32 apresentaram irregularidades. O resultado indica que 99,83% dos produtos estão dentro dos padrões estabelecidos pelo Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes (PNCRC) da área animal. O índice é semelhante ao registrado em 2009, de 99,82%. Nas amostras que apresentaram irregularidades, os principais problemas encontrados foram, a detecção de resíduos de vermífugo na espécie bovina e equina e de contaminantes inorgânicos (cádmio e arsênio) em bovinos, suínos e equinos (AVISITE, 2011).

3 DESENVOLVIMENTO

Os trabalhos a seguir estão formatados conforme as normas das revistas nas quais serão publicados.

3.1 IDENTIFICAÇÃO DE *Enterobacteriaceae* DA MICROBIOTA INTESTINAL DE FRANGOS DE CORTE SUBMETIDOS À DIETA COM NITROFURANOS. (TRABALHO ACEITO PARA PUBLICAÇÃO NA REVISTA BRASILEIRA DE CIÊNCIA VETERINÁRIA)

Identificação de *Enterobacteriaceae* da microbiota intestinal de frangos de corte submetidos a dieta com nitrofuranos

Enterobacteriaceae identification of the broiler intestinal microbiota submitted to nitrofurans diet

Carla Inês Soares Praxedes, Nathália Oliveira Cavalcanti Zúniga, Paula Aparecida

Martins Borges Bastos, Robson Maia Franco, Sérgio Borges Mano

RESUMO: Objetivou-se neste trabalho identificar *Enterobacteriaceae* da microbiota intestinal de frangos de corte que foram submetidos a quatro tratamentos diferentes com nitrofuranos, do 15° ao 23° dia de vida. Foram coletadas, por via cloacal, amostras fecais

através de suabes estéreis de 52 aves da linhagem Cobb, em seguida transportados em meio Cary-blair para isolamento e identificação dos gêneros e espécies através das provas bacteriológicas convencionais e, através dos sistemas Bactray I e II. Os gêneros e espécies isolados nos tratamentos com nitrofuranos e no controle foram: *Citrobacter* spp., *Escherichia coli*, *Escherichia fergusonii*, *Escherichia Hermannii*, *Enterobacter aerogenes*, *Enterobacter aminigenus*, *Enterobacter cloacae*, *Enterobacter sakazakii*, *Hafnia alvei*, *Klebsiella oxytoca*, *Klebsiella ozaenae*, *Klebsiella pneumoniae*, *Morganella morganii*, *Proteus* spp e *Pseudomonas luteola*. De todos os tratamentos, o maior percentual de *Escherichia coli* isoladas ocorreu no grupo controle, sendo este também o que apresentou menor diversidade de microrganismos, com apenas dois gêneros identificados. O uso de antimicrobianos na ração nos demais tratamentos pode ser uma explicação para o desequilíbrio da microbiota normal do intestino, resultando em um aumento populacional de outras enterobacteriaceas.

Palavras-chave: antimicrobianos, enterobactérias, isolamento

SUMMARY: The objective of this study was to identify *Enterobacteriaceae* of the broiler intestinal microbiota submitted to four different treatments involving nitrofurans, from the 15th to the 23th day of life. Fecal samples, from the chickens' sewers, were collected through sterilized swabs from 52 chickens of the Cobb strain, afterwards taken into Cary-blair method to isolation, and identification of genus and species through the conventional bacteriological tests and Bactray I/II systems. The genera and species isolated in nitrofurans treatments and in the control were: *Citrobacter* spp., *Escherichia coli*, *Escherichia fergusonii*, *Escherichia Hermannii*, *Enterobacter aerogenes*, *Enterobacter aminigenus*, *Enterobacter cloacae*, *Enterobacter sakazakii*, *Hafnia alvei*, *Klebsiella oxytoca*, *Klebsiella ozaenae*, *Klebsiella pneumoniae*, *Morganella morganii*, *Proteus* spp e *Pseudomonas luteola*. Of all treatments, the highest percentage of isolated *Escherichia coli* occurred in the control group, being the

latter the one which presented the lowest microorganism diversity – only two genera were identified. The use of antibiotics in the feed on other treatments can be an explanation the imbalance of the common tract microbiota, resulting in a population growth of other *Enterobacteriaceae*.

Keywords: antimicrobial, enterobacteria, isolation

INTRODUÇÃO

Durante o desenvolvimento embrionário do pinto não há qualquer microbiota natural intestinal, que se forma a partir da ingestão de microrganismos durante o processo de nascimento, aumentando nas primeiras semanas de vida até se tornar uma população predominantemente de bactérias anaeróbicas. Alguns gêneros e espécies bacterianas que colonizam inicialmente o trato intestinal, geralmente persistem ao longo de toda a vida das aves, passando a compor a microbiota intestinal residente (Furlan et al., 2004; Palermo-Neto et al., 2005). Apajalahti et al. (2004) utilizando técnicas que caracterizam o DNA microbiano extraídos de colônias do trato gastrointestinal mostraram que 90% das bactérias encontradas são de espécies desconhecidas.

Neste contexto, o estudo da microbiota instestinal tem sido motivo de diversas investigações científicas, principalmente pelo relacionamento que se estabelece entre o hospedeiro e os organismos que são albergados (Silva et al., 2004). Estudos recentes apontam para o aumento considerável na proporção de microrganismos resistentes e multirresistentes, agravando-se com maior rapidez comparando com décadas anteriores (Hernández et al. 2004; Palermo-Neto et al., 2005)

Seres humanos e animais podem se contaminar por bactérias patogênicas de difícil controle terapêutico, a partir de alimentos e ambientes contaminados (Costa et al., 2009), advindos principalmente do uso do promotor de crescimento na ração (Pessanha e Gontijo

Filho, 2001). Os nitrofuranos pela sua eficácia e baixo custo foram muito utilizados como profilático em coccidioses e salmoneloses, terapêutico nas infecções por *E. coli*, *Salmonella* spp., *Mycoplasma gallisepticum* e enterites inespecíficas e como aditivo zootécnico antibacteriano e antiprotozoário em aves e suínos (Magalhães et al., 1985; Mottier et al., 2005; Barbosa et al., 2007; Price, 2009).

Desde 1990, está proibido na União Europeia o uso destes compostos na criação de animais de produção (União Europeia, 1990) e no Brasil através da Instrução Normativa nº 9 de 27 de Junho de 2003 do Ministério da Agricultura (Brasil, 2003a). Entretanto, têm sido utilizados de forma ilegal, constatados em produtos de origem animal no Sul e Sudeste da Ásia, Brasil e Portugal (Kennedy (2003) e mais recentemente Bangladesh, Índia e Sri Lanka (Rasff, 2009).

Neste sentido, objetivou-se no presente trabalho avaliar a ocorrência de enterobacteriaceas da microbiota intestinal de frangos de corte submetidos à dieta com nitrofuranos.

MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho foi realizado no Instituto Federal Fluminense, através de um acordo tripartite interinstitucional feito em 2008, denominado “Acordo de Cooperação Acadêmica e Intercâmbio Técnico, Científico e Cultural” entre o Instituto de Química da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), a Faculdade de Veterinária da Universidade Federal Fluminense (UFF) e o Instituto Federal Fluminense (IFF) câmpus Bom Jesus, naquele ano denominado Colégio Agrícola Ildefonso Bastos Borges vinculado à Universidade Federal Fluminense (UFF).

O experimento de campo foi realizado em galpão experimental do câmpus Bom Jesus, sendo adquiridos 275 pintos de um dia (machos e fêmeas) da linhagem Cobb, provenientes do incubatório da empresa Globoaves da cidade de Formiga, Minas Gerais.

Os animais foram separados em cinco grupos de 55 animais (cl clinicamente sadios) e criados em condições experimentais, feita da forma mais próxima possível de uma criação comercial, mimetizando o manejo de um avicultor. No manejo de criação as aves receberam durante os primeiros catorze dias de vida ração de fase inicial (milho, soja e núcleo de fase inicial) e água potável à vontade provida em bebedouros pendulares durante todo experimento. No décimo quinto iniciou-se o tratamento com as rações medicadas contendo dosagens terapêuticas de acordo com Zuidema et al. (2004) e McCracken et al. (2005), por nove dias consecutivos.

Para a ração medicada no tratamento um contendo 185 mg/kg de furazolidona (FZD), foram homogeneizados 3,7 g de furazolidona da SIGMA-ALDRICH (St. Louis, MO, USA) em 1,0 kg de ração de milho e soja adicionada de núcleo em saco plástico fechado. Após a homogeneização foram adicionados mais 19 kg de ração, completando 20 kg de alimento medicado, sendo feita a homogeneização do total. Para a ração medicada do tratamento dois contendo 202 mg/kg de furaltadona (FTD), foram homogeneizados 4,04 g de furaltadona da SIGMA-ALDRICH (St. Louis, MO, USA) conforme descrito para a furazolidona. Para a ração medicada do tratamento três contendo 300 mg/kg de nitrofurantoína, foram homogeneizados 6,0 g de nitrofurantoína (NFT) da SIGMA-ALDRICH (St. Louis, MO, USA) da mesma forma como descrito para a furazolidona. Para a ração medicada do tratamento quatro contendo 300 mg/kg de nitrofurazona, foram homogeneizados 6,0 g de nitrofurazona (NFZ) da SIGMA-ALDRICH (St. Louis, MO, USA) em conformidade com o descrito para a furazolidona. No tratamento cinco, designado ao grupo controle, os animais continuaram recebendo a ração de fase inicial, porém sem a adição de antimicrobiano.

Após os nove dias de tratamento, restituiu-se a criação normal, retornando a alimentação com ração comercial de fase de crescimento, que foi administrada até os 42 dias de vida, quando houve a substituição por ração de fase de finalização, administrada até os 51 dias de vida.

Procedeu-se seis abates de grupos de animais de todos os tratamentos entre o 23º dia de vida ao 51º dia, com objetivo de coletar amostras para futuro estudo de metabolização e distribuição de resíduos de nitrofuranos por pesquisadores da Universidade Federal do Rio de Janeiro (Zúniga, 2010). No 51º dia de vida, no momento anterior ao abate, foi realizada a coleta de amostra através de suabe cloacal do último grupo de aves (52 aves) para posterior identificação bacteriana.

As 52 amostras fecais (suabes) foram distribuídas da seguinte forma: nove suabes do tratamento um contendo furazolidona, 11 suabes do tratamento dois contendo furaltadona, 11 suabes do tratamento três contendo nitrofurantoína, 12 suabes do tratamento quatro contendo nitrofurazona e nove suabes do tratamento cinco, denominado controle. Após, os suabes foram acondicionados em tubos de ensaio esterilizados contendo o meio Cary-blair (meio de transporte) da marca STERILE e enviados para o Laboratório de Microbiologia do campus Bom Jesus. Cada ave (frango) foi representada por um suabe (amostra fecal).

As amostras mantidas em meio Cary-blair foram analisadas para detecção de *Enterobacteriaceae* de acordo com a metodologia descrita pela Instrução Normativa SDA N° 62 de 26 de agosto de 2003, do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (Brasil, 2003b) para as fases de pré-enriquecimento, enriquecimento seletivo, isolamento e identificação bioquímica de triagem.

Todas as colônias foram submetidas a análises bioquímicas específicas através do sistema BacTray I e II para identificação de *Enterobacteriaceae*.

Os resultados foram expressos em percentuais de ocorrência dos microrganismos encontrados em cada tratamento e no grupo controle.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram identificados 142 isolados das 52 amostras pesquisadas.

Na TABELA 1 estão apresentadas todas as enterobactérias identificadas no sexto e último abate de frangos (51° dia de criação), separadas de acordo com o tratamento dos nitrofuranos e o grupo controle.

TABELA 1: Microrganismos isolados a partir de suabes cloacais de frangos de corte com 51 dias de idade submetidos à dieta com nitrofuranos

	FZD	FTD	NFT	NFZ	CONTROLE
<i>Citrobacter spp.</i>			3%		
<i>Escherichia coli</i>	72%	47%	57%	33%	76%
<i>Escherichia fergusonii</i>	4%			6%	
<i>Escherichia hermannii</i>			3%		
<i>Enterobacter aerogenes</i>	4%				
<i>Enterobacter aminigenus</i>				3%	
<i>Enterobacter cloacae</i>			7%	3%	
<i>Enterobacter sakazakii</i>		3%	3%	3%	
<i>Hafnia alvei</i>	4%	6%		3%	
<i>Klebsiella oxytoca</i>	4%	3%	7%		
<i>Klebsiella ozaenae</i>	12%	22%		13%	20%
<i>Klebsiella pneumoniae</i>		10%	3%	23%	4%
<i>Morganella morganii</i>			7%		
<i>Proteus spp.</i>			10%		
<i>Pseudomonas luteola</i>		9%		13%	

FZD = Furazolidona; FTD = Furaltadona; NFT = Nitrofurantoína; NFZ = Nitrofurazona; Controle = Sem medicação

O gênero *Salmonella* não foi identificado em nenhum dos isolados, o que pode ser resultado de uma criação que envolveu as boas práticas agropecuárias, pois apesar de ser uma criação experimental, nesta procurou-se mimetizar a ambiência de uma granja comercial, ou então devido à utilização dos quimioterápicos (nitrofuranos) na ração, evitando a colonização de *Salmonella* spp., dificultando sua detecção pelos métodos tradicionais (Tellez et al., 2001).

Coutinho et al. (2009) também não identificaram *Salmonella* spp., *Listeria* spp., *Campylobacter* spp. ao analisarem suabes cloacais de avestruzes, porém, foram isoladas *E. coli* (95%), *Pseudomonas aeruginosa* (28,3%), *Klebsiella* spp. (8,33%), *Proteus* spp. e *Enterobacter* spp. (1,66%).

Observou-se que o percentual de *Escherichia coli* nos grupos com os tratamentos contendo furaltadona, nitrofurantoína e nitrofurazona (47%, 57% e 33%, respectivamente) foram inferiores ao encontrado no grupo tratado com furazolidona (72%) e no controle (76%).

Observou-se também que nas aves do grupo controle ocorreu menor diversidade na microbiota intestinal, com a presença de apenas dois gêneros, dentre esses, três espécies (*Escherichia coli*, *Klebsiella ozaenae* e *Klebsiella pneumoniae*). Avaliando gêneros por grupo, a maior diversidade foi encontrada no tratamento com a nitrofurantoína, onde foram isolados seis gêneros diferentes, no tratamento com a nitrofurazona e a furaltadona cinco gêneros diferentes e com a furazolidona quatro gêneros diferentes.

