

UNIVERSIDADE DE LISBOA

FACULDADE DE FARMÁCIA DE LISBOA



**PESQUISA E QUANTIFICAÇÃO DE RESÍDUOS DE
ANTIBIÓTICOS EM LEITÕES PARA CONSUMO HUMANO**

Paula Alexandra Rato da Costa Fonseca

Mestrado em Controlo da Qualidade e Toxicologia dos Alimentos

Julho de 2007

UNIVERSIDADE DE LISBOA

FACULDADE DE FARMÁCIA DE LISBOA



**PESQUISA E QUANTIFICAÇÃO DE RESÍDUOS DE
ANTIBIÓTICOS EM LEITÕES PARA CONSUMO HUMANO**

Paula Alexandra Rato da Costa Fonseca

Dissertação orientada por Doutora Maria Eduardo da Costa Morgado Figueira
Dr. Manuel Abreu Dias

Mestrado em Controlo da Qualidade e Toxicologia dos Alimentos

Julho de 2007

Agradecimentos

Agradeço à Prof. Doutora Maria Eduardo Figueira pelo apoio prestado, orientação dada e por me ter posto em contacto com as pessoas que me apoiaram na realização de toda a parte experimental da tese. Obrigada por ter sempre podido contar consigo.

Agradeço ao Dr. Abreu Dias pela orientação dada na escolha do tema da tese, pelo apoio prestado sempre que preciso, possibilitando ainda os contactos necessários para que fosse possível a obtenção de amostras de leitão para o meu trabalho.

Agradeço à professora Madalena Pimentel que me permitiu a realização da parte experimental referente aos métodos microbiológicos a horas tardias sem que me tivesse faltado qualquer apoio. Pela sua ajuda, ensinamentos e disponibilidade no apoio prestado, sem os quais não teria conseguido.

Ao Dr. Jorge Barbosa quero agradecer por ter possibilitado a realização dos métodos de confirmação no LNIV, por todo o apoio prestado, ensinamentos e orientação na análise dos resultados.

Obrigada à Rita Barbosa e Andreia Freitas por toda a ajuda dada na obtenção dos resultados, pelo apoio na compreensão dos diferentes métodos de confirmação utilizados e pela disponibilidade demonstrada.

Agradeço ao casal que permitiu a recolha das amostras sem as quais este trabalho não teria sido possível. Obrigada pela vossa disponibilidade e ajuda.

Aos meus pais e à minha irmã, agradeço por tudo. Por todo o amor e a força que me deram, e pelo apoio incondicional e constante sem o qual não teria conseguido fazer este Mestrado (e muito mais).

Por fim, quero agradecer à Cláudia, minha grande amiga e novamente companheira de estudos, pois se não estivéssemos juntas em mais esta odisséia não penso que teríamos conseguido.

Resumo

O consumo de alimentos de origem animal contendo resíduos de agentes antimicrobianos ou seus metabolitos, pode originar efeitos tóxicos directos nos consumidores, como reacções alérgicas em indivíduos hipersensíveis, ou efeitos indirectos, como indução do desenvolvimento de bactérias resistentes. As possíveis consequências para a saúde humana são potenciadas pelo elevado consumo de alimentos de origem animal.

Os leitões são bastante susceptíveis ao aparecimento de doenças infecciosas pelo que, na maioria das explorações convencionais, o tratamento com agentes antimicrobianos é iniciado pouco tempo após o nascimento, quer para fins terapêuticos como profiláticos.

No presente trabalho foram pesquisados em leitões resíduos de antibióticos β -lactâmicos, tetraciclina, sulfonamidas, aminoglicosídeos e macrólidos, pelo teste das 4 Placas, e de tetraciclina, sulfonamidas, macrólidos, quinolonas, quinoxalinas e coccidiostáticos por métodos de confirmação LC-MS/MS. Dado que a carne de leitão é cozinhada antes de consumida, foram analisadas amostras em cru e em assado.

Os resultados obtidos em ambos os métodos para as amostras em cru revelaram, para algumas, a presença de resíduos de tetraciclina acima dos LMR estabelecidos, tendo sido detectada a presença de antibióticos β -lactâmicos e aminoglicosídeos pelo método das 4 Placas. Duas das amostras em assado analisadas revelaram, por LC-MS/MS, quantidades vestigiárias de tetraciclina, não apresentando resíduos, em concentração acima dos limites de detecção, dos restantes compostos analisados.

Observa-se, assim, a presença de resíduos de medicamentos veterinários cuja concentração é reduzida para níveis vestigiários pelo processo de assadura ao qual os leitões são normalmente submetidos antes de serem consumidos, indicando que o consumo de leitão assado não coloca em risco a saúde do consumidor no que respeita à presença destes compostos. No entanto, dada a possibilidade de haver formação de compostos de degradação durante o processamento, não se pode afirmar que a carne assada encontra-se isenta de resíduos e que não existe risco para a saúde humana.

Palavras-Chave

Antibióticos; Agentes antimicrobianos; Resíduos; Animais de produção; Leitões;
Método das quatro placas; LC-MS/MS

Abstract

Antibiotic residues or their metabolites may have direct toxic effects, like causing allergic reactions in hypersensitive individuals, or indirect effects, like inducing the development of resistant strains of bacteria. The possible consequences for Human health are increased due to the high consumption of foods from animal origin.

Usually, piglets develop infectious diseases. In most conventional herds, antibiotic treatment starts soon after birth, with both therapeutic and prophylactic treatments. In the present work, piglet meat was analyzed for residues of antibiotics β -lactams, tetracyclines, sulphonamides, aminoglycosides and macrolides, with the 4 Plate Test, and for residues of tetracyclines, sulphonamides, macrolides, quinolones, quinoxalines and coccidiostatics with LC-MS/MS confirmatory tests.

Since piglet's meat is cooked before consumption, raw and roast samples were analyzed. The results obtained for raw meat, in both tests, revealed the presence of residues of tetracyclines above the established LMR. The results obtained for the 4 Plate Test indicated the presence antibiotics β -lactam and aminoglycosides.

LC-MS/MS analysis for the roast samples revealed, in two cases, trace amounts of tetracyclines residues. For the other analyzed antibiotics, no residues, at concentrations above the detection limits of the methods, were detected. These results suggests that the meat processed with high temperatures reduces, to very low levels, the concentrations of residues eventually present in raw meat, thus safeguarding the health of the consumer, regarding to the present of these compounds. However, given the possibility that degradation products can be formed during the roasting process, it cannot be affirmed that the meat is free of residues and, consequently, safe for the consumer.

Keywords

Antibiotic; Antimicrobial agents; Residues; Food animals; Piglets; Four Plate Method;
LC-MS/MS

Índice Geral

Agradecimentos	i
Resumo	ii
Abstract	iv
Índice Geral	vi
Índice de Figuras.....	viii
Índice de Tabelas	x
Lista de Abreviaturas	xiii
1 Introdução	1
1.1 Uso de Antibióticos em Animais de Produção	1
1.2 Monitorização de Resíduos.....	7
1.3 Exemplos de Tipos de Compostos	10
1.3.1 β -Lactâmicos	10
1.3.2 Tetraciclinas	11
1.3.3 Sulfonamidas	12
1.3.4 Aminoglicosídeos	13
1.3.5 Macrólidos.....	13
1.3.6 Quinolonas	14
1.3.7 Quinoxalinas.....	15
1.3.8 Coccidiostáticos.....	15
2 Objectivo do Trabalho Realizado	17
3 Pesquisa de Resíduos de Antibióticos	19
3.1 Processo de Amostragem.....	19
3.2 Método de Triagem	21
3.2.1 Descrição e Campo de Aplicação	21
3.2.2 Meios e Reagentes	22
3.2.3 Procedimento.....	25
3.2.4 Resultados	28
3.2.5 Discussão e Conclusões	33
3.3 Métodos de Confirmação e Quantificação.....	40
3.3.1 Descrição Geral dos Métodos.....	44
3.3.2 Tetraciclinas	48
3.3.3 Sulfonamidas	57

3.3.4	Macrólidos.....	64
3.3.5	Quinolonas	72
3.3.6	Quinoxalinas.....	77
3.3.7	Coccidiostáticos.....	82
3.3.8	Discussão e Conclusões Gerais dos Métodos de Confirmação.....	87
4	Discussão de Resultados e Conclusão Gerais.....	89
5	Bibliografia	95

Índice de Figuras

Figura 1 - Placa de teste com o meio de ágar a pH 7,2 inoculado com a suspensão de esporos de <i>Bacillus subtilis</i> . Na fotografia são visualizadas 3 amostras em duplicado identificadas com os números 1, 2 e 3. Todas foram consideradas positivas por apresentarem, respectivamente, halos de inibição médios de 3, 4 e 2 mm de largura.	29
Figura 2 – Placa de teste com o meio de ágar a pH 8 inoculado com a cultura de <i>Micrococcus luteus</i> . O disco de controlo contém 20 µL da solução de trabalho de eritromicina. Observa-se um halo de inibição de 7 mm de largura. São visualizadas 4 amostras em duplicado identificadas com os números 1, 2, 3 e 4. Apenas as amostras 2 e 3 foram consideradas positivas por apresentarem, respectivamente, halos de inibição médios de 2 e 5 mm de largura. A amostra 1 foi considerada duvidosa por apenas uma das sub-amostras apresentar um halo de inibição.	29
Figura 3 – Placa de teste com o meio de ágar a pH 6 inoculado com a suspensão de esporos de <i>Bacillus subtilis</i> . O disco de controlo contém 20 µL da solução de trabalho de penicilina e apresentou um halo de inibição de 6 mm. Não são observados halos de inibição nas amostras analisadas.	29
Figura 4 – Resultado global do teste de triagem para as amostras de leitão cru indicando o número de amostras analisadas e número obtido de amostras consideradas positivas e negativas.....	35
Figura 5 – Relação entre o número de amostras consideradas positivas em cada uma das placas de teste ou o número de amostras consideradas negativas, e o total de amostras de leitão cru analisadas.	36
Figura 6 – Esquema do processo de extracção utilizado no método de confirmação para as tetraciclinas em estudo.	49
Figura 7 – Esquema do processo de limpeza em fase sólida utilizado no método de confirmação para as tetraciclinas em estudo.....	50
Figura 8 – Cromatograma obtido em modo MRM ajustado para a detecção do par iónico 445,5/410,1 da TC.	52
Figura 9 – Cromatograma obtido em modo MRM ajustado para a detecção do par iónico 479,4/444,0 da CITC.	52
Figura 10 – Cromatograma obtido em modo MRM ajustado para a detecção do par iónico 461,5/426,2 da OTC.....	52

Figura 11 – Cromatograma obtido em modo MRM ajustado para a detecção do par iónico 445,5/428,1 da DC.....	52
Figura 12 – Cromatograma obtido em modo MRM ajustado para a detecção do par iónico 465,1/448,0 da DMTC.....	53
Figura 13 – Esquema do processo de extracção utilizado no método de confirmação para as sulfonamidas em estudo.....	59
Figura 14 – Esquema do processo de limpeza em fase sólida utilizado no método de confirmação para as sulfonamidas em estudo.....	60
Figura 15 – Esquema do processo de extracção utilizado no método de confirmação para os macrólidos em estudo.....	66
Figura 16 – Esquema do processo de limpeza em fase sólida utilizado no método de confirmação para os macrólidos em estudo.....	67
Figura 17 – Esquema do processo de extracção utilizado no método de confirmação para as quinolonas em estudo.....	73
Figura 18 – Esquema do processo de limpeza em fase sólida utilizado no método de confirmação para as quinolonas em estudo.....	74
Figura 19 – Esquema do processo de extracção utilizado no método de confirmação para os resíduos marcadores das quinoxalinas em estudo.....	78
Figura 20 – Esquema do processo de limpeza em fase sólida utilizado no método de confirmação para os resíduos marcadores das quinoxalinas em estudo.....	79
Figura 21 – Esquema do processo de extracção utilizado no método de confirmação para os resíduos dos agentes coccidiostáticos em estudo.....	83
Figura 22 – Esquema do processo de limpeza em fase sólida utilizado no método de confirmação para os agentes coccidiostáticos em estudo.....	84

Índice de Tabelas

Tabela 1 – Limites máximos de resíduos estabelecidos para alguns antibióticos β -lactâmicos usados em suínos (CEE 2377/90).	11
Tabela 2 – Limites máximos de resíduos estabelecidos para alguns aminoglicosídeos usados em suínos (CEE 2377/90; CE 868/2002; CE 1181/2002; CE 1530/2002; CE 324/2004).	13
Tabela 3 – Limites máximos de resíduos estabelecidos para os macrólidos analisados no método de confirmação (CEE 2377/90).	14
Tabela 4 – Limites máximos de resíduos estabelecidos para as quinolonas analisadas no método de confirmação (CEE 2377/90).	15
Tabela 5 – Quantidade da solução padrão de trabalho contida no disco de difusão e condições de incubação para cada uma das placas de teste.	28
Tabela 6 – Resultados obtidos no teste das quatro placas para as amostras de leitão cru (continua nas páginas seguintes).	30
Tabela 7 – Amostras agrupadas por data de recolha e por produtor considerando a numeração utilizada para o método das 4 Placas. As amostras com quantidade suficiente foram analisadas pelo método de confirmação e encontram-se classificadas alfanumericamente.	43
Tabela 8 – Tempos de retenção das tetraciclinas em análise e do padrão interno.	50
Tabela 9 – Condições operacionais do espectrómetro de massa para a identificação e quantificação das tetraciclinas em estudo.	51
Tabela 10 – Razão m/z dos iões moleculares e fragmentos correspondentes aos pares iónicos monitorizados (ião molecular/ião fragmento).	51
Tabela 11 – Conjuntos de amostras em cru por produtor e data de recolha analisados por LC-MS/MS e resultados obtidos.	53
Tabela 12 – Resultados obtidos na pesquisa de tetraciclinas para os conjuntos de amostras analisados por LC-MS/MS e para as amostras individuais em cru correspondentes, analisadas pelo teste das 4 Placas. São também apresentados os resultados obtidos para a placa a pH 8 inoculada com <i>M. luteus</i>	54
Tabela 13 – Conjuntos de amostras em assado por produtor e data de recolha analisados pelo método LC-MS/MS e resultados obtidos.	56
Tabela 14 – Tempos de retenção das sulfonamidas em análise e do padrão interno.	61

Tabela 15 – Condições operacionais do espectrômetro de massa para a identificação e quantificação das sulfonamidas em estudo.....	61
Tabela 16 – Razão m/z dos íões moleculares e fragmentos correspondentes aos pares iônicos monitorizados (ião molecular/ião fragmento).....	62
Tabela 17 – Conjuntos de amostras, por produtor e por data de recolha, analisados pelo método de identificação e quantificação de resíduos de sulfonamidas. Não foram identificados resíduos em concentrações acima dos limites de detecção do método.	62
Tabela 18 – Resultados obtidos na pesquisa de sulfonamidas para os conjuntos de amostras analisados por LC-MS/MS e para as amostras individuais em cru correspondentes, analisadas pelo teste das 4 Placas.....	63
Tabela 19 – Tempos de retenção dos macrólidos em análise e do padrão interno.....	67
Tabela 20 – Condições operacionais do espectrômetro de massa para a identificação e quantificação dos macrólidos em estudo.	68
Tabela 21 – Razão m/z dos íões moleculares e fragmentos correspondentes aos pares iônicos monitorizados (ião molecular/ião fragmento).....	68
Tabela 22 – Conjuntos de amostras por produtor e datas de recolha analisados pelo método de identificação e quantificação de resíduos de macrólidos. Não foram identificados resíduos em concentração acima dos limites de detecção do método..	69
Tabela 23 – Resultados obtidos na pesquisa de macrólidos para os conjuntos de amostras analisados por LC-MS/MS e para as amostras individuais em cru correspondentes, analisadas pelo teste das 4 Placas. São também apresentados os resultados obtidos para a placa a pH 6 inoculada com <i>B. subtilis</i> (continua na página seguinte).....	69
Tabela 24 – Tempos de retenção das quinolonas em análise.	75
Tabela 25 – Condições operacionais do espectrômetro de massa para a identificação e quantificação das quinolonas em estudo.....	75
Tabela 26 – Razão m/z dos íões moleculares e fragmentos correspondentes aos pares iônicos monitorizados (ião molecular/ião fragmento).....	76
Tabela 27 – Conjuntos de amostras por produtor e data de recolha analisados pelo método de identificação e quantificação de resíduos de quinolonas em estudo. Não foram identificados resíduos em concentrações acima dos limites de detecção do método.	76
Tabela 28 – Tempos de retenção das quinoxalinas em estudo.....	80

Tabela 29 – Condições operacionais do espectrómetro de massa para a identificação e quantificação das quinoxalinas em estudo.....	80
Tabela 30 – Razão m/z dos iões moleculares e fragmentos correspondentes aos pares iónicos monitorizados (ião molecular/ião fragmento).....	81
Tabela 31 – Conjuntos de amostras por produtor e data de recolha analisados pelo método de identificação e quantificação de resíduos de quinoxalinas em estudo. Não foram identificados resíduos em concentrações acima dos limites de detecção do método.	81
Tabela 32 – Tempos de retenção dos coccidiostáticos em análise e padrões internos. ..	85
Tabela 33 – Conjuntos de amostras por produtor e data de recolha analisados pelo método de identificação e quantificação de resíduos dos coccidiostáticos em estudo. Não foram identificados resíduos em concentrações acima dos limites de detecção do método.	86

Lista de Abreviaturas

CE	Comissão Europeia
CCE	Comissão das Comunidades Europeias
CEE	Comunidade Económica Europeia
CID	Collision-Induced Dissociation (Dissociação Induzida por Colisão)
CITC	Clorotetraciclina
DC	Doxiciclina
DDA	Dose Diária Aceitável
DGV	Direcção Geral de Veterinária
DL	Decreto-Lei
DMTC	Dimetiltetraciclina
EMA	European Medicines Agency
ESI	Electrospray Ionization (Ionização por Electrospray)
FEDESA	European Federation of Animal Health
LC	Liquid Chromatography (Cromatografia Líquida)
LC-MS/MS	Liquid Chromatography - Tandem Mass Spectrometry (Cromatografia Líquida com sistemas sequenciais de Espectrometria de Massa)
LMR	Limite Máximo de Resíduo
LNIV	Laboratório Nacional de Investigação Veterinária
m/z	Razão entre a massa e a carga do ião
MRM	Multiple Reaction Monitoring (Monitorização Múltipla de Reacções)
MS	Mass Spectrometry (Espectrometria de Massa)
OTC	Oxitetraciclina
PNCR	Plano Nacional de Controlo de Resíduos
SRM	Selected Reaction Monitoring (Monitorização Selectiva de Reacções)
TC	Tetraciclina
EU	União Europeia
WHO	World Health Organization (Organização Mundial de Saúde)

1 Introdução

Os agentes quimioterápicos são compostos que possuem uma toxicidade selectiva actuando sobre as células invasoras sem afectar significativamente as células do organismo. Os antibióticos constituem uma classe de agentes quimioterápicos, de origem natural ou química, que suprimem o crescimento de microrganismos chegando, nalguns casos, a destruí-los. Este grupo inclui compostos orgânicos produzidos por bactérias ou fungos e compostos sintéticos e semi-sintéticos. Muitos dos compostos existentes são alterados quimicamente com vista ao aumento da sua eficácia. A principal categoria de antibióticos são os antibacterianos mas também se incluem fármacos como os antivirais e antiprotozoários (CCE, 2001). No presente trabalho, tanto o termo “antibiótico” como a expressão “agente antimicrobiano” são usados para definir os compostos naturais, semi-sintéticos ou sintéticos usados no tratamento de doenças, capazes de destruir ou inibir o desenvolvimento de microrganismos, incluindo bactérias, fungos e protozoários. O termo “antibacteriano” é usado para definir compostos capazes de destruir ou inibir o desenvolvimento de bactérias. Esta classificação não é geral encontrando-se, na bibliografia, casos que definem antibióticos como sendo referentes a substâncias antibacterianas (CCE, 2001).

Os agentes antimicrobianos podem ser classificados de várias formas, mas, do ponto de vista analítico, a classificação de acordo com a estrutura química é a mais útil. Algumas das classes existentes são os aminoglicosídeos, β -lactâmicos, macrólidos, quinolonas (incluindo fluoroquinolonas), sulfonamidas e tetraciclina (Díaz-Cruz e Barceló, 2005). Outro tipo de classificação comum diz respeito ao fim a que se destinam, podendo os antibióticos ser classificados como sendo para fins terapêuticos, profiláticos ou de promoção de crescimento (Shea, 2004; Díaz-Cruz e Barceló, 2005; Barton, 2000; Phillips *et al.*, 2004).

1.1 Uso de Antibióticos em Animais de Produção

A descoberta dos antibióticos deu origem a uma nova era da terapia antimicrobiana levando a uma grande diminuição da morbidade e mortalidade causadas por doenças infecciosas. O aparecimento destes compostos teve um grande impacto nas medicinas humana e veterinária, na saúde pública e nos factores económicos associados. Os

agentes antimicrobianos têm sido usados em animais de produção desde os anos 50 (Di Corcia e Nazzari, 2002; Angulo *et al.*, 2004). O desenvolvimento das práticas de produção animal tem visado o aumento da produtividade e a intensificação da produção, levando a um favorecimento da dispersão de doenças e, simultaneamente, ao desenvolvimento de fármacos com vista ao tratamento e, mais tarde, à prevenção de doenças e promoção de crescimento (Price, 2005).

Nas explorações de animais, em especial nas intensivas, a protecção da saúde animal é fundamental e exige medidas rápidas e eficazes de profilaxia e tratamentos colectivos. Neste tipo de explorações a ocorrência de infecções cruzadas é comum e a vulnerabilidade a infecções é elevada, pelo que a administração de agentes antimicrobianos é, muitas das vezes, prolongada (Turnidge, 2004; Di Corcia e Nazzari, 2002). Normalmente, o uso terapêutico de antibióticos envolve o tratamento individual de animais durante um curto período de tempo, com doses superiores à concentração mínima inibitória do agente patogénico em causa. Por vezes, o tratamento terapêutico é efectuado por incorporação de antibióticos nos alimentos ou na água. No entanto, a eficiência deste tipo de administração é duvidosa na medida em que os animais doentes muitas vezes não comem nem bebem (Phillips *et al.*, 2004; Barton, 2000; Shea, 2004). O tratamento profilático envolve o uso de doses moderadas e elevadas, normalmente administradas nos alimentos ou na água, a um grupo de animais durante um período de tempo definido, e visa prevenir o aparecimento de doenças ou controlar a sua disseminação. Os medicamentos utilizados para este fim incluem agentes antibacterianos e coccidiostáticos (Price, 2005). No caso da promoção de crescimento, os agentes antimicrobianos são administrados na ração de todos os animais da produção, em concentrações subterapêuticas e durante períodos de tempo prolongados. A alteração da flora intestinal, através do aumento da proporção de microrganismos benéficos, melhora a digestão e a absorção dos nutrientes por parte dos animais. Este tipo de fármacos não deve incluir compostos usados para fins terapêuticos em humanos ou animais (Tollefson e Flynn, 2002). Os compostos utilizados como promotores de crescimento incluem hormonas, alguns antibióticos e beta-agonistas. Na UE é proibido o uso de hormonas e beta-agonistas para este fim, em animais produtores de alimentos (CE, 2006; Price, 2005). Aditivos alimentares contendo substâncias activas, são produzidos maioritariamente para as indústrias produtoras de suínos, frangos e peixes (Price, 2005).

A salvaguarda da saúde pública e animal, e do meio ambiente em geral, exige a utilização de medicamentos veterinários e alimentos medicamentosos de qualidade, eficazes e seguros, que garantam a ausência de níveis de resíduos e não coloquem em risco a saúde do consumidor (DL 151/2005). De acordo com a legislação, o termo “resíduo” é definido como sendo o resíduo de substâncias com acção farmacológica, ou dos seus metabolitos, bem como outras substâncias que estejam presentes nos animais, nas suas carnes ou noutros produtos deles provenientes, susceptíveis de prejudicar a saúde humana (CE 96/23). Apenas podem ser comercializados medicamentos veterinários que tenham sido autorizados de acordo com a legislação em vigor sendo uma das condições a definição, por parte do fabricante, dos intervalos de segurança correspondentes (Price, 2005). O intervalo de segurança corresponde ao período de tempo entre a última administração, nas condições normais de utilização, de um medicamento veterinário ou de um alimento medicamentoso e a obtenção de géneros alimentícios provenientes desse animal, a fim de garantir que os mesmos não contenham resíduos em teor superior aos limites máximos de resíduos estabelecidos em conformidade com o Regulamento (CEE) 2377/90, do Conselho, de 26 de Junho, e posteriores alterações (DL 184/97). Desta forma, compete ao fabricante exercer um controlo de qualidade dos produtos colocados no mercado, devendo o criador respeitar as disposições particulares referentes à prescrição (DL 151/2005).

O limite máximo de resíduos (LMR) é definido como sendo a concentração máxima de resíduos, resultante da utilização de um medicamento veterinário (expresso em mg/kg ou µg/kg de peso fresco), que a Comunidade pode aceitar como legalmente autorizada, ou que é reconhecida como aceitável, à superfície ou no interior de um alimento (CEE 2377/90). De acordo com a legislação em vigor, a comercialização de medicamentos veterinários para uso em animais destinados a produção de alimentos, apenas poderá ser aprovada caso os respectivos constituintes farmacologicamente activos se encontrem listados nos Anexos I, II ou III do Regulamento 2377/90 do Conselho (CEE 2377/90) e alterações posteriores. Neste Regulamento as substâncias farmacologicamente activas são incluídas numa das quatro categorias ou Anexos definidos. O Anexo I lista as substâncias para as quais foi estabelecido um LMR, o Anexo II as substâncias não submetidas a LMR, o Anexo III as substâncias para as quais foram fixados LMR provisórios e o Anexo IV as substâncias para as quais não foram fixados LMR dados os riscos, considerados inaceitáveis, para a saúde humana (CEE 2377/90; CE, 2006). O

LMR baseia-se no tipo e quantidade de resíduos que se considera não apresentar qualquer risco de toxicidade para a saúde humana nos termos expressos pela dose diária aceitável (DDA) ou com base numa DDA temporária com um factor de segurança adicional (CEE 2377/90; Currie *et al.*, 1998). Também são considerados outros riscos pertinentes para a saúde pública, a existência de resíduos nos alimentos de origem vegetal e/ou no ambiente, bem como aspectos de tecnologia alimentar. Por outro lado, o LMR pode ser reduzido de forma a torná-lo compatível com a boa prática de utilização de medicamentos veterinários, desde que se disponha de métodos práticos de análise (CEE 2377/90). Questões têm sido levantadas em relação ao facto do LMR de algumas substâncias farmacologicamente activas, especialmente de antibióticos, ser determinado com base nos limites da determinação analítica em vez de ser de acordo com a avaliação toxicológica ou de risco (Coffman e Beran, 1999). O desenvolvimento ao nível das técnicas analíticas tem permitido a revisão dos LMR estabelecidos.

O elevado e, nalguns casos, incorrecto uso de agentes antimicrobianos e, especificamente, o não cumprimento do intervalo de segurança, pode levar à existência, nos tecidos das carcaças dos animais, de quantidades dos compostos administrados acima das permitidas. A presença de resíduos em maior ou menor quantidade está relacionada com a natureza do produto, a dose utilizada, o modo de administração e o período decorrido entre a última administração e o abate do animal (Price, 2005; Coffman e Beran, 1999). Os agentes terapêuticos são normalmente administrados em partes por milhão (ppm). Após a administração, o medicamento pode estar presente nos tecidos quer na forma livre ou ligada, podendo, os resíduos presentes nos tecidos, corresponder ao composto pai ou a um metabolito. Os metabolitos formados podem ser mais ou menos activos do que o composto administrado (Price, 2005). O consumo de alimentos de origem animal contendo resíduos de agentes antimicrobianos ou de seus metabolitos, pode originar efeitos tóxicos directos nos consumidores, como por exemplo, reacções alérgicas em indivíduos hipersensíveis, ou efeitos indirectos, através da indução do desenvolvimento de bactérias resistentes e da transferência de resistência na flora intestinal do Homem (Dubois *et al.*, 2001; Dey *et al.*, 2003; Hussein *et al.*, 2005; Barton, 2000). O desenvolvimento de espécies resistentes a alguns dos antibióticos mais usados na medicina veterinária e a possibilidade desta resistência ser transferida para o Homem através da cadeia alimentar, contribuindo, assim, para o aparecimento e difusão do fenómeno da resistência antimicrobiana, é uma das

consequências mais graves e de preocupação geral (Currie *et al.*, 1998; WHO, 2004). Na realidade, a maioria das classes de antibióticos usados na medicina veterinária são análogos a compostos usados na medicina humana, aumentando a probabilidade de organismos patogénicos, presentes nos animais, desenvolverem resistência cruzada a antibióticos para humanos (Turnidge, 2004; Anderson *et al.*, 2003). A exceção são os ionofóros, como por exemplo a lasalocida, narasina, salinomina ou a monensina, e as quinoxalinas, como por exemplo o olanquidox (Turnidge, 2004). Desta forma, a Organização Mundial de Saúde (WHO – World Health Organization), recomendou, após a realização de uma série de estudos, o fim do uso de agentes antimicrobianos para fins de promoção de crescimento em animais de produção, caso sejam usados em humanos ou conduzam ao desenvolvimento de resistência cruzada a antimicrobianos usados em medicina humana (WHO, 1997; WHO, 2001).

O uso excessivo e inadequado de antibióticos está a originar o rápido desenvolvimento de microrganismos resistentes potenciando o número de casos de doenças, a falha de tratamentos e outros efeitos adversos, incluindo a morte, na medida em que poderão surgir microrganismos para os quais não existe tratamento (Anderson *et al.*, 2003; NZFSA, 2000). Adicionalmente, poderão haver efeitos a longo prazo, resultantes da exposição contínua e prolongada de pequenas quantidades, que ainda são desconhecidos (Bogialli *et al.*, 2006). Assim, de forma a minimizar o impacto na saúde pública do uso de agentes antimicrobianos em animais de produção de alimentos, deverá ser considerada tanto a presença de resíduos em tecidos edíveis como o nível de resistência da flora intestinal dos animais. Estas medidas permitirão não só proteger a saúde pública como também salvaguardar a eficácia futura dos antibióticos em medicina veterinária (Pena *et al.*, 2004).

Legalmente as empresas não são obrigadas a fornecer informação relativa à venda de agentes antimicrobianos em todos os Estados Membros pelo que dados referentes ao uso de antibióticos em animais são difíceis de obter (Schwarz e Chaslus-Dancla, 2001). De acordo com o Relatório elaborado pela EMEA (European Medicines Agency) em 1999, referente à resistência a antibióticos na UE associada às medicinas humana e veterinária, Portugal é um dos países para os quais pouca ou nenhuma informação existe relativamente ao uso de antibióticos (EMEA, 1999). A FEDESA (European Federation of Animal Health), a pedido da Comissão Europeia, procedeu à elaboração e recolha de

questionários com vista à obtenção de informação relativa ao consumo de antibióticos na EU em 1997. De acordo com este relatório, a venda de antibióticos para uso em animais para consumo humano, excluindo coccidiostáticos, nos países da UE e Suíça foi estimada em 5.093 toneladas das quais 3.494 toneladas (cerca de 69%) correspondem a antibióticos usados para fins terapêuticos e 1.599 (cerca de 31%) para fins de promoção de crescimento. Dos antibióticos usados para tratamento de doenças, 66% correspondem a tetraciclina, 12% a macrólidos, 9% a penicilinas e os restantes são correspondentes a outros grupos de antibióticos. Em Portugal, os valores estimados de venda de antibióticos para fins terapêuticos e de promoção de crescimento foram, respectivamente, 44 e 24 toneladas (EMEA, 1999; Schwarz e Chaslus-Dancla, 2001; Follet, 2000; CE, 1999). No geral, em Portugal, os agentes antimicrobianos mais usados em suínos são tetraciclina, tilosina, β -lactâmicos, sulfametazina e outras sulfonamidas. Estes últimos não são permitidos para fins de promoção de crescimento (Pena *et al.*, 2004).

Em Portugal, o consumo de leitões, suínos com idade inferior a 10 semanas e peso vivo inferior a 20 kg (DL 135/2003; INE, 2006), é bastante comum, tendo-se observado um aumento do número de reses abatidas desde 2001, sendo o total em 2005 de 973.499 (INE, 2006). Os leitões são bastante susceptíveis ao aparecimento de doenças infecciosas pelo que, na maioria das explorações convencionais de suínos, o tratamento com agentes antimicrobianos é iniciado pouco tempo após o nascimento (Roselli *et al.*, 2005). Dadas as doenças que normalmente atingem os leitões, estes recebem tratamento para a enterite e doenças respiratórias. Após o desmame, que não deverá ocorrer antes de 28 dias de idade (DL 135/2003), os leitões desenvolvem normalmente diarreias causadas por *Escherichia coli* sendo adicionados antibióticos à ração com vista à prevenção do aparecimento da infecção (NZFSA, 2000; Montagne *et al.*, 2004). Os agentes antimicrobianos normalmente usados para o tratamento são os aminoglicósidos neomicina e apramicina, a penicilina ampicilina, a quinolona enrofloxacina ou a sulfonamida trimetoprima (Harvey e Mason, 1998). Dada a falta de informação referente ao uso de agentes antimicrobianos em animais de produção em Portugal, não foi encontrada informação referente ao tipo e quantidade destes compostos que são mais usados em leitões. No entanto, dados obtidos junto de técnicos da área de medicina veterinária indicam que os agentes antimicrobianos mais usados nas diarreias dos leitões são o ceftiofur (uma cefalosporina de 3ª geração), a lincomicina (uma lincosamíde), a

trimetoprima (um derivado de diaminopirimidina) e a ciprofloxacina (uma fluoriquinolona). Tal como referido anteriormente, caso sejam abatidos animais, aos quais tenham sido administrados medicamentos veterinários, sem que o período de segurança tenha sido cumprido, os resíduos presentes poderão exceder os LMR estabelecidos.

1.2 Monitorização de Resíduos

As possíveis consequências para a saúde humana devido à existência de resíduos e à transferência de bactérias resistentes através do consumo de alimentos de origem animal são potenciadas pelo facto dos alimentos de origem animal terem um elevado consumo. Ao nível dos 15 Estados Membros da UE a 30 de Abril de 2004 (Bélgica, Alemanha, Áustria, Dinamarca, Espanha, Finlândia, França, Grécia, Itália, Irlanda, Luxemburgo, Países Baixos, Portugal, Reino Unido e Suécia) a carne mais consumida em 2005 foi a de suínos (17,9 milhões de toneladas), seguida da de galinha (8,4 milhões de toneladas) e de vaca/vitela (7,3 milhões de toneladas) (Eurostat, 2007). Várias organizações estão, assim, envolvidas no desenvolvimento de mecanismos de controlo para o uso de medicamentos veterinários em animais de produção de alimentos. Estes mecanismos incluem o controlo da distribuição e do uso, a determinação do limite máximo de resíduos e as técnicas de detecção utilizadas, sendo definidos Planos Nacionais de Controlo de Resíduos (PNCR).

A União Europeia estabelece medidas de controlo a aplicar a certas substâncias e aos seus resíduos nos animais vivos e respectivos produtos aplicáveis a todos os Estados Membros (CE 96/23). Desta forma os Estados Membros devem elaborar PNCR e garantir uma pesquisa de resíduos de substâncias de acção farmacológica e dos seus derivados, nos animais vivos e respectivos produtos, susceptíveis de tornar o seu consumo eventualmente perigoso ou nocivo para a saúde humana. De acordo com o relatório da Comissão Europeia referente à avaliação do controlo de resíduos em animais de produção em Portugal, realizada em 2003 (CE, 2003), verifica-se que o fornecimento de medicamentos veterinários é efectuado, na maioria dos casos, sem prescrição. Com base nos dados de um fornecedor consultado, cerca de 80% de alguns dos medicamentos veterinários foram vendidos directamente a produtores. Adicionalmente foi verificada a venda de quantidades consideráveis de medicamentos

autorizados, a produções nas quais a administração desses medicamentos era proibida (por exemplo, preparações de fenilbutazona que apenas são permitidas para uso em cavalos, vendidas a produtores de suínos e bovinos). Por outro lado, foi relatada a existência de prescrições veterinárias para animais para os quais os medicamentos em causa são proibidos. O relatório menciona ainda que a frequência de inspecções realizadas por parte das entidades responsáveis aos diferentes intervenientes nos processos de fornecimento e aquisição de medicamentos veterinários, é baixa. Verificasse, assim em Portugal, uma falta de controlo ao nível da venda e utilização de medicamentos veterinários. A possibilidade de utilização de compostos proibidos e/ou o não cumprimento do intervalo de segurança aumentam o risco da presença de resíduos e, conseqüentemente, o risco para a saúde humana. Este relatório menciona ainda que, apesar da Direcção Geral de Veterinária (DGV) possuir toda a informação necessária para a realização eficiente da supervisão e monitorização do progresso do PNCR, existem falhas ao nível da periodicidade de amostragem, do número de amostras recolhidas em animais vivos ou em carcaças no matadouro e do tempo decorrido entre a recolha das amostras e a realização das análises. Estes resultados sugeriam que a supervisão realizada não era plenamente eficiente (CE, 2003).

A pesquisa de resíduos de agentes antimicrobianos em animais de produção é normalmente realizada em carcaças de animais abatidos. No entanto, dado que a maioria destes alimentos são processados antes de serem ingeridos, torna-se importante avaliar a presença de resíduos nos alimentos processados. Existem estudos de estabilidade de alguns compostos sujeitos a diferentes processos, tempo e temperatura de processamento (Maris e Hurtaud-Pessel, 2000). Geralmente é assumido que resíduos de medicamentos veterinários eventualmente presentes em alimentos de origem animal sejam degradados quando sujeitos a altas temperaturas (Kuhne *et al.*, 2001). No entanto, os resultados obtidos nos diversos estudos sugerem que os efeitos ao nível da estabilidade dos compostos variam entre estes e de acordo com as condições do processamento. Adicionalmente há que considerar a hipótese de haver formação de compostos de degradação que poderão ser prejudiciais para a saúde humana (Kuhne *et al.*, 2001). No entanto, não existem muitos estudos acerca das cinéticas de destruição dos antibióticos, identificação de possíveis compostos de degradação e correspondente análise.

É importante a existência de processos de monitorização eficazes que permitam detectar resíduos de medicamentos veterinários em quantidades superiores aos LMR, impedindo a entrada de alimentos contaminados na cadeia alimentar (Currie *et al.*, 1998). Para a detecção de resíduos em tecidos são utilizados dois tipos de testes complementares: teste de triagem, que permite determinar a presença de resíduos de agentes terapêuticos, e o teste de confirmação, que permite a identificação e quantificação dos resíduos presentes (Price, 2005; Ferrini *et al.*, 2006). Os métodos de triagem devem ser económicos, de fácil execução e permitir a análise simultânea de um número elevado de amostras e a rápida obtenção de resultados (Okerman *et al.*, 2004; Bogialli *et al.*, 2006). Estes métodos deverão ser capazes de diferenciar amostras positivas e negativas em termos de presença de resíduos, em concentrações acima das estabelecidas na legislação, permitindo uma caracterização preliminar dos resíduos de antibióticos presentes e facilitando a selecção de métodos de confirmação adequados para a identificação e quantificação dos resíduos (Pena *et al.*, 2004; Ferrini *et al.*, 2006). Os métodos de triagem utilizados incluem ensaios microbiológicos, de inibição enzimática e ensaios de imunoafinidade. Uma vez que os medicamentos antimicrobianos são, provavelmente, a categoria de terapêuticos mais usada em animais de produção a nível mundial, os métodos de triagem normalmente utilizados correspondem a testes de inibição microbiana (CE, 2006). Estes métodos normalmente não são específicos, não distinguindo entre compostos pertencentes à mesma classe permitindo apenas uma análise semiquantitativa dos resíduos presentes podendo, nalguns casos, originar falsos positivos. Adicionalmente, requerem que não existam outras substâncias capazes de promover ou inibir o crescimento bacteriano ou que, de alguma forma, possam modificar a resposta do método ao analito pesquisado (Wang *et al.*, 2006; Bogialli *et al.*, 2006). Por outro lado, os resíduos de antibióticos em alimentos de origem animal não se encontram, normalmente, na forma livre pelo que os efeitos e estabilidade de resíduos ligados poderão diferir dos observados em compostos livres. Por exemplo, as tetraciclina quando ligadas, praticamente não possuem actividade antimicrobiana, o que faz com que não sejam detectadas em ensaios de triagem microbiológicos (Kuhne *et al.*, 2001). Ainda assim, dada a simplicidade e baixo custo associados, estes métodos continuam a ser bastante usados (Di Corcia e Nazzari, 2002; Dubois *et al.*, 2001).

Os testes de confirmação deverão ser quantitativos, específicos e precisos em termos de repetibilidade, na medida em que os resultados obtidos poderão ser usados para

confiscar os alimentos e ser objecto de uma acção legal que porventura se venha a desenvolver (Price, 2005; Di Corcia e Nazzari, 2002). Os métodos de confirmação mais usados são a cromatografia gás-líquido e as cromatografias líquida de alta pressão ou gasosa acopladas com espectrometria de massa (Price, 2005; Coffman e Beran, 1999). Estes métodos são muito específicos, pelo que não podem ser utilizados como métodos iniciais de análise, na medida em que existem muitas substâncias antimicrobianas que poderão estar presentes nos alimentos. Desta forma, a escolha dos métodos de confirmação apropriados requer o conhecimento prévio das famílias das substâncias presentes (Ferrini *et al.*, 2006).

1.3 Exemplos de Tipos de Compostos

Existem vários tipos de agentes antimicrobianos usados em animais de produção. Do ponto de vista analítico estes compostos encontram-se agrupados em diferentes classes. A descrição geral de algumas das classes e compostos pertencentes às mesmas são apresentados de seguida.

1.3.1 β -Lactâmicos

Esta classe de agentes antimicrobianos engloba vários grupos de compostos sendo as penicilinas e cefalosporinas as mais importantes (Díaz-Cruz e Barceló, 2005). Estes compostos são muito utilizados em medicina veterinária para a prevenção e tratamento de infecções bacterianas (Kennedy *et al.*, 1998; Becker *et al.*, 2004). São compostos quimicamente semelhantes possuindo um anel β -lactâmico, sendo as cefalosporinas mais estáveis, especialmente ao ataque de enzimas como a penicilase. No entanto, estas últimas são relativamente dispendiosas o que reduz o seu uso em medicina veterinária. Os β -lactâmicos possuem uma forte actividade contra bactérias Gram positivas mas uma acção relativamente fraca contra bactérias Gram negativas (Price, 2005). A manipulação da cadeia lateral das penicilinas tem alterado o espectro antibacteriano de modo a incluir bactérias Gram negativas. As penicilinas possuem um efeito tanto bactericida, provocando a morte, como bacteriostático, inibindo o crescimento de bactérias sensíveis. As cefalosporinas são bactericidas interferindo com a síntese da parede celular (Kennedy *et al.*, 1998).

O uso inadequado de antibióticos β -lactâmicos em animais de produção pode resultar na existência de resíduos em concentrações que podem originar riscos para a saúde humana. Desta forma, e dado o potencial alérgico destes compostos em pessoas sensíveis, foram estabelecidos limites máximos de resíduos em tecidos de animais para consumo humano (Becker *et al.*, 2004; Verdon *et al.*, 2000). A legislação actual estabelece LMR para diferentes substâncias farmacologicamente activas pertencentes aos grupos das penicilinas e cefalosporinas (CEE 2377/90). Na Tabela 1 são apresentados os LMR definidos para alguns dos antibióticos β -lactâmicos permitidos em suínos.

Tabela 1 – Limites máximos de resíduos estabelecidos para alguns antibióticos β -lactâmicos usados em suínos (CEE 2377/90).

Composto	LMR ($\mu\text{g}/\text{kg}$ músculo suíno)
<i>Penicilinas</i>	
Amoxicilina	50
Ampicilina	50
Fenoximetilpenicilina	25
Oxacilina	300
<i>Cefalosporinas</i>	
Cefquinoma	50
Ceftiofur	1 000

1.3.2 Tetraciclina

As tetraciclina, como a tetraciclina, clorotetraciclina, oxitetraciclina e doxiciclina são antibióticos de largo espectro, activos contra a maioria das bactérias Gram positivas e Gram negativas (Samanidou *et al.*, 2005). São bacteriostáticos que inibem a síntese proteica na célula ao bloquearem o receptor na subunidade 30S que se liga ao t-RNA (Kennedy *et al.*, 1998; Pioletti *et al.*, 2001; Balizs e Hewitt, 2003; Cherlet *et al.*, 2003). As tetraciclina são provavelmente os antibióticos terapêuticos mais usados em animais de produção dado o seu largo espectro de actividade e a sua relação custo/eficácia (Cherlet *et al.*, 2003; De Wasch *et al.*, 1998; Bogialli *et al.*, 2006). São absorvidas e excretadas lentamente tendendo, assim, a serem bem distribuídas pelos tecidos (Price, 2005). Para além de administradas para fins de profilaxia e de tratamento de doenças, as tetraciclina também são utilizadas como promotores de crescimento (Bogialli *et al.*, 2006).

O uso abundante e, nalguns casos, impróprio destes compostos poderá resultar na presença de resíduos em tecidos edíveis, o que pode ser tóxico e perigoso para a saúde humana podendo, ainda, causar reacções alérgicas (Samanidou *et al.*, 2005).

A legislação actual estabelece um LMR de 100 µg/kg de músculo de suíno para a presença de resíduos de tetraciclina, clorotetraciclina, oxitetraciclina e doxiciclina. No caso dos três primeiros compostos, o resíduo marcador corresponde à soma do princípio activo e do seu 4-epímero (CEE 2377/90).

1.3.3 Sulfonamidas

As sulfonamidas são uma das classes de substâncias farmacologicamente activas há mais tempo usadas em medicina veterinária, tendo sido descobertas em 1935 (Hussein, 2004; Hussein *et al.*, 2005). Os compostos pertencentes a este grupo são derivados do ácido benzóico e possuem actividade antibacteriana e/ou anticoccidia. Alguns são activos principalmente contra bactérias Gram positivas e outros contra bactérias Gram negativas. A maioria destes compostos tem longos tempos de meia vida, sendo o grau de penetração nos tecidos dependente da sua solubilidade lipídica. A actividade da maioria destes compostos é potenciada com a adição de trimetoprima (Price, 2005).

As sulfonamidas têm desempenhado um papel importante em medicina veterinária no tratamento de infecções de origem bacteriana e protozoária, sendo muito usados no tratamento de infecções dos aparelhos respiratório e digestivo (Shao *et al.*, 2005). Quando administradas em doses subterapêuticas exibem uma acção de promoção de crescimento pelo que são também usadas para este fim, sendo adicionadas às rações (Hussein *et al.*, 2005; Wang *et al.*, 2006; Hussein, 2004). Dada o elevado uso, as sulfonamidas são actualmente dos contaminantes antimicrobianos mais comuns em alimentos de origem animal originando potenciais riscos para a saúde humana como reacções alérgicas ou tóxicas (Wang *et al.*, 2006). O aparecimento de efeitos negativos tem sido reportado particularmente em casos de consumo prolongado de produtos de animais contendo vestígios de sulfonamidas ou dos seus metabolitos (Hussein, 2004). Além disso, tem-se demonstrado que algumas sulfonamidas são potenciais carcinogéneos o que levou a um aumento da preocupação ao nível da segurança alimentar (Shao *et al.*, 2005; Wang *et al.*, 2006; Baliz e Hewitt, 2003).

Dada a preocupação acerca da existência de resíduos de sulfonamidas em alimentos de origem animal, a legislação actual estabelece um LMR de 100 µg/kg de músculo de suíno para o total combinado dos resíduos de todas as substâncias do grupo sulfonamidas (CEE 2377/90).

1.3.4 Aminoglicósidos

Os aminoglicósidos são um grupo de antibióticos de largo espectro de acção actuando, por inibição da síntese proteica, contra bactérias Gram positivas e Gram negativas (Price, 2005). Este grupo inclui a streptomina, neomicina, gentamicina e kanamicina (CE 1570/98; CE 2162/2001). Dado que a absorção digestiva destes compostos é baixa, são normalmente administrados por via parentérica (Díaz-Cruz e Barceló, 2005). Estes compostos são tóxicos para os rins e para os tecidos nervosos (Price, 2005).

A legislação actual estabelece LMR para várias substâncias farmacologicamente activas pertencentes à classe dos aminoglicósidos. Na Tabela 2 são apresentados os LMR definidos para alguns dos aminoglicósidos permitidos para suínos.

Tabela 2 – Limites máximos de resíduos estabelecidos para alguns aminoglicósidos usados em suínos (CEE 2377/90; CE 868/2002; CE 1181/2002; CE 1530/2002; CE 324/2004).

Composto	LMR (µg/kg músculo suíno)
Aminosidina	500
Canamicina	100
Gentamicina	50
Neomicina	500
Streptomina	500

1.3.5 Macrólidos

Os macrólidos constituem uma importante classe de agentes antibacterianos muito usada na produção intensiva de animais para produção de alimentos, no tratamento de doenças respiratórias ou na promoção de crescimento. São compostos constituídos por um anel lactónico ligado a vários açúcares (Díaz-Cruz e Barceló, 2005; Dubois *et al.*, 2001; Baliz e Hewitt, 2003). São activos contra bactérias Gram positivas inibindo a síntese proteica por bloqueio da subunidade ribossómica 50S (Price, 2005). São muito usados em casos de desenvolvimento de estirpes resistentes a penicilina, sendo bem

absorvidos após administração oral e distribuídos extensamente na maioria dos tecidos (Dubois *et al.*, 2001). O grupo engloba a eritromicina, a tilosina e a tilmicosina (CEE 2377/90).

A legislação actual estabelece LMR para diferentes substâncias farmacologicamente activas pertencentes aos grupos dos macrólidos (CEE 2377/90). Na Tabela 3 são apresentados os LMR definidos para os macrólidos pesquisados no método de confirmação realizado no âmbito deste trabalho (vide ponto 3.3.4).

Tabela 3 – Limites máximos de resíduos estabelecidos para os macrólidos analisados no método de confirmação (CEE 2377/90).

Composto	LMR ($\mu\text{g}/\text{kg}$ músculo suíno)
Tilosina	100
Tilmicosina	50
Espiramicina	250
Eritromicina	200

1.3.6 Quinolonas

As quinolonas são uma classe de antibióticos de largo espectro que tiveram origem no ácido nalidíxico, descoberto em 1962. A maioria das quinolonas usadas em medicina pertence ao subgrupo das fluoroquinolonas que possui um átomo de flúor ligado ao anel central, tipicamente na posição 6. As fluoroquinolonas são antibióticos de largo espectro que foram desenvolvidos face ao aumento observado da resistência a diversos antibióticos usados na medicina humana e veterinária (Toussaint *et al.*, 2005). Estes compostos são utilizados no tratamento de doenças respiratórias e de infecções provocadas por bactérias entéricas em humanos e animais (Toussaint *et al.*, 2005; Hermo *et al.*, 2006). A sua actividade antibacteriana consiste numa inibição selectiva da síntese do DNA originando a morte da bactéria (Hermo *et al.*, 2006; Kirbis *et al.*, 2005).