Uma possível explicação para a maior diversidade de gêneros nos grupos tratados com os derivados dos nitrofuranos pode estar no desequilíbrio causado pela oferta do quimioterápico sobre a microbiota intestinal normal do frango. Reynolds et al (1997) apontaram para o fato de que o uso de antimicrobianos pode exacerbar a população de algumas enterobacteriaceae devido ao desequilíbrio da microbiota normal do intestino. No grupo controle, que ocorreu a menor diversidade de gêneros, houve maior percentual de *Escherichia coli* comparado a todos os outros grupos. Alto percentual de *Escherichia coli*

também foi encontrado de forma semelhante, 88% por Sáenz et al. (2001) e 57% por Silva et al. (2004).

O alto percentual de *E. coli* encontrado no grupo controle, se deve provavelmente a colonização normal do trato gastrointestinal das aves, pois inúmeras espécies de bactérias iniciam a colonização imediatamente após o nascimento das aves e aumenta durante as primeiras semanas de vida, até se tornar uma população predominantemente de bactérias anaeróbias (Furlan et al., 2004).

No grupo tratado com furazolidona também houve aumento no percentual de *Escherichia coli* isoladas (72%), que provavelmente se justifica pelo menor efeito da furazolidona em relação a este microrganismo, visto que Manning et al. (1994) ao introduzirem *Salmonella* Enteritidis resistentes a nitrofurazona em aves de corte com sete dias de idade, alimentadas com ração contendo nitrofurazona, verificaram redução significativa da concentração de ácidos graxos voláteis no ceco, que influenciam a susceptibilidade frente a alguns patógenos entéricos.

Para Ito et al. (2000), quando manipulam-se diferentes tipos de ingredientes ou aditivos alimentares, fenômenos ainda pouco compreendidos podem estar ocorrendo com a microbiota intestinal das aves, e de forma inusitada, ocorrendo perda de seus efeitos benéficos ou exacerbação de seus efeitos nocivos.

Segundo Lancini (1994) a microbiota bacteriana do trato entérico das aves tem um efeito benéfico atuando no processo digestório, e de acordo com Ito et al. (2000), de uma forma indireta, a presença da microbiota intestinal equilibrada, particularmente no ceco, contribui com a exclusão e/ou competição com bactérias patogênicas como *E.coli*, *Clostridium* spp. e *Salmonella* spp. Muito dos gêneros identificados no presente trabalho foram detectadas no intestino e/ou ceco de aves, como é o caso de *Citrobacter*, *Enterobacter*,

Proteus, *Escherichia*, *Klebsiella* (Furlan et al., 2004; Silva et al., 2004; Palermo-Neto et al., 2005)

As aves podem ser portadoras de diversos microrganismos, patogênicos ou não, e esses possivelmente podem ser transmitidos a outras aves (Silva et al., 2004), podendo apresentar-se isoladas ou associadas. São também responsáveis por surtos epidêmicos ou casos isolados de perturbação intestinal em humanos através do consumo de alimentos contaminados (Costa e Hofer, 1972).

CONCLUSÕES

Apesar de procurar mimetizar a ambiência de uma granja comercial, este procedimento foi uma criação experimental, sendo conduzida dentro das boas práticas agropecuárias. Foram isoladas diversas espécies bacterianas, em especial a *Escherichia coli*, que se apresentou em todas as aves, sob efeito dos quimioterápicos ou não, principalmente com percentual elevado no grupo controle (76%) e no grupo tratado com furazolidona (72%).

A detecção do grau de susceptibilidade dessas bactérias aos nitrofuranos pode ser uma fonte de informação importante para explicar a diversidade bacteriana entre os distintos tratamentos com os nitrofuranos e o controle desse quimioterápico, existindo poucos dados na literatura científica. A preocupação com casos de resistência bacteriana e até mesmo transferência de genes de resistência constituem uma inquietude para com a saúde coletiva, e sua disseminação via cadeia alimentar pode diminuir as opções de tratamento nas infecções causadas por microrganismos patogênicos ou comensais humanos. Mediante tal ponderação, a realização do perfil de resistência dos microrganismos identificados no presente trabalho é de extrema importância, sendo objeto de outra pesquisa em andamento.

REFERÊNCIAS

APAJALAHTI, J.; KETTUNEN, A.; GRAHAM, H. Characteristics of the gastrointestinal microbial communities, with special reference to the chicken. *World's Poultry Science Journal*, n. 60, p. 223-232, 2004.

BARBOSA, J.; MOURA, S.; BARBOSA, R.; RAMOS, F.; SILVEIRA, M. Determination of nitrofurans in animal feeds by liquid chromatography-UV photodiode array detection and liquid chromatography –ionspray tandem mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta*, v. 586, p. 359-365, 2007.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 9 de 27 de Junho de 2003a. Proíbe a fabricação, a manipulação, o fracionamento, a comercialização, a importação e o uso dos principais ativos cloranfenicol e 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, p. 4, 30 de junho de 2003.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa SDA nº 62 de 26 de agosto de 2003b. Métodos Analíticos Oficiais para Análises Microbiológicas para Controle de Produtos de Origem Animal e Água. *Diário Oficial da República Federativa do Brasil*, Brasília, DF, 265 p., 18 de setembro de 2003.

COSTA, R.A.; HOFER, E. *Isolamento e identificação de enterobactérias* (Apostila). Rio de Janeiro: Instituto Oswaldo Cruz, 120 p., 1972.

COSTA, M.M.; MALBONI, F.; WEBER, S.S.; FERRONATO, A.I.; SCHRANK, I.S.; VARGAS, A.P.C. Patotipos de *Escherichia coli* na suinocultura e suas implicações ambientais e na resistência aos antimicrobianos. *Arquivo Instituto de Biologia*, São Paulo, v. 76, n. 3, p.509-516, 2009.

COUTINHO, C.E.R.; FRANCO, R.M.; MAGALHÃES, H.; AQUINO, M.H.C. Investigação de *Salmonella* spp., *Listeria* spp., *Campylobacter* spp. e *Pseudomonas* spp. no trato intestinal de avestruzes (*Struthio camelus*) criados no estado do Rio de Janeiro. *Revista Brasileira de Ciência Veterinária*, v. 16, n. 3, p. 129-132, 2009.

FURLAN, R.L.; MACARI, M.; LUQUETTI, B.C. Como avaliar o efeito de uso de probióticos, prebióticos e flora de exclusão competitiva. In: 5º Simpósio Técnico de Incubação, Matrizes de Corte e Nutrição. Balneário Camboriú, SC, 2004.

HERNÁNDEZ, F.; MADRID, J.; GARCIA, V. Influence of two plant extracts on broilers performance, digestibility, and digestive organ size. *Poultry Science*, v. 83, p. 169-174, 2004.

ITO, N.M.K.; MIYAJI, C.I.; LIMA, E.A.; OKABAYASHI. *Enfermidades do Sistema Digestório e Anexos*. In: BERCHIERI JÚNIOR, A; MACARI, M. Doenças das Aves. Campinas: FACTA, 2000, p. 47-60.

KENNEDY, G. Nitrofuranos em Avicultura. *IV Simpósio Brasil Sul de Avicultura*. Chapecó, SC, 2003.

LANCINI, J.B. *Fatores exógenos na função gastrointestinal*. In: Fisiologia da Digestão e Absorção das Aves. Fundação Apinco, 1994. p. 99-126.

MAGALHÃES, H.M.; BOELTER, R.; SIVA, A.R. *Elementos de Farmacologia Veterinária*. 3. ed. Porto Alegre: Ed. Sulina, 1985. 199p.

McCRACKEN, R.J.; VAN RHIJN, J.A.; KENNEDY, D.G. The occurrence of nitrofurans metabolites in the tissues of chickens exposed to very low dietary concentrations of the nitrofurans. *Food Additives and Contaminants*, v. 22, n. 6, p. 567-572, 2005.

MANNING, J.G.; HARGIS, B.M.; HINTON, A.; CORRIER, D.E.; DeLOACH, J.R.; CREGER, C.R. Effect of selected antibiotics and anticoccidials on *Salmonella enteritidis* cecal colonization and organ invasion in Leghorn chicks. *Avian Diseases*, v. 38, n. 2, p. 256-261, 1994.

MOTTIER, P.; KHONG, S.P.; GREMAUD, E.; RICHOZ, J.; DELATOUR, T.; GOLDMANN, T.; GUY, P.A. Quantitative determination of four nitrofurans metabolites in meat by isotope dilution liquid chromatography-electrospray ionization-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, v. 1067, p. 85-91, 2005.

PALERMO-NETO, J.; SPINOSA, H.S.; GÓRNIK, S.L. *Farmacologia aplicada à avicultura: Boas Práticas no Manejo de Medicamentos*. Editora Roca Ltda, 2005.

PESSANHA, R.P.; GONTIJO FILHO, P.P. Uso de antimicrobianos como promotores de crescimento e resistência em isolados de *Escherichia coli* e de *Enterobacteriaceae* lactose-negativa da microbiota fecal de frangos de corte. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v.53, n. 01, 2001.

PRICE, P. *Residues meat Instruction: General residues background information*. 2009. Disponível em: <<http://www.dardni.gov.uk/vphu-moc-chapter-05-residues.pdf>>. Acesso em 14 de julho de 2010.

RASFF. The Rapid Alert System for Food and Feed. Annual Report 2009. Disponível em: <ec.europa.eu/food/food/.../report2009_en.pdf>. Acesso em: 21 de junho de 2011.

REYNOLDS, D.J.; DAVIES, R.H.; RICHARDS, M.E.; WRAY, C. Evaluation of combined antibiotic and competitive exclusion treatment in broiler breeder flocks infected with *Salmonella enterica* serovar *enteritidis*. *Avian Pathology*, v. 26, n. 01, p. 83-95, 1997.

SÁENZ, Y.; ZARAZAGA, M.; BRIÑAS, L.; LANTERO, M.; RUIZ-LARREA, F.; TORRES, C. Antibiotic resistance in *Escherichia coli* isolates obtained from animals, foods and humans in Spain. *International Journal of Antimicrobial Agents*, v. 18, p. 353-358, 2001.

SILVA, G.M.; SILVA, C.M.F.; BRUNO, S.F.; ABREU, D.L.C. Identificação de *Enterobacteriaceae* da microbiota intestinal de aves de postura (*Gallus gallus* Linnaeus, 1758) da linhagem Lohmann S.L.S. *Revista Brasileira de Ciência Veterinária*, v. 11, n. 3, p. 153-155, 2004.

TELLEZ, G.; PETRONE, V.M.; ESCORCIA, M.; MORISHITA, T.I.; COBB, C.W.; VILLASEÑOR, L. Evaluation of avian-specific probiotic and *Salmonella enteritidis*, *Salmonella typhimurium*, *Salmonella* Heidelberg-Specific antibodies on cecal colonization and organ invasion of *Salmonella enteritidis* in broilers. *Journal Food Protection*, v. 64, n. 3, p. 287-291, 2001.

UNIÃO EUROPEIA Council Regulation 2377/90/EC of 26 June 1990, 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 Union* L224, 18/08/1990.

ZUIDEMA, T.; VAN RHIJN, J.A.; SCHAT, B.; MULDER, P.P.J.; BOLCK, Y.J.C.; HOOGENBOOM, L.A.P. e KENNEDY, D.G. Metabolism and depletion of furazolidone and furaltadone in broilers. In: *Proceedings of the Euroresidue V Conference*, Ginkel L.A. (van), Bergwerff A.A., editors. Noordwijkerhout, The Netherlands, 12 may 2004. Bilthoven: RIVM, p. 996-1001, 2004.

ZÚNIGA, N.O.C. Desenvolvimento de criação experimental de frango de corte para viabilização de estudo de metabolização de nitrofuranos. 2010. 211 f. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Química – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2010.

3.2 SENSIBILIDADE DE *Enterobacteriaceae* DA MICROBIOTA INTESTINAL DE FRANGOS DE CORTE SUBMETIDOS À DIETA COM NITROFURANOS. (TRABALHO ENVIADO A REVISTA DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS – LISBOA/PORTUGAL)

SENSIBILIDADE DE *Enterobacteriaceae* DA MICROBIOTA INTESTINAL DE FRANGOS DE CORTE SUBMETIDOS A DIETA COM NITROFURANOS

***Enterobacteriaceae* SENSITIVITY OF THE BROILER INTESTINAL MICROBIOTA SUBMITTED TO NITROFURANS DIET**

**Carla Inês Soares Praxedes, Paula Aparecida Martins
Borges Bastos, Nathália Oliveira Cavalcanti Zúniga,
Robson Maia Franco e Sérgio Borges Mano**

RESUMO

Objetivou-se neste trabalho detectar a sensibilidade de bactérias da família *Enterobacteriaceae* a diferentes antimicrobianos em frangos de corte submetidos à dieta com nitrofuranos. Para avaliar a sensibilidade foram isoladas e identificadas colônias da microbiota intestinal em frangos de corte. Os gêneros de maior frequência foram *Escherichia* e *Klebsiella*, seguidos de *Enterobacter*, *Pseudomonas*, *Hafnia*, *Proteus*, *Morganella*, além do gênero *Citrobacter*. Todos os isolados apresentaram resistência a dois ou mais antimicrobianos com diferentes perfis de resistência. Observou-se grande resistência aos nitrofuranos, especialmente a nitrofurantoína (100%), nitrofurazona (98,5%) e furaltadona (97,8%). Em relação às outras classes de antimicrobianos, a maior resistência foi a tetraciclina (92,5%) e a maior sensibilidade a amoxicilina/ácido clavulânico (48,1%). Não foi possível afirmar que a alta resistência aos nitrofuranos detectados nos isolados fecais foi devido ao uso destes antimicrobianos na ração. A resistência à tetraciclina e nitrofuranos reafirma a importância da não utilização destes fármacos em criações avícolas.