A legislação actual estabelece LMR para algumas das substâncias farmacologicamente activas pertencentes ao grupo das quinolonas (CEE 2377/90). Na Tabela 4 são apresentados os LMR que se encontram definidos para as quinolonas pesquisadas no âmbito deste trabalho (vide ponto 3.3.5). Para os restantes compostos pesquisados não foi fixado LMR.

Tabela 4 – Limites máximos de resíduos estabelecidos para as quinolonas analisadas no método de confirmação (CEE 2377/90).

Composto	LMR ($\mu\text{g}/\text{kg}$ músculo suíno)
<i>Quinolonas anfotéricas</i>	
Marbofloxacina	150
Enrofloxacina	a
Ciprofloxacina	a
Danofloxacina	100
<i>Quinolonas ácidas</i>	
Flumequina	50
Ácido Oxolínico	100

^a LMR para a soma de Enrofloxacina e Ciprofloxacina é de 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$.

1.3.7 Quinoxalinas

O carbadox e o olaquinox são antibióticos sintéticos, pertencentes à classe das quinoxalinas, que actuam por inibição da síntese do DNA, sendo activos contra bactérias Gram negativas. Apesar destas quinoxalinas serem muitas vezes consideradas como sendo promotores de crescimento, são usadas na prevenção de diarreias em suínos (Butaye *et al.*, 2003; Hutchinson *et al.*, 2002). Em 1999, ambos os compostos foram proibidos como aditivos de alimentos para animais na UE. Esta proibição deveu-se à possibilidade de ocorrência de efeitos adversos na saúde humana, dado o reconhecimento da genotoxicidade e carcinogenicidade do carbadox e da genotoxicidade e oncogenicidade do olaquinox, para roedores (CE 2788/98; Hutchinson *et al.*, 2005; Schwarz e Chaslus-Dancla, 2001). Estes efeitos poderão ocorrer mesmo a níveis de ingestão muito baixos, especialmente se a substância for ingerida regularmente durante alguns anos (Hutchinson *et al.*, 2005).

Não sendo permitida a existência de resíduos destes compostos, os métodos desenvolvidos deverão ser validados para limites de detecção mínimos na medida em que os produtos destinados a consumo humano deverão estar isentos destes compostos.

1.3.8 Coccidiostáticos

Os coccidiostáticos são compostos usados em animais para o tratamento da coccidiose, uma doença parasitária que afecta praticamente todas as espécies animais. Alguns destes compostos, como os ionofóros, possuem actividade antimicrobiana (JETACAR, 1999). Os coccidiostáticos são permitidos como aditivos em rações mas proibidos como medicamentos veterinários (DANMAP, 2003; Harvey e Mason, 1998; CE, 2006).

Alguns dos compostos mais comuns pertencentes a este grupo são os ionofóros, como a lasalocida, narasina, salinomicina e a monensina, a maduramicina, a robenidina e o diclazuril (Price, 2005; Harvey e Mason, 1998). Neste trabalho foram pesquisadas, para além destes compostos, a halofuginona, a nigericina e a dinitrocarbanilida (vide ponto 3.3.7).

A legislação actual estabelece LMR para apenas algumas das substâncias farmacologicamente activas pertencentes a este grupo (CE, 2006), mas nenhuma das correspondentes aos compostos pesquisados é permitida como aditivo em rações de suínos (CEE 2377/90). Desta forma, os métodos desenvolvidos para a análise destes compostos deverão ser validados para limites de detecção mínimos na medida em que os produtos de origem suína destinados a consumo humano deverão estar isentos destes compostos.

2 Objectivo do Trabalho Realizado

Neste trabalho é estudada a presença de resíduos de algumas classes de agentes antimicrobianos em leitões. O estudo acerca da presença de resíduos de agentes antimicrobianos em leitões é importante dado o nível de consumo observado (INE, 2006) e pelo facto de se tratarem de animais mais sujeitos ao aparecimento de doenças e, conseqüentemente, à administração de medicamentos veterinários quer para fins terapêuticos como profilácticos.

Este tipo de alimento é cozinhado antes de ser consumido, pelo que este estudo também visa a pesquisa de resíduos de antibióticos nas amostras após a assadura, um tipo de processamento comum em leitões. Desta forma será possível um maior conhecimento da exposição efectiva dos consumidores a estes químicos.

Neste trabalho são utilizados dois tipos de métodos: um método de triagem, com vista à detecção da presença de resíduos de antibióticos β -lactâmicos, tetraciclina, sulfonamidas, aminoglicósidos e macrólidos, e um método de confirmação, com vista à identificação e quantificação de resíduos de tetraciclina, sulfonamidas, macrólidos, quinolonas (incluindo fluoroquinolonas), quinoxalinas e coccidiostáticos, eventualmente presentes. Como método de triagem é utilizado o teste microbiológico das 4 Placas, um dos métodos mais usados pelos laboratórios de referência dos Estados Membros (CE, 2006). Como método de confirmação, recorre-se ao processo analítico de separação por cromatografia líquida com detecção e quantificação por espectrometria de massa, utilizando sistemas de espectrometria sequenciais. Trata-se de um método com elevadas sensibilidade e selectividade, cujas condições experimentais dependem do grupo de compostos em análise (Díaz-Cruz e Barceló, 2005; Hermo *et al.*, 2006). A utilização dos dois métodos analíticos permitirá também, para os compostos em comum, validar os resultados obtidos pelo teste de triagem com base nos obtidos para o teste de confirmação.

Desta forma, recorrendo a dois métodos analíticos, pretende-se estudar a presença de resíduos de agentes antimicrobianos na carne de leitão em cru e em assado e assim avaliar o risco para a saúde humana no consumo deste tipo de alimento. A pesquisa de resíduos de agentes antimicrobianos na carne após ter sido submetida ao processo de

assadura permite avaliar o efeito do mesmo nos resíduos dos agentes antimicrobianos em estudo eventualmente presentes nas amostras analisadas.

3 Pesquisa de Resíduos de Antibióticos

As amostras recolhidas de leitão cru e assado foram analisadas através de dois métodos: um microbiológico de triagem e um analítico de identificação e quantificação. A pesquisa de resíduos pelo método das 4 Placas foi realizada no laboratório de microbiologia da Faculdade de Farmácia de Lisboa. Os métodos de confirmação foram realizados no Laboratório Nacional de Investigação Veterinária (LNIV). O processo de amostragem, os procedimentos e classes de antibióticos pesquisadas em cada um dos métodos, são descritos de seguida.

3.1 Processo de Amostragem

As amostras de leitão foram recolhidas aleatoriamente e espaçadamente durante o período de Novembro de 2005 a Setembro de 2006. As recolhas foram realizadas num estabelecimento onde são efectuados o abate e a assadura de leitões. Os leitões eram provenientes de diferentes produtores localizados no centro e sul de Portugal. No total foram recolhidas amostras de 118 leitões pertencentes a 24 produtores distintos (Tabela 6). A proveniência dos leitões era variável, sendo as amostras recolhidas de acordo com os leitões abatidos no dia da recolha. Adicionalmente, dos leitões abatidos, apenas foi possível retirar amostras dos que se destinavam a ser cortados e comercializados internamente pelo estabelecimento. Desta forma, as amostras eram recolhidas de acordo com as carcaças que eram disponibilizadas não sendo possível escolher quais os produtores associados pelo que o número de amostras retiradas por produtor dependeu da frequência de fornecimento de leitões para abate. Adicionalmente, a proveniência das carcaças não foi conhecida, identificando-se, ao longo do trabalho, o produtor de acordo com um código atribuído. Alguns dos produtores identificados poderão corresponder a fornecedores que recolhem animais para abate de diferentes criadores. No entanto, dado que a informação referente aos criadores originais, não foi disponibilizada, para fins de identificação das amostras, os fornecedores foram considerados como sendo os produtores dos leitões para os quais foram recolhidas amostras das respectivas carcaças.

As amostras foram retiradas do músculo psoas menor incluindo porções dos músculos intercostais, ambos situados abaixo da costela, de carcaças de animais recentemente

abatidos. A quantidade recolhida e a escolha da zona para recolha das amostras estavam condicionadas na medida em que a peça não poderia ser danificada. Desta forma, apesar dos músculos escolhidos corresponderem a músculos menos irrigados, a recolha de amostras dessa zona não danificava a peça, não alterando o seu valor. Para a pesquisa de resíduos de agentes antimicrobianos seria mais adequada a escolha de músculos mais irrigados, como o diafragma, que não pôde ser usado na medida em que as carcaças eram assadas abertas, expondo este músculo directamente às altas temperaturas de processamento, os músculos da língua, que também têm limitações ao nível da dimensão e dificuldade de colheita após assadura ou os músculos dos membros, cuja recolha de amostras em cru e em assado desvalorizava as carcaças. Tratando-se de músculos mais irrigados, os níveis de resíduos eventualmente presentes seriam mais elevados. A quantidade de amostra recolhida dependia do tamanho do leitão variando entre aproximadamente 7 a 20 gramas.

As carcaças encontravam-se armazenadas em câmaras frigoríficas desde o fim do processo de abate e foram identificadas através de um corte no focinho, recorrendo a uma simbologia adequada. A assadura dos leitões foi efectuada cerca de 3 dias após a recolha das amostras em cru. Durante esse período as carcaças permaneceram armazenadas em câmaras frigoríficas. O processamento a que foram sujeitas as carcaças dos leitões analisados não sofreu alterações em relação ao processo em vigor no estabelecimento onde a recolha das amostras foi efectuada.

As amostras recolhidas em cru e em assado foram guardadas em sacos com fecho, identificados com o símbolo com o qual a carcaça do leitão foi marcada, data da recolha e código do produtor, e armazenadas numa câmara de congelação a -18°C . Posteriormente foram transportadas congeladas e protegidas da luz de forma a se proceder à análise laboratorial, permanecendo armazenadas a -18°C até à realização dos testes. Os testes de triagem foram realizados entre 16 de Junho e 18 de Setembro de 2006 pelo que o período máximo de armazenamento, verificado para as primeiras amostras recolhidas, foi de 7 meses. Os testes de confirmação foram realizados em Janeiro de 2007.

3.2 Método de Triagem

De acordo com a legislação Europeia (CE 657/2002) o método de triagem consiste num método utilizado para detectar a presença de uma substância ou classe de substâncias ao nível requerido, com capacidade para processar um número elevado de amostras. Estes métodos são utilizados para seleccionar os resultados potencialmente não conformes, sendo concebidos especificamente para evitar a obtenção de falsos resultados conformes.

Os métodos microbiológicos constituem a base dos métodos de triagem usados para monitorizar a presença de resíduos de medicamentos veterinários que possuem actividade antimicrobiana ou antibacteriana em alimentos de origem animal (Hussein, 2004). O método utilizado para detectar a presença de resíduos de agentes antibacterianos foi o Teste das Quatro Placas, um método muito mais usado pelos laboratórios de referência dos Estados Membros (Hussein *et al.*, 2005; CE, 2006). Trata-se de um método simples e económico, vulgarmente utilizado na Europa na detecção de resíduos de várias classes de agentes antibacterianos e útil para analisar um elevado número de amostras (Caprioli *et al.*, 2000; Currie *et al.*, 1998; Koenen-Dierick e De Beer, 1998; CE, 2006). O método consiste no uso de quatro placas com meios de cultura de diferentes pH nos quais é inoculado um microrganismo sensível. O método permite a detecção de várias classes de agentes antibacterianos.

3.2.1 Descrição e Campo de Aplicação

Este método consiste num teste de difusão em ágar onde espécies bacterianas sensíveis a substâncias antibacterianas são inoculadas num meio gelosado sobre o qual é colocada uma amostra de carne. A placa de Petri, contendo o meio inoculado e as amostras, é incubada à temperatura óptima de crescimento do microrganismo. A difusão de substâncias antibacterianas, porventura presentes na amostra, resulta na formação de um halo de inibição do crescimento do microrganismo à volta da amostra (Ragheb, 1988; Caprioli *et al.*, 2000).

Nesta técnica são utilizadas quatro placas com meios de diferentes pH inoculadas com *Bacillus subtilis* ou *Micrococcus luteus*. As placas a pH 6, 7,2 e 8 são inoculadas com uma suspensão de *Bacillus subtilis* permitindo a detecção, respectivamente, de

antibióticos β -lactâmicos e tetraciclina, sulfonamidas e aminoglicosídeos (CNEVA, 1993). Na placa a pH 7,2 é adicionada uma solução de trimetoprima que, dado o efeito sinérgico, visa aumentar a sensibilidade do teste a sulfonamidas (Koenen-Dierick e De Beer, 1998). A suspensão de *Micrococcus luteus* é incorporada num meio de cultura a pH 8 permitindo a detecção de antibióticos β -lactâmicos e macrólidos (CNEVA, 1993).

Dado que diferentes famílias originam halos de inibição em diferentes placas do teste, é possível a diferenciação entre classes como os aminoglicosídeos, os β -lactâmicos e as tetraciclina (Currie *et al.*, 1998). O procedimento seguido para a triagem de resíduos de substâncias antibacterianas nas amostras de leitão, foi baseado no protocolo do Laboratório de Medicamentos Veterinários de França, cedido pelo LNIV do Porto (CNEVA, 1993). O método aplica-se a carne fresca mas, no âmbito deste trabalho, também foi utilizado para detectar resíduos nas amostras de carne assada correspondentes a amostras de carne crua consideradas positivas.

3.2.2 Meios e Reagentes

Os meios de cultura utilizados foram previamente preparados e armazenados em câmara frigorífica a temperatura entre 4 e 6°C.

3.2.2.1 Meio Mueller Hinton

O meio Muller Hinton usado corresponde ao meio completo da marca Oxoid com a referência CM337 tendo sido preparado de acordo com as indicações do fabricante.

3.2.2.2 Meios de Ágar

A composição dos meios de ágar a pH 6, 7,2 e 8, para um volume final de 1000 mL, é apresentada de seguida:

Meio de ágar a pH 6

Peptona de caseína obtida por digestão trípica (0259-17-9 Difco)	3,45 g
Peptona de carne obtida por digestão trípica (211677 Difco)	3,45 g
Cloreto de sódio p.a. (31434 Riedel)	5,1 g

Ágar-ágar (LP0011 Oxoid)	13,0 g
Água bidestilada esterilizada	1000 mL

Meio de ágar a pH 7,2

Peptona (L34 Oxoid)	7,0 g
Cloreto de sódio p.a. (31434 Riedel)	5,0 g
Fosfato trisódico (12 H ₂ O) p.a. (30427 Riedel)	0,8 g
Ágar-ágar (LP0011 Oxoid)	13,0 g
Água bidestilada esterilizada	1000 mL

Meio de ágar a pH 8

Peptona de caseína obtida por digestão trípica (0259-17-9 Difco)	3,45 g
Peptona de carne obtida por digestão trípica (211677 Difco)	3,45 g
Cloreto de sódio p.a. (31434 Riedel)	5,1 g
Fosfato trisódico (12 H ₂ O) p.a. (30427 Riedel)	2,4 g
Ágar-ágar p.a. (LP0011 Oxoid)	13,0 g
Água bidestilada esterilizada	1000 mL

Para a preparação dos meios, os compostos constituintes foram pesados e dissolvidos em água. O volume final foi ajustado a 1000 mL e o meio foi levado à ebulição. O pH foi verificado a 45°C e, caso necessário, ajustado com uma solução 1N de NaOH p.a. (30620 Riedel) ou 1N de HCl p.a. (131020.1212 Panreac). Dependente do meio em preparação, o pH a 45°C deveria ser $6,0 \pm 0,1$; $7,2 \pm 0,1$ ou $8,0 \pm 0,1$. O meio foi posteriormente esterilizado numa autoclave a 121°C durante 15 minutos.

3.2.2.3 Solução de Trimetoprima

Para a preparação da solução stock dissolveram-se $50,0 \pm 0,1$ mg de trimetoprima ($\geq 98\%$ p/p, Sigma T 7883) em 5 mL ácido acético p.a. (100063 Merck) a 5%. A solução foi de seguida diluída em 500 mL de água bidestilada esterilizada.

Para a preparação da solução de trabalho, a solução stock foi diluída de modo a obter-se uma concentração de trimetoprima de 5 µg/mL.

Após preparação, alíquotas das soluções stock e de trabalho foram colocadas em tubos apropriados e conservadas a -18°C . Aquando da realização do teste, a alíquota da solução de trabalho foi deixada à temperatura ambiente até descongelação completa.

3.2.2.4 Solução Padrão de Penicilina

Uma solução stock foi preparada a 1000 UI/mL em água por dissolução de penicilina G sódica (PEN-NA Sigma).

Previamente à realização do teste preparou-se uma solução por diluição da solução stock num factor de 1/20 (v/v). A solução de trabalho foi preparada por diluição desta num factor de 1/50 (v/v) sendo a concentração final em penicilina equivalente a 1 UI/mL.

A solução stock foi colocada em tubos apropriados e conservada a -18°C . Aquando da realização do teste, a alíquota da solução stock foi deixada à temperatura ambiente até descongelação completa.

3.2.2.5 Solução Padrão de Sulfametazina

Dissolveram-se $50,0 \pm 0,1$ mg de sulfametazina (S6256-25G Sigma) em 5 mL de uma solução 0,1 N de NaOH p.a. (30620 Riedel). A solução foi depois diluída em 50 mL de água bidestilada esterilizada.

Previamente à realização do teste preparou-se a solução de trabalho por diluição da solução stock num factor de 1/25 (v/v). A concentração final em sulfametazina foi de $0,04 \mu\text{g/mL}$.

A solução stock foi colocada em tubos apropriados e conservada a -18°C . Aquando da realização do teste, a alíquota da solução stock foi deixada à temperatura ambiente até descongelação completa.

3.2.2.6 Solução Padrão de Dihidroestreptomicina

Uma solução stock de sesquisulfato de dihidroestreptomicina (D7253-5G Sigma) foi preparada a 5 mg de substância activa /mL em água bidestilada esterilizada.

Previamente à realização do teste preparou-se a solução de trabalho por diluição da solução stock num factor de 1/20 (v/v). A concentração final em dihidroestreptomicina foi de 0,05 µg/mL.

A solução stock foi colocada em tubos apropriados e conservada a -18°C. Aquando da realização do teste, a alíquota da solução stock foi deixada à temperatura ambiente até descongelação completa.

3.2.2.7 Solução Padrão de Eritromicina

Dissolveu-se uma quantidade de eritromicina (E6376 Sigma) equivalente a 50 mg de substância activa (aproximadamente $54 \pm 0,1$ mg) em 3 mL de metanol p.a. (106009 Merck). A solução foi depois diluída em 50 mL de água bidestilada esterilizada

Previamente à realização do teste preparou-se a solução de trabalho por diluição da solução stock num factor de 1/20 (v/v). A concentração final em eritromicina foi de 0,05 µg/mL.

A solução stock foi colocada em tubos apropriados e conservada a -18°C. Aquando da realização do teste, a alíquota da solução stock foi deixada à temperatura ambiente até descongelação completa.

3.2.3 Procedimento

3.2.3.1 Suspensão de Esporos de *Bacillus subtilis*

A suspensão de esporos de *Bacillus subtilis* foi uma solução pronta a usar, preparada com base nas técnicas de preparações bacterianas descritas no capítulo referente à aferição microbiológica de antibióticos da Farmacopeia Portuguesa (Comissão da Farmacopeia Portuguesa, 1999). Para a preparação da suspensão de esporos, procedeu-

se ao cultivo do microrganismo a 35-37°C durante 7 dias, à superfície de um meio apropriado para indução de esporulação, previamente adicionado de 0,04g/L de sulfato de manganês mono-hidratado. Os restantes constituintes do meio são extracto de carne (10g/L), extracto de levedura (10g/L), ágar-ágar (15g/L) e água bidestilada esterilizada, sendo o pH ajustado a 7,0. A cultura, constituída principalmente por esporos, é recolhida por meio de lavagem com soro fisiológico. A suspensão é posteriormente aquecida a 70°C durante 30 minutos e diluída com soro fisiológico de forma a obter uma suspensão de esporos entre 10 e 100x10⁴ esporos por mililitro.

3.2.3.2 Preparação das Placas de Teste de *Bacillus subtilis*

Foram preparadas placas com os meios de ágar a pH 6, pH 7,2 e pH 8, os quais foram previamente fundidos e arrefecidos até 45°C. A cada 50 mL de meio foram incorporados 800 µL da suspensão de esporos de *Bacillus subtilis* de forma a obter-se uma concentração de cerca de 2x10⁴ esporos/mL de meio. A quantidade de suspensão adicionada permitiu a obtenção de zonas de inibição nitidamente delimitadas. Ao meio de ágar a pH 7,2 foram adicionados 500 µL da solução de trabalho de trimetoprima de forma a obter-se uma concentração de 1% (v/v). Os meios foram transferidos para placas de Petri estéreis obtendo-se uma espessura de ágar de 2 mm. As placas permaneceram numa superfície horizontal até solidificação completa do ágar.

3.2.3.3 Suspensão de *Micrococcus luteus*

Procedeu-se à repicagem de colónias de *Micrococcus luteus* no meio de cultura Mueller Hinton. As placas foram incubadas a 37 ± 1°C durante 24 horas. As culturas foram conservadas entre 4 a 6°C.

A suspensão utilizada foi preparada, aquando da preparação das placas de teste, por dissolução de algumas colónias de uma cultura recente, em 10 mL de água bidestilada estéril de forma a obter-se uma concentração de cerca de 5x10⁴/mL.

3.2.3.4 Preparação das Placas de Teste de *Micrococcus luteus*

Foram preparadas placas com o meio de ágar a pH 8. Os meios foram fundidos e arrefecidos até 45°C e transferidos, num volume de 50 mL, para placas de Petri estéreis obtendo-se uma espessura de ágar de 2 mm. As placas permaneceram numa superfície horizontal até solidificação completa do ágar. Tratando-se de um microrganismo aeróbio, a inoculação da suspensão de *Micrococcus luteus* foi efectuada por espalhamento à superfície do ágar, transferindo-se 10 mL da mesma para cada uma das placas. A suspensão foi espalhada por toda a superfície de ágar e o excesso foi retirado. A suspensão remanescente foi semeada por espalhamento por toda a superfície de ágar com uma zaragatoa.

3.2.3.5 Preparação das Amostras

As amostras foram retiradas do congelador uns minutos antes da realização da técnica de difusão e colocadas na câmara de fluxo laminar em ambiente estéril onde foi realizado o procedimento de colocação das amostras nas placas. Com a ajuda de uma pinça e uma tesoura estéreis, a amostra foi transferida para uma placa de Petri estéril e foram cortados 8 pedaços com cerca de 8x3 mm e 2 mm de espessura.

3.2.3.6 Técnica de Difusão

Em cada uma das placas do teste foram colocados dois pedaços de cada amostra, num total de 4 amostras por placa, a uma distância de cerca de 1 cm da extremidade da placa. Adicionalmente, foi colocado um disco de controlo contendo 20 µL da solução padrão de trabalho da substância inibidora correspondente a cada placa de teste.

Na Tabela 5 são listadas, para cada uma das placas do teste, a quantidade da solução padrão de trabalho contida no disco de difusão e as condições de incubação.

Tabela 5 – Quantidade da solução padrão de trabalho contida no disco de difusão e condições de incubação para cada uma das placas de teste.

Microrganismo	pH do meio (45°C)	Solução padrão e quantidade no disco de difusão	Temperatura de incubação (°C)	Tempo de incubação aprox. (horas)
<i>Bacillus subtilis</i>	6	Penicilina 20 µL x 1 UI/mL = 0,02 UI	30 ± 1	18
<i>Bacillus subtilis</i>	7,2	Sulfametazina 20 µL x 0,04 µg/µL = 0,8 µg	30 ± 1	18
<i>Bacillus subtilis</i>	8	Dihidroestreptomicina 20 µL x 0,05 µg/µL = 1 µg	30 ± 1	18
<i>Micrococcus luteus</i>	8	Eritromicina 20 µL x 0,05 µg/µL = 1 µg	37 ± 1	24

3.2.4 Resultados

Neste trabalho foram analisadas amostras de leitão cru e assado armazenadas logo após a recolha com vista a minimizar a obtenção de falsos positivos nos testes de inibição bacteriana devido ao envelhecimento dos tecidos e a contaminação bacteriana. O armazenamento das amostras até análise foi realizado a -18°C de forma a minimizar os efeitos negativos na estabilidade de eventuais resíduos de agentes antibacterianos, diminuindo assim a ocorrência de falsos negativos (Pena *et al.*, 2004).

Após incubação das placas, os halos de inibição das amostras foram medidos desde a extremidade da amostra até às primeiras colónias visíveis. No caso do halo de inibição ser assimétrico, foi considerada a largura maior. As amostras que possuíam um halo de inibição de largura igual ou superior a 2 mm foram consideradas positivas (Figura 1). No caso do resultado ter sido considerado duvidoso, por existir um halo de inibição com crescimento, por uma amostra apresentar um resultado positivo e outro negativo (Figura 2) ou por haver contaminação do meio, o ensaio foi repetido. Se o resultado do segundo ensaio não foi positivo, a amostra foi considerada negativa.

A validade de cada ensaio foi confirmada pela formação de um halo de inibição de largura igual ou superior a 6 mm nos discos de cada padrão (Figura 3).

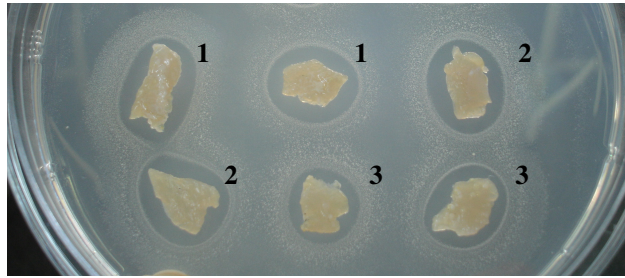


Figura 1 - Placa de teste com o meio de ágar a pH 7,2 inoculado com a suspensão de esporos de *Bacillus subtilis*. Na fotografia são visualizadas 3 amostras em duplicado identificadas com os números 1, 2 e 3. Todas foram consideradas positivas por apresentarem, respectivamente, halos de inibição médios de 3, 4 e 2 mm de largura.

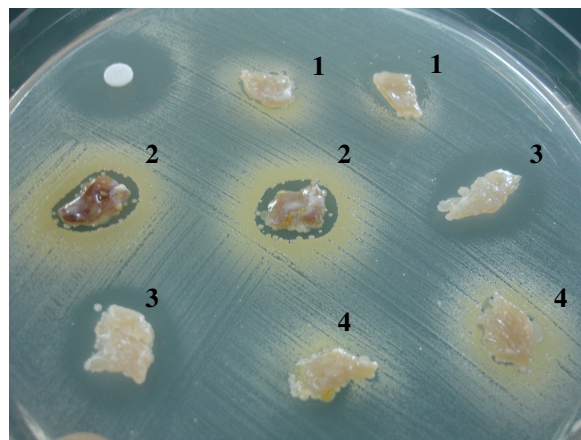


Figura 2 – Placa de teste com o meio de ágar a pH 8 inoculado com a cultura de *Micrococcus luteus*. O disco de controle contém 20 μ L da solução de trabalho de eritromicina. Observa-se um halo de inibição de 7 mm de largura. São visualizadas 4 amostras em duplicado identificadas com os números 1, 2, 3 e 4. Apenas as amostras 2 e 3 foram consideradas positivas por apresentarem, respectivamente, halos de inibição médios de 2 e 5 mm de largura. A amostra 1 foi considerada duvidosa por apenas uma das sub-amostras apresentar um halo de inibição.

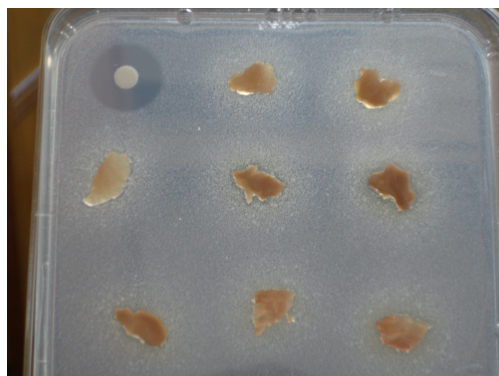


Figura 3 – Placa de teste com o meio de ágar a pH 6 inoculado com a suspensão de esporos de *Bacillus subtilis*. O disco de controle contém 20 μ L da solução de trabalho de penicilina e apresentou um halo de inibição de 6 mm. Não são observados halos de inibição nas amostras analisadas.

As amostras em assado analisadas foram as correspondentes a amostras em cru consideradas positivas em qualquer das placas de teste. Os ensaios foram efectuados para as quatro placas de teste, independentemente do resultado obtido para a amostra em cru.

Os resultados finais obtidos nos ensaios realizados às amostras em cru são apresentados na Tabela 6. As amostras encontram-se identificadas por uma sequência numérica e ordenadas de acordo com a data da recolha. Os produtores das diferentes amostras foram identificados por uma sequência alfanumérica. Para cada placa de teste, são apresentadas as larguras dos halos de inibição, observados em cada porção da amostra analisada, que são iguais ou superiores a 2 mm. Para as restantes, o resultado é apresentado como NE – Não Existente. O resultado final do teste de triagem, referente à detecção de resíduos de antibióticos, é também apresentado. Este foi considerado positivo (+) no caso de ter sido observado, em pelo menos uma das placas de teste, um halo de inibição igual ou superior a 2 mm, ou negativo (-) no caso deste não ter sido observado em nenhuma das placas de teste.

Tabela 6 – Resultados obtidos no teste das quatro placas para as amostras de leitão cru (continua nas páginas seguintes).

Amostra	Data da Recolha	Produtor	Largura do Halo de Inibição (mm)				Resultado Final
			<i>B. subtilis</i> pH 6	<i>B. subtilis</i> pH 7,2	<i>B. subtilis</i> pH 8	<i>M. luteus</i> pH 8	
1	22 Nov 2005	P01	NE	NE	NE	NE	-
2			NE	NE	NE	NE	-
3			NE	NE	NE	NE	-
4		P02	NE	NE	NE	NE	-
5			NE	NE	NE	NE	-
6		P03	2/2	2/2	NE	NE	+
7	07 Dez 2005	P04	2/2	2/2	2/2	NE	+
8			4/4	4/5	3/3	NE	+
9			3/3	5/5	3/4	NE	+
10			3/2	4/3	3/3	NE	+
11			2/3	4/4	3/3	NE	+
12			2/2	2/3	2/2	2/2	+
13			3/3	4/4	2/2	NE	+
14			2/3	3/2	2/2	NE	+
15	14 Dez 2005	P05	NE	NE	NE	NE	-
16			NE	NE	NE	NE	-
17		P06	NE	NE	NE	NE	-
18			3/3	NE	3/3	2/2	+
19		P07	NE	NE	NE	NE	-
20			NE	NE	NE	NE	-

Amostra	Data da Recolha	Produtor	Largura do Halo de Inibição (mm)				Resultado Final
			<i>B. subtilis</i> pH 6	<i>B. subtilis</i> pH 7,2	<i>B. subtilis</i> pH 8	<i>M. luteus</i> pH 8	
21		P08	NE	NE	NE	NE	-
22			NE	NE	NE	2/2	+
23			NE	NE	NE	2/2	+
24			NE	NE	NE	2/2	+
25	08 Mar 2006	P07	2/2	NE	2/2	2/2	+
26			2/2	NE	NE	2/2	+
27		P09	3/3	NE	2/2	NE	+
28			3/2	NE	NE	2/2	+
29			3/3	NE	NE	2/2	+
30			NE	NE	NE	2/2	+
31		P10	3/3	NE	2/2	2/2	+
32			NE	NE	NE	NE	-
33		P11	3/3	NE	2/2	2/2	+
34			NE	NE	NE	NE	-
35	05 Abr 2006	P08	NE	NE	NE	2/2	+
36			NE	NE	NE	2/3	+
37			NE	NE	NE	2/2	+
38			NE	NE	NE	NE	-
39			NE	NE	NE	2/2	+
40			NE	NE	NE	NE	-
41		P12	2/2	NE	2/2	2/2	+
42		P13	NE	NE	NE	2/2	+
43			NE	NE	NE	NE	-
44		P14	NE	NE	NE	2/2	+
45			NE	NE	NE	NE	-
46	09 Mai 2006	P15	NE	NE	NE	NE	-
47			NE	NE	NE	3/3	+
48			NE	NE	NE	3/2	+
49		P16	NE	NE	NE	2/2	+
50			NE	NE	NE	2/2	+
51			NE	NE	NE	2/2	+
52			2/2	2/2	NE	3/3	+
53		P17	NE	NE	NE	NE	-
54			NE	NE	NE	NE	-
55			NE	NE	NE	2/2	+
56	10 Mai 2006	P08	NE	NE	NE	3/3	+
57			NE	NE	NE	NE	-
58		P18	NE	NE	NE	2/2	+
59			NE	NE	NE	2/2	+
60			NE	NE	2/2	2/2	+
61		P19	NE	NE	NE	NE	-
62			NE	NE	NE	NE	-
63		P20	NE	NE	NE	NE	-
64			2/3	4/4	2/2	NE	+
65			NE	NE	NE	2/2	+
66	30 Mai 2006	P01	NE	NE	4/3	NE	+
67			NE	NE	NE	NE	-

Amostra	Data da Recolha	Produtor	Largura do Halo de Inibição (mm)				Resultado Final
			<i>B. subtilis</i> pH 6	<i>B. subtilis</i> pH 7,2	<i>B. subtilis</i> pH 8	<i>M. luteus</i> pH 8	
68		P02	NE	NE	NE	2/2	+
69			NE	NE	NE	3/4	+
70			NE	NE	4/4	2/3	+
71			NE	NE	NE	5/5	+
72		P03	NE	NE	NE	4/4	+
73			NE	NE	NE	2/2	+
74		P08	NE	NE	3/2	4/4	+
75			NE	NE	NE	NE	-
76			NE	NE	NE	2/2	+
77	11 Jul 2006	P01	NE	NE	NE	NE	-
78			3/3	NE	2/2	2/2	+
79			2/2	NE	2/2	2/2	+
80		P02	NE	NE	NE	2/2	+
81			NE	NE	NE	2/2	+
82		P08	3/3	NE	NE	2/2	+
83			2/2	NE	2/2	2/2	+
84			3/3	NE	2/2	2/2	+
85		P16	NE	NE	NE	2/2	+
86			3/2	NE	NE	2/2	+
87			3/2	NE	NE	2/2	+
88		P21	NE	NE	NE	2/2	+
89	08 Ago 2006	P05	NE	NE	2/2	NE	+
90			NE	NE	NE	NE	-
91			NE	NE	NE	NE	-
92		P15	NE	NE	2/2	2/2	+
93			NE	NE	2/2	2/2	+
94			NE	NE	2/3	2/2	+
95			NE	NE	2/2	2/2	+
96		P16	NE	NE	2/2	NE	+
97			NE	NE	2/2	2/2	+
98			NE	NE	NE	NE	-
99	06 Set 2006	P19	NE	NE	NE	NE	-
100			NE	NE	NE	NE	-
101			NE	NE	NE	NE	-
102			NE	NE	NE	NE	-
103			NE	NE	NE	NE	-
104			NE	NE	NE	NE	-
105			NE	NE	NE	NE	-
106		P22	NE	NE	NE	NE	-
107			NE	NE	NE	NE	-
108			NE	NE	NE	NE	-
109	13 Set 2006	P07	NE	NE	NE	NE	-
110			NE	NE	NE	4/3	+
111		P22	NE	NE	NE	NE	-
112			NE	NE	NE	NE	-
113			9/10	9/9	4/5	2/2	+
114			10/10	7/8	4/5	2/3	+

Amostra	Data da Recolha	Produtor	Largura do Halo de Inibição (mm)				Resultado Final
			<i>B. subtilis</i> pH 6	<i>B. subtilis</i> pH 7,2	<i>B. subtilis</i> pH 8	<i>M. luteus</i> pH 8	
115			10/11	7/8	5/5	NE	+
116		P23	NE	NE	NE	2/3	+
117			NE	NE	NE	2/2	+
118		P24	NE	NE	7/7	4/5	+

Observando os resultados obtidos (Tabela 6), verifica-se que, na maioria dos casos, as amostras que continham substâncias inibitórias para o crescimento de *Bacillus subtilis* deram resultado positivo em mais de uma das três placas de teste inoculadas com esta estirpe. Das 42 amostras consideradas positivas por inibição do crescimento de *Bacillus subtilis*, 12 originaram halos de inibição superiores a 2 mm nas três placas de teste. Dezoito amostras foram consideradas positivas em apenas uma das placas de teste das quais 12 são referentes ao teste a pH8 e as restantes 6 ao teste a pH6.

A análise das amostras de leitão assado não revelou a presença de resíduos de antibióticos com actividade antibacteriana em nenhuma das amostras, não tendo sido observado qualquer halo de inibição.

3.2.5 Discussão e Conclusões

Os métodos de inibição bacteriana são considerados úteis na medida em que permitem uma caracterização inicial dos resíduos de agentes antibacterianos de amostras contaminadas, conduzindo à selecção apropriada dos métodos de identificação e quantificação. O teste das quatro placas possui diversas vantagens na medida em que é simples, pouco dispendioso, sensível, viável, permitindo a detecção de diferentes resíduos e a análise de um elevado número de amostras. Apesar do método não permitir a identificação individual dos resíduos, a comparação entre os resultados obtidos para uma determinada amostra nas várias placas, permite tirar algumas possíveis conclusões acerca do tipo de resíduos presentes. Tal como referido anteriormente, as placas de teste a pH 6, pH 7,2 e pH 8 inoculadas com a suspensão de esporos de *Bacillus subtilis* permitem a detecção, respectivamente, de antibióticos β -lactâmicos e tetraciclinas, sulfonamidas e aminoglicosídeos. A placa de teste a pH 6 é bastante sensível para β -lactâmicos originando halos de inibição mais largos aquando da presença destes

compostos (Ferrini *et al.*, 2006). A placa de teste a pH 8 inoculada com a suspensão de *Micrococcus luteus* permite a detecção de antibióticos β -lactâmicos e macrólidos. Assim, caso as amostras estejam contaminadas com resíduos de antibióticos β -lactâmicos tanto a placa de teste a pH 6 com *Bacillus subtilis* como a placa a pH 8 com *Micrococcus luteus* deverão dar resultado positivo uma vez que os limites de detecção de ambas as placas são semelhantes (Okerman *et al.*, 1998a). De notar que apenas as moléculas livres dos agentes antibacterianos existentes na amostra, inibem o crescimento bacteriano (Ferrini *et al.*, 2006).

Para além das classes de agentes antibacterianos mencionadas, estudos referenciam outros compostos para os quais o teste das quatro placas é sensível. Num estudo de avaliação deste método para a detecção de agentes antimicrobianos, os resultados indicam que o método é sensível para alguns compostos pertencentes às classes das lincosamidas e fluoroquinolonas (Currie *et al.*, 1998). No entanto, outro estudo sugere que o método apenas é sensível para níveis elevados de fluoroquinolonas (Okerman *et al.*, 1998a). Para a análise dos resultados obtidos nas diferentes placas do teste, apenas foram tidas em consideração as classes de agentes antibacterianos para as quais o método se encontra definido (CNEVA, 1993). A eventual presença de outros compostos poderá ser confirmada utilizando outros métodos de triagem apropriados ou métodos de confirmação específicos.

Com a aplicação do método das quatro placas, detectou-se a presença de resíduos de substâncias antibacterianas em 75 das 118 amostras de leitão cru analisadas, o que corresponde a 64% de positivos (Figura 4).

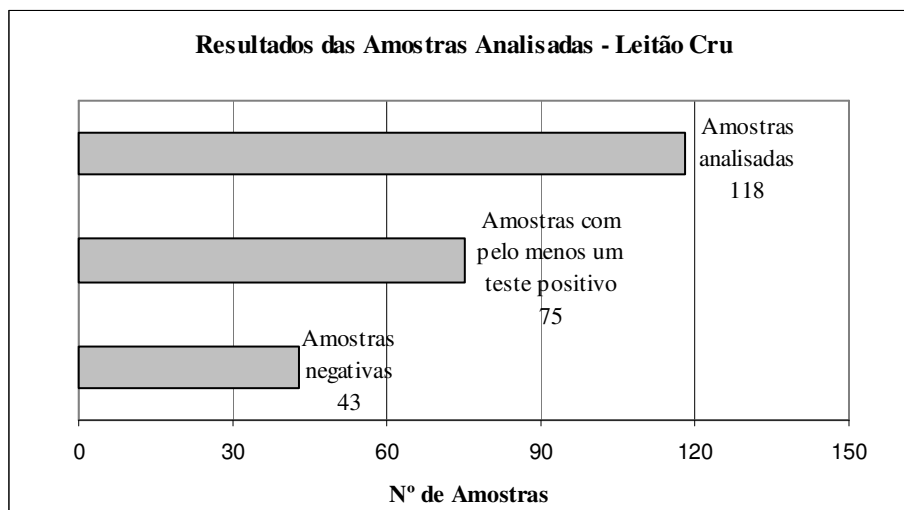


Figura 4 – Resultado global do teste de triagem para as amostras de leitão cru indicando o número de amostras analisadas e número obtido de amostras consideradas positivas e negativas.

Na Figura 5 é visualizada a percentagem relativa das amostras consideradas positivas em cada uma das placas do teste de triagem e das amostras consideradas negativas em relação ao número total de amostras de leitão cru analisadas. Verifica-se que o maior número de amostras consideradas positivas (52%, correspondente a 61 amostras) foi observado para a placa de teste a pH 8 inoculada com a suspensão de *Micrococcus luteus*, indicando a possível presença de resíduos de antibióticos β -lactâmicos e macrólidos. Analisando os resultados obtidos para a placa de ágar a pH 6 (Tabela 6) verifica-se que, das 30 amostras consideradas positivas, 19 foram também consideradas positivas na placa de teste inoculada com *Micrococcus luteus*, o que pode indicar a presença de antibióticos β -lactâmicos. Dadas as classes de agentes antibacterianos pesquisadas nesta placa de teste, os halos de inibição, observados nas restantes amostras, poderão ser devidos à presença de resíduos de tetraciclinas. No que diz respeito às restantes amostras consideradas positivas no teste da placa inoculada com *Micrococcus luteus*, a inibição observada poderá ser devida à presença de macrólidos. No entanto, alguns estudos sugerem que este teste pode resultar na obtenção de falsos positivos pelo que estes resultados deverão ser validados por métodos de confirmação adequados (Okerman *et al.*, 1998b). As causas destes resultados não são conhecidas, mas tanto o envelhecimento da carne como a contaminação bacteriana poderão desempenhar um papel importante (Pena *et al.*, 2004). Os fenómenos associados ao envelhecimento da carne, nomeadamente a desnaturação proteica e alteração das

gorduras por auto-oxidação, são relativamente lentos à temperatura de armazenamento utilizada no presente trabalho, pelo que não é expectável que tenham tido influência na possível ocorrência de falsos negativos. A contaminação bacteriana das amostras poderá ter ocorrido durante a fase da recolha, na medida em que foi efectuada no local de armazenamento das carcaças e, como tal, num ambiente não estéril. No que respeita à presença de resíduos de antibióticos β -lactâmicos, sabe-se que, para muitos destes antibióticos, o armazenamento a -20°C não é suficiente para garantir a estabilidade dos mesmos. De acordo com estudos realizados, para a pesquisa de resíduos de penicilina G e ampicilina as amostras devem ser armazenadas a -75°C (Maris e Hurtaud-Pessel, 2000; Verdon *et al.*, 2000). No entanto, os resultados obtidos para as placas de teste a pH 6 e 8 inoculadas, respectivamente, com *Bacillus subtilis* e *Micrococcus luteus*, indicam a possível presença de resíduos de antibióticos β -lactâmicos em 19 das amostras analisadas.

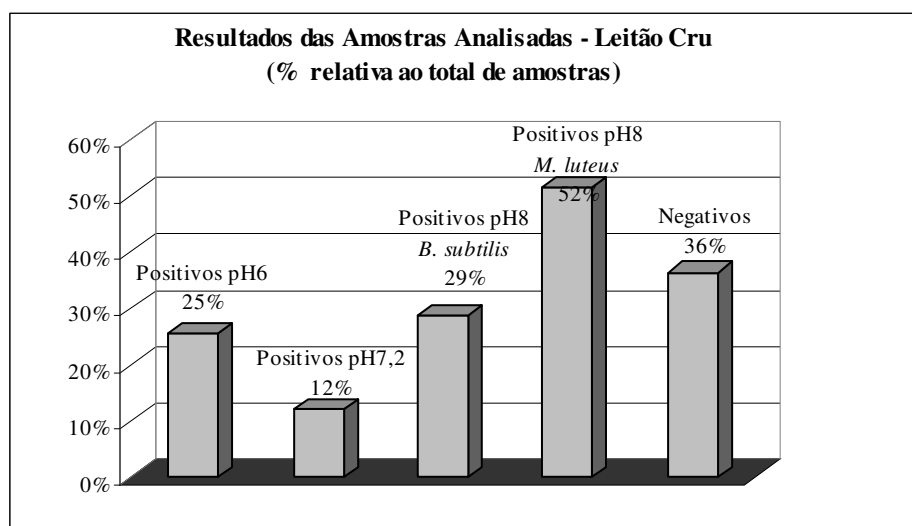


Figura 5 – Relação entre o número de amostras consideradas positivas em cada uma das placas de teste ou o número de amostras consideradas negativas, e o total de amostras de leitão cru analisadas.

Apesar da placa a pH 7,2, inoculada com a suspensão de esporos de *Bacillus subtilis*, ser específica para a detecção de sulfonamidas, na qual a adição da solução de trimetoprima visa aumentar o efeito inibitório (Hussein *et al.*, 2005), estudos indicam que não é igualmente sensível para todas as substâncias do grupo das sulfonamidas considerando o LMR definido pelo Regulamento (CE) 2377/90 e emendas (CE 1570/98) de 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ para o total de sulfonamidas em músculo (Hussein *et al.*, 2005; Okerman *et al.*, 1998a; Pena *et al.*, 2004; Hussein, 2004). Por exemplo, a sulfametazina (sulfadimidina),

que é o composto do grupo das sulfonamidas mais usado em medicina veterinária, não é detectada pelo método das quatro placas ao nível do LMR estabelecido (Hussein, 2004; Pena *et al.*, 2004). Desta forma, apenas amostras com uma concentração mais elevada destes resíduos poderá levar ao aparecimento de halos de inibição. Hussein e colaboradores (Hussein, 2004) estudaram o efeito do aumento da concentração da solução de trimetoprima no meio de ágar do teste das quatro placas, no aumento do limite de detecção de resíduos de sulfametazina. Os resultados obtidos indicam que para uma concentração de trimetoprima de 0,15 µg/mL é possível detectar resíduos de sulfametazina em concentrações abaixo do LMR. A técnica seguida no presente trabalho correspondeu ao método de referência em que a concentração de trimetoprima é de 0,05 µg/mL, o que poderá ter levado à obtenção de falsos negativos no que diz respeito à presença de sulfametazina. Este pressuposto, aliado com o facto deste composto ser um dos antibióticos mais usados em suínos (Currie *et al.*, 1998), poderá explicar o baixo número de positivos identificados para este teste (Figura 5). Esta hipótese será validada com base nos resultados obtidos no método de confirmação (vide ponto 3.3.3.2). Há ainda que considerar o facto das sulfonamidas serem compostos rapidamente metabolizados para formas inactivas para as quais os métodos baseados em inibição bacteriana não são apropriados (Currie *et al.*, 1998).

As amostras consideradas positivas no teste de ágar a pH 8 inoculado com a suspensão de *Bacillus subtilis* (29%, correspondente a 34 amostras) revelam uma possível contaminação com resíduos de aminoglicósidos.

A análise da variação ao longo do tempo do número de amostras consideradas positivas, não foi efectuada dado que as mesmas são provenientes de vários produtores. Esta análise apenas poderia ser efectuada caso se considerasse que as práticas de administração de agentes antibacterianos fossem comuns para os diferentes produtores. Dado terem sido observadas diferenças nos resultados obtidos nas quatro placas de teste para amostras de diferentes produtores, este pressuposto não foi assumido.

Na análise dos resultados obtidos para as várias placas de teste deverá ter-se em consideração que, sendo o método das quatro placas um método microbiológico baseado na inibição do crescimento das bactérias teste, poderão existir outros factores que influenciem o aparecimento de halos de inibição. Por exemplo, poderão existir

outros contaminantes que, nas condições do teste, também inibam o crescimento bacteriano. Na realidade todos os contaminantes naturalmente presentes na carne que possuem actividade antibacteriana poderão inibir o crescimento de bactérias sensíveis (Price, 2005; De Wasch *et al.*, 1998). Adicionalmente, a carne possui bactérias produtoras de bacteriocinas que podem actuar sobre as bactérias teste, e assim a inibição observada ser devida a outros inibidores naturais presentes na carne. A existência destes factores pode resultar na obtenção de falsos positivos em relação às classes de antibacterianos pesquisadas.

Outro factor que pode influenciar os resultados do teste é o efeito da matriz. Em 1998 Okerman e colaboradores (Okerman *et al.*, 1998a) realizaram um trabalho com vista ao estudo dos efeitos da matriz na detecção de agentes antimicrobianos em músculo por métodos de inibição bacteriana. Os agentes antibacterianos estudados pertenciam a diferentes classes, incluindo as tetraciclinas (oxitetraciclina, tetraciclina, clorotetraciclina e doxiciclina), os β -lactâmicos (ampicilina e penicilina G), os aminoglicósidos (estreptomina), os macrólidos (eritromicina e tilosina) e as sulfonamidas (sulfadimidina). De acordo com os resultados obtidos, apenas as tetraciclinas não sofreram interferências da matriz, indicando, assim, que a matriz da amostra influencia o teste de difusão, podendo resultar na obtenção de falsos negativos. Adicionalmente, os autores alertam para o facto dos resultados serem referentes a amostras contaminadas, existindo a possibilidade de, no caso de amostras naturalmente contaminadas, os resíduos não se difundirem completamente no meio. No entanto, desde a publicação deste estudo o método das quatro placas tem continuado a ser amplamente usado como um método de triagem em carne fresca.

Para além dos factores até agora referenciados, a bibliografia refere ainda a existência de outros que podem influenciar os resultados do teste, como o meio de ágar e o pH deste. O meio de ágar pode influenciar o tamanho do halo de inibição devido aos efeitos na taxa de crescimento do microrganismo e na actividade e taxa de difusão da substância antibacteriana (Okerman *et al.*, 1998a; Ferrini *et al.*, 2006). O pH do meio influencia a actividade de certos agentes antibacterianos, como por exemplo tetraciclinas, que são mais activas em meio ácido, e aminoglicósidos, que são mais activos em meio alcalino (Ferrini *et al.*, 2006). O pH do meio pode sofrer alterações durante o período de incubação (Korkela e Pekkanen, 1977). No caso das sulfonamidas,

um estudo realizado por Hussein (Hussein, 2004) indica, pelos resultados obtidos a pH 7,0 e 7,2, um efeito mínimo no diâmetro dos halos de inibição observados.