Palavras-chave: Antimicrobianos, *Enterobacteriaceae*, nitrofuranos, sensibilidade

ABSTRACT

In this study, we aimed to detect the sensitivity of the *Enterobacteriaceae* to different antimicrobials in broilers submitted to a nitrofurans diet. To evaluate this sensitivity, colonies of the broiler intestinal microbiota have been isolated and identified. The most frequent genera found have been *Escherichia* and *Klebsiella*, followed by *Enterobacter*, *Pseudomonas*, *Hafnia*, *Proteus*, *Morganella* and further *Citrobacter*. All isolates have presented resistance to two or more antimicrobials with different resistance level profiles. Resistance to nitrofurans,

especially nitrofurantoin (100%), nitrofurazone (98.5%), and furaltadone (97.8%) has been observed. Concerning other antimicrobials classes, the higher resistance has been to tetracycline (92.5%) and the lower sensitivity, to amoxicillin/clavulanic acid (48.1%). It has not been possible to assert that the high resistance to the nitrofurans detected in the fecal isolates is due to the usage of these antimicrobials in the feed. The resistance to tetracycline and nitrofurans reaffirms the importance of not using of these drugs in poultry breeding.

Keywords: antimicrobials, *Enterobacteriaceae*, nitrofurans, sensitivity

INTRODUÇÃO

A resistência aos antimicrobianos de bactérias patogênicas, em seres humanos e animais é uma questão de grande preocupação. Embora o mau uso de antimicrobianos na medicina humana seja a principal causa do problema, bactérias resistentes a antimicrobianos utilizados em animais, são fatores que contribuem com alguns tipos de resistência em algumas espécies de bactérias (Barton, 2000).

Independentemente dos antimicrobianos serem usados com fins terapêutico, profilático ou intensificador do desempenho, seu uso na produção animal estimula a seleção de populações bacterianas resistentes, seja através da sobrevivência diferencial conferida por uma ou mais mutações espontâneas no cromossomo das bactérias, seja pela aquisição de material genético transferível que codifica um determinado mecanismo funcional de resistência (Jetacar, 1999).

Bactérias que inevitavelmente desenvolvem resistência aos antimicrobianos em animais são compreendidas por patógenos, oportunistas e comensais. Os mesmos genes de resistência aos antimicrobianos e os mecanismos de transferência de genes, podem ser encontrados na microbiota de animais e seres humanos (Teuber, 2001).

A maioria das bactérias da família *Enterobacteriaceae* encontradas na natureza habita o intestino dos seres humanos e dos animais (Madigan, Martinko e Parker, 2004; Tortora, Funke e Case, 2012), sendo a principal família de microrganismos responsáveis por surtos em humanos (Lourenço *et al.* 2007). Nos registros são encontrados dados de que mais de 74% dos incidentes de toxinfecções alimentares em que um veículo alimentar é estabelecido, pratos à base de frango ou outra carne são, em geral, os incriminados (Hobbs e Roberts, 1998). De acordo com os últimos dados da Secretaria de vigilância em Saúde do Ministério da Saúde, no período de 2000 a 2011, aproximadamente 50% dos alimentos envolvidos em surtos alimentares são carnes bovina, suína, aves e principalmente ovos e derivados (MS, 2011).

Segundo Palermo-Neto *et al.* (2006), a maior preocupação com o uso indevido de antimicrobianos na produção animal está na ingestão humana de alimentos contaminados com bactérias resistentes, podendo ser a terapia antimicrobiana ineficaz. Além disso, os resíduos desses antimicrobianos podem apresentar efeitos tóxicos diretos para o consumidor e causar transtornos na microbiota do meio ambiente.

O surgimento e a propagação da resistência em *Enterobacteriaceae* estão dificultando o tratamento de graves infecções hospitalares e propiciando a seleção de espécies resistentes a todos os agentes atualmente disponíveis (Peterson, 2006).

Através do baixo custo e efeito eficaz contra uma série de bactérias patogênicas, os nitrofuranos foram muito administrados nas gastroenterites causadas pelas enterobactérias *Escherichia coli* e *Salmonella* spp. Sendo também utilizados como terapêutico, profilático e como aditivo zootécnico antibacteriano e antiprotozoário em aves, suínos, na aquíicultura (peixes e camarões) e em colônias de abelhas (Gottschall e Wang, 1995; McCracken *et al.*;

1995; Finzi *et al.*, 2005; Mottier *et al.*, 2005; Barbosa *et al.*, 2007; Vass, Hruska e Franek, 2008; Price, 2009).

Os nitrofuranos têm como principais membros a furazolidona (FZD), furaltadona (FTD), nitrofurantoína (NFT) e nitrofurazona (NFZ), sendo antimicrobianos sintéticos (quimioterápicos) de largo espectro, apresentando o grupo nitro-5 característico, essencial para a atividade antimicrobiana (Jones *et al.*, 1983; Kennedy, 2003; Finzi *et al.*, 2005; Vass, Hruska e Franek, 2008).

Com base em estudos, Delatour *et al.* (2003) demonstraram alterações cromossômicas e neoplásicas relacionadas ao uso destes compostos. A União Europeia banuiu o uso dos nitrofuranos na criação de animais de produção, e estes fármacos passaram a fazer parte do Anexo IV do Regulamento 2377/90/EC, onde são incluídas substâncias que não possuem um Limite Máximo de Resíduo (LMR), pois resíduos destas substâncias presentes em alimentos de origem animal, a qualquer nível, representam perigo para a saúde do consumidor (União Europeia, 1990).

No Brasil, com base na Portaria n° 448 de 10 de Setembro de 1998 (Brasil, 1998), a Instrução Normativa N° 38 de 10 de maio de 2002 (Brasil, 2002) e a Instrução Normativa n° 9 de 27 de Junho de 2003 (Brasil, 2003a) do Ministério da Agricultura, está proibida a fabricação, a manipulação, o fracionamento, a comercialização, a importação e o uso dos princípios ativos cloranfenicol e nitrofuranos e os produtos que os contenham estes princípios ativos, para uso veterinário e suscetível de emprego na alimentação de todos os animais e insetos.

Apesar da proibição, esses produtos continuam sendo comercializados. Pontes Netto *et al.* (2005) ao realizarem o levantamento em 160 estabelecimentos comerciais no estado do Paraná, Brasil, detectaram entre os principais fármacos frequentemente administrados em terapêuticas para patologias do rebanho leiteiro, a presença de furazolidona e nitrofurazona.

Segundo o Sistema de Alerta Rápido para os Gêneros Alimentícios e Alimentos para Animais, do inglês “Rapid Alert System for Food and Feed” (RASFF, 2010), houve pouca detecção de metabólitos de nitrofuranos nas análises de resíduos de fármacos veterinários em alimentos de origem animal. No ano anterior (RASFF, 2009), em Bangladesh, Índia e Sri Lanka, houve grande número de casos de contaminação, especialmente em crustáceos. No entanto, notificações em pescados, mel, carne de frango e outras carnes também foram relatadas em poucos casos.

No sentido de relacionar os efeitos dos nitrofuranos na resistência bacteriana em avicultura, o presente trabalho teve como objetivo avaliar a sensibilidade de bactérias da família *Enterobacteriaceae* a diferentes antimicrobianos em frangos de corte submetidos à dieta com nitrofuranos.

MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho foi realizado no câmpus Bom Jesus do Itabapoana do Instituto Federal Fluminense, através de um acordo tripartite interinstitucional feito em 2008, denominado “Acordo de Cooperação Acadêmica e Intercâmbio Técnico, Científico e Cultural” entre o Instituto de Química da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), a Faculdade de Veterinária da Universidade Federal Fluminense (UFF) e o Instituto Federal Fluminense (IFF) câmpus Bom Jesus do Itabapoana/RJ, naquele ano denominado Colégio Agrícola Ildefonso Bastos Borges vinculado à Universidade Federal Fluminense (UFF).

O experimento de campo foi realizado em galpão experimental no câmpus Bom Jesus do Itabapoana, sendo adquiridos 275 pintos de um dia (machos e fêmeas) da linhagem Cobb, provenientes do incubatório da empresa Globoaves na cidade de Formiga, Minas Gerais.

Os animais foram separados em cinco grupos de 55 animais e criados em condições experimentais, feita da forma mais próxima possível de uma criação comercial, mimetizando o manejo de um avicultor. No manejo de criação as aves receberam durante os primeiros catorze dias de vida ração de fase inicial (milho, soja e núcleo de fase inicial) e água potável à vontade provida em bebedouros pendulares durante todo experimento. No décimo quinto iniciou-se o tratamento com as rações medicadas por nove dias consecutivos.

Para a ração utilizada no tratamento um (T01) contendo 185 mg/kg de furazolidona (FZD), foram homogeneizados 3,7 g de furazolidona da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) em 1,0 kg de ração de milho e soja adicionada de núcleo em saco plástico fechado. Após a homogeneização foram adicionados mais 19 kg de ração, completando 20 kg de alimento tratado, sendo realizada a homogeneização do total. Para a ração utilizada no tratamento dois (T02) contendo 202 mg/kg de furaltadona (FTD), foram homogeneizados 4,04 g de furaltadona da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) conforme descrito para a furazolidona. Para a ração utilizada no tratamento três (T03) contendo 300 mg/kg de nitrofurantoína, foram homogeneizados 6,0 g de nitrofurantoína (NFT) da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) da mesma forma como descrito para a furazolidona. Para a ração utilizada no tratamento quatro (T04) contendo 300 mg/kg de nitrofurazona, foram homogeneizados 6,0 g de nitrofurazona (NFZ) da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) em conformidade com o descrito para a furazolidona. No tratamento cinco (T05) continuou recebendo a ração de fase inicial e representou o grupo controle (Zuidema *et al.*, 2004; McCracken, Van Rhijn e Kennedy, 2005).

Após os nove dias de tratamento, restituiu-se a criação normal, retornando a alimentação com ração comercial de fase de crescimento, que foi administrada até os 42 dias de vida, quando houve a substituição por ração de fase de finalização, administrada até os 51 dias de vida.

Procedeu-se seis abates de grupos de animais de todos os tratamentos entre o 23º dia de vida ao 51º dia, com objetivo de coletar amostras para futuro estudo de metabolização e distribuição de resíduos de nitrofuranos por pesquisadores da UFRJ (Zúniga, 2010). No 51º dia de vida, momentos antes do abate, foi realizada a coleta de amostra através de suabe cloacal do último grupo de aves (52 aves) para identificação bacteriana e posterior avaliação da sensibilidade antimicrobiana.

As 52 amostras fecais (suabes) foram distribuídas da seguinte forma: nove suabes do T01, 11 suabes do T02, 11 suabes do T03, 12 suabes do T04 e nove suabes do T05. Posteriormente, os suabes foram acondicionados em tubos de ensaio esterilizados contendo o meio “Cary-Blair” (meio de transporte) da marca “Sterile” e enviados para o Laboratório de Microbiologia do câmpus Bom Jesus do Itabapoana do Instituto Federal Fluminense. Cada ave (frango) foi representada por um suabe (amostra fecal).

As amostras foram analisadas para detecção de *Enterobacteriaceae* em conformidade com a metodologia descrita pela Instrução Normativa SDA N° 62 de 26 de agosto de 2003, do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (Brasil, 2003b) para as fases de pré-enriquecimento, enriquecimento seletivo, isolamento e identificação bioquímica de triagem.

Após a fase de isolamento, foram coletadas todas as colônias para realização das provas bioquímicas de triagem e posterior confirmação bioquímica.

Todas as 142 colônias foram submetidas a análises bioquímicas específicas através do sistema Bactray I e II para identificação de bastonetes Gram-negativos. Culturas confirmadas bioquimicamente foram submetidas ao teste de sensibilidade antimicrobiana.

A sensibilidade antimicrobiana foi determinada pelo método Kirby Bauer pelo teste de difusão em discos, segundo o Comitê Nacional de Padrões Clínicos Laboratoriais (CLSI, 2011).

Os antimicrobianos testados foram: amicacina, amoxicilina/ácido clavulânico, ampicilina, aztreonam, cefalotina, cefepime, cefoxitina, ceftazidima, ceftriaxona, ciprofloxacina, cloranfenicol, gentamicina, piperacilina/tazobactam, sulfazotrim, tetraciclina, furazolidona, furaltadona, nitrofurantoína e nitrofurazona. Os 15 primeiros corresponderam ao sistema Polissensidisc 15 (DME®) para Gram-negativo e para o grupo dos nitrofuranos foi preparado antimicrobianos no Laboratório de Controle Microbiológico de Alimentos do Departamento de Tecnologia dos Alimentos da Faculdade de Veterinária da Universidade Federal Fluminense, em concentrações terapêuticas segundo Zuidema *et al.* (2004) e McCracken, Van Rhijn e Kennedy (2005).

Um isolado foi definido como resistente caso o mesmo fosse resistente a um ou mais agentes testados, sendo a resistência múltipla definida como resistência para dois ou mais agentes (Carramiñana *et al.* 2004).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram obtidos 142 isolados de bactérias Gram-negativas a partir dos suabes fecais coletados. Todos os isolados foram agrupados por gênero com exceção das *Escherichia* que foram separadas por espécie devido à importância e frequência da *E. coli*.

A maior frequência observada foi de *Escherichia coli* (55,6%), seguidos de *Klebsiella* spp. (24,6%). Outros gêneros isolados foram: *Enterobacter* (5,6%), *Pseudomonas* (4,9%), *Hafnia* (2,1%), *Proteus* (2,1%), *Morganella* (1,4%), *Citrobacter* (0,7%) e as espécies *E. fergusonii* (2,1%) e *E. hermannii* (0,7%).

Peterson (2006) e Menezes *et al.* (2008) mencionaram que com relação aos isolados de maior frequência, sabe-se que *E. coli* é uma bactéria potencialmente patogênica, enquanto a importância da *Klebsiella* spp. como agente patogênico vem crescendo nos últimos anos, além disso essa bactéria vem se equiparando a *E. coli* no que se refere a saúde coletiva. Esses aspectos são corroborados quando observa-se os resultados na presente pesquisa.

Todos os isolados apresentaram resistência a dois ou mais antimicrobianos, sendo multirresistentes, com diferentes perfis de resistência. Resultados apresentados na TABELA 2, TABELA 3, TABELA 4, TABELA 5 e TABELA 6.

Dos 15 antimicrobianos testados, disponíveis comercialmente, a tetraciclina foi a que teve maior número de microrganismos resistentes (92,5%) em relação a todos os tratamentos, seguida pelo aztreonam (80%). Contudo, a amoxicilina/ác. clavulânico foi o antimicrobiano em que a microbiota isolada apresentou maior sensibilidade (48,1%).