As amostras em assado, correspondentes a amostras em cru consideradas positivas para a presença de resíduos de agentes antibacterianos, foram analisadas pelo teste das quatro placas, não se observando quaisquer halos de inibição de crescimento bacteriano. Estes resultados indicam que as amostras em assado não possuem compostos capazes de, nas condições experimentais, inibir o crescimento bacteriano. No entanto, há que considerar a possibilidade do método das quatro placas, desenvolvido para amostras de carne fresca, não ser adequado para a análise de amostras processadas na medida em que a coagulação das proteínas impede a migração de líquidos, podendo, assim, interferir com a difusão de resíduos eventualmente presentes. Por outro lado, o efeito da temperatura nos compostos presentes nas amostras em cru, pode ter levado à destruição ou conversão noutros compostos que não inibem o crescimento das bactérias teste nas condições experimentais. Desta forma, não se pode concluir que as amostras em assado estão isentas de resíduos, podendo existir resíduos de compostos que, hipoteticamente, são mais nocivos para a saúde humana do que os compostos originais (Kuhne *et al.*, 2001). Vários trabalhos foram realizados com vista ao estudo da estabilidade de resíduos de medicamentos veterinários em alimentos de origem animal, durante o processamento dos mesmos. Pelos resultados obtidos nalguns destes estudos verifica-se que o efeito das condições de processamento difere entre os diferentes tipos de processos, o tempo de processamento e de acordo com o composto em causa. Num estudo realizado por Kuhne e colaboradores (Kuhne *et al.*, 2001) relativamente à estabilidade de resíduos de tetraciclina e clorotetraciclina durante o tratamento a 133°C verificou-se, após 45 minutos de processamento, uma redução de apenas 50% de tetraciclina e uma redução de 90 a 100% da clorotetraciclina. Estes resultados estão de acordo com o estudo realizado por Honikel e colaboradores (Honikel *et al.*, 1978). A diminuição da concentração de resíduos de oxitetraciclina com a temperatura de processamento também foi reportada (Rose *et al.*, 1996). As temperaturas atingidas durante o processo de assadura dos leitões são bastante mais elevadas pelo que é provável que os níveis de destruição de tetraciclina sejam superiores. Rose e colaboradores (Rose *et al.*, 1997) estudaram a estabilidade de resíduos de benzilpenicilina em amostras de músculo bovino durante o processamento e verificaram que não são estáveis, sendo as perdas observadas proporcionais à severidade do

processamento. Adicionalmente verificaram a perda de resíduos da carne para o líquido utilizado no processamento ou por exsudação chegando, no caso da cozedura, a atingir mais de metade do total de resíduos presente. De acordo com estes resultados verifica-se que o aporte de resíduos provenientes de alimentos de origem animal, pode ser diminuído se os líquidos resultantes do processamento dos alimentos não forem ingeridos.

Os resultados obtidos pelo teste das 4 Placas para as amostras em cru indicam a existência de resíduos de agentes antimicrobianos em concentrações acima dos LMR estabelecidos, sugerindo o uso indevido de agentes antimicrobianos e/ou o não cumprimento do intervalo de segurança. Desta forma, e de acordo com a legislação em vigor, as amostras seriam consideradas não conformes devendo os resultados ser confirmados por métodos analíticos adequados. No que diz respeito às amostras em assado e considerando que o teste é adequado para a pesquisa de resíduos em amostras processadas, os resultados obtidos indicam que os resíduos de compostos pertencentes às classes pesquisadas, eventualmente presentes na carne em cru, são destruídos com o processamento de assadura. Assim, dado que a carne de leitão é normalmente sujeita a este tipo de processamento, os resultados sugerem que o consumo deste alimento não coloca em risco a saúde do consumidor no que diz respeito à ingestão de resíduos dos compostos estudados. No entanto, não se pode afirmar que, após ser submetida ao processo de assadura, a carne encontra-se isenta de resíduos na medida em que poderão haver outros compostos sem actividade antibacteriana ou compostos de degradação eventualmente formados que não são detectados nas condições de realização do teste.

Dados os factores que influenciam o método utilizado e o facto do mesmo não permitir a identificação individual de compostos, os resultados obtidos pelo teste das quatro placas para as amostras em cru e em assado não podem ser considerados conclusivos. A confirmação da presença de resíduos e correspondente identificação e quantificação, apenas poderá ser confirmada através de métodos analíticos específicos.

3.3 Métodos de Confirmação e Quantificação

Para a identificação e quantificação dos resíduos de agentes antimicrobianos eventualmente presentes nas amostras, recorreu-se ao processo analítico de separação

por cromatografia líquida (LC – Liquid Chromatography) com detecção e quantificação por espectrometria de massa (MS – Mass Spectrometry) utilizando sistemas sequenciais de espectrometria (LC-MS/MS). A espectrometria de massa corresponde a uma técnica analítica poderosa que garante uma inequívoca identificação e quantificação de compostos presentes em matrizes complexas (Hermo *et al.*, 2006; Becker *et al.*, 2004). A sensibilidade e selectividade observadas são tremendamente aumentadas quando se utilizam sistemas de espectrometria sequenciais (MS/MS) (Díaz-Cruz e Barceló, 2005; Hermo *et al.*, 2006). Os métodos são desenvolvidos especificamente para determinados tipos de compostos (Shao *et al.*, 2005) e são constituídos, normalmente, por quatro passos: extracção, limpeza em fase sólida, separação cromatográfica e identificação e quantificação por espectrometria de massa. Cada um destes passos é desenvolvido e optimizado para cada grupo de compostos com características químicas semelhantes. Estes métodos são destrutivos requerendo uma quantidade específica de amostra (Sparkman, 2005).

Os métodos de confirmação e quantificação dos resíduos de agentes antimicrobianos, eventualmente presentes nas amostras de leite, foram realizados no LNIV em Lisboa. Para a escolha das classes de agentes antimicrobianos analisadas, foram consideradas as pesquisadas no método de triagem, os métodos de rotina utilizados no laboratório e as classes de agentes antimicrobianos detectadas com maior frequência, em suínos, nas análises realizadas pelo laboratório. Das classes pesquisadas no teste de triagem apenas não foram analisados resíduos de antibióticos β -lactâmicos e aminoglicosídeos. Os resíduos de penicilinas não foram pesquisados dado que, de acordo com estudos publicados, estes compostos não são estáveis à temperatura de -20°C durante longos períodos de armazenamento (Maris e Hurtaud-Pessel, 2000; Verdon *et al.*, 2000). Como o período que decorreu entre a realização do método microbiológico e do método de confirmação foi entre 4 a 7 meses, optou-se por não realizar esta análise dado que, mesmo que fossem identificados e quantificados resíduos, os níveis determinados não seriam os reais. As classes de antibióticos cefalosporinas e aminoglicosídeos não são pesquisadas no LNIV. As restantes classes de antibióticos pesquisadas foram as quinolonas (incluindo algumas pertencentes ao subgrupo das fluoroquinolonas), as quinoxalinas e os coccidiostáticos. Os métodos utilizados para a identificação e quantificação de agentes antimicrobianos nas amostras de leite, correspondem aos métodos de rotina realizados pelo LNIV. Tratando-se de um laboratório de referência,

competente a coordenação das normas e métodos de análise para cada resíduo ou grupo de resíduos em causa, incluindo a organização de testes comparativos periódicos, efectuados com amostras fraccionadas pelos laboratórios autorizados, bem como a observância dos limites estabelecidos (DL 185/2005). Assim, os métodos utilizados pelo LNIV visam a análise quantitativa de resíduos em concentrações próximas dos LMR correspondentes, ou a confirmação da presença de resíduos no caso de compostos sem LMR estabelecido.

A identificação e quantificação de resíduos de várias classes, recorrendo a diferentes métodos de confirmação, requer uma quantidade total de amostra que, nalguns casos era superior à quantidade recolhida. Tal como referido no ponto 3.1, dado que não existe informação relativamente aos produtores identificados, considera-se, no âmbito deste trabalho, que estes correspondem aos criadores dos leitões. Assim, e considerando a hipótese que a administração de agentes antimicrobianos aos leitões não é individual mas sim realizada a toda a produção, a estratégia seguida baseou-se na associação das amostras por data de recolha e produtor. A única excepção correspondeu às amostras 111 a 115, recolhidas a 13 de Setembro, que foram divididas em dois conjuntos. Tal deveu-se ao facto das amostras constituintes de cada conjunto terem apresentado resultados bastante diferentes entre cada conjunto no teste das 4 Placas. O agrupamento das amostras por data de recolha e produtor permitiu, na maioria dos casos, a obtenção de uma massa total suficiente para permitir o estudo de diferentes classes de agentes antimicrobianos. Observando os resultados obtidos no teste das 4 Placas para diferentes amostras do mesmo produtor e com a mesma data de recolha (Tabela 6) verifica-se que, nalguns casos, existem diferenças entre as amostras. Dado que estas diferenças poderão ser devidas à ocorrência de falsos positivos causados por alguns dos factores mencionados em 3.2.5 ou a diferente metabolização, por parte dos animais, dos compostos administrados, considera-se viável a hipótese de se utilizarem, para a realização dos testes de confirmação, os conjuntos de amostras por produtor e data de recolha. Na Tabela 7 são apresentadas as amostras analisadas no método de confirmação, apresentando-se a relação com as amostras analisadas pelo teste das 4 placas. As amostras agrupadas foram classificadas alfanumericamente. Alguns dos conjuntos de amostras por produtor e data de recolha não possuíam quantidade suficiente para a realização de testes de confirmação, pelo que não foram analisadas. Na

tabela são ainda apresentados o código dos respectivos produtores e as datas de recolha em cru e em assado.

Tabela 7 – Amostras agrupadas por data de recolha e por produtor considerando a numeração utilizada para o método das 4 Placas. As amostras com quantidade suficiente foram analisadas pelo método de confirmação e encontram-se classificadas alfanumericamente.

Amostra teste 4 Placas	Amostra teste confirmação	Data de recolha		Produtor
		Cru	Assado	
1 a 3	—	22 Nov 2005	23 Nov 2005	P01
4, 5	—	22 Nov 2005	23 Nov 2005	P02
6	—	22 Nov 2005	23 Nov 2005	P03
7 a 14	C1	7 Dez 2005	8 Dez 2005	P04
15, 16	—	14 Dez 2005	17 Dez 2005	P05
17, 18	—	14 Dez 2005	17 Dez 2005	P06
19, 20	—	14 Dez 2005	17 Dez 2005	P07
21 a 24	C2	14 Dez 2005	17 Dez 2005	P08
25, 26	C3	8 Mar 2006	11 Mar 2006	P07
27 a 30	—	8 Mar 2006	11 Mar 2006	P09
31, 32	—	8 Mar 2006	11 Mar 2006	P10
33, 34	C4	8 Mar 2006	11 Mar 2006	P11
35 a 40	C5	5 Abr 2006	8 Abr 2006	P08
41	—	5 Abr 2006	8 Abr 2006	P12
42, 43	C6	5 Abr 2006	8 Abr 2006	P13
44, 45	—	5 Abr 2006	8 Abr 2006	P14
46 a 48	C7	9 Mai 2006	13 Mai 2006	P15
49 a 52	C8	9 Mai 2006	13 Mai 2006	P16
53 a 55	C9	9 Mai 2006	13 Mai 2006	P17
56, 57	C10	10 Mai 2006	13 Mai 2006	P08
58 a 60	C11	10 Mai 2006	13 Mai 2006	P18
61, 62	C12	10 Mai 2006	13 Mai 2006	P19
63 a 65	C13	10 Mai 2006	13 Mai 2006	P20
66, 67	C14	30 Mai 2006	3 Jun 2006	P01
68 a 71	C15	30 Mai 2006	3 Jun 2006	P02
72, 73	C16	30 Mai 2006	3 Jun 2006	P03
74 a 76	C17	30 Mai 2006	3 Jun 2006	P08
77 a 79	C18	11Jul 2006	— ^a	P01
80, 81	C19	11Jul 2006	— ^a	P02
82 a 84	C20	11Jul 2006	— ^a	P08
85 a 87	C21	11Jul 2006	— ^a	P16
88	—	11Jul 2006	— ^a	P21
89 a 91	C22	8 Ago 2006	12 Ago 2006	P05
92 a 95	C23	8 Ago 2006	12 Ago 2006	P15
96 a 98	C24	8 Ago 2006	12 Ago 2006	P16
99 a 105	C25	6 Set 2006	9 Set 2006	P19
106 a 108	C26	6 Set 2006	9 Set 2006	P22
109, 110	C27	13 Set 2006	15 Set 2006	P07
111, 112	C28	13 Set 2006	15 Set 2006	P22
113 a 115	C29	13 Set 2006	15 Set 2006	P22
116, 117	C30	13 Set 2006	15 Set 2006	P23
118	—	13 Set 2006	15 Set 2006	P24

^a Amostra não recolhida em assado

Dado o elevado número de amostras e a impossibilidade de se efectuarem análises às diferentes classes de agentes antimicrobianos para as várias amostras, o procedimento

seguido baseou-se na pesquisa de apenas algumas das classes em estudo para cada conjunto de amostras. As análises foram realizadas sem ter em consideração os resultados obtidos no teste de triagem permitindo, também, a validação destes resultados. Apenas foram analisadas amostras em assado correspondentes a amostras em cru para as quais foi confirmada a presença de resíduos.

Previamente à realização dos ensaios, as amostras foram descongeladas procedendo-se à remoção de gordura e de cartilagens porventura existentes. Este procedimento é necessário na medida em que verifica-se que a existência de gordura dificulta o processo de extracção e interfere com a detecção na medida em que origina um maior ruído de fundo na análise cromatográfica. Desta forma, há que considerar a hipótese de resíduos eventualmente presentes nestes tecidos adiposos não serem quantificados por estes métodos. As amostras tratadas foram agrupadas de acordo com a data de recolha e o produtor, picadas com uma picadora eléctrica e armazenadas a -18°C até à data da realização do método. Os métodos foram realizados em Janeiro de 2007.

3.3.1 Descrição Geral dos Métodos

Os métodos utilizados para a identificação e quantificação das diferentes classes de agentes antimicrobianos em estudo, são constituídos por quatro passos: extracção, limpeza em fase sólida, separação e identificação e quantificação. As condições de cada um destes passos são dependentes dos compostos em análise.

Os passos de extracção e limpeza em fase sólida visam a concentração dos compostos em estudo e a remoção de contaminantes. Como referido anteriormente, os métodos analíticos utilizados para a separação e identificação e quantificação baseiam-se numa metodologia analítica que conjuga a técnica de separação por cromatografia líquida com a técnica de identificação e quantificação por espectrometria de massa. A cromatografia líquida permite a separação dos compostos em análise com base na afinidade dos diferentes constituintes do extracto, proveniente das fases de extracção e limpeza em fase sólida, com a fase estacionária da coluna. De acordo com os tempos de retenção dos compostos em análise, o eluato proveniente da coluna é introduzido no espectrómetro de massa com vista à identificação e quantificação dos compostos em estudo eventualmente presentes na amostra. A técnica de espectrometria de massa

baseia-se na geração de iões e na sua posterior detecção com base na razão entre a massa e a carga (m/z) (Bramer, 1997). O espectrómetro de massa inclui um local para injeção da amostra, uma fonte de ionização, um analisador de massa e um detector. Os iões são gerados na fonte de ionização por indução à perda ou ganho de carga por parte de espécies neutras (SCMS, 2005). Uma vez formados, são acelerados, por um campo eléctrico ou magnético, para o analisador de massa sendo o seu movimento influenciado pela razão m/z correspondente. No analisador de massa, os iões são separados, no espaço e no tempo, de acordo com a razão m/z . Após separação, os iões são detectados e o sinal é transferido para o periférico de saída onde os dados são analisados. O resultado deste processo é um espectro que poderá fornecer informação relativa à massa ou até à estrutura molecular (Bramer, 1997; SCMS, 2005). Os espectrómetros de massa operam em vácuo de forma a permitir que os iões atinjam o detector sem colidirem com outras moléculas ou átomos gasosos, aumentando a resolução e a sensibilidade do método (SCMS, 2005).

Existem vários métodos utilizados para a geração de iões. Um destes métodos é a ionização por electrospray (ESI - Electrospray Ionization) que permite a geração de iões com número de cargas elevado, reduzindo a razão m/z , permitindo, assim, a análise de compostos de elevada massa molecular como proteínas (Baliz e Hewitt, 2003). A ESI é uma técnica de ionização à pressão atmosférica, pelo que a fonte não se encontra na zona de vácuo do espectrómetro de massa, óptima tanto para compostos polares como apolares, bem como para compostos com baixa estabilidade térmica (Díaz-Cruz e Barceló, 2005; Baliz e Hewitt, 2003; Bramer, 1997). As amostras a analisar são introduzidas em solução e os compostos são submetidos a uma ionização suave, permitindo que as interacções não covalentes entre moléculas, que existem em solução, sejam preservadas na fase gasosa (SCMS, 2005). O analito em solução é pulverizado na extremidade de um capilar de aço inoxidável e mantido a um potencial relativamente elevado em relação a um contra-eléctrodo (Bramer, 1997). O sinal do potencial aplicado determina a polaridade das gotas e dos iões formados, estando normalmente compreendido entre os 700 e os 5000 V (SCMS, 2005). A nebulização da solução é, nalguns casos, facilitada pela introdução de um gás nebulizador, em geral o azoto. As moléculas dos compostos em análise são ionizadas e separadas do solvente, sendo a evaporação deste muitas vezes completada por intermédio de um fluxo contra corrente de um gás, em geral, azoto. Este é normalmente designado como gás de secagem e visa

maximizar a transferência de iões desta zona para a zona de alto vácuo do analisador de massa (Biosystems, 2001; SCMS, 2005). A fonte de ionização pode operar em modo positivo (ESI+) ou negativo (ESI-) dependendo da composição da fase móvel e dos compostos a analisar originando, respectivamente, iões moleculares positivos ou negativos (SCMS, 2005; Baliz e Hewitt, 2003; Becker *et al.*, 2004). Os iões formados são acelerados pelo campo eléctrico para o analisador de massa, que percorre uma gama de m/z previamente definida e selecciona os iões de interesse que posteriormente são encaminhados para o detector. Existem diferentes tipos de analisadores de massa usados em sistemas LC-MS. Um exemplo corresponde ao analisador quadrupolo que tem sido bastante usado em conjunto com fontes de ionização ESI. Tal deve-se ao facto dos iões produzidos a partir de proteínas e outras biomoléculas (m/z entre 1000 e 3500) conseguirem ser analisados por analisadores quadrupolos na medida em que permitem a análise de iões com uma razão m/z até 4000 (SCMS, 2005; Bramer, 1997). No caso de espectrometria de massa sequencial (MS/MS), são utilizados três quadrupolos em série. Os iões de interesse, seleccionados pelo primeiro quadrupolo (MS1) de acordo com a razão m/z , seguem para o segundo quadrupolo onde são activados por colisão com um gás neutro. Este quadrupolo também é designado por célula de colisão, dado que é onde ocorre a fragmentação dos iões por dissociação induzida por colisão (CID - Collision-Induced Dissociation). Os iões moleculares e fragmentos iónicos resultantes são conduzidos para o terceiro quadrupolo (MS2) onde são seleccionados e encaminhados para o detector (SCMS, 2005; Baliz e Hewitt, 2003).

De acordo com o composto em análise, são identificados os iões de diagnóstico que serão pesquisados com vista à identificação e quantificação de resíduos eventualmente presentes. Estes podem corresponder ao ião molecular, a aductos característicos do ião molecular, iões fragmento característicos e iões isótopos. No caso de técnicas de espectrometria de massa sequencial, a detecção pode ser efectuada por monitorização selectiva de reacções (SRM - Selected Reaction Monitoring), onde apenas é seleccionado um par iónico (ião pai e ião secundário), ou por monitorização múltipla de reacções (MRM - Multiple Reaction Monitoring), onde são analisados alguns pares iónicos. As intensidades dos pares iónicos são monitorizadas ao longo da corrida cromatográfica, obtendo-se cromatogramas de massa que relacionam a intensidade dos pares iónicos analisados com o tempo de retenção na coluna (ASMS, 2001).

Dadas as características associadas, os métodos LC-MS/MS possuem uma elevada selectividade, especificidade e sensibilidade, permitindo a separação e detecção de compostos com a mesma massa molecular e/ou que sejam igualmente retidos na coluna cromatográfica, desde que originem diferentes iões produto (Díaz-Cruz e Barceló, 2005).

Nos métodos usados para a identificação e quantificação dos agentes antimicrobianos em estudo, foram utilizados dois espectrómetros de massa do tipo quadrupolo, PE Sciex API 2000 da Applied Biosystems e MDS SCIEX API 3000 da Applied Biosystems. O espectrómetro API 2000 utilizou o azoto em quatro tipos de gases: gás nebulizador, gás de aquecimento, gás de secagem e gás na câmara de colisão. No espectrómetro API 3000, em que o gás nebulizador funciona também como gás de aquecimento, o azoto foi igualmente utilizado como gás nebulizador, gás de secagem e gás da câmara de colisão. A fonte de ionização utilizada foi a electrospray em modo positivo (ESI+). No caso do método de confirmação de coccidiostáticos, realizado no espectrómetro de massa API 3000 foi também utilizada a fonte de ionização em modo negativo (ESI-) para a identificação e quantificação de dois dos compostos analisados. Para fins de identificação e quantificação, os fragmentos iónicos foram gerados por dissociação induzida por colisão dos iões quasimoleculares com moléculas de azoto. A aquisição de dados foi feita em modo MRM tendo sido monitorizados, por composto, dois pares iónicos correspondentes ao composto pai e um ião filho. O modo MRM permite um elevado nível de selectividade, possibilitando a detecção de compostos presentes em matrizes complexas (Baliz e Hewitt, 2003; Hermo *et al.*, 2006). Para cada molécula, os tempos de retenção observados para os dois pares iónicos estudados são os mesmos, permitindo assim a identificação e quantificação dos compostos. Dado tratarem-se de matrizes complexas, todas as análises foram realizadas utilizando o método de adição de padrão de forma a compensar os efeitos da matriz. As características e condições gerais, bem como os resultados obtidos em cada método utilizado, são descritos de seguida. A título de exemplo, são apresentados cromatogramas referentes às tetraciclinas pesquisadas.

3.3.2 Tetraciclinas

O método utilizado pelo LNIV para a determinação de resíduos de tetraciclinas em músculo é adaptado de um protocolo do Laboratório de Medicamentos Veterinários da CNEVA (CNEVA, 1997). Como padrão interno foi utilizada a dismetiltetraciclina (DMTC). O método permite a identificação e quantificação de resíduos de tetraciclina (TC), clorotetraciclina (CITC), oxitetraciclina (OTC) e doxiciclina (DC).

3.3.2.1 Procedimento

Para o processo de extração foram pesados 4 ± 1 g da amostra homogeneizada. A amostra foi colocada num tubo de polipropileno de 50 mL seguindo-se a adição de 25 mL de tampão Mc Ilvaino/0,1 M EDTA e agitação em vortex durante 30 segundos. A mistura foi agitada, a 100 rpm com uma barra magnética durante 15 minutos, sendo posteriormente centrifugada a 4°C e 3000 rpm durante 20 minutos. Após centrifugação, as amostras foram submetidas ao processo de extração de proteínas. O intervalo entre estes dois passos foi o mínimo possível devido a problemas de estabilidade. O sobrenadante foi recolhido para um tubo de vidro de 30 mL e submetido a agitação em vortex. Seguiu-se a adição, lenta e em constante agitação, de 2,5 mL de uma solução de ácido tricloroacético (1 g/mL) sendo a mistura agitada durante mais um minuto. O esquema do processo seguido para a extração das tetraciclinas em estudo, porventura presentes nas amostras, é apresentado na Figura 6.

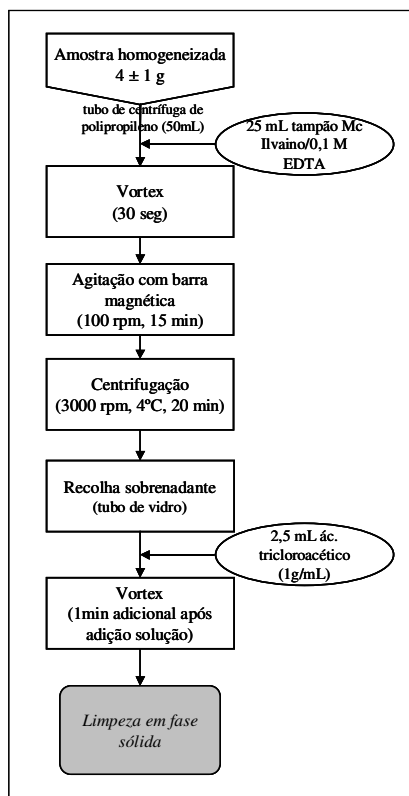


Figura 6 – Esquema do processo de extracção utilizado no método de confirmação para as tetraciclina em estudo.

O extracto proveniente do processo anterior foi submetido a um passo de limpeza numa coluna de extracção em fase sólida Bond Elut C18, 200 mg da Varian. A coluna foi pré-condicionada com 1 mL de metanol, 1 mL de água ultrapura e 1 mL tampão Mc Ilvaine. Foi conectado um reservatório com um filtro de lã de vidro e o extracto foi filtrado com a ajuda de uma bomba de vácuo a um fluxo não superior a 2 gotas/s, tendo-se tido o cuidado de não deixar que a coluna secasse. A coluna foi posteriormente lavada com 1 mL de água e seca com a bomba de vácuo durante 5 minutos. Após a secagem, o filtro foi retirado e os analitos foram lentamente eluídos, para um tubo de polipropileno, com uma solução de 0,4 mL de metanol/2% ácido hipoclorídrico seguida de 0,6 mL de água ultrapura. Previamente à injeção de um volume de 50 µL no sistema LC-MS/MS, o eluato foi filtrado com um filtro 0,45 µm e 13 mm de diâmetro (Millex-HV13). O esquema do processo seguido para a limpeza em fase sólida do extracto proveniente do processo de extracção, é apresentado na Figura 7.

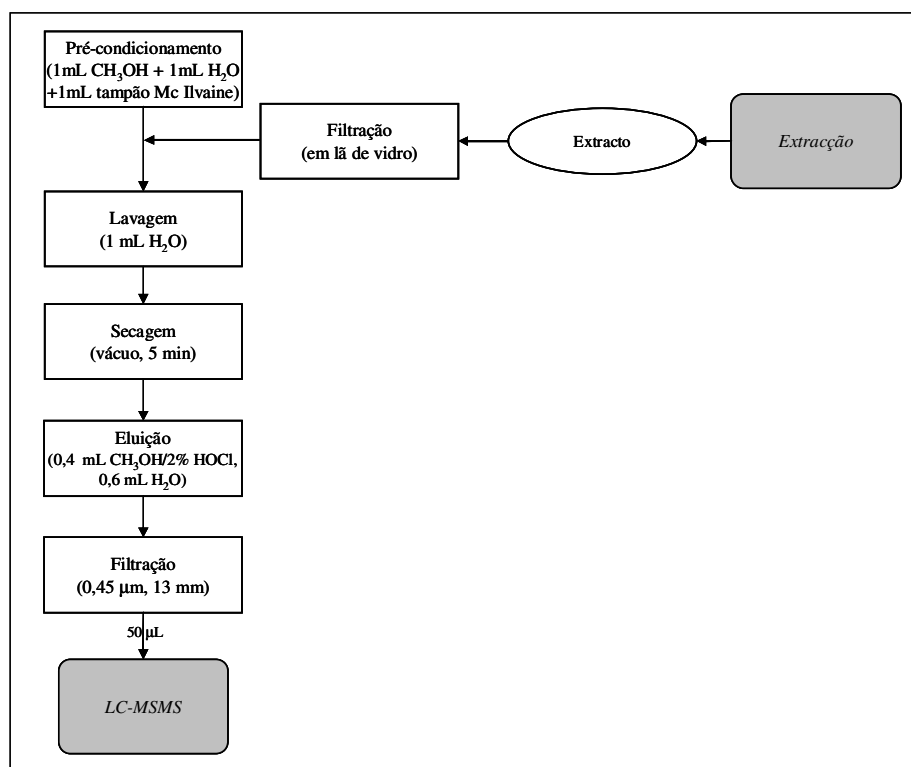


Figura 7 – Esquema do processo de limpeza em fase sólida utilizado no método de confirmação para as tetraciclinas em estudo.

A separação cromatográfica foi conseguida com uma coluna Zorbax SB - Aq (2,1 x 50 mm, 5 µm) à temperatura de 30°C. A fase móvel consistiu numa solução de ácido oxálico 0,1 mM em ácido fórmico 0,2% (A) e metanol (B). A corrida iniciou-se com 90% de fase A, descendo linearmente até 25% aos 3,5 minutos. A percentagem de fase móvel A voltou a subir até aos 90% em 6,1 minutos. O tempo de corrida foi de 9 minutos e o fluxo 300 µL/min com um split de 1:1. Os tempos de retenção dos compostos em análise são apresentados na Tabela 8. Para fins de identificação são utilizados os tempos de retenção relativos calculados com base no tempo de retenção do padrão interno.

Tabela 8 – Tempos de retenção das tetraciclinas em análise e do padrão interno.

Composto	Tempo de retenção (minutos)	Tempo de retenção relativo
Tetraciclina (TC)	4,38	0,98
Clorotetraciclina (CITC)	4,64	1,04
Oxitetraciclina (OTC)	4,30	0,96
Doxiciclina (DC)	4,88	1,09
Dimetiltetraciclina (DMTC)	4,48	—

O eluato proveniente da coluna foi transferido para o espectrômetro de massa API 2000, com vista à detecção e quantificação dos compostos em análise eventualmente presentes na amostra. A fonte de ionização ESI operou em modo positivo. As condições operacionais do espectrômetro de massa referentes ao fluxo dos gases utilizados, à temperatura e à voltagem no capilar, são apresentadas na Tabela 9.

Tabela 9 – Condições operacionais do espectrômetro de massa para a identificação e quantificação das tetraciclinas em estudo.

Fluxo do gás nebulizador (N ₂)	30 L/min
Fluxo do gás de aquecimento (N ₂)	70 L/min
Fluxo do gás de secagem (N ₂)	30 L/min
Voltagem no capilar	5000 V
Fluxo do gás na célula de colisão (N ₂)	2 L/min
Temperatura	400°C

Para cada composto a pesquisar, foram monitorizados dois pares iônicos referentes ao íon molecular e a dois íons fragmento mais abundantes. Para a identificação do padrão interno, foi monitorizado um par iônico. As massas dos diferentes íons são apresentadas na Tabela 10.

Tabela 10 – Razão m/z dos íons moleculares e fragmentos correspondentes aos pares iônicos monitorizados (íon molecular/íon fragmento).

Composto	Íon molecular (m/z)	Íon fragmento (m/z)
Tetraciclina (TC)	445,5	410,1
		427,1
Clorotetraciclina (CITC)	479,4	444,0
		462,0
Oxitetraclina (OTC)	461,5	426,2
		443,2
Doxiciclina (DC)	445,5	428,1
		410,1
Dismetiltetraciclina (DMTC)	465,1	448,0

Nas Figuras seguintes são apresentados, a título de exemplo, cromatogramas obtidos para amostras fortificadas na monitorização de um dos pares iônicos de cada um dos compostos estudados e do par iônico do padrão interno usado.

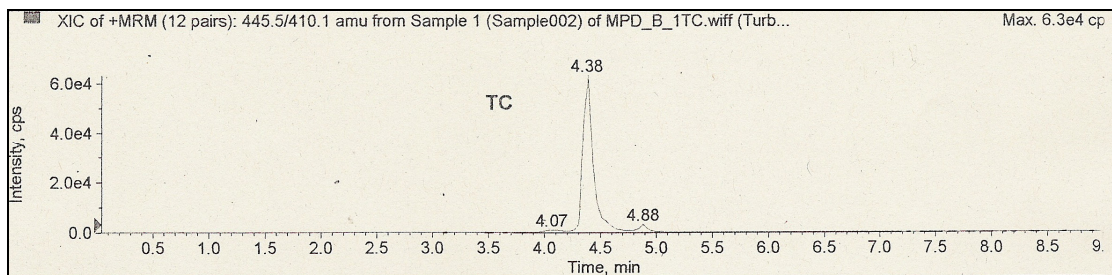


Figura 8 – Cromatograma obtido em modo MRM ajustado para a detecção do par iônico 445,5/410,1 da TC.

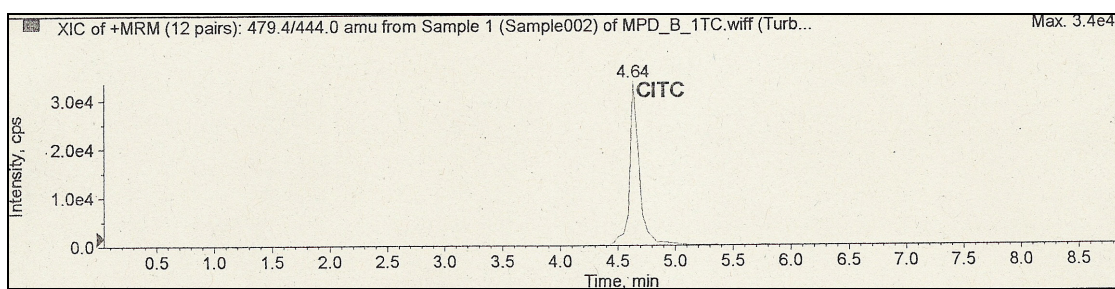


Figura 9 – Cromatograma obtido em modo MRM ajustado para a detecção do par iônico 479,4/444,0 da CITC.

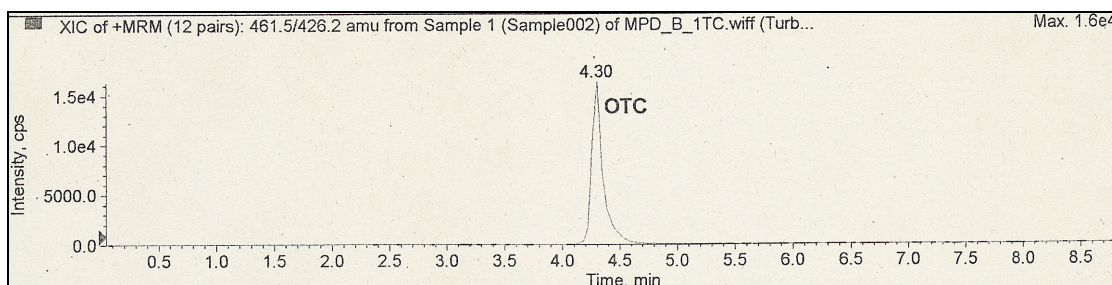


Figura 10 – Cromatograma obtido em modo MRM ajustado para a detecção do par iônico 461,5/426,2 da OTC.

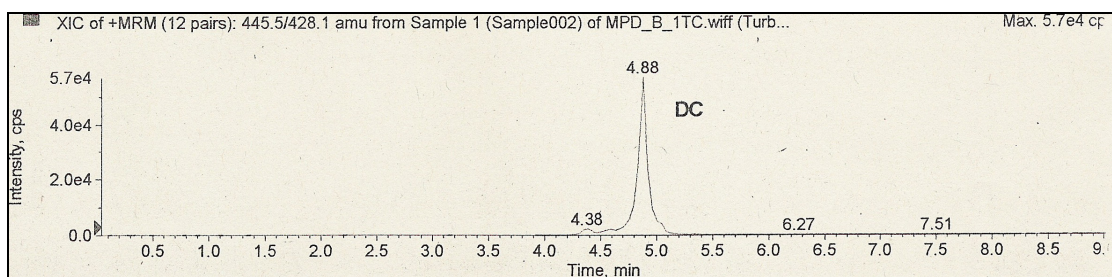


Figura 11 – Cromatograma obtido em modo MRM ajustado para a detecção do par iônico 445,5/428,1 da DC.

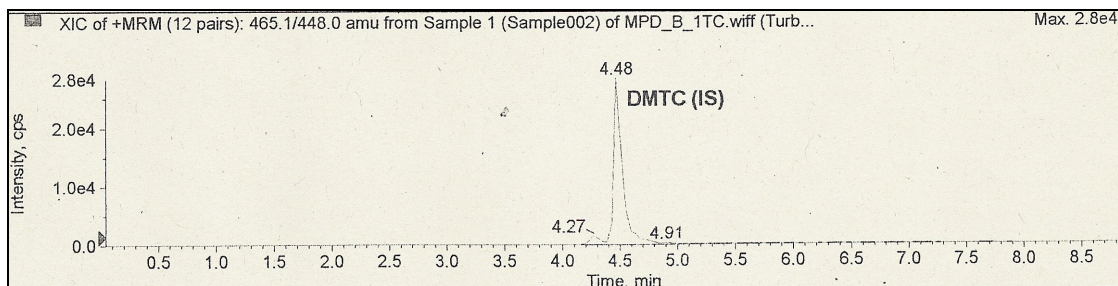


Figura 12 – Cromatograma obtido em modo MRM ajustado para a detecção do par iônico 465,1/448,0 da DMTC.

3.3.2.2 Resultados e Discussão

Os resultados obtidos para os conjuntos de amostras por produtor e data de recolha, analisados pelo método de identificação e quantificação de resíduos de tetraciclinas, são apresentados na Tabela 11. As concentrações dos resíduos identificados são apresentadas em μg de resíduo por kg de músculo.

Tabela 11 – Conjuntos de amostras em cru por produtor e data de recolha analisados por LC-MS/MS e resultados obtidos.

Amostra teste confirmação	Data recolha (cru)	Produtor	Concentração do resíduo ($\mu\text{g}/\text{kg}$)			
			Tetraciclina (TC)	Clorotetraciclina (CITC)	Oxitetraciclina (OTC)	Doxiciclina (DC)
C1	7 Dez 2005	P04	—	—	20	243
C8	9 Mai 2006	P16	—	—	150	—
C13	10 Mai 2006	P20	—	—	—	—
C20	11 Jul 2006	P08	—	—	3	7
C21	11 Jul 2006	P16	—	—	2	—
C28	13 Set 2006	P22	—	—	143	36
C29	13 Set 2006	P22	—	—	36	560

De acordo com os resultados obtidos verifica-se, para os conjuntos de amostras analisados, uma maior incidência de resíduos de OTC e DC não sendo detectada a presença de resíduos de TC e CITC. Tal como referido no ponto 1.3.2, o LMR estabelecido para cada um dos compostos em estudo em suínos é $100 \mu\text{g}/\text{kg}$ de músculo, sendo este limite, no caso da TC, CITC e OTC, correspondente à soma destes compostos e dos correspondentes 4-epímeros (CEE 2377/90). Os resíduos dos 4-epímeros não foram pesquisados neste método. Os resultados obtidos revelam concentrações de OTC cerca de 50% acima do limite permitido para as amostras C8 e C28. Já as amostras C1 e C29 excedem em muito o limite permitido na medida em que apresentam, respectivamente, concentrações de 243 e $560 \mu\text{g}/\text{kg}$. As amostras C20 e C21 revelam a presença, respectivamente, de resíduos de OTC e DC e de OTC em concentrações bastante abaixo do LMR.

Os resultados obtidos no método de confirmação (Tabela 11) foram comparados com os obtidos pelo método das 4 Placas, para as amostras individuais, na placa a pH 6 inoculada com *Bacillus subtilis* (Tabela 6), na medida em que esta placa permite a detecção de resíduos de tetraciclinas e β -lactâmicos. Ambos os resultados são apresentados na Tabela 12.

Tabela 12 – Resultados obtidos na pesquisa de tetraciclinas para os conjuntos de amostras analisados por LC-MS/MS e para as amostras individuais em cru correspondentes, analisadas pelo teste das 4 Placas. São também apresentados os resultados obtidos para a placa a pH 8 inoculada com *M. luteus*.

Amostra teste confirmação	Amostra teste 4 Placas	Data recolha (cru)	Produtor	Resultado Teste confirmação	Resultado Teste de Triagem	
					pH 6 <i>B. subtilis</i>	pH 8 <i>M. luteus</i>
C1	7	7 Dez 2005	P04	20 OTC; 243 DC	2/2	NE
	8				4/4	NE
	9				3/3	NE
	10				3/2	NE
	11				2/3	NE
	12				2/2	2/2
	13				3/3	NE
	14				2/3	NE
C8	49	9 Mai 2006	P16	150 OTC	NE	2/2
	50				NE	2/2
	51				NE	2/2
	52				2/2	3/3
C13	63	10 Mai 2006	P20	—	NE	NE
	64				2/3	NE
	65				NE	2/2
C20	82	11 Jul 2006	P08	3 OTC; 7 DC	3/3	2/2
	83				2/2	2/2
	84				3/3	2/2
C21	85	11 Jul 2006	P16	2 OTC	NE	2/2
	86				3/2	2/2
	87				3/2	2/2
C28	111	13 Set 2006	P22	143 OTC; 36 DC	NE	NE
	112				NE	NE
C29	113	13 Set 2006	P22	36 OTC; 560 DC	9/10	2/2
	114				10/10	2/3
	115				10/11	NE

Das amostras que apresentaram resíduos de tetraciclinas acima dos limites máximos estabelecidos, verifica-se que no caso da C1, todas as amostras constituintes desta foram consideradas positivas no teste das 4 placas. No caso da amostra C8 apenas uma das quatro amostras constituintes foi considerada positiva no teste de triagem, apresentando um halo de inibição de 2 mm. Dado que a confirmação da presença de resíduos não foi realizada para as amostras individuais, não é possível validar se os resultados das restantes amostras correspondem a falsos negativos. A amostra C28 apresentou uma

concentração de 143 µg OTC/kg. Dado que esta é constituída por 2 amostras, a concentração determinada poderá ser devida a uma ou ambas as amostras indicando assim, a ocorrência de pelo menos um falso negativo pelo método de triagem. As 3 amostras constituintes da C29, para a qual foi determinada uma concentração de 560 µg DC/kg, apresentaram halos de inibição médios de 10 mm.

Para a amostra C13 não foi detectada a presença de resíduos de tetraciclina acima do limite de detecção do método. No entanto, no teste das 4 placas uma das amostras foi considerada positiva no teste a pH 6 com *Bacillus subtilis*. Não se tratando de resíduos de tetraciclina, o resultado poderia ser referente à presença de antibióticos β-lactâmicos. No entanto, dado que a mesma amostra foi considerada negativa no teste a pH 8 com *Micrococcus luteus* (Tabela 12), que permite a detecção de antibióticos β-lactâmicos e macrólidos, trata-se possivelmente de um falso positivo. Para as amostras C20 e C21 foram identificadas concentrações muito baixas de resíduos. Desta forma, e dado que o limite de detecção do teste de triagem é próximo do LMR estabelecido, os resultados positivos obtidos para as três amostras correspondentes à C20 e para duas das três amostras correspondentes à C21 poderão ser devidos à presença de antibióticos β-lactâmicos, na medida em que também foram consideradas positivas no teste a pH 8 com *Micrococcus luteus*. Dado que a presença de resíduos de compostos pertencentes a esta classe não foi confirmada, esta hipótese não pôde ser validada.

A análise dos resultados com vista à verificação da contaminação por resíduos de tetraciclina acima do LMR, deveria ter sido completada com a pesquisa dos 4-epímeros da TC, CITC e OTC na medida em que estes compostos também são tidos em consideração para a determinação da concentração de resíduos presentes. No entanto, dado que estes compostos possuem a mesma massa, deveriam aparecer junto dos picos dos isómeros correspondentes. Como nos cromatogramas obtidos após análise no sistema LC-MS/MS em modo MRM ajustado para a detecção dos diferentes pares iónicos (Figuras 8 a 12), apenas é visualizado um pico para os tempos de retenção dos compostos em estudo (Tabela 10), é provável que os 4-epímeros da TC, CITC e OTC apresentem os mesmos tempos de retenção dos isómeros correspondentes, pelo que a concentração determinada corresponde à soma dos dois compostos.

As amostras assadas correspondentes aos conjuntos de amostras em cru, também foram analisadas com vista à identificação e quantificação de resíduos de tetraciclinas eventualmente presentes. As amostras C8 e C29 não foram analisadas por não possuírem quantidade suficiente. Tal como indicado na Tabela 7, as amostras correspondentes à C20 e C21 não foram recolhidas em assado. Os resultados obtidos para as amostras em assado analisadas são apresentados na Tabela 13.

Tabela 13 – Conjuntos de amostras em assado por produtor e data de recolha analisados pelo método LC-MS/MS e resultados obtidos.

Amostra teste confirmação	Data recolha	Produtor	Concentração do resíduo (µg/kg)			
			Tetraciclina (TC)	Clorotetraciclina (CITC)	Oxitetraciclina (OTC)	Doxiciclina (DC)
C1	8 Dez 2005	P04	—	—	—	0,6
C13	13 Mai 2006	P20	—	—	—	—
C28	15 Set 2006	P22	—	—	3	15

Apesar de não ter sido possível a realização do teste de confirmação nas amostras C8 e C29 em assado que correspondiam a amostras em cru com concentrações ilegais de resíduos (150 µg OTC/kg e 560 µg DC/kg, respectivamente), os resultados obtidos revelam uma diminuição dos resíduos para concentrações bastante abaixo do LMR estabelecido, resultante do processo de assadura. Estes resultados estão de acordo com os obtidos no teste de triagem (vide ponto 3.2.4). Tal como mencionado no ponto 3.2.5, estudos realizados sobre o efeito da temperatura em resíduos de determinadas tetraciclinas indicam uma diminuição da concentração dos mesmos com a temperatura e o tempo de processamento (Kuhne *et al.*, 2001; Honikel *et al.*, 1978; Maris e Hurtaud-Pessel, 2000). Dado que as amostras C20 e C21 não foram recolhidas em assado, a influência do processamento não pôde ser analisada. No entanto, ambos os conjuntos de amostras apresentaram concentrações de resíduos mínimas pelo que, dada a diminuição da concentração de resíduos observada para as amostras analisadas (Tabela 13) e relatada em estudos realizados (Maris e Hurtaud-Pessel, 2000), seria expectável que não fossem detectados quaisquer resíduos.

Os resultados obtidos para as amostras em assado estão, assim, de acordo com o que seria expectável considerando as temperaturas atingidas durante o processamento de assadura dos leitões, observando-se uma diminuição acentuada da concentração de resíduos. No entanto, para uma correcta avaliação do efeito do processo de assadura na

concentração de resíduos das tetraciclinas em estudo, seria necessário a análise de um maior número de amostras.

Com base nos resultados obtidos em ambos os testes, para as amostras em cru e em assado analisadas, verifica-se que o teste das 4 placas permite a detecção de resíduos de tetraciclinas presentes. No entanto, os resultados obtidos nas amostras C8 e C28 sugerem que o método de triagem utilizado não é suficientemente sensível para concentrações próximas do LMR estabelecido na legislação em vigor. Esta possibilidade não pode ser confirmada na medida em que não foram realizados estudos com vista à validação do limite de detecção do método microbiológico. Por outro lado há que considerar a hipótese dos resíduos presentes estarem ligados a proteínas e, como tal, não terem praticamente actividade antimicrobiana não sendo por isso, detectadas por testes microbiológicos (Kuhne *et al.*, 2001) Adicionalmente, verifica-se a ocorrência de falsos positivos na análise pelo método das 4 Placas. No entanto, estudos publicados indicam um período de estabilidade de resíduos de oxitetraciclina em músculo de apenas 6 semanas, ocorrendo uma diminuição da concentração para períodos de armazenamento mais longos (Maris e Hurtaud-Pessel, 2000). Dado o tempo decorrido entre a realização dos métodos de triagem e confirmação, existe a possibilidade das amostras em causa não serem falsos positivos na medida em que a contaminação observada poderia ser devida à presença de resíduos de oxitetraciclina que, entretanto, tenham desaparecido.

Os resultados obtidos pelo método de confirmação das tetraciclinas em estudo revelam, para quatro das sete amostras analisadas, a existência de resíduos de OTC e/ou DC em concentrações acima das permitidas na carne de leitão cru. Adicionalmente, verifica-se uma diminuição, para níveis residuais, dos compostos presentes com o processo de assadura ao qual a carne de leitão é normalmente sujeita. Desta forma, os resultados indicam que o consumo deste alimento não coloca em risco a saúde do consumidor no que respeita à presença de resíduos das tetraciclinas em estudo.

3.3.3 Sulfonamidas

O método utilizado pelo LNIV para a determinação de resíduos de sulfonamidas em músculo é adaptado do método publicado por Shao e colaboradores (Shao *et al.*, 2005).

O método permite a identificação e quantificação de resíduos de 15 sulfonamidas: sulfamerazina, sulfatiazol, sulfaclopiridazina, sulfametazina, sulfadimetoxina, sulfadoxina, sulfametoxazol, sulfanilamida, sulfadiazina, sulfaquinoxalina, sulfisoxazol, sulfisomidina, sulfapiridina, sulfametiazol e sulfametoxipiridazina. O sulfameter (sulfamethoxidiazina) foi utilizado como padrão interno.

3.3.3.1 Procedimento

Para o processo de extracção foram pesados 5 g da amostra homogeneizada. A amostra foi colocada num tubo de centrífuga de polipropileno de 50 mL e foram adicionados 25 ng do padrão interno sulfameter, 10 g de sulfato de sódio anidro e 15 mL de acetonitrilo. A amostra foi homogeneizada em vortex durante 1 minuto e posteriormente centrifugada a 8000 rpm e à temperatura de 0°C durante 10 minutos. O sobrenadante foi decantado e o resíduo foi extraído uma segunda vez com adição de 15 mL de acetonitrilo seguida de mistura em vortex e centrifugação a 8000 rpm e à temperatura de 0°C durante 10 minutos. Os sobrenadantes foram combinados, tendo-se adicionado 20 mL de n-hexano. Após mistura por agitação, a camada superior correspondente ao n-hexano foi rejeitada e adicionaram-se 5 mL de 1-propanol. O solvente foi evaporado até à secura a 30°C recorrendo a um evaporador rotativo. O resíduo foi dissolvido por ultrasounds durante 30 segundos após a adição de 0,4 mL de clorofórmio e 3,6 mL de n-hexano. O esquema do processo seguido para a extracção das sulfonamidas em estudo, porventura presentes nas amostras, é apresentado na Figura 13.

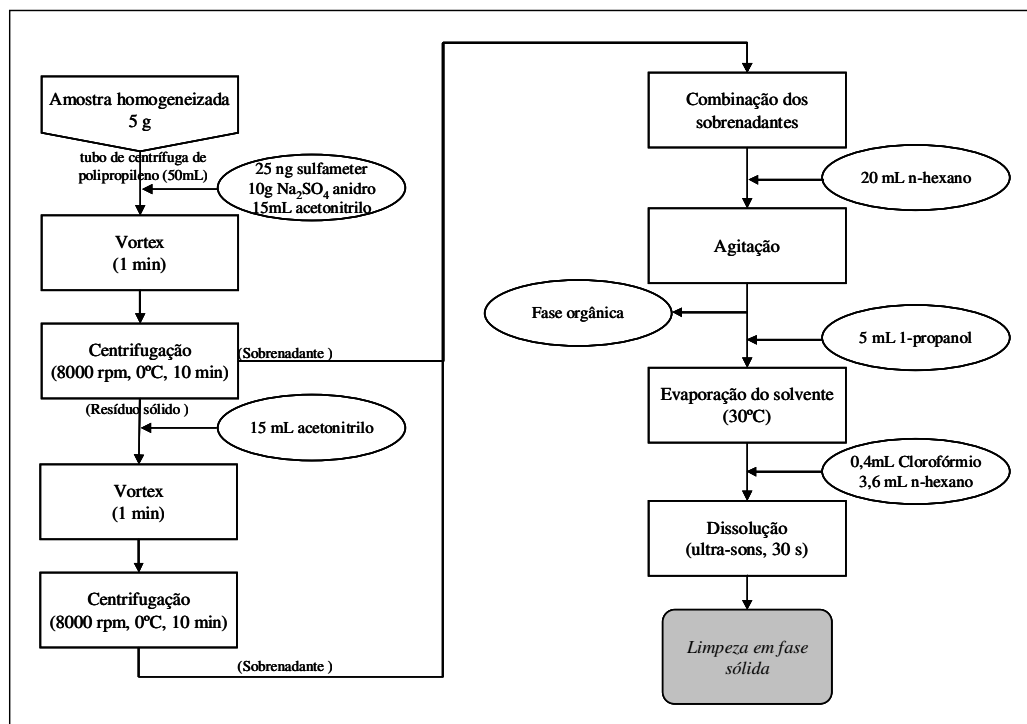


Figura 13 – Esquema do processo de extracção utilizado no método de confirmação para as sulfonamidas em estudo.