Os isolados de *E. coli*, em todos os grupos tratados e controle, apresentaram maior resistência à tetraciclina (92,5%), seguida de uma quinolona, a ciprofloxacina (82,3%). A resistência a esses antimicrobianos também foi detectada por Sáenz *et al.* (2001) na Espanha, em 40 isolados de *E. coli* presentes em amostras fecais de frangos de corte, maior resistência a quinolona (ácido nalidíxico) e tetraciclina, em percentual de 88% e 75% respectivamente.

Segundo Looveren *et al.* (2001), os principais agentes utilizados na profilaxia e tratamento de doenças entéricas na última década foram as fluoroquinolonas. Também a tetraciclina foi muito utilizada, sendo considerado o antimicrobiano, mais antigo, empregado no tratamento e como promotor de crescimento em rações de animais. Apesar de terem sido banidas no Brasil desde 1998, segundo Rossi (2005) as fluoroquinolonas continuam sendo usadas no país. Este pode ser a justificativa, em parte, dos resultados de alta resistência encontrados para estes antimicrobianos.

O maior perfil de sensibilidade para *E. coli* foi detectado para amoxicilina/ácido clavulânico (48,1%), piperacilina/tazobactam (44,3%) e cloranfenicol (43%).

Klebsiella spp. também foi encontrada em todos os grupos tratados e no controle, havendo sensibilidade a maior número de antimicrobianos nos grupos tratados com furaltadona e nitrofurazona. No grupo tratado com furaltadona essa bactéria foi sensível a todos os 15 antimicrobianos comercialmente disponíveis, enquanto no grupo tratado com nitrofurazona apresentou resistência apenas a tetraciclina.

E. fergusonii foi isolada apenas dos grupos de animais tratados com furazolidona e nitrofurazona. Observou-se a tendência à maior resistência nos isolados do segundo grupo, pois enquanto no primeiro detectou-se resistência apenas à tetraciclina, no grupo tratado com nitrofurazona houve sensibilidade apenas a dois antimicrobianos: o beta-lactâmico cefepime, e o aminoglicosídeo amicacina.

As estirpes de *Enterobacter* spp. não foram isoladas somente do grupo de controle, tendo sido detectadas em todos os outros. As estirpes isoladas do grupo tratado com furaltadona foram resistentes a todos os antimicrobianos testados, enquanto as do grupo tratado com nitrofurazona apresentaram sensibilidade apenas aos beta-lactâmicos ceftadizima e ceftriaxona. Observou-se que os grupos tratados com furaltadona e nitrofurazona apresentaram resistência a maior número de antimicrobianos que nos outros grupos.

Morganella spp., *Proteus* spp., *Citrobacter* spp. e a espécie *E. hermannii* foram detectadas apenas no grupo tratado com nitrofurantoína. Apresentaram sensibilidade a um grande número de antimicrobianos. *Morganella* spp. foi resistente apenas a tetraciclina e sulfazotrim; *Proteus* spp. apresentou resistência a tetraciclina e ao beta-lactâmico aztreonam; *E. hermannii* foi resistente a ampicilina, tetraciclina, ciprofloxacina e sulfazotrim, enquanto *Citrobacter* spp. foi resistente apenas ao cloranfenicol.

No teste de sensibilidade utilizando discos com nitrofuranos testados foram detectados os seguintes resultados: observou-se uma grande resistência aos nitrofuranos dentre os gêneros e espécies isolados, especialmente a nitrofurantoína (100%), nitrofurazona (98,5%) e furaltadona (97,8%).

Todos os microrganismos isolados dentre os tratamentos com nitrofuranos e controle foram resistentes à nitrofurantoína. Também houve ampla resistência a nitrofurazona, tendo sido detectada sensibilidade a este nitrofurano apenas em um isolado de *E. coli* do grupo controle e um isolado do grupo tratado com furazolidona.

Com relação à furaltadona, observou-se sensibilidade apenas em isolados de *E. coli*, *Enterobacter* spp. e *Pseudomonas* spp.

Dos isolados tratados com furazolidona ocorreu o maior número de isolados sensíveis (22,5%) dentre os nitrofuranos, caracterizando-se como o antimicrobiano de maior eficácia, tendo sido detectada essa sensibilidade em isolados de *E. coli*, *E. fergusonii*, *Enterobacter* spp., *Klebsiella* spp. e *Proteus* spp.

Não foi detectada diferença entre o grupo controle e todos os grupos de animais tratados com os nitrofuranos em relação ao perfil de resistência da *Klebsiella* spp., cujos isolados foram 100% resistentes aos nitrofuranos com exceção da furazolidona, em que foram detectados isolados sensíveis em todos os tratamentos (22,9%). Pode-se inferir a partir desse resultado que *Klebsiella* spp. não foi afetada pelo fármaco utilizado na ração no que se refere ao seu perfil de sensibilidade frente aos nitrofuranos.

O gênero *Hafnia* detectado nos grupos tratados com furazolidona, furaltadona e nitrofurazona, foi resistente a todos nitrofuranos.

Dos gêneros e espécie detectados exclusivamente no grupo de animais tratados com nitrofurantoína (*Citrobacter*, *E. hermannii*, *Morganella* e *Proteus*), todos foram resistentes aos nitrofuranos, com exceção de *Proteus* spp. que foi sensível à furazolidona.

A resistência a nitrofuranos também foi detectada em outras bactérias Gram-negativas por Pereira (2003), em que espécies de *Aeromonas* e *Vibrio* identificadas em mexilhões apresentaram perfil de resistência a nitrofurantoína, tendo sido detectadas também estirpes

multirresistentes à nitrofurantoína-pefloxacina. Isto demonstra a grande dispersão de estirpes bacterianas multirresistentes a nitrofuranos em diferentes espécies animais.

Moreira e Moraes (2002) pesquisando bactérias Gram-negativas em carcaças de frango detectaram que os isolados de *Salmonella* resistentes a cinco ou mais antimicrobianos possuíram maior sensibilidade a furazolidona (62,5%) que a nitrofurantoína (28,1%), enquanto os isolados de *E. coli* encontrados nesta pesquisa foram 90% sensíveis à furazolidona e 30% a nitrofurantoína.

Estes achados corroboram resultados encontrados no presente trabalho, em que as enterobactérias *E. coli* e *Klebsiella* spp. apresentaram maior sensibilidade à furazolidona (24,1% e 22,9%, respectivamente) quando comparados aos outros nitrofuranos. *Klebsiella* spp. apresentou 100% de resistência à furaltadona, nitrofurantoína e nitrofurazona, enquanto *E.coli* foi resistente em 98,7%, 100% e 97,4%, respectivamente.

Não houve diferença aparente entre os quatro tratamentos e o grupo controle no que diz respeito à resistência, tanto aos nitrofuranos pesquisados, quanto aos demais antimicrobianos testados. Moreira e Moraes (2002) detectaram uma grande porcentagem de isolados resistentes à furazolidona e nitrofurantoína, entre outras classes de antimicrobianos com uso frequente no Brasil, como promotores de crescimento em aves. O trabalho destes autores foi realizado no período que os nitrofuranos eram legalmente comercializados no Brasil. Observa-se, no presente trabalho, que as altas resistências aos nitrofuranos encontradas uma década após aqueles terem sido ilegalizados, podem indicar a permanência dos efeitos desse uso no passado, e/ou, a não observação por parte dos produtores da legislação vigente.

CONCLUSÕES

Os resultados obtidos neste trabalho permitem concluir que:

Não foi possível afirmar que a grande resistência aos nitrofuranos detectada nos isolados fecais de frangos é devido ao uso destes antimicrobianos na ração, já que não houve diferença aparente entre os quatro tratamentos e o grupo controle no que diz respeito à resistência, tanto aos nitrofuranos pesquisados, quanto aos demais antimicrobianos testados.

A alta resistência a antimicrobianos banidos pela legislação para uso na alimentação animal, como os nitrofuranos e a tetraciclina é uma preocupação que deve ser levada em consideração. Com base nestes achados pode-se reafirmar a importância da não utilização destes fármacos em criações avícolas, pois além dos efeitos já conhecidos, sua utilização em animais pode ser ineficaz pela grande resistência da microbiota das aves.

O perfil de multirresistência detectado em todos os isolados bacterianos é preocupante do ponto de vista da saúde coletiva, tendo em vista serem muitas destas bactérias potencialmente patogênicas, como é o caso da *E. coli* e *Klebsiella* spp., podendo haver dificuldades no tratamento em casos de infecções e/ou toxinfecções alimentares.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Barbosa, J.; Moura, S.; Barbosa, R.; Ramos, F.; Silveira, M. (2007) - Determination of nitrofurans in animal feeds by liquid chromatography-UV photodiode array detection and liquid chromatography – ionspray tandem mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta*, 586: 359-365.
- Barton, M.D. (2000) - Antibiotic use in animal feed and its impact in human health. *Nutrition Research Reviews*, 13: 279-299.

- Brasil. (1998) - Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Portaria nº 448 de 10 de Setembro de 1998. Proíbe a fabricação, a importação, a comercialização e o emprego de preparações farmacêuticas de uso veterinário, de rações e de aditivos alimentares contendo cloranfenicol, furazolidona e nitrofurazona, em animais cujos produtos sejam destinados à alimentação humana. *Diário Oficial da República Federativa do Brasil*, Brasília, DF, p. 38, 11 setembro. 1998. Seção 1.
- Brasil. (2002) - Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 38 de 08 de Maio de 2002. Proíbe a fabricação, a importação e a comercialização de cloranfenicol, de nitrofuranos e de produtos que contenham estes princípios ativos, para uso em preparação de insumos utilizados na pecuária nacional. *Diário Oficial da República Federativa do Brasil*, Brasília, DF, p. 9, 09 maio 2002. Seção 1.
- Brasil. (2003a) - Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 9 de 27 de Junho de 2003. Proíbe a fabricação, a manipulação, o fracionamento, a comercialização, a importação e o uso dos principais ativos cloranfenicol e 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, p. 4, 30 junho. 2003. Seção 1.
- Brasil. (2003b) - Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa SDA nº 62 de 26 de agosto de 2003. Métodos Analíticos Oficiais para Análises Microbiológicas para Controle de Produtos de Origem Animal e Água. *Diário Oficial da República Federativa do Brasil*, Brasília, DF, 265 p., 18 de setembro de 2003.
- Carramiñana, J.J.; Rota, C.; Agustín, I. e Herrera, A. (2004) - High prevalence of multiple resistance to antibiotics in *Salmonella* serovars isolated from a poultry slaughterhouse in Spain. *Veterinary Microbiology*, 104: 133-139.
- CLSI. (2011) - Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing: Twenty-First Informational Supplement. CLSI document M100-S21. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute.
- Delatour, T.; Gremaud, E.; Mottier, P.; Richoz, J.; Vera, F.A. e Stadler, R. H. (2003) - Preparation of stable isotope-labeled 2-nitrobenzaldehyde derivatives of four metabolites of nitrofurantoin antibiotics and their comprehensive characterization by UV, MS, and NMR techniques. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51: 6371-6379.
- Finzi, J.K.; Donato, J.L.; Sucupira, M. e De Nucci, G. (2005) - Determination of nitrofurantoin metabolites in poultry muscle and eggs by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography B*, 824: 30-35.
- Gottschall, D.W. e Wang, R. (1995) - Depletion and bioavailability of [¹⁴C] furazolidone residues in swine tissues. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 43: 2520-2525.
- Hobbs, B.C. e Roberts, D. (1998) - *Toxinfeccões e controle higiênico-sanitário de alimentos*. São Paulo, Livraria Varela, 347 p.

- Jetacar. (1999) - Report of the Joint Expert Advisory Committee on Antibiotic Resistance. The use of antibiotics in food-producing animals: antibiotic-resistant bacteria in animals and humans. (Acesso em 10 agosto 2011). Disponível em <<http://www.health.gov.au/internet/main/publishing.nsf/content/health-pubs-jetacar-cnt.htm>>.
- Jones, L.M; Booth, N.H.; McDonald, L.E. (1983) - *Farmacologia e Terapêutica em Veterinária*. 4° ed. Rio de Janeiro, Ed. Guanabara Koogan S.A., 1000 p.
- Kennedy, G. (2003) - Nitrofuranos em Avicultura. IV Simpósio Brasil Sul de Avicultura. Chapecó/SC, Brasil. (Acesso em 26 julho 2011). Disponível em <www.cnpsa.embrapa.br/sgc/sgc.../anais0304_bsa_kennedy.pdf>.
- Looveren, M.V.; Daube, G.; Zutter, L.; Dumont, J.M.; Lammens, C.; Wijdooghe, M.; Vandamme, P.; Jouret, M.; Cornelis, M. e Goossens, H. (2001) - Antimicrobial susceptibilities of *Campylobacter* strains isolated from food animals in Belgium. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 48: 235-240.
- Lourenço, N.G.G.S.; Takahashi, C.K.; Lopes, T.F. e Lopes, C.A.M. (2007) - Environmental parameters and antimicrobial susceptibility of enterobacteriaceae isolated from estuarine waters of São Vicente, São Paulo, Brasil. *The Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases*, 13 (2): 472-478.
- Madigan, M.T.; Martinko, J.M. e Parker, J. (2004) - *Microbiologia de Brock*. 10° ed. São Paulo, Prentice Hall, 608 p.
- McCracken, R.J.; Blanchflower, W.J.; Rowan, C.; McCoy, M.A. e Kennedy, D.G. (1995) - Determination of furazolidone in porcine tissue using thermospray liquid chromatography-mass spectrometry and a study of the pharmacokinetics and stability of its residues. *Analyst*, 120: 2347-2351.
- McCracken, R.J. e Van Rhijn, J.A. e Kennedy, D.G. (2005) - The occurrence of nitrofurán metabolites in the tissues of chickens exposed to very low dietary concentrations of the nitrofurans. *Food Additives and Contaminants*, 22 (6): 567-572.
- Menezes, E.A.; Alencar, A.M.; Cunha, F.A.; Ângelo, M.R.F.; Salviano, M.N.C. e Oliveira, I.R.N. (2008) - Frequência de cepas produtoras de enzima beta lactamase de espectro expandido (ESBL) e perfil de susceptibilidade de *Klebsiella pneumoniae* em hemo-culturas no berçário de um hospital em Fortaleza. *Revista Brasileira de Análises Clínicas*, 40 (1): 7-11.
- Moreira, M.A.S. e Moraes, C.A. (2002) - Resistência a antibióticos em bactérias Gram-negativas isoladas de carcaças de frango. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, 54 (1): 1-7.
- Mottier, P.; Khong, SP.; Gremaud, E.; Richoz, J.; Delatour, T.; Goldmann, T.; Guy, P.A. (2005) - Quantitative determination of four nitrofurán metabolites in meat by isotope dilution liquid chromatography-electrospray ionization-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1067: 85-91.