O extracto, proveniente do processo anterior, foi submetido a um passo de limpeza numa coluna de extracção em fase sólida SCX. A coluna foi pré-condicionada com 6 mL de n-hexano. Após a passagem do extracto e sem deixar a coluna secar, esta foi lavada com 5 mL de n-hexano. Os analitos foram eluídos com a adição sequencial de 6 mL de metanol/acetona (1:1, v/v) e 6 mL de acetona. Para a recuperação dos mesmos, o eluente foi seco sob um fluxo suave de azoto e o resíduo obtido ressuspendido com 1 mL da fase móvel A utilizada no passo de separação por cromatografia líquida. O volume de injecção na coluna cromatográfica foi de 50 μ L. O esquema do processo seguido para a limpeza em fase sólida do extracto proveniente do processo de extracção, é apresentado na Figura 14.

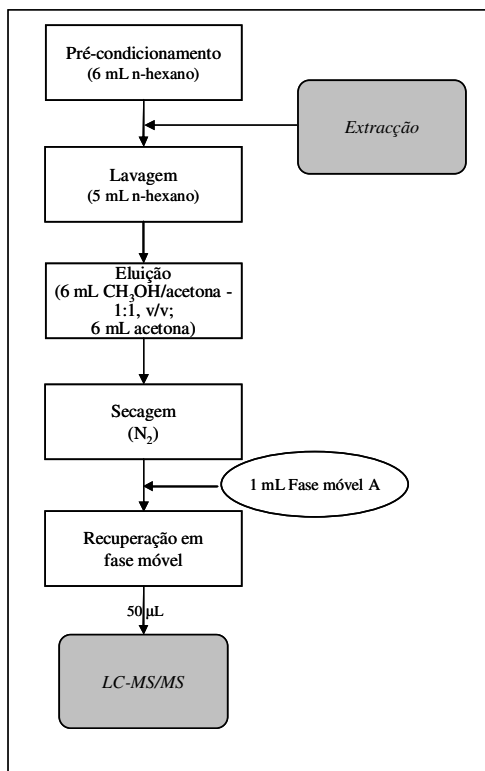


Figura 14 – Esquema do processo de limpeza em fase sólida utilizado no método de confirmação para as sulfonamidas em estudo.

A separação cromatográfica foi conseguida com uma coluna Zorbax SB - Aq (2,1 x 50 mm, 5 µm) à temperatura de 28°C. A fase móvel consistiu numa solução de ácido fórmico 0,1% (A) e metanol (B). A corrida iniciou-se com 100% de fase A descendo linearmente até 10% aos 15 minutos. A percentagem de fase móvel A voltou a subir até aos 100% aos 20 minutos. O tempo de corrida foi de 20 minutos e o fluxo 300 µL/min com um split de 1:1. Os tempos de retenção dos compostos em análise são apresentados na Tabela 14.

Tabela 14 – Tempos de retenção das sulfonamidas em análise e do padrão interno.

Composto	Tempo de retenção (minutos)	Tempo de retenção relativo
Sulfamerazina	9,10	0,92
Sulfatiazol	8,59	0,87
Sulfaclorpiridazina	11,50	1,17
Sulfametazina	10,07	1,02
Sulfadimetoxina	16,99	1,72
Sulfadoxina	12,58	1,28
Sulfametoxazol	12,05	1,22
Sulfanilamida	5,27	0,54
Sulfadiazina	8,29	0,84
Sulfaquinoxalina	18,50	1,88
Sulfisoxazol	13,15	1,34
Sulfisomidina	8,10	0,82
Sulfapiridina	8,78	0,89
Sulfametiazol	10,05	1,02
Sulfametoxipiridazina	10,57	1,07
Sulfameter	9,85	—

O eluato proveniente da coluna foi transferido para o espectrômetro de massa API 2000, com vista à detecção e quantificação dos compostos em análise eventualmente presentes na amostra. A fonte de ionização ESI operou em modo positivo. As condições operacionais do espectrômetro de massa, referentes ao fluxo dos gases, à temperatura e à voltagem no capilar, são apresentadas na Tabela 15.

Tabela 15 – Condições operacionais do espectrômetro de massa para a identificação e quantificação das sulfonamidas em estudo.

Fluxo do gás nebulizador (N ₂)	30 L/min
Fluxo do gás de aquecimento (N ₂)	70 L/min
Fluxo do gás de secagem (N ₂)	30 L/min
Voltagem no capilar	5000 V
Fluxo do gás na célula de colisão (N ₂)	4 L/min
Temperatura	400°C

Para a identificação e quantificação das sulfonamidas pesquisadas, foram monitorizados dois pares iônicos referentes ao íon molecular e a dois íons fragmento mais abundantes. Para o padrão interno foi monitorizado apenas um par iônico. As massas dos diferentes íons são apresentadas na Tabela 16.

Tabela 16 – Razão m/z dos íons moleculares e fragmentos correspondentes aos pares iônicos monitorizados (ião molecular/ião fragmento).

Composto	Ião molecular (m/z)	Ião fragmento (m/z)
Sulfamerazina	265,1	107,9 91,9
Sulfatiazol	256,0	155,9 91,9
Sulfaclorpiridazina	285,1	155,8 91,9
Sulfametazina	279,2	185,9 123,9
Sulfadimetoxina	311,1	155,9 91,9
Sulfadoxina	311,1	155,8 91,9
Sulfametoxazol	254,1	155,8 91,9
Sulfanilamida	173,2	155,7 91,9
Sulfadiazina	251,2	155,9 91,9
Sulfaquinoxalina	301,2	155,8 91,9
Sulfisoxazol	268,1	155,9 113,1
Sulfisomidina	279,1	123,9 185,9
Sulfapiridina	250,1	155,8 91,9
Sulfametiazol	271,0	155,9 107,9
Sulfametoxipiridazina	281,2	155,8 91,9
Sulfameter	281,2	155,8

3.3.3.2 Resultados e Discussão

Os resíduos de sulfonamidas foram pesquisados em 4 conjuntos de amostras em cru. Nenhuma das amostras analisadas revelou a presença de resíduos dos compostos pesquisados, em concentração acima dos limites de detecção do método. Os conjuntos de amostras analisadas são apresentados na Tabela 17.

Tabela 17 – Conjuntos de amostras, por produtor e por data de recolha, analisados pelo método de identificação e quantificação de resíduos de sulfonamidas. Não foram identificados resíduos em concentrações acima dos limites de detecção do método.

Amostra teste confirmação	Data recolha (cru)	Data recolha (assado)	Produtor
C1	7 Dez 2005	8 Dez 2005	P04
C13	10 Mai 2006	13 Mai 2006	P20
C28	13 Set 2006	15 Set 2006	P22
C29	13 Set 2006	15 Set 2006	P22

Dado nenhuma das amostras ter revelado a presença de resíduos das sulfonamidas estudadas, as amostras em assado correspondentes não foram analisadas. Os resultados obtidos pelo método de confirmação foram comparados com os obtidos pelo teste de triagem para a placa a pH 7,2 inoculada com *Bacillus subtilis* (Tabela 19).

Tabela 18 – Resultados obtidos na pesquisa de sulfonamidas para os conjuntos de amostras analisados por LC-MS/MS e para as amostras individuais em cru correspondentes, analisadas pelo teste das 4 Placas.

Amostra teste confirmação	Amostra teste 4 Placas	Data recolha (cru)	Produtor	Resultado Teste confirmação	Resultado Teste de Triagem pH 7,2 <i>B. subtilis</i>
C1	7	7 Dez 2005	P04	—	2/2
	8				4/5
	9				5/5
	10				4/3
	11				4/4
	12				2/3
	13				4/4
C13	14	10 Mai 2006	P20	—	3/2
	63				NE
	64				4/4
C28	65	13 Set 2006	P22	—	NE
	111				NE
C29	112	13 Set 2006	P22	—	9/9
	113				7/8
	114				7/8
	115				7/8

Observando os resultados obtidos em ambos os testes, verifica-se que apenas os resultados obtidos para as amostras pertencentes à C28 são coincidentes. Todas as amostras constituintes da C1 e da C29 e uma das 3 amostras da C13 foram consideradas positivas no teste das 4 Placas. Esta diferença poderá ser devido à presença de outras substâncias que possuam um efeito inibidor do crescimento da bactéria teste nas condições de realização originando a ocorrência de falsos positivos. No entanto, para a análise dos resultados também deve ser tido em consideração que o intervalo de tempo entre os dois testes foi entre 3 a 5 meses. Apesar das amostras terem permanecido armazenadas a -18°C, estudos realizados indicam uma diminuição da concentração de resíduos com o tempo de armazenagem a -20°C (Parks, 1994). Num estudo da estabilidade de resíduos de sulfonamidas, em amostras de carne de suíno e bovino (Alfredsson e Ohlsson, 1998), foi observada, para um período de 15 meses de armazenamento a -20°C, uma diminuição de 50% dos resíduos de sulfametazina. Thomas e colaboradores (Thomas *et al.*, 1997) estudaram a estabilidade de resíduos de sulfonamidas armazenadas a -20°C e calcularam o tempo de meia vida correspondente.

Os tempos determinados foram de 291 dias para o sulfatiazol, 312 dias para a sulfaclopiridazina, 457 dias para a sulfametazina, 567 dias para a sulfadimetoxina e 271 dias para a sulfaquinoxalina. Este estudo também reporta uma diminuição de 65% de resíduos de sulfaquinoxalina durante a fase de preparação das amostras. Desta forma, dada a relativa estabilidade destes compostos durante longos períodos de armazenamento a -20°C, não é expectável que, ao existirem resíduos, tenham sofrido uma diminuição para concentrações abaixo do limite de detecção do método de confirmação. Por outro lado, dada a baixa estabilidade de alguns destes compostos durante a fase de preparação e a 4°C (Maris e Hurtaud-Pessel, 2000), o processo de preparação das amostras, que incluiu a remoção de gorduras e de cartilagens porventura existentes e a trituração das amostras, poderia ter levado a uma diminuição da concentração de resíduos eventualmente presentes. No entanto, dados os limites de detecção dos métodos de triagem e de confirmação esta hipótese apenas seria viável se os factores mencionados originassem uma diminuição da concentração dos eventuais resíduos que tenham sido detectados no teste de triagem para níveis abaixo do limite de detecção do método de confirmação. Dado o limite de detecção do método das 4 Placas ser próximo do LMR e tendo em consideração o resultado de testes realizados por outros autores que indicam que o teste das 4 Placas não é igualmente sensível para todas as substâncias do grupo das sulfonamidas (Hussein *et al.*, 2005; Pena *et al.*, 2004; Okerman *et al.*, 1998b; Hussein, 2004), a hipótese de se tratarem de falsos positivos é considerada mais viável.

Os resultados obtidos pelo teste de confirmação para as amostras em cru analisadas indicam, assim, que a carne de leitão encontra-se isenta de resíduos das sulfonamidas estudadas, acima dos limites de detecção do método, sugerindo que o consumo deste alimento não coloca em risco a saúde do consumidor no que respeita à presença destes compostos. No entanto, esta hipótese apenas poderia ser confirmada se todas as amostras recolhidas fossem analisadas. Adicionalmente, o tempo decorrido entre a amostragem e a realização do teste deveria ser minimizado.

3.3.4 Macrólidos

O método utilizado pelo LNIV para a determinação de resíduos de macrólidos em músculo é adaptado de um método realizado por Dubois e colaboradores (Dubois *et al.*,

2001). O método permite a identificação e quantificação de resíduos de 4 macrólidos: tilosina, tilmicosina, espiramicina e eritromicina. A roxitromicina, um macrólido com um espectro de actividade semelhante ao da eritromicina mas que não é utilizado em medicina veterinária, foi utilizada como padrão interno.

3.3.4.1 Procedimento

Para o processo de extracção foram pesados 5 g da amostra homogeneizada aos quais foram adicionados 100 µL de uma solução 10 µg/mL de roxitromicina. Após um período de estabilização de 15 minutos, adicionaram-se 25 mL de tampão Tris (pH 10,5 ± 0,2; 0,1 M) e a mistura foi vigorosamente agitada durante 15 minutos. Seguiu-se uma centrifugação durante 10 minutos a 3000 x g e 4°C. O sobrenadante foi recolhido para um tubo de centrífuga de polipropileno e o resíduo foi submetido a um segundo processo de extracção com adição de 25 mL de tampão Tris seguido de agitação e centrifugação. O sobrenadante resultante foi misturado com o obtido no primeiro processo de extracção. Seguiu-se a adição de 600 µL de ácido acético e 5 mL de tampão tungstato de sódio (0,15 M) com vista à precipitação das proteínas. Após estabilização durante 1 hora a 4°C, a amostra foi centrifugada a 3000 x g durante 10 minutos. O sobrenadante foi filtrado com um filtro de lã de vidro. O esquema do processo seguido para a extracção dos macrólidos em estudo, porventura presentes nas amostras, é apresentado na Figura 15.

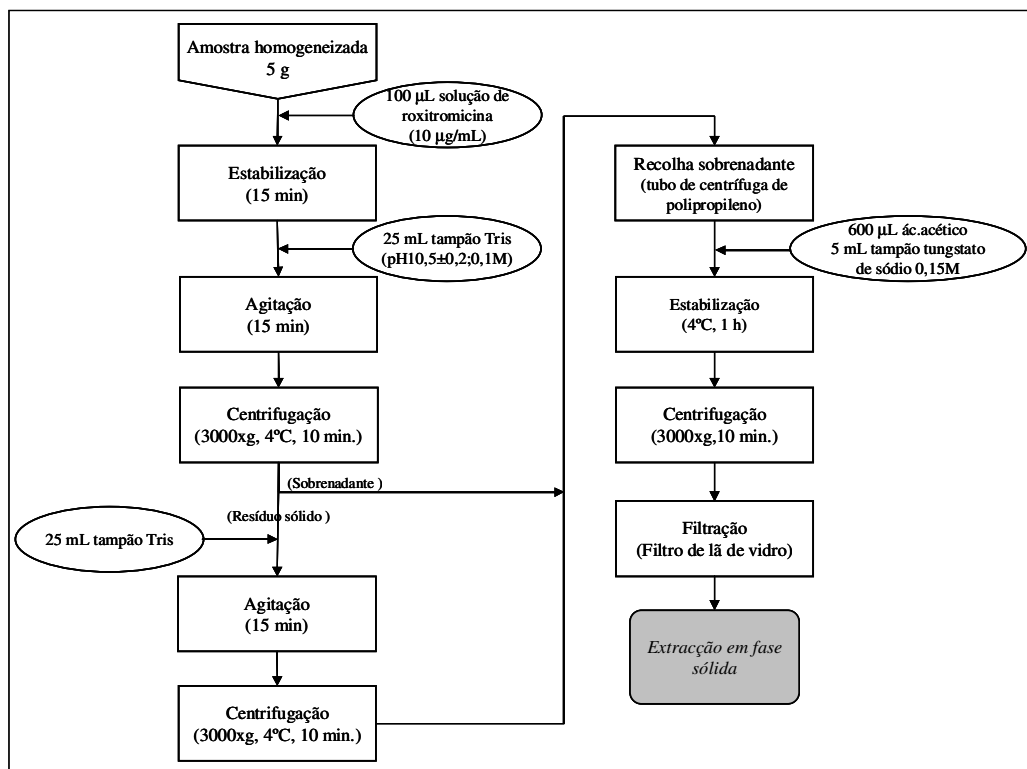


Figura 15 – Esquema do processo de extracção utilizado no método de confirmação para os macrólidos em estudo.

O extracto obtido no processo anterior foi submetido a um passo de limpeza numa coluna de extracção em fase sólida OASIS HLB (6 cm³, 200 mg). A coluna foi pré-condicionada com 10 mL de metanol e 10 mL de água. Após ter-se feito passar lentamente o extracto pela coluna, esta foi lavada com 20 mL de metanol/água (5:95, v/v) e 5 mL de hexano. Após o último passo de lavagem, a coluna foi seca sob vácuo durante 10 minutos. Os macrólidos foram eluídos com 5 mL de metanol/30% amónia (95:5, v/v). O eluato foi evaporado até à secura sob um fluxo de azoto e o resíduo seco foi ressuspendido com 300 µL de uma solução de acetato de amónio/acetoneitrilo (80:20, v/v), transferido para microtubos e centrifugado a 3000 x g durante 10 minutos. Antes de ser transferido para os frascos de análise de HPLC o extracto foi filtrado em filtros de 0,45 µm. O esquema do processo seguido para a limpeza em fase sólida do extracto proveniente do processo de extracção, é apresentado na Figura 16.

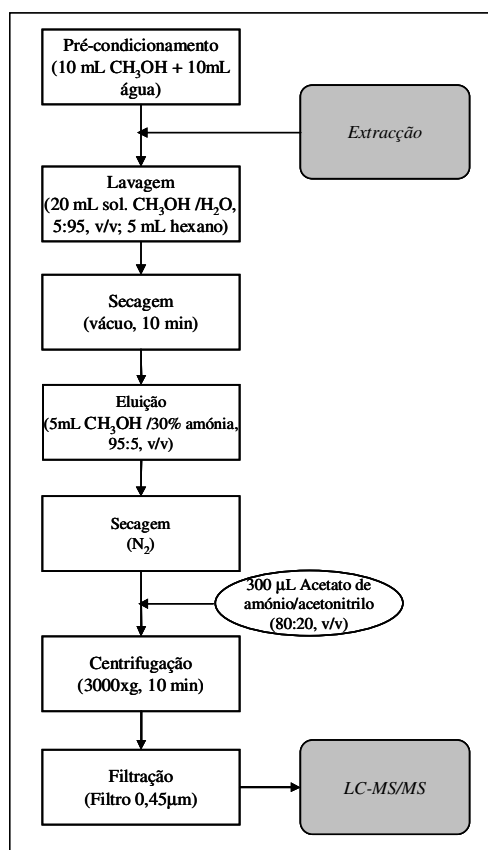


Figura 16 – Esquema do processo de limpeza em fase sólida utilizado no método de confirmação para os macrólidos em estudo.

A separação cromatográfica foi conseguida com uma coluna Zorbax XDB - C18 (2,1 x 150 mm, 5 µm) à temperatura de 40°C sendo o volume de injeção de 50 µL. A fase móvel consistiu numa solução de acetato de amónio 0,1 M em água (A) e acetonitrilo (B). O gradiente foi iniciado com 90% da fase A descendo linearmente até 10% em 15 minutos. A percentagem de fase móvel A voltou a subir até aos 90% aos 20 minutos. O tempo de corrida foi de 20 minutos e o fluxo 400 µL/min com um split de 1:1. Os tempos de retenção dos compostos em análise e padrão interno são apresentados na Tabela 19.

Tabela 19 – Tempos de retenção dos macrólidos em análise e do padrão interno.

Composto	Tempo de retenção (minutos)	Tempo de retenção relativo
Tilosina	11,06	0,87
Tilmicosina	12,59	0,99
Espiramicina	11,18	0,88
Eritromicina	10,81	0,85
Roxitromicina	12,65	—

O eluato proveniente da coluna foi transferido para o espectrômetro de massa API 3000 com vista à detecção e quantificação dos compostos em análise eventualmente presentes na amostra. A fonte de ionização ESI operou em modo positivo. As condições operacionais do espectrômetro de massa referentes ao fluxo dos gases, à temperatura e à voltagem no capilar são apresentadas na Tabela 20.

Tabela 20 – Condições operacionais do espectrômetro de massa para a identificação e quantificação dos macrólidos em estudo.

Fluxo do gás nebulizador (N ₂)	6 L/min
Fluxo do gás de secagem (N ₂)	9 L/min
Voltagem no capilar	5500 V
Fluxo do gás na célula de colisão (N ₂)	5 L/min
Temperatura	450°C

Para cada macrólido pesquisado foram monitorizados dois pares iônicos referentes ao íon molecular e a dois íons fragmento mais abundantes. Para a identificação do padrão interno foi monitorizado um par iônico. As massas dos diferentes íons pesquisados são apresentadas na Tabela 21.

Tabela 21 – Razão m/z dos íons moleculares e fragmentos correspondentes aos pares iônicos monitorizados (íon molecular/íon fragmento).

Composto	Íon molecular (m/z)	Íon fragmento (m/z)
Tilosina	916,3	772,2
		318,4
Tilmicosina	869,6	696,6
		522,2
Espiramicina	843,4	540,2
		318,2
Eritromicina	734,3	576,3
		558,3
Roxitromicina	837,4	158,1

3.3.4.2 Resultados e Discussão

Os resíduos de macrólidos foram pesquisados em 20 conjuntos de amostras em cru. Nenhuma das amostras analisadas revelou a presença de resíduos dos compostos pesquisados em concentração acima dos limites de detecção do método. As amostras analisadas são apresentadas na Tabela 22.

Tabela 22 – Conjuntos de amostras por produtor e datas de recolha analisados pelo método de identificação e quantificação de resíduos de macrólidos. Não foram identificados resíduos em concentração acima dos limites de detecção do método.

Amostra teste confirmação	Data recolha (cru)	Data recolha (assado)	Produtor
C3	8 Mar 2006	11 Mar 2006	P07
C4	8 Mar 2006	11 Mar 2006	P11
C5	5 Abr 2006	8 Abr 2006	P08
C6	5 Abr 2006	8 Abr 2006	P13
C7	9 Mai 2006	13 Mai 2006	P15
C8	9 Mai 2006	13 Mai 2006	P16
C10	10 Mai 2006	13 Mai 2006	P08
C11	10 Mai 2006	13 Mai 2006	P18
C13	10 Mai 2006	13 Mai 2006	P20
C15	30 Mai 2006	3 Jun 2006	P02
C16	30 Mai 2006	3 Jun 2006	P03
C17	30 Mai 2006	3 Jun 2006	P08
C19	11 Jul 2006	— ^a	P02
C20	11 Jul 2006	— ^a	P08
C21	11 Jul 2006	— ^a	P16
C23	8 Ago 2006	12 Ago 2006	P15
C27	13 Set 2006	15 Set 2006	P07
C28	13 Set 2006	15 Set 2006	P22
C29	13 Set 2006	15 Set 2006	P22
C30	13 Set 2006	15 Set 2006	P23

^a Amostra não recolhida em assado

Dado nenhuma das amostras ter revelado a presença de resíduos dos macrólidos estudados, as amostras em assado correspondentes não foram analisadas. Os resultados obtidos no método de confirmação foram comparados com os obtidos pelo método das 4 Placas, para as amostras individuais, na placa a pH 8 inoculada com *Micrococcus luteus* (Tabela 6), na medida em que esta placa permite a detecção de resíduos de macrólidos e β -lactâmicos. Ambos os resultados são apresentados na Tabela 23.

Tabela 23 – Resultados obtidos na pesquisa de macrólidos para os conjuntos de amostras analisados por LC-MS/MS e para as amostras individuais em cru correspondentes, analisadas pelo teste das 4 Placas. São também apresentados os resultados obtidos para a placa a pH 6 inoculada com *B. subtilis* (continua na página seguinte).

Amostra teste confirmação	Amostra teste 4 Placas	Data recolha (cru)	Produtor	Resultado Teste confirmação	Resultado Teste de Triagem	
					pH 8 <i>M. luteus</i>	pH 6 <i>B. subtilis</i>
C3	25	08 Mar 2006	P07	—	2/2	2/2
	26				2/2	2/2
C4	33	08 Mar 2006	P11	—	2/2	3/3
	34				NE	NE
C5	35	05 Abr 2006	P08	—	2/2	NE
	36				2/3	NE
	37				2/2	NE
	38				NE	NE
	39				2/2	NE
C6	42	05 Abr 2006	P13	—	2/2	NE
	43				NE	NE

Amostra teste confirmação	Amostra teste 4 Placas	Data recolha (cru)	Produtor	Resultado Teste confirmação	Resultado Teste de Triagem	
					pH 8 <i>M. luteus</i>	pH 6 <i>B. subtilis</i>
C7	46	09 Mai 2006	P15	—	NE	NE
	47				3/3	NE
	48				3/2	NE
C8	49	09 Mai 2006	P16	—	2/2	NE
	50				2/2	NE
	51				2/2	NE
					3/3	2/2
C10	56	10 Mai 2006	P08	—	3/3	NE
	57				NE	NE
C11	58	10 Mai 2006	P18	—	2/2	NE
	59				2/2	NE
	60				2/2	NE
C13	63	10 Mai 2006	P20	—	NE	NE
	64				NE	2/3
	65				2/2	NE
C15	68	30 Mai 2006	P02	—	2/2	NE
	69				3/4	NE
	70				2/3	NE
	71				5/5	NE
C16	72	30 Mai 2006	P03	—	4/4	NE
	73				2/2	NE
C17	74		P08	—	4/4	NE
	75				NE	NE
	76				2/2	NE
C19	80	11 Jul 2006	P02	—	2/2	NE
	81				2/2	NE
C20	82	11 Jul 2006	P08	—	2/2	3/3
	83				2/2	2/2
	84				2/2	3/3
C21	85	11 Jul 2006	P16	—	2/2	NE
	86				2/2	3/2
	87				2/2	3/2
C23	92		P15	—	2/2	NE
	93				2/2	NE
	94				2/2	NE
	95				2/2	NE
C27	109	13 Set 2006	P07	—	NE	NE
	110				4/3	NE
C28	111		P22	—	NE	NE
	112				NE	NE
C29	113	13 Set 2006	P22	—	2/2	9/10
	114				2/3	10/10
	115				NE	10/11
C30	116	13 Set 2006	P23	—	2/3	NE
	117				2/2	NE

Observando os resultados obtidos, verifica-se que apenas o conjunto C28 é constituído na totalidade por amostras consideradas negativas no teste das 4 Placas. Os restantes conjuntos de amostras analisados são constituídos por amostras consideradas positivas.