- MS. Ministério da Saúde (2011) – *Dados Epidemiológicos – DTA período de 2000 a 2011*. Brasília, Secretaria de Vigilância em Saúde. (Acesso em 4 de março de 2012). Disponível em <www.portal.saude.gov.br/portal/.../dados_epidemiologicos_dta_15911.pdf>.
- Palermo-Neto, J. (2006) - Uso de medicamentos veterinários: Impactos na moderna avicultura. *In: Simpósio Brasil Sul de Avicultura*. Anais, Chapecó, p. 70-78.
- Pereira, C.S. (2003) - *A cultura de mexilhões na Baía de Guanabara e suas implicações para a saúde pública – Contexto político-social e microbiológico*. Tese de Doutorado. Rio de Janeiro, Escola Nacional de Saúde Pública, Fundação Oswaldo Cruz, 176 p.
- Peterson, D.L. (2006) - Resistance in gram-negative bacteria: *Enterobacteriaceae*. *American Journal of Medicine*, 34 (5): 20-28.
- Pontes Netto, D.; Lopes, M.O.; Oliveira, M.C.S.; Nunes, M.P.; Machinski Junior, M.; Bosquiroli, S.L.; Benatto, A.; Benini, A.; Bombardelli, A.L.C.; Vedovelho Filho, D.; Machado, E.; Belmonte, I.L.; Aberton, M.; Pedroso, P.P. e Scucato, E.S. (2005) - Levantamento dos principais fármacos utilizados no rebanho leiteiro de Estado do Paraná. *Acta Scientiarum Animal Sciences*, 1: 145-151.
- Price, P. (2009) – General residues background. *In: Residues meat Instruction*. information. (Acesso em 14 julho 2010). Disponível em <<http://www.dardni.gov.uk/vphu-moc-chapter-05-residues.pdf>>.
- RASFF. (2009) – The Rapid Alert System for Food and Feed. Annual Report 2009. (Acesso em 21 de junho de 2011). Disponível em <ec.europa.eu/food/food/.../report2009_en.pdf>.
- RASFF. (2010) – The Rapid Alert System for Food and Feed. Annual Report 2010. (Acesso em 06 de dezembro de 2011). Disponível em <http://ec.europa.eu/food/food/rapidalert/index_en.htm>.
- Rossi, A.A. (2005) - Biossegurança em frangos de corte e saúde pública: limitações, alternativas e subsídios na prevenção de salmoneloses. Dissertação de Mestrado. Florianópolis, Universidade Federal de Santa Catarina, 111 f.
- Sáenz, Y.; Zarazaga, M.; Briñas, L.; Lantero, M.; Ruiz-Larrea, F. e Torres, C. (2001) - Antibiotic resistance in *Escherichia coli* isolates obtained from animals, foods and humans in Spain. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 18: 353-358.
- Teuber, M. (2001) - Veterinary use and antibiotic resistance. *Current Opinion in Microbiology*, 4: 493-499.
- Tortora, G.J.; Funke, B.R. e Case, C.L. (2012) - *Microbiologia*. 10º ed. Porto Alegre, Artmed, 934 p.
- União Europeia. (1990) - Council Regulation 2377/90/EC of 26 June 1990, 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 Union L224*, 18/08/1990.

- Vass, M.; Hruska, K. e Franek, M. (2008) - Nitrofurán antibiotics: a review on the application, prohibition and residual analysis. *Veterinarni Medicina*, 53 (9): 469-500.
- Zuidema, T.; Van Rhijn, J.A.; Schat, B.; Mulder, P.P.J; Bolck, Y.J.C.; Hoogenboom, L.A.P. e Kennedy, D.G. (2004) - Metabolism and depletion of furazolidone and furaltadone in broilers. *In: Proceedings of the Euroresidue V Conference*, Ginkel L.A. (van), Bergwerff A.A., editors. Noordwijkerhout, The Netherlands, 12 may 2004. Bilthoven: RIVM, p. 996-1001.
- Zúniga, N.O.C. (2010) - *Desenvolvimento de criação experimental de frango de corte para viabilização de estudo de metabolização de nitrofuranos*. Dissertação de Mestrado. Rio de Janeiro, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 211 p.

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Ao pesquisar amostras fecais de frangos alimentados com ração contendo diferentes nitrofuranos encontrou-se os seguintes resultados:

Isolamento dos seguintes gêneros e espécies: *Citrobacter* spp., *Escherichia coli*, *Escherichia fergusonii*, *Escherichia Hermannii*, *Enterobacter aerogenes*, *Enterobacter aminigenus*, *Enterobacter cloacae*, *Enterobacter sakazakii* (*Cronobacter sakazakii*), *Hafnia alvei*, *Klebsiella oxytoca*, *Klebsiella ozaenae*, *Klebsiella pneumoniae*, *Morganella morganii*, *Proteus* spp e *Pseudomonas luteola*.

De todos os tratamentos, o maior percentual de *Escherichia coli* isoladas ocorreu no grupo controle, sendo este também o que apresentou menor diversidade de microrganismos, com apenas dois gêneros identificados. O uso de antimicrobianos na ração nos demais tratamentos pode ser uma explicação para o desequilíbrio da microbiota normal do intestino, resultando no aumento populacional de outras enterobacteriaceas.

Ao se realizar pesquisa de sensibilidade bacteriana das amostras isoladas, observou-se que todos os isolados apresentaram resistência a dois ou mais antimicrobianos com diferentes perfis de resistência.

Houve alta resistência aos nitrofuranos, especialmente a nitrofurantoína (100%), nitrofurazona (98,5%) e furaltadona (97,8%). Em relação às outras classes de antimicrobianos, a maior resistência foi a tetraciclina (92,5%) e a maior sensibilidade a amoxicilina/ác.clavulânico (48,1%).

Não foi possível afirmar que a grande resistência aos nitrofuranos detectada nos isolados fecais de frangos seja devido ao uso destes antimicrobianos na ração, por não ter ocorrido diferença aparente entre os quatro tratamentos e o grupo

controle no que diz respeito à resistência, tanto aos nitrofuranos pesquisados, quanto aos demais antimicrobianos testados.

A alta resistência a antimicrobianos banidos pela legislação para uso na alimentação animal, como os nitrofuranos e a tetraciclina é uma preocupação que deve ser levada em consideração. Com base nestes achados pode-se reafirmar a importância da não utilização destes fármacos em criações avícolas, pois além dos efeitos conhecidos, sua utilização em animais pode ser ineficaz pela grande resistência da microbiota das aves.

O perfil de multirresistência detectado em todos os isolados bacterianos é preocupante do ponto de vista da saúde coletiva, tendo em vista serem muitas destas bactérias potencialmente patogênicas, como é o caso da *E. coli* e *Klebsiella* spp., podendo haver dificuldades no tratamento em casos de infecções e/ou toxinfecções alimentares.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABADI, A.T.B.; TAGHVAEI, T.; VAIRA, D. Considerable use of Furazolidone in Iran. *Saudi Journal of Gastroenterology*, v. 16, n. 4, p. 308-309, 2010.

AKINBOWALE, O.L.; PENG, H.; BARTON, M.D. Antimicrobial resistance in bacteria isolated from aquaculture sources in Australia. *Journal of Applied Microbiology*, v. 100, n. 5, p.1103-1113, 2006.

ALBERTON, L.R. *Produção de zilanase em resíduos agroindustriais por Streptomyces viridosporus T7A e aplicação do extrato bruto em veterinária*. 2004. 132 f. Tese (Doutorado) – Saúde Animal – Universidade Federal do Paraná, 2004.

AL-GHAMDI, M.S.; EL-MORSY, F.; AL-MUSTAFA, Z.H.; AL-RAMADHAN, M.; HANIF, M. Antibiotic resistance of *Escherichia coli* isolated from poultry workers, patients and chicken in the eastern province of Saudi Arabia. *Tropical Medicine and International Health*, n. 04, p. 278-283, 1999.

ANDRADE, A.N. *Mitos e verdades sobre o uso de antibióticos nas rações*. Jornal CRMV-RJ. Informativo do Conselho Regional de Medicina Veterinária do Estado do Rio de Janeiro. n. 186, jan. 2007. Disponível em: <www.crmvrj.com.br/new/jornal/artigos/jornaljan2007.pdf> Acesso em: 27 de outubro de 2009.

ANTIMICROBIAL RESISTANCE: IMPLICATIONS FOR THE FOOD SYSTEM. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, v. 5, p. 71–137, 2006. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1541-4337.2006.00004.x>>. Acesso em 21 de julho de 2010.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. *Agência vai monitorar aspectos microbiológicos em carne de frango*. 23 de março de 2009. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/wps/portal/anvisa/anvisa/imprensa>> Acesso em: 17 de julho de 2010.

APAJALAHTI, J.; KETTUNEN, H.; KETTUNEN, A.; HOLBEN, W.E.; NURMINEM, P.H.; RAUTONEM, N.; MUTANEM, M. Culture-independent microbial community analysis reveals that inulin in the diet primarily affects previously unknown bacteria in the mouse caecum. *Applied. Environmental Microbiology*, n. 68, p. 4986-4995, 2002.

APAJALAHTI, J.; KETTUNEN, A.; GRAHAM, H. Characteristics of the gastrointestinal microbial communities, with special reference to the chicken. *World's Poultry Science Journal*, n. 60, p. 223-232, 2004.

AVEWORLD. Promotores naturais de crescimento. *Revista do Avicultor*. Paulínia: Ed. Animaworld, 2005. 14 p.

ARAÚJO, J.A.; SILVA, J.H.V.; AMÂNCIO, A.L.L.; LIMA, M.R.; LIMA, C.B. Uso de aditivos na alimentação de aves. *Acta Veterinária Basílica*, v.1, n.3, p. 69-77, 2007.

AVICULTURA INDUSTRIAL. *Resistência a antibióticos*. Disponível em: <http://www.aviculturaindustrial.com.br/noticias/resistencia-a-antibioticos/20100524135900_G_114>. Acesso em 18 de julho de 2010.

AVISITE. O Portal da Avicultura na Internet. *Ministério da Agricultura divulga resultados do PCNRC 2010*. Fiscalização, Campinas, 2011. Disponível em <<http://www.avisite.com.br/clipping/default.asp?codnoticia=16316>>. Acesso: 28 de julho de 2011.

_____. O Portal da Avicultura na Internet. *Resíduos de medicamentos veterinários*. Notícias: Segurança Alimentar, Campinas, 2004. Disponível em: <<http://www.avisite.com.br/noticias/maisnotss.asp?codnoticia=4842&mes=9&ano=2004>>. Acesso em: 29 de julho de 2011.

BARBOSA, J.; MOURA, S.; BARBOSA, R.; RAMOS, F.; SILVEIRA, M. Determination of nitrofurans in animal feeds by liquid chromatography-UV photodiode array detection and liquid chromatography –ionspray tandem mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta*, v.586, p. 359-365, 2007.

BARTOLONI, A.; PALLECCHI, L.; FIORELLI, C.; DI MAGGIO, T.; FERNANDEZ, C.; VILLAGRAN, A.L.; MANTELLA, A.; BARTALESI, F.; STROHMEYER, M.; BECHINI, A.; GAMBOA, H.; RODRIGUEZ, H.; KRISTIANSSON, C.; KRONVALL, G.; GOTUZZO, E.; PARADISI, F.; ROSSOLINI, M. Increasing Resistance in Commensal *Escherichia coli*, Bolivia and Peru. Letters: *Emerging Infectious Diseases*, v.14, n.2, 2008.

BENVENGO, Y.H.B. Envolvimento dos genes *rdxA* e *frxA* de *Helicobacter pylori* na resistência aos antibióticos metronidazol e furazolidona. Campinas, 2005. 79f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2005.

BERCHIERI JÚNIOR, A.; ROSSI JUNIOR, O.D.; PAULILLO, A.C.; IRINO, K.; FERNANDES, S.A.; ÁVILA, F.A.; PESSOA, G.V.A.; CALZADA, C.T. *Salmonella* em um abatedouro avícola. *ARS Veterinária*, v.3, n.1, p.81-87, 1987.

_____.; MACARI, M. *Doenças das Aves*. Campinas: FACTA, 2000. 800p.

BOSQUESI, P.L.; ALMEIDA, A.E.; BLAU, L.; MENEGON, R.F.; SANTOS, J.L.; CHUNG, M.C. Toxicidade de fármacos nitrofurânicos. *Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada*, v.29, n.3, p.231-238, 2008.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Portaria nº 86 de 07 de fevereiro de 1979. Cria o Programa Nacional de Controle de Resíduos Biológicos em Carnes. *Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil*, Brasília, DF. 1979.

_____. _____. Portaria nº 51 de 06 de fevereiro de 1986. Dispõe sobre a instituição do Plano Nacional de Controle de Resíduos Biológicos em Produtos de Origem Animal. *Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil*, Brasília, DF, p. 2228, 07 de fevereiro. 1986. Seção 1.

_____. _____. Portaria nº 527. Atribui ao Secretário de Defesa Agropecuária a responsabilidade de coordenar a execução do PNCRB. *Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil*, Brasília, DF. 1995.

_____. _____. Portaria nº 448 de 10 de Setembro de 1998. Proíbe a fabricação, a importação, a comercialização e o emprego de preparações farmacêuticas de uso veterinário, de rações e de aditivos alimentares contendo cloranfenicol, furazolidona e nitrofurazona, em animais cujos produtos sejam destinados à alimentação humana. *Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil*, Brasília, DF, p. 38, 11 setembro. 1998. Seção 1.

_____. _____. Instrução Normativa nº 42. Altera o PNCR e leva à público a programação anual: Programa de Controle de Resíduos em Carnes – PCRC, Mel – PCRM, Leite – PCRL e Pescado – PCRP. *Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil*, Brasília, DF. 1999.

_____. _____. Instrução Normativa nº 38 de 08 de Maio de 2002. Proíbe a fabricação, a importação e a comercialização de cloranfenicol, de nitrofuranos e de produtos que contenham estes princípios ativos, para uso em preparação de insumos utilizados na pecuária nacional. *Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil*, Brasília, DF, p. 9, 09 maio 2002. Seção 1.

_____. _____. Instrução Normativa nº 9 de 27 de Junho de 2003. Proíbe a fabricação, a manipulação, o fracionamento, a comercialização, a importação e o uso dos principais ativos cloranfenicol e 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, p. 4, 30 junho. 2003. Seção 1.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução nº 20 de 05 de maio de 2011. Dispõe sobre o controle de medicamentos à base de substâncias classificadas como antimicrobianos, de uso sob prescrição, isoladas ou em associação. *Diário Oficial da República Federativa do Brasil*, Brasília, DF, p. 39/41, 09 maio. 2011a. Seção 1.

_____. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. *Tabela de aditivos antimicrobianos, anticoccidianos e agonistas com uso autorizado na alimentação*

animal. Divisão de Aditivos/CPAA/DFIP/DAS. 2011b. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/animal/alimentacao/aditivos/aditivos-autorizados>>. Acesso em: 26 de agosto de 2011.

CAPRIOLI, A.; BUSANI, L.; MARTEL, J.L.; HELMUTH, R. Monitoring of antibiotic resistance in bacteria of animal origin: epidemiological and microbiological methodologies. *International Journal of Antimicrobial Agents*, n.14, p. 295-301, 2000.

CARNEIRO, D.O.; FIGUEIREDO, H.C.P.; PEREIRA JÚNIOR, D.J.; LEAL, C.A.G.; LOGATO, P.V.R. Perfil de susceptibilidade a antimicrobianos de bactérias isoladas em diferentes sistemas de cultivo de tilápia-do-nylo (*Oreochromis niloticus*). *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v. 59, n. 4, 2007.

CASEWELL, M.; FRIIS, C.; MARCO, E.; McMULLIN, P.; PHILLIPS, I. The European ban on growth-promoting antibiotics and emerging consequences for human and animal health. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v. 52, p. 159-161, 2003.

CHERNAKI-LEFFER, A.M.; BIESDORF, S.M.; ALMEIDA, L.M.; LEFFER, E.V.B.; VIGNE, F. Isolamento de Enterobactérias em *Alphitobius diaperinus* e na cama de aviários no oeste do Estado do Paraná, Brasil. *Revista Brasileira de Ciência Avícola*, v.4, n.3, p.243-247, 2002.

CORNELI, J. *Avaliação de promotores de crescimento alternativos em substituição aos convencionais sobre o desempenho, característica de carcaça e morfologia intestinal em frangos de corte*. Santa Maria, 2004. 59f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Santa Maria, Rio Grande do Sul, 2004.

COSTA, D.M.L. Ototoxicidade dos antibióticos aminoglicosídeos e sistema eferente: comparação entre a administração aguda e crônica com a gentamicina e os efeitos agudos de outros antibióticos. *Revista HCPA*, v. 19, n. 2, p. 186-196, 1999.

COSTA, M.M.; PEIXOTO, R.M.; BOIJINK, C.L.; CASTAGNA, L.; MEURER, F.; VARGAS, A.C. Sensibilidade antimicrobiana de bactérias isoladas de Jundiá (*Rhamdia quelen*). *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v.28, n.10, 2008.

_____.; MALBONI, F.; WEBER, S.S.; FERRONATO, A.I.; SCHRANK, I.S.; VARGAS, A.P.C. Patotipos de *Escherichia coli* na suinocultura e suas implicações ambientais e na resistência aos antimicrobianos. *Arquivo Instituto de Biologia*, São Paulo, v. 76, n. 3, p.509-516, 2009.

COURVALIN, P. Antibiotic resistance: the pros and cons of probiotics. *Digestive and Liver Disease*, v. 38, Suppl. 2, p. 261-265, 2006

COX, J.M.; BROOK, M.D.; WOOLCOCK, J.B. Sensitivity of Australian isolates of *Salmonella enteritidis* to nitrofurantoin and furazolidone. *Veterinary Microbiology*, v. 49, p. 305-308, 1996.

DECAMP, O.; MORIARTY, D.J.W.P. A segurança dos probióticos para a aqüicultura. *Revista da Associação Brasileira de Criadores de Camarão*, v. 8, n. 2, p. 40-41, 2006.

DELATOUR, T.; GREMAUD, E.; MOTTIER, P.; RICHOZ, J.; VERA, F.A.; STADLER, R. H. Preparation of stable isotope-labeled 2-nitrobenzaldehyde derivatives of four metabolites of nitrofurantoin antibiotics and their comprehensive characterization by UV, MS, and NMR techniques. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.51, p. 6371-6379, 2003.

DODD, M.C.; STILLMAN, W.B. The in vitro bacteriostatic action of some simple furan derivatives. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, v.82, p.11-18, 1944.

EDENS, F.W. An alternative for antibiotic use in poultry: probiotics. *Revista Brasileira de Ciência Avícola*, v. 5, n. 2, 2003.

EDWARDS, D.I. Nitroimidazole drugs—action and resistance mechanisms I. Mechanism of action. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v. 31, n. 1, p. 9–20, 1993.

EMBRAPA AVES E SUÍNOS. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária Suínos e Aves. *Entendendo a questão dos antibióticos promotores de crescimento em frangos*. 2005. Disponível em: <www.cnpsa.embrapa.br/sgc/sgc_artigos/artigos_x9t63k4g.pdf>. Acesso em: 30 de outubro de 2009.

_____. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária Suínos e Aves. *Embrapa pesquisa plantas para substituição de aditivos convencionais da ração de frangos*. 2008. Disponível em: <<http://www.cnpsa.embrapa.br/?ids=&idn=666>>. Acesso em 12 de junho de 2010.

ENGLERT, S.I. Avicultura: tudo sobre raças, manejo, alimentação e sanidade. *Revista Avicultura*. 4. ed. Porto Alegre: Agropecuária Ltda, 1982.

EPAULARD, O.; BRION, J.P. Fenicoles (cloranfenicol y tianfenicol). *EMC – Tratado de Medicina*, v. 14, n. 1, p. 1-6, 2010.

ESPIGARES, E.; BUENO, A.; ESPIGARES, M.; GÁLVEZ, R. Isolation of Salmonella serotypes in wastewater and effluent: Effect of treatment and potential risk. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, 209, p.103-107, 2006.

FLEMMING, J.S.; FREITAS, R.J.S. Avaliação do efeito de prebióticos (MOS), probióticos (*Bacillus licheniformis* e *Bacillus subtilis*) e promotor de crescimento na alimentação de frangos de corte. *Archives of Veterinary Science*, v.10, n.2, p. 41-47, 2005.

FORSYTHE, S.J. *Microbiologia da Segurança Alimentar*. Porto Alegre: Artmed, 2007. 424 p.

FRANCO, B.D.G.M.; LANDGRAF, M. Microrganismos Patogênicos de Importância em Alimentos. In: FRANCO, B.D.G.M.; LANDGRAF, M. *Microbiologia dos Alimentos*. São Paulo: Ed. Atheneu, p. 33-81, 2003.

FRANCO, B.D.G.M. Microbiologia da carne de frango. In: OLIVO, R. *O mundo do frango: cadeia produtiva da carne de frango*. Criciúma: do Autor, 2006. 680 p. cap. 55, p. 655-663.

FROTA, L.C.; CUNHA, M.P.S.S.; LIMA, C.R.; ARAÚJO-FILHO, A.H.; FROTA, L.A.S.; BRAGA, L.L.B.C. *Helicobacter pylori* eradication using tetracycline and furazolidone versus amoxicillin and azithromycin in lansoprazole based triple therapy: an open randomized clinical Trial. *Arquivos de Gastroenterologia*, v. 42, n. 2, p. 111-115, 2005.

FUCHS, F.D.; WANNMACHER, L. *Farmacologia clínica: fundamentos da terapêutica racional*. 2.ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 1999. 678 p.

FUKUDA, R.T. Resíduos químicos e biológicos na carne. In: PRATA, L.F.; FUKUDA, R.T. *Fundamentos em Higiene e inspeção de carnes*. Jaboticabal: Funep, 2001. 326p. cap.XVII, p. 197-211.

FURLAN, R.L.; MACARI, M.; LUQUETTI, B.C. Como avaliar o efeito de uso de probióticos, prebióticos e flora de exclusão competitiva. In: SIMPÓSIO TÉCNICO DE INCUBAÇÃO, MATRIZES DE CORTE E NUTRIÇÃO, 5., 2004, Balneário Camboriu, Santa Catarina.

GEDEK, B. Probiotics in animal feeding. Effects on performance and animal health. *Feed Management*, Sea Iste, v. 3, n. 1, p. 21-24, 1986.

GHADBAN, G.S. Probiotics in Broiler production – a review. *Arch Geflügelk*, v. 66, n. 2, p. 49-58, 2002.

GONZALES, E. *Ação pró nutritive dos aditivos alimentares*. Curso de fisiologia da digestão e metabolismo dos nutrientes em aves. Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp. Jaboticabal, 2004.

GOTTSCHALL, D.W.; WANG, R. Depletion and bioavailability of [14C] furazolidone residues in swine tissues. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 43, p. 2520-2525, 1995.

HERNÁNDEZ, F.; MADRID, J.; GARCIA, V. Influence of two plant extracts on broilers performance, digestibility, and digestive organ size. *Poultry Science*, v. 83, p.169-174, 2004.

HOBBS, B.C.; ROBERTS, D. *Toxinfecções e controle higiênico-sanitário de alimentos*. São Paulo: Livraria Varela, 1998. 347 p.

HOF, H. Antibacterial activities of the antiparasitic drugs nifurtimox and benznidazole. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v.33, p.404-405, 1989.

HOLT, J.G.; KRIEG, N.R.; SNEATH, P.H.A.; STALEY, J.T.; WILLIAMS, S.T. Facultatively anaerobic Gram-negative rods. In: *Bergey's Manual of determinative bacteriology*. 9 ed., Baltimore: Williams & Wilkins, 1994. 787 p.

IARC. International Agency for Research on Cancer. *Nitrofurural (Nitrofurazone)*. Disponível em: <<http://monographs.iarc.fr/ENG/Monographs/vol50/mono50-14.pdf>>. Acesso em: 11 de novembro de 2009.

ICMSF. INTERNATIONAL COMMISSION ON MICROBIOLOGICAL SPECIFICATIONS FOR FOODS. *Microrganismos de los alimentos*. Su significado y métodos de enumeración. 2. ed. Zaragoza: Editorial Acribia, 2000. p.147-150.

JAY, J.M. *Microbiología de alimentos*. 6.ed. Porto Alegre: Editora Artmed, 2005. 711 p.

JONES, L.M; BOOTH, N.H.; McDONALD, L.E. *Farmacologia e Terapêutica em Veterinária*. 4. ed. Rio de Janeiro: Ed. Guanabara Koogan S.A., 1983. 1000p. Tradução de: *Veterinary Pharmacology and Therapeutics*.

JORGENSEN, M.A.; MANOS, J.; MENDZ, G.L.; HAZELL, S. The mode of action of metronidazole in *Helicobacter pylori*: futile cycling or reduction? *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, n. 41, p. 67-75, 1998.

KARCI, A.; BALCIOGLU, I.A. Investigation of the tetracycline, sulfonamide, and fluoroquinolone antimicrobial compounds in animal manure and agricultural soils and Turkey. *Science of the Total Environment*, 407, p. 4652-4664, 2009.

KASZANYITZKY, É.J.; TENK, M.; GHIDÁN, Á.; FEHÉRVÁRI, G.Y.; PAPP, M. Antimicrobial susceptibility of enterococci strains isolated from slaughter animals on the data of Hungarian resistance monitoring system from 2001 to 2004. *International Journal of Food Microbiology*, n.115, p. 119-123, 2007.

KEMPER, N. Veterinary antibiotics in the aquatic and terrestrial environment. *Ecological Indicators*, v. 8, p. 1-13, 2008.

KENNEDY, G. Nitrofuranos em Avicultura. *IV Simpósio Brasil Sul de Avicultura*. Chapecó/SC, Brasil, 2003.

KHARDORI, N. Antibiotics: Past, Present, and Future. *The Medical Clinics of North America*, n. 90, p. 1049-1076, 2006.

KONEMAN, E.W.; ALLEN, S.D.; JANDA, W.M.; SCHRECKENBERGER, P.C.; WOODS, G.L.; WINN JR., W.C. *Koneman's Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology*. 6.ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2006.

KUENZEL, W.J.; ABDEL-MAKSOUND, M.M.; ELSASSER; PROUDMAN, J.A. Sulfamethazine advances puberty in male chicks by effecting a rapid increase in gonadotropins. *Comparative Biochemistry Physiology – Part A*, v. 137, n. 2, p. 349-355, 2004.

LANCINI, J.B. Fatores exógenos na função gastrointestinal. In: *Fisiologia da Digestão e Absorção das Aves*. Fundação Apinco, 1994. p. 99-126.

LEVY, S. B. *The challenge of antibiotic resistance*. Scientific American 30 abr., 1999, Disponível em:<<http://www.sciam.com/1998/0398issue/0398levy.html>>. Acesso em 07 junho 2010.

LODISH, H.; BERK, A.; MATSUDAIRA, P.; KAISER, C.A.; KRIEGER, M.; SCOTT, M.P.; ZIPURSKY, L.; DARNELL, J. *Biologia Celular e Molecular*. 5ª Edição Porto Alegre: Artmed, 2007. 1054p.

LOURENÇO, N.G.G.S.; TAKAHASHI, C.K.; LOPES, T.F.; LOPES, C.A.M. Environmental parameters and antimicrobial susceptibility of enterobacteriaceae isolated from estuarine waters of São Vicente, São Paulo, Brasil. *The Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases*, v. 13, n. 2, p. 472-478, 2007.

MACHADO, R.S.; SILVA, M.R.; VIRIATO, A. Furazolidona, tetraciclina e omeprazol: uma alternativa de baixo custo para erradicação de *Helicobacter pylori* em crianças. *Journal de Pediatria*, v. 84, n. 2, p. 160-165, 2008.

MADIGAN, M.T.; MARTINKO, J.M.; PARKER, J. *Microbiologia de Brock*. 10º Edição. São Paulo: Prentice Hall, 2004. 608 p.

MADRP. Ministério da Agricultura, do Desenvolvimento Rural e das Pescas. *Resíduos de Nitrofuranos em Portugal – Relatório Final*, Lisboa, 2003. Disponível em: www.portugal.gov.pt/pt/Documentos/Governo/.../Relatorio_Nitrofuranos.p... Acesso em: 21 de outubro de 2010.