Dado que esta placa de teste também é sensível a antibióticos β -lactâmicos os resultados obtidos no teste de triagem poderiam ser devido à presença destes resíduos. No entanto, tal como mencionado no ponto 3.2.1, a presença de β -lactâmicos também é detectada pelo teste com a placa a pH 6 inoculada com *Bacillus subtilis* pelo que, existindo resíduos acima do LMR estabelecido, ambas as placas deveriam dar resultados positivos. Observando os resultados obtidos no teste de triagem para as duas placas, verifica-se que apenas amostras pertencentes aos conjuntos C8, C13, C20, C21 e C29 foram consideradas positivas no teste a pH 6. Dado que a presença de resíduos de antibióticos β -lactâmicos não foi analisada através de métodos de identificação e quantificação, não é possível confirmar a existência destes resíduos. No entanto, tendo em consideração os resultados obtidos para estas amostras no teste de confirmação de tetraciclina que indicaram a presença de resíduos, em concentrações acima dos LMR estabelecidos, para as amostras C8 e C29 (Tabela 11), poderá ser considerada a hipótese dos resultados na placa de teste a pH 6 serem referentes a tetraciclina e, conseqüentemente, de se tratarem de falsos positivos no teste a pH 8. Dado o elevado número de falsos positivos obtidos para as restantes amostras analisadas, esta hipótese deverá ser considerada. Adicionalmente, como já referido anteriormente, estes compostos não são estáveis em condições de armazenamento a -20°C durante longos períodos de tempo (Maris e Hurtaud-Pessel, 2000; Verdon *et al.*, 2000), pelo que é expectável que a concentração dos resíduos que eventualmente estivessem presentes nas amostras, sofresse uma diminuição dado o tempo de armazenagem a -18°C para as amostras mais antigas. Os resultados obtidos no teste de triagem estão, assim, de acordo com alguns estudos que sugerem que o teste a pH 8 com *Micrococcus luteus* pode resultar na obtenção de falsos positivos (Okerman *et al.*, 1998b). Estes resultados poderão ser devidos à presença de substâncias que, nas condições do teste, inibam o crescimento das bactérias de *Micrococcus luteus*.

Não existem muitos estudos acerca da estabilidade destes compostos. No entanto, de acordo com o relatório elaborado em 2000 pela AFSSA (Agence Française de Sécurité Sanitaire de Aliments) relativo à estabilidade de resíduos de medicamentos veterinários durante a armazenagem e o processamento dos alimentos (Maris e Hurtaud-Pessel, 2000), resultados internos laboratoriais revelaram uma boa estabilidade da tilmicosina, tilosina e espiramicina a -20°C entre 6 a 12 meses. Em contrapartida, os resultados

também indicam uma rápida degradação a +4°C e à temperatura ambiente. Considerando o processo de preparação das amostras que incluiu a remoção prévia de gordura e de cartilagens porventura existentes, poderá ter havido alguma perda de resíduos eventualmente presentes e detectados no método de triagem. No entanto, dado que não é conhecida a relação entre a degradação dos compostos e o tempo de exposição da amostra à temperatura ambiente, esta hipótese não pode ser validada.

Os resultados obtidos pelo método de confirmação para as amostras em cru analisadas, sugerem que não existem resíduos dos macrólidos estudados em concentrações acima do limite de detecção do método e, conseqüentemente, que o consumo deste alimento não coloca em risco a saúde do consumidor. No entanto, esta hipótese apenas poderia ser confirmada se todas as amostras recolhidas fossem analisadas. Adicionalmente, e, de forma a evitar a possível degradação dos compostos eventualmente presentes, o teste deveria ser realizado logo após a recolha das amostras.

3.3.5 Quinolonas

O método utilizado pelo LNIV para a determinação de resíduos de quinolonas em músculo é adaptado de um estudo publicado por Toussaint e colaboradores (Toussaint *et al.*, 2005). O método permite a identificação e quantificação de resíduos de 11 quinolonas, incluindo espécies ácidas e anfotéricas. As quinolonas anfotéricas pesquisadas foram a norfloxacin, a ofloxacin, a enoxacin, a marbofloxacin, a enrofloxacin, a ciprofloxacin e a danofloxacin. Estes compostos pertencem ao subgrupo das fluoroquinolonas. As espécies ácidas pesquisadas foram a cinoxacin, a flumequin, o ácido oxolínico e o ácido nalidíxico. Os compostos lomefloxacin e cincofeno foram utilizados como padrões internos para a quantificação, respectivamente, das quinolonas anfotéricas e das ácidas.

3.3.5.1 Procedimento

Para o processo de extracção, transferiu-se 1g da amostra homogeneizada para um tubo de centrífuga. Após a adição de 10 mL de acetonitrilo, a amostra foi misturada num vortex durante 1 minuto seguido de agitação horizontal durante 15 minutos. A mistura foi centrifugada a 2808 x g durante 10 minutos. Após centrifugação, 10 mL do

sobrenadante foram recolhidos e evaporados até à secura a 37°C sob fluxo de azoto. O resíduo foi redissolvido em 2 mL de tampão acetato de amónio (5 mM, pH 4). A dissolução foi efectuada por agitação em vortex seguida de um banho de ultra-sons durante 15 minutos. O esquema do processo seguido para a extracção das quinolonas em estudo porventura presentes nas amostras, é apresentado na Figura 17.

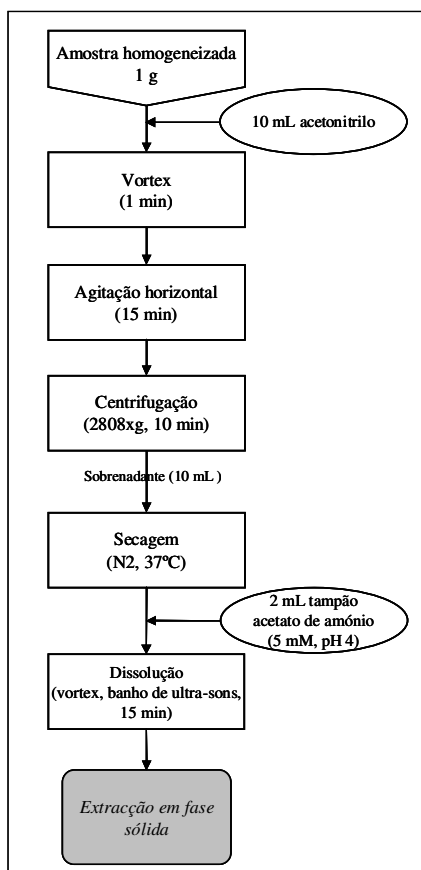


Figura 17 – Esquema do processo de extracção utilizado no método de confirmação para as quinolonas em estudo.

O extracto proveniente do processo de extracção foi submetido a um passo de limpeza numa coluna de extracção em fase sólida SDB-RPS descartável (10 mm, 6 mL) constituída por uma mistura de fases C8 e de permuta iónica. A coluna foi pré-condicionada com 2 x 1 mL de metanol, 2 x 1 mL de água e 2 x 1 mL de tampão acetato de amónio (5 mM pH 4). Após a passagem, gota a gota, do extracto pela coluna, os compostos foram eluídos com 4 x 1 mL de uma mistura de acetonitrilo e hidróxido de amónio (75:25, v/v). O eluato foi evaporado até à secura a 37°C sob um fluxo de azoto e o resíduo seco redissolvido em 300 µL de uma solução de ácido fórmico diluído (pH

2,5). Previamente à injeção de 50 μL no sistema LC-MS/MS, o eluato foi filtrado com um filtro 0,45 μm . O esquema do processo seguido para a limpeza em fase sólida do extracto proveniente do processo de extracção, é apresentado na Figura 18.

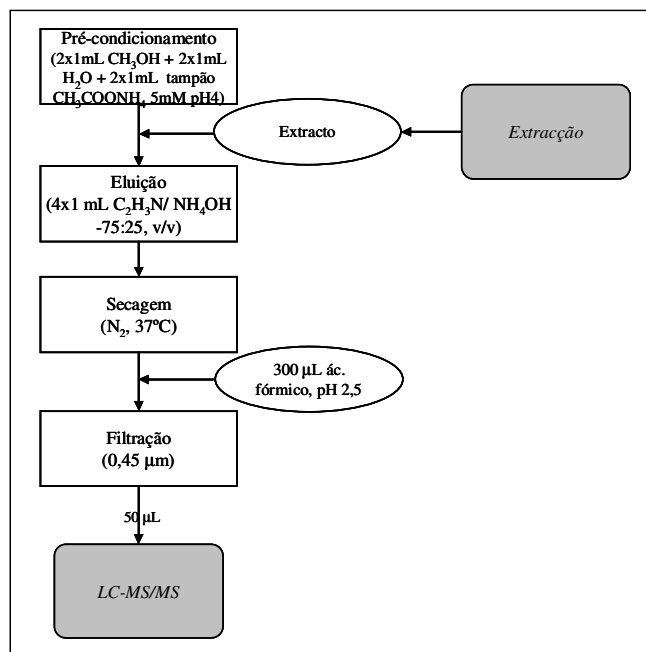


Figura 18 – Esquema do processo de limpeza em fase sólida utilizado no método de confirmação para as quinolonas em estudo.

A separação cromatográfica foi conseguida com uma coluna Zorbax Eclipse XDB C8 (4,6 mm x 150 mm, 5 μm) à temperatura de 40°C. A fase móvel consistiu numa solução de ácido fórmico 0,5 M a pH 2,5 (A) e por uma solução de acetonitrilo (B). A corrida iniciou-se com 38% de fase móvel A. A percentagem da fase móvel B subiu até os 100% aos 10,5 minutos mantendo-se estável durante 2 minutos adicionais. Aos 13 minutos a percentagem de fase móvel B foi definida a 10% tendo-se mantido durante 2 minutos com vista ao re-condicionamento da coluna. O tempo de corrida foi de 15 minutos e o fluxo 800 $\mu\text{L}/\text{min}$ com um split 1:4. Os tempos de retenção dos compostos em análise são apresentados na Tabela 24.

Tabela 24 – Tempos de retenção das quinolonas em análise.

Composto	Tempo de retenção (minutos)	Tempo de retenção relativo
Quinolonas anfotéricas		
Norfloxacin	4,91	0,98
Ofloxacin	4,90	0,98
Enoxacin	4,55	0,91
Marbofloxacin	4,64	0,93
Enrofloxacin	5,43	1,09
Ciprofloxacin	4,99	1,00
Danofloxacin	5,11	1,02
Cincofeno	5,00	—
Quinolonas ácidas		
Cinoxacin	7,84	0,71
Flumequina	10,60	0,96
Ácido Oxolínico	8,60	0,78
Ácido Nalidíxico	10,30	0,94
Lomefloxacin	11,0	—

O eluato proveniente da coluna foi transferido para o espectrômetro de massa API 3000, com vista à detecção e quantificação dos compostos em análise eventualmente presentes na amostra. A fonte de ionização ESI operou em modo positivo. As condições operacionais do espectrômetro de massa referentes ao fluxo dos gases, à temperatura e à voltagem no capilar são apresentadas na Tabela 25.

Tabela 25 – Condições operacionais do espectrômetro de massa para a identificação e quantificação das quinolonas em estudo.

Fluxo do gás nebulizador (N ₂)	8 L/min
Fluxo do gás de secagem (N ₂)	6 L/min
Voltagem no capilar	5500 V
Fluxo do gás na célula de colisão (N ₂)	7 L/min
Temperatura	450°C

Para a identificação dos diferentes compostos pesquisados, foram monitorizados dois pares iônicos referentes ao íon molecular e a dois íons fragmento mais abundantes. Para os padrões internos utilizados, foi monitorizado apenas um par iônico. As massas dos diferentes íons são apresentadas na Tabela 26.

Tabela 26 – Razão m/z dos íões moleculares e fragmentos correspondentes aos pares iônicos monitorizados (ião molecular/ião fragmento).

Composto	Ião molecular (m/z)	Ião fragmento (m/z)
<i>Quinolonas anfotéricas</i>		
Norfloxacina	320,1	276,2 233,1
Ofloxacina	362,2	261,1 318,2
Enoxacina	321,1	206,1 257,1
Marbofloxacina	363,2	320,1 345,2
Enrofloxacina	360,2	316,2 245,2
Ciprofloxacina	332,3	288,1 245,2
Danofloxacina	358,2	340,1 314,2
Cincofeno	250,2	128,0
<i>Quinolonas ácidas</i>		
Cinoxacina	263,1	217,1 245,2
Flumequina	262,2	202,1 244,2
Ácido Oxolínico	262,1	216,1 244,1
Ácido Nalidíxico	233,2	215,2 187,1
Lomefloxacina	352,2	265,2

3.3.5.2 Resultados e Discussão

Os resíduos de quinolonas foram pesquisados em 6 conjuntos de amostras em cru. Nenhuma das amostras analisadas revelou a presença de resíduos dos compostos pesquisados em concentração acima dos limites de detecção do método. As amostras analisadas são apresentadas na Tabela 27.

Tabela 27 – Conjuntos de amostras por produtor e data de recolha analisados pelo método de identificação e quantificação de resíduos de quinolonas em estudo. Não foram identificados resíduos em concentrações acima dos limites de detecção do método.

Amostra teste confirmação	Data recolha (cru)	Data recolha (assado)	Produtor
C1	7 Dez 2005	8 Dez 2005	P04
C2	14 Dez 2005	17 Dez 2005	P08
C14	30 Mai 2006	3 Jun 2006	P01
C23	8 Ago 2006	12 Ago 2006	P15
C24	8 Ago 2006	12 Ago 2006	P16
C25	6 Set 2006	9 Set 2006	P19

Dado nenhuma das amostras ter revelado a presença de resíduos das quinolonas estudadas, as amostras em assado correspondentes não foram analisadas. Os resultados obtidos no teste de confirmação não podem ser comparados com os obtidos no método das 4 placas, na medida em que este método não é sensível a estes compostos.

No que diz respeito à estabilidade destes compostos, apenas foi encontrada uma referência, relativa à enrofloxacinina em músculo de suíno, que indica uma boa estabilidade durante 3 meses a -20°C (Maris e Hurtaud-Pessel, 2000). Desta forma, dado o período decorrido entre a recolha das amostras e a realização do teste de confirmação (entre 4 a 7 meses), não pode ser afirmado que as amostras analisadas se encontravam isentas de resíduos em concentrações acima do limite de detecção na medida em que, ao existirem, poderão ter sofrido uma perda de actividade até níveis abaixo do limite de detecção do método.

Os resultados obtidos para as amostras em cru analisadas indicam, assim, a não existência de resíduos das quinolonas pesquisadas em concentrações superiores aos limites de detecção do método, sugerindo que o consumo deste alimento não coloca em risco a saúde do consumidor no que respeita à presença destes compostos. Para confirmação desta hipótese seria necessária a análise de um maior número de amostras devendo o teste ser realizado logo após a recolha das amostras de forma a minimizar possíveis perdas dos compostos com o tempo de armazenagem.

3.3.6 Quinoxalinas

O método utilizado pelo LNIV para a determinação de resíduos de quinoxalinas em músculo é adaptado de um estudo realizado por Hutchinson e colaboradores (Hutchinson *et al.*, 2002). O método permite a identificação e quantificação dos resíduos dos metabolitos nomeados como marcadores dos compostos carbadox e olaquinox, em tecido de suínos. Os metabolitos são, respectivamente, o ácido quinoxalina-2-carboxílico (QCA) e o ácido metil-3-quinoxalina-2-carboxílico (MQCA) (Hutchinson *et al.*, 2005). Como padrão interno foi utilizado o composto d_4 -QCA.

3.3.6.1 Procedimento

Para o processo de extracção foram pesados 5 g da amostra homogeneizada e transferidos para um tubo de centrífuga. Após a adição de 10 mL de uma solução de hidróxido de sódio 3 M, a amostra foi aquecida num banho de água a 100°C durante 30 minutos. Após o arrefecimento da amostra, foram adicionados 4 mL de ácido clorídrico concentrado e 6 mL de acetato de etilo. A mistura foi homogeneizada durante 1 minuto e centrifugada a 4000 rpm durante 5 minutos. O sobrenadante foi recolhido e o resíduo foi submetido a um segundo processo de extracção com adição de 4 mL de ácido clorídrico concentrado e 6 mL de acetato de etilo, homogeneização durante 1 minuto e centrifugação a 4000 rpm durante 5 minutos. Os sobrenadantes das duas extracções foram combinados para um tubo de centrífuga de polipropileno, adicionando-se 8 mL de tampão fosfato de sódio. A mistura foi centrifugada a 4000 rpm durante 5 minutos. A fase orgânica foi retirada e 4 mL da fase aquosa foram transferidos para um tubo de 10 mL contendo 1 mL de ácido clorídrico concentrado. O esquema do processo seguido para a extracção das quinoxalinas em estudo, porventura presentes nas amostras, é apresentado na Figura 19.

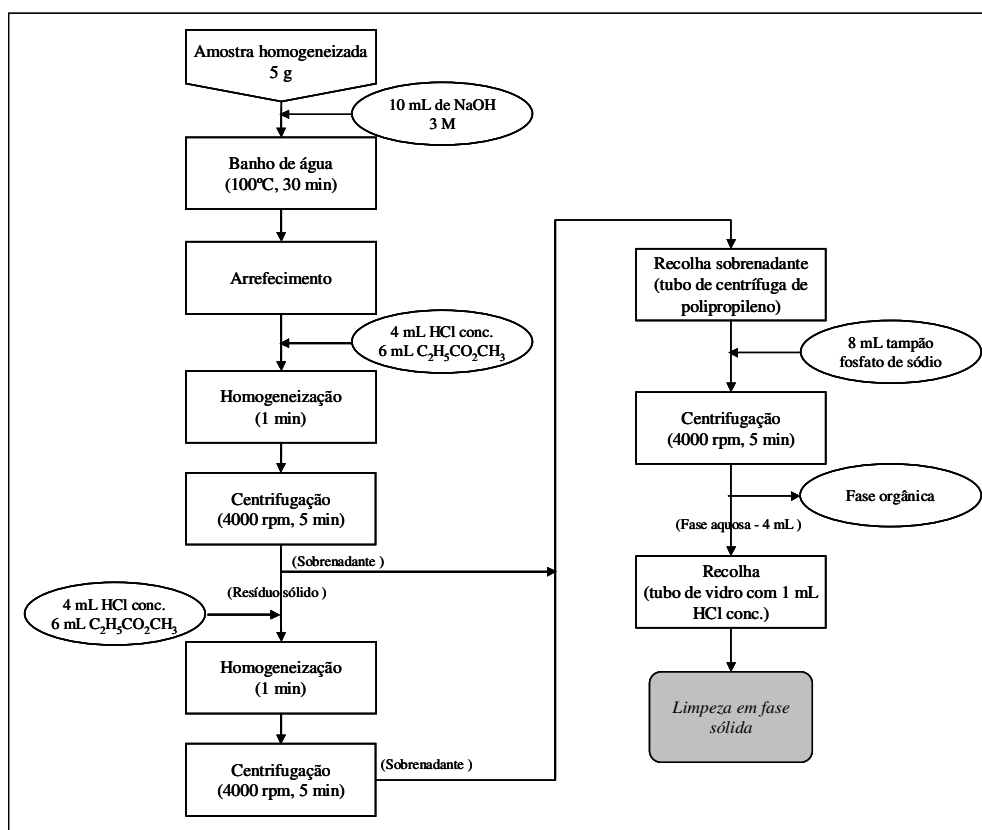


Figura 19 – Esquema do processo de extracção utilizado no método de confirmação para os resíduos marcadores das quinoxalinas em estudo.

O extracto proveniente do processo de extracção foi submetido a um passo de limpeza numa coluna de extracção em fase sólida SCX (3 mL, 1 g). A coluna foi pré-condicionada com 5 mL de água e 5 mL de uma solução de ácido clorídrico 1 M. Após a passagem do extracto e sem deixar a coluna secar, esta foi lavada com 5 mL de uma solução de ácido clorídrico 1 M. Os compostos foram eluídos com 3 mL de uma mistura de hidróxido de sódio 0,1 M e metanol (70:30, v/v). O eluato foi transferido para um tubo de vidro, tendo-se adicionado 0,3 mL de ácido clorídrico concentrado e 2 mL de acetato de etilo. A mistura foi centrifugada a 4000 rpm durante 5 minutos. O sobrenadante foi recolhido e o resíduo sólido sujeito a um segundo processo de extracção com adição de 0,3 mL de ácido clorídrico concentrado e 2 mL de acetato de etilo e centrifugação a 4000 rpm durante 5 minutos. Os sobrenadantes, obtidos nos dois processos de extracção, foram combinados e evaporados até à secura a 60°C sob um fluxo de azoto. O resíduo seco foi redissolvido em 300 µL da fase móvel A utilizada na cromatografia líquida do sistema de LC-MS/MS, e misturada em vortex. O volume de injeção na coluna cromatográfica foi de 50 µL. O esquema do processo seguido para a limpeza em fase sólida do extracto proveniente do processo de extracção das quinoxalinas em estudo, é apresentado na Figura 20.

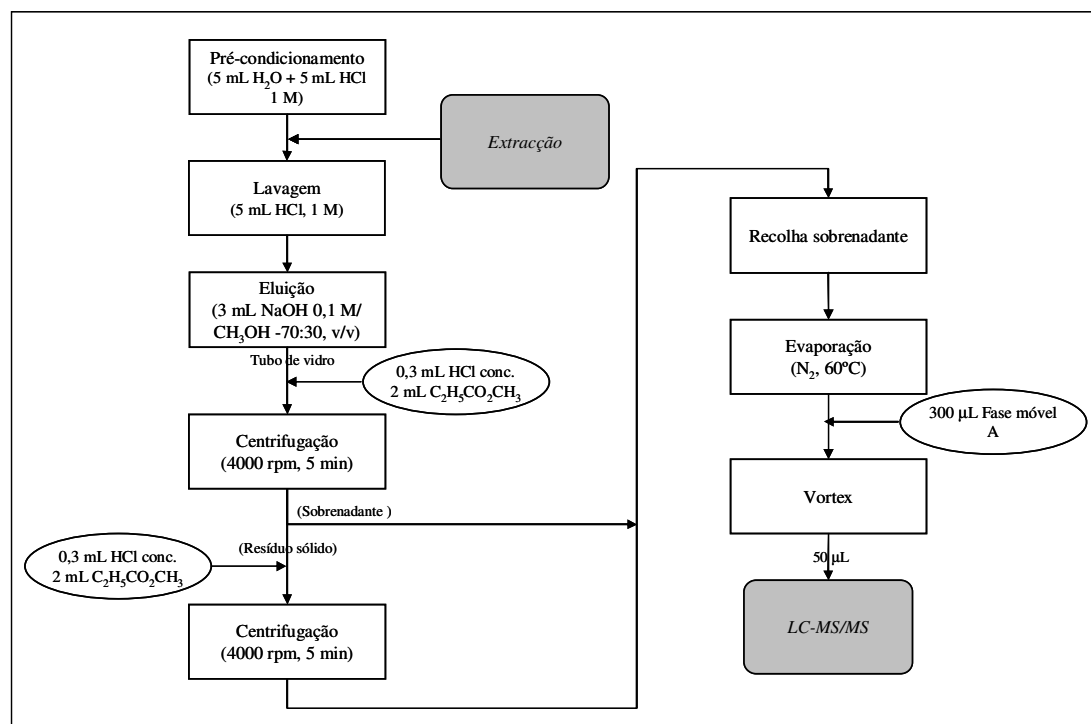


Figura 20 – Esquema do processo de limpeza em fase sólida utilizado no método de confirmação para os resíduos marcadores das quinoxalinas em estudo.

A separação cromatográfica foi conseguida com uma coluna Zorbax SB - Aq (2,1 x 50 mm, 3,5 μ m) à temperatura de 40°C. A fase móvel constituiu numa solução de ácido pentafluoropropiónico (PFPA) 0,1% (A) e acetonitrilo (B). A corrida iniciou-se com 90% de fase A descendo linearmente até 60% aos 6 minutos. A percentagem de fase móvel A voltou a subir até aos 90% até aos 10 minutos. O tempo de corrida foi de 10 minutos e o fluxo de 600 μ L/min com um split de 1:1. Os tempos de retenção dos compostos em análise são apresentados na Tabela 28.

Tabela 28 – Tempos de retenção das quinoxalinas em estudo.

Composto	Tempo de retenção (minutos)	Tempo de retenção relativo
Carbadox	6,50	1,01
Olaquindox	6,90	1,07
d ₄ -QCA	6,46	—

O eluato proveniente da coluna foi transferido para o espectrómetro de massa API 3000 com vista à detecção e quantificação dos compostos em análise eventualmente presentes na amostra. A fonte de ionização ESI operou em modo positivo. As condições operacionais do espectrómetro de massa referentes ao fluxo dos gases, à temperatura e à voltagem no capilar são apresentadas na Tabela 29.

Tabela 29 – Condições operacionais do espectrómetro de massa para a identificação e quantificação das quinoxalinas em estudo.

Fluxo do gás nebulizador (N ₂)	6 L/min
Fluxo do gás de secagem (N ₂)	8 L/min
Voltagem no capilar	5000 V
Fluxo do gás na célula de colisão (N ₂)	4 L/min
Temperatura