MAGALHÃES, M.; VÉRAS, A. Resistência transferível em culturas de Salmonella typhimurium isoladas no Recife. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, v.17, n.2, p.75-78, 1975.

MAGALHÃES, H.M.; BOELTER, R.; SIVA, A.R. *Elementos de Farmacologia Veterinária*. 3. ed. Porto Alegre: Ed. Sulina, 1985. 199p.

MAIA, A.J; CANTISANI, M.L.; ESPOSTO, E.M.; SILVA, W.C.P.; RODRIGUES, E.C.P.; RODRIGUES, D.P.; LÁZARO, N.S. Resistência antimicrobiana de *Pseudomonas aeruginosa* isolados de pescado e de cortes e miúdos de frango. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 29, n. 1, p. 114-119, 2009.

MAIORKA, A.; SANTIN, E.; SUGETA, S.M.; ALMEIDA, J.G.; MACARI, M. Utilização de Prebióticos, Probióticos ou Simbióticos em dietas para frangos. *Revista Brasileira de Ciência Avícola*, v. 3, n. 1, 2001.

MANGIA, A.H.R. *Pesquisadora comenta a epidemia de E.coli na Europa*. Disponível em: <http://www.fiocruz.br/ccs/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?infolid=4029&sid=4>. Acesso em: 10 de agosto de 2011.

MARSHALL, B.J.; GOODWIN, C.S.; WARREN, J.R.; MURRAY, R.; BLINCOW, E.D.; BLACKBOUM, S.J.; PHILLIPS, M.; WATERS, T.E.; SANDERSON, C.R. Prospective double-blind trial of duodenal ulcer relapse after eradication of *Campylobacter pylori*. *The Lancet*, v. 332, n. 8628, p. 1437-1442, 1988.

McCRACKEN, R.J.; BLANCHFLOWER, W.J.; ROWAN, C.; McCOY, M.A. e KENNEDY, D.G. Determination of furazolidone in porcine tissue using thermospray liquid chromatography-mass spectrometry and a study of the pharmacokinetics and stability of its residues. *Analyst*, v. 120, p. 2347-2351, 1995.

McKEON, D.M.; CALABRESE, J.P.; BISSONNETTE, G.K. Antibiotic resistant gram-negative bacteria in rural groundwater supplies. *Water Research*, vol.29, n.8, p.1902-1908, 1995.

MENEZES, E.A.; ALENCAR, A.M.; CUNHA, F.A.; ÂNGELO, M.R.F.; SALVIANO, M.N.C.; OLIVEIRA, I.R.N. Frequência de cepas produtoras de enzima beta lactamase de espectro expandido (ESBL) e perfil de susceptibilidade de *Klebsiella pneumoniae* em hemo-culturas no berçário de um hospital em Fortaleza. *Revista Brasileira de Análises Clínicas*, v. 40, n. 1, pág. 7-11, 2008.

MENTEM, J.F.M. *Eficácia, efeito sinérgico e modo de ação de agentes antimicrobianos como promotores de crescimento em suínos*. 106 p. Tese – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1995.

MENTEM, J.F.M. Aditivos alternativos na produção de aves: probióticos e prebióticos. In: SBZ, 38, 2001, Piracicaba, SP. *Anais...* Piracicaba, SP: SBZ, 2001. p. 141-157.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. *Aspectos toxicológicos dos nitrofuranos e eventuais riscos para a saúde humana*. Lisboa: Direcção-Geral da Saúde, p. 1-9; 2003.

MIRANDA, J.M.; GUARDDON, M.; VÁSQUEZ, B.I.; FENTE, C.A.; BARROS-VELÁZQUEZ, J.; CEPEDA, A.; FRANCO, C.M. Antimicrobial resistance in *Enterobacteriaceae* strains isolated from organic chicken, conventional chicken and conventional turkey meat: A comparative survey. *Food Control*, 19, p.412-416, 2008.

MONTECINOS, S.M. Cloranfenicol e identidade. *Revista Chilena de Infectología*, v. 26, n. 6, p. 560-561, 2009.

MOTTIER, P.; KHONG, SP.; GREMAUD, E.; RICHOZ, J.; DELATOUR, T.; GOLDMANN, T.; GUY, P.A. Quantitative determination of four nitrofurantoin metabolites in meat by isotope dilution liquid chromatography-electrospray ionization-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, v.1067, p. 85-91, 2005.

MS. Ministério da Saúde - Secretaria de Vigilância em Saúde. *Dados Epidemiológicos – DTA período de 2000 a 2011*, Brasília, 2011. Disponível em: <www.portal.saude.gov.br/portal/.../dados_epidemiologicos_dta_15911.pdf>. Acesso em 4 de março de 2012.

NOVOTNY, C.; DIAS, N.; KAPANEM, A.; MALACHOVÁ, K; VÁNDROVCOVÁ, M.; ITÁVAARA, M.; LIMA, N. Comparative use of bacterial, algal and protozoan tests to study toxicity of azo-and anthraquinone dyes. *Chemosphere*, Oxford, v. 63, p. 1436-1442, 2006.

NWOSU, V.C. Antibiotic resistance with particular reference to soil microorganisms. *Research of Microbiology*, v. 152, n. 5, p. 421-430, 2001.

OLIVEIRA, W.F.; CARDOSO, W.M.; MARQUES, L.C.L.; SALLES, R.P.R.; AGUIAR FILHO, J.L.C.; TEIXEIRA, R.S.C.; ROMÃO, J.M.; LIMA, A.C.P. Utilização de diferentes meios de cultura para o isolamento de enterobactérias em amostras fecais de frangos de corte procedentes de explorações industriais do Estado do Ceará, Brasil. *Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias (RPCV)*, v.99, n. 552, p. 211-214, 2004.

OPH. *Nitrofurans*. Louisiana Department of Health and Hospitals. The Infectious Disease Epidemiology Section, Office of Public Health. Disponível em: <www.dhh.louisiana.gov/offices/miscdocs/docs-249/vet/nitrofurans.pdf>. Acesso em: 06 de julho de 2010.

OZGUMUS, O.B.; TOSUN, I.; AYDIN, F.; KILIC, A.O. Horizontal dissemination of TEM and SHV typr beta-lactamase genes carrying resistance plasmids amongst clonical isolates of *Enterobacteiaceae*. *Brazilian Journal of Microbiology*, v.39, n.4, p.636-643, 2008.

PALERMO-NETO, J.; SPINOSA, H.S.; GÓRNIK, S.L. *Farmacologia aplicada à avicultura*: Boas Práticas no Manejo de Medicamentos. Editora Roca Ltda, 2005.

_____. *Simpósio alerta para a crescente resistência de microrganismos a medicamentos: Os desdobramentos do uso veterinário de antimicrobianos sobre a saúde humana*. Agência Fiocruz de Notícias, Rio de Janeiro, 2006a. Disponível em: <<http://www.fiocruz.br/ccs/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?inford=548&sid=9>>. Acesso em 21 de janeiro de 2010.

_____. *Uso de medicamentos veterinários: Impactos na moderna avicultura*. In: Simpósio Brasil Sul de Avicultura, Chapecó, 2006, Anais. Chapecó, 2006b. p. 70-78.

PANTOZZI, F.L.; MOREDO, F.A.; VIGO, G.B.; GIACOBONI, G.I. Resistência a los antimicrobianos em bactérias indicadoras y zoonoticas aisladas de animales domésticos em Argentina. *Revista Argentina de Microbiologia*, v. 42, n. 1, 2010.

PARDI, M.C.; SANTOS, I.F.; SOUZA, E.R.; PARDI, H.S. *Ciência, higiene e tecnologia da carne*: Ciência e higiene da carne. Tecnologia da sua obtenção e transformação. 2.ed. Goiânia: Editora UFG, 2001. 623 p. v. 1.

PAULA, F.R.; SERRANO, S.H.P.; TAVARES, L.C. Aspectos mecanísticos da bioatividade e toxicidade de nitrocompostos. *Quimica Nova*, v. 32, n. 04, p. 1013-1020, 2009.

PEREIRA, A.L.; PITA, J.R. Alexander Fleming (1881-1955) – Da descoberta da penicilina (1928) ao Prêmio Nobel (1945). *Revista da Faculdade de Letras, História, III Série*, v. 6, p.129-151, 2005.

PERFEITO, L.; FERNANDES, L.; MOTA, C.; GORDO, I. Adaptive Mutations in Bacteria: High Rate and Small Effects. *Science*, v.317, n.5839, p.813-815, 2007.

PESSANHA, R.P.; GONTIJO FILHO, P.P. Uso de antimicrobianos como promotores de crescimento e resistência em isolados de *Escherichia coli* e de *Enterobacteriaceae* lactose-negativa da microbiota fecal de frangos de corte. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v.53, n. 01, 2001.

PETERSEN, A.; ANDERSEN, J.S.; KAEWMAK, T.; SOMSIRI, T.; DALSGAARD, A. Impact of integrated fish farming on antimicrobial resistance in a pond environment. *Applied and Environmental Microbiology*, v.68, n.12, p.6036-6042, 2002.

PETERSON, F.J.; MASON, R.P.; HOVSEPIAN, J.; HOLTZMAN, J.L. Oxygen-sensitive and -insensitive nitroreduction by *Escherichia coli* and rat hepatic microsomes. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 254, p. 4009-4014, 1979.

PETERSON, D.L. (2006). Resistance in gram-negative bacteria: *Enterobacteriaceae*. *American Journal of Medicine*, v. 34, n. 05, p. 20-28, 2006.

PHILLIPS, I.; CASEWELL, M.; COX, T.; GROOT, B.D.; FRIIS, C.; JONES, R.; NIGHTINGALE, C.; PRESTON, R.; WADDELL, J. Does the use of antibiotics in food animals pose a risk to human health? A critical review of published data. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 53, p. 28-52, 2004.

PRATA, L.F.; FUKUDA, R.T. *Fundamentos de Higiene e Inspeção de Carnes*. Jaboticabal: Funep, 2001. 326 p.

PRICE, P. *Residues meat Instruction: General residues background information*. 2009. Disponível em: <<http://www.dardni.gov.uk/vphu-moc-chapter-05-residues.pdf>>. Acesso em 14 de julho de 2010.

RACE, P.R.; LOVERING, A.L.; GREEN, R.M.; OSSOR, A.; WHITE, S.A.; SEARLE, P.F.; WRIGHTON, C.J.; HYDE, E.L.J. Structural and mechanistic studies of *Escherichia coli* nitroreductase with the antibiotic nitrofurazone. Reversed binding orientations in different redox states of the enzyme. *Journal of Biological Chemistry*, v.280, n.14, p.13256-13264, 2005.

RASFF. *The Rapid Alert System for Food and Feed. Annual Report 2009*. (Acesso em 21 de junho de 2011). Disponível em <ec.europa.eu/food/food/.../report2009_en.pdf>.

_____. *The Rapid Alert System for Food and Feed. Annual Report 2010*. (Acesso em 06 de dezembro de 2011). Disponível em <http://ec.europa.eu/food/food/rapidalert/index_en.htm>.

REMONATO, B.M.; FRANCO, A.P.G.; SCHWARZ, K.K.; FRANCO, S.G. Substituição de antimicrobianos por probióticos e prebióticos na alimentação de frangos de corte. In: ZOOTECA, 2008, João Pessoa, PB. *Anais...* João Pessoa, PB: ZOOTECA, 2008.

RIGOBELLO, E.C.; MALUTA, R.P.; ÁVILA, F.A. Performance of broiler chicken fed probiotics supplemented diet. *Ars Veterinaria*, v. 27, n. 2, p. 111-115, 2011.

ROE, M.T.; PILLAI, S.D. Monitoring and identifying antibiotic resistance mechanisms in bacteria. *Poultry Science*, v.82, n.4, p.622-626, 2006.

ROSSI, A.A. *Biossegurança em frangos de corte e saúde pública: limitações, alternativas e subsídios na prevenção de salmoneloses*. 2005. 111 f. Dissertação (Mestrado em Agroecossistemas) – Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis. 2005.

RUIZ B, J.D.; SUÁREZ, M.C. Susceptibilidade antimicrobiana *in vitro* de cepas de *Salmonella* spp. em granjas de ponedoras comerciais del departamento de Antioquia. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuárias*, v. 19, n. 3, p. 297-305, 2006.

SÁENZ, Y. *Caracterización fenotípica y genotípica de la resistencia a antibióticos en estirpes de Escherichia coli no patógenas de alimentos y de la microflora intestinal de humanos y animales*. Rioja - Logroño, 2001. 248p. Tese (Doutorado) – Área de Bioquímica e Biología Molecular, Universidade de La Rioja, Rioja - Logroño, 2004.

SANTOS, J.R.G.; TURNES, C.G. Probióticos em Avicultura. *Ciência Rural*, Santa Maria, v. 35, n. 3, p. 741-747, 2005.

SCHNEIDER, R.N.; NADVORNY, A.; SCHMIDT, V. Resistência antimicrobiana de *E. coli* em meio aquático. *Revista Biotemas*. Editora: UFSC, v. 22, n. 3, 2009.

SILVA, C.H.P.M. Beta-lactamase de espectro estendido: definições, importância clínica e detecção laboratorial. *Revista Brasileira de Análises Clínicas*, v.32, n.3, p. 215-219, 2000.

SILVA, E.N.; DUARTE, A. *Salmonella* Enteritidis em Aves: Retrospectiva no Brasil. *Revista Brasileira de Ciência Avícola*, v.4, n.2, p.85-100, 2002.

SIQUEIRA, R.S. *Manual de microbiologia de alimentos*. Brasília: Embrapa - Centro Nacional de Pesquisa de Tecnologia Agroindustrial de Alimentos, 1995. 159 p.

SISSON, G.; GOODWIN, A.; RAUDONIKIENE, A.; HUGHES, N.J.; MUKHOPADHYAY, A.K.; BERG, D.E.; HOFFMAN, P.S. Enzymes associated with reductive activation and action of nitazoxanide, nitrofurans, and metronidazole in *Helicobacter pylori*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v.46, p.2116-2123, 2002.

SMITH, M.A., EDWARDS, D.I. Oxygen scavenging, NADH oxidase and metronidazole resistance in *Helicobacter pylori*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v. 39, p. 347–353, 1997.

SOSA, A. *Pesquisador ressalta desafios colocados pela resistência bacteriana a antibióticos*. Agenda Fiocruz de Notícias: Entrevista, Rio de Janeiro, 2006.

Disponível em:

<<http://www.fiocruz.br/ccs/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?infoid=562&sid=3>>. Acesso em 21 de janeiro de 2010.

SPENSER, E.L. Compounding, extralabel drug use, and other pharmaceutical quagmires in avian and exotics practice. *Journal of Exotic Pet Medicine*, v. 13, n.1, p. 16-24, 2004.

SPISSO, B.F.; NÓBREGA, A.W.; MARQUES, M.A.S. Resíduos e contaminantes químicos em alimentos de origem animal no Brasil: histórico, legislação e atuação da vigilância sanitária e demais sistemas regulatórios. *Ciência & Saúde Coletiva*, v. 14, n. 6, p. 2091-2106, 2009.

SPOO, J.R.; RIVIERE, J.E. Antibióticos Aminoglicosídeos. In: ADAMS, H.R. *Farmacologia e Terapêutica em Veterinária*. São Paulo: Guanabara Koogan, 2003. 1048 p. cap. 43, p. 703-719.

SQUELLA, J.A.; LETELIER, M.E.; LINDERMEYER, L.; NUÑEZ-VERGARA, L.J. Redox behavior of nifuroxazide: generation of the one-electron reduction product. *Chemico-Biological Interactions*, v.99, p.227-238, 1996.

SWEENEY, E.A.; CHIPMAN, J.K.; FORSYTHE, S.J. Evidence for direct-acting oxidative genotoxicity by reduction products of azo dyes. *Environmental Health Perspectives*, v.102, p.119-122, 1994.

TAVARES, W. *Manual de antibióticos e quimioterápicos antiinfeciosos*. 3.ed. São Paulo: Editora Atheneu, 2001. 1220 p.

TEUBER, M. Veterinary use and antibiotic resistance. *Current Opinion in Microbiology*, v. 4, p. 493-499, 2001.

TORTORA, G.J.; FUNKE, B.R.; CASE, C.L. *Microbiologia*. 10.ed. Porto Alegre: Artmed, 2012. 934 p.

TOWNSON, S.M.; BOREHAM, P.F.L.; UPCROFT, P.; UPCROFT, J.A. Resistance to the nitroheterocyclic drugs. *Acta Tropica*, v. 56, p.173-194, 1994.

TRABULSI, L.R.; ALTHERTUM, F. *Microbiologia*. 5ª ed., São Paulo: Atheneu, 2008. 760 p.

UMBUZEIRO, G.A.; FREEMAN, H.; WARREN, S.H.; KUMMROW, F.; CLAXTON, L.D. Mutagenicity evaluation of the commercial product CI Disperse Blue 291 using different protocols of the *Salmonella* assay. *Food and Chemical Toxicology*, Oxford, v.43, p.49-56, 2005.

UNIÃO EUROPEIA Council Regulation 2377/90/EC of 26 June 1990, 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 Union L224*, 18/08/1990.

VALDERAS, M.S.; MARTÍN, M.V.M. Tetraciclinas, fenicoles, lincosamidas, polimixinas, espectinomomicina, fosfomicina. *Medicine – Programa de Formación Médica Continuada Acreditado*, v. 9, n. 58, p. 3776-3781, 2006.

VASS, M.; HRUSKA, K.; FRANEK, M. Nitrofurantoin antibiotics: a review on the application, prohibition and residual analysis. *Veterinarni Medicina*, v. 53, n. 9, p. 469-500, 2008.

VICENTE, D.; PÉREZ-TRALLERO, E. Tetraciclinas, sulfamidas y metronidazol. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, v. 28, n. 2, p. 122-130, 2010.

VESSONI, C.L.Z. *Resistência a antimicrobianos em cepas de Salmonella spp, Escherichia coli e Enterococcus spp isolada de carcaças de frango*. Campinas, 2003. 111f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2003.

WASSENAAR, T.M. Use of Antimicrobial Agents in Veterinary Medicine and Implications for Human Health. *Critical Reviews in Microbiology*, v. 31, n. 3, p. 155-169, 2005.

WHITE, P.A.; McLVER, J.; RAWLINSON, W.D. Integrons and Gene Cassettes in the *Enterobacteriaceae*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 45, n. 9, p. 2658-2661, 2001.

WHITE, D.G.; FEDORKA-CRAY, P.; CHILLER, T.C. National Antimicrobial Resistance Monitoring System (NARMS). *NMC Annual Meeting Proceedings*, p. 56-60, 2006.

ZHAO, C.; TANG, N.; WU, Y.; ZHANG, Y.; WU, Z.; LI, W.; QIN, X.; ZHAO, J.; ZHANG, G. First reported fatal *Morganella morganii* infections in chickens. *Veterinary Microbiology* (2010), doi: 10.106/j.vetmic.2011.11.021, 2011.

6 APÉNDICES

6.1 PERFIL DE RESISTÊNCIA – RAÇÃO CONTENDO FURAZOLIDONA

TABELA 2 - Perfil de resistência de microrganismos isolados de amostras fecais de frango de corte submetidos à dieta com furazolidona

MOO	FZD	FTD	NFT	NFZ	AMI	AMC	AMP	ATM	CFL	CPM	CFO	CAZ	CRO	CIP	CLO	GEN	PIT	SUT	TET
A 1	R	R	R	R	R		R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
A 2	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R		R
A 3	R	R	R	R	R					R	R	R			R	R	R	R	R
A 4	R	R	R	R	R			R			R	R	R	R		R			R
A 5	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R		R
A 6	R	R	R	R	R		R	R	R	R	R	R	R	R	R	R		R	R
A 7	R	R	R	R	R	R		R	R	R	R	R	R	R	R	R		R	R
A 8		R	R			R	R	R	R	R	R	R	R	R	R		R	R	R
A 9		R	R	R		R	R		R		R	R		R	R	R	R	R	R
A 10		R	R	R	R	R	R		R	R		R		R	R	R	R		R
A 11	R	R	R	R	R	R	R	R	R		R	R	R	R		R	R	R	R
A 12	R	R	R	R	R	R	R	R	R				R	R					R
A 13	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
A 14		R	R	R	R		R	R			R	R		R		R		R	R
A 15	R	R	R	R	R	R	R		R			R		R	R	R	R	R	R
A 16	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
A 17	R	R	R	R	R		R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R		R
A 18	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
B 1		R	R	R															R
C 1	R	R	R	R	R		R	R		R	R	R		R				R	R
D 1	R	R	R	R	R			R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
E 1		R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R		R
E 2	R	R	R	R	R	R		R		R	R	R			R	R	R	R	R
E 3	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
E 4	R	R	R	R	R	R		R		R		R	R			R			R

(MOO) Microrganismo; (FZD) Furazolidona; (FTD) Furaltadona; (NFT) Nitrofurantoína; (NFZ) Nitrofurazona; (AMI) Amicacina; (AMC) Amoxicilina/Ácido Clavulânico; (AMP) Ampicilina; (ATM) Aztreonam; (CFL) Cefalotina; (CPM) Cefepime; (CFO) Cefoxitina; (CAZ) Ceftadizima; (CRO) Ceftriaxona; (CIP) Ciprofloxacina; (CLO) Cloranfenicol; (GEN) Gentamicina; (PIP) Piperacilina/Tazobactam; (SUT) Sulfazotrim; (TET) Tetraciclina; A = *Escherichia coli*; B = *Escherichia fergusonii*; C = *Enterobacter aerogenes*; D = *Hafnia alvei*; E = *Klebsiella* spp.; R = Resistência; Espaço em branco = Sensibilidade.

6.2 PERFIL DE RESISTÊNCIA – RAÇÃO CONTENDO FURALTADONA

TABELA 3 - Perfil de resistência de microrganismos isolados de amostras fecais de frango de corte submetidos à dieta com furaltadona

MOO	FZD	FTD	NFT	NFZ	AMI	AMC	AMP	ATM	CFL	CPM	CFO	CAZ	CRO	CIP	CLO	GEN	PIT	SUT	TET
A 1	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
A 2	R	R	R	R	R		R	R	R	R	R	R	R	R		R	R	R	R
A 3		R	R	R	R		R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R		R
A 4	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
A 5	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
A 6	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
A 7	R	R	R	R	R		R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
A 8	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
A 9	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R		R	R	R	R
A 10	R	R	R	R		R	R	R	R	R			R					R	R
A 11	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R		R		R	R
A 12	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
A 13	R	R	R	R	R		R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
A 14	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
A 15	R	R	R	R			R	R	R	R	R	R	R	R	R	R			R
B 1	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R		R
C 1	R	R	R	R			R	R		R	R	R		R	R	R	R	R	R
C 2	R	R	R	R			R	R			R	R			R		R	R	R

B 4	R	R	R	R		R	R		R			R	R	R		R	R	R
B 5	R	R	R	R						R			R	R	R			R
B 6	R	R	R	R	R			R		R			R	R	R	R	R	R
B 7	R	R	R	R	R			R		R			R	R			R	R
B 8	R		R	R	R			R	R		R	R	R	R	R		R	R
B 9	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
B 10	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R			R
B 11	R	R	R	R	R					R		R		R				R
B 12		R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R			R		R
B 13	R	R	R	R									R	R				
B 14	R	R	R	R									R			R		R
B 15	R	R	R	R									R					R
B 16	R	R	R	R	R			R		R	R	R	R				R	R
B 17	R	R	R	R				R		R	R					R		R
C 1	R	R	R	R			R							R			R	R
D 1	R	R	R	R						R			R	R		R		R
D 2		R	R	R			R			R			R			R		R
D 3			R	R				R			R		R					R
E 1	R	R	R	R	R	R		R	R		R	R	R	R			R	
E 2		R	R	R	R		R	R	R	R	R		R	R				R
E 3		R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R				R
F 1	R	R	R	R											R		R	R
F 2	R	R	R	R	R			R	R		R	R	R	R		R		R
G 1	R	R	R	R				R		R					R		R	R
G 2	R	R	R	R	R			R		R	R	R	R		R		R	R
G 3		R	R	R	R		R	R					R	R				R

(MOO) Microrganismo; (FZD) Furazolidona; (FTD) Furalfadona; (NFT) Nitrofurantoína; (NFZ) Nitrofurazona; (AMI) Amicacina; (AMC) Amoxicilina/Ácido Clavulânico; (AMP) Ampicilina; (ATM) Aztreonam; (CFL) Cefalotina; (CPM) Cefepime; (CFO) Cefoxitina; (CAZ) Ceftadizima; (CRO) Ceftriaxona; (CIP) Ciprofloxacina; (CLO) Cloranfenicol; (GEN) Gentamicina; (PIP) Piperacilina/Tazobactam; (SUT) Sulfazotrim; (TET) Tetraciclina; A = *Citrobacter* spp.; B = *Escherichia coli*; C = *Escherichia hermannii*; D = *Enterobacter* spp.; E = *Klebsiella* spp.; F = *Morganella morganii*; G = *Proteus* spp.; R = Resistência; Espaço em branco = Sensibilidade.

E 9	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
E 10	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
E 11	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
F 1	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R		R	R	R	R
F 2	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
F 3	R	R	R	R	R		R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
F 4	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R

(MOO) Microrganismo; (FZD) Furazolidona; (FTD) Furaltadona; (NFT) Nitrofurantoína; (NFZ) Nitrofurazona; (AMI) Amicacina; (AMC) Amoxicilina/Ácido Clavulânico; (AMP) Ampicilina; (ATM) Aztreonam; (CFL) Cefalotina; (CPM) Cefepime; (CFO) Cefoxitina; (CAZ) Ceftadizima; (CRO) Ceftriaxona; (CIP) Ciprofloxacina; (CLO) Cloranfenicol; (GEN) Gentamicina; (PIP) Piperacilina/Tazobactam; (SUT) Sulfazotrim; (TET) Tetraciclina; A = *Escherichia coli*; B = *Enterobacter* spp.; C = *Escherichia fergusonii*; D = *Hafnia alvei*; E = *Klebsiella* spp.; F = *Pseudomonas* spp.; R = Resistência; Espaço em branco = Sensibilidade.

6.5 PERFIL DE RESISTÊNCIA – RAÇÃO SEM MEDICAÇÃO

TABELA 6 - Perfil de resistência de microrganismos isolados de amostras fecais de frango de corte sem utilização de antimicrobianos na ração (controle)

MOO	FZD	FTD	NFT	NFZ	AMI	AMC	AMP	ATM	CFL	CPM	CFO	CAZ	CRO	CIP	CLO	GEN	PIT	SUT	TET
A 1	R	R	R	R		R	R		R			R		R	R	R	R	R	
A 2		R	R	R				R			R				R	R	R		
A 3	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R		R	R		R	R
A 4	R	R	R	R	R			R	R	R	R	R	R	R	R		R	R	R
A 5		R	R	R	R			R	R	R	R	R	R						R
A 6		R	R	R	R		R	R	R	R	R								R
A 7		R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
A 8	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R		R
A 9	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R		R	R	R	R
A 10			R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
A 11			R	R	R	R	R		R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
A 12		R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
A 13		R	R		R		R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
A 14	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
A 15	R	R	R	R	R														R
A 16	R	R	R	R	R		R	R	R	R	R		R						R
A 17		R	R	R	R			R		R			R						R
A 18		R	R	R	R			R		R	R	R	R	R	R			R	R
A 19		R	R	R	R			R			R		R	R	R		R	R	R
B 1		R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
B 2	R	R	R	R	R		R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
B 3	R	R	R	R	R		R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R		R
B 4	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R		R	R	R	R	R	R	R	R
B 5	R	R	R	R	R		R	R	R	R	R	R	R	R	R	R		R	R
B 6		R	R	R	R		R	R		R	R	R	R		R			R	R

(MOO) Microrganismo; (FZD) Furazolidona; (FTD) Furaltadona; (NFT) Nitrofurantoína; (NFZ) Nitrofurazona; (AMI) Amicacina; (AMC) Amoxicilina/Ácido Clavulânico; (AMP) Ampicilina; (ATM) Aztreonam; (CFL) Cefalotina; (CPM) Cefepime; (CFO) Cefoxitina; (CAZ) Ceftadizima; (CRO) Ceftriaxona; (CIP) Ciprofloxacina; (CLO) Cloranfenicol; (GEN) Gentamicina; (PIP) Piperacilina/Tazobactam; (SUT) Sulfazotrim; (TET) Tetraciclina; A = *Escherichia coli*; B = *Klebsiella* spp.; R = Resistência; Espaço em branco = Sensibilidade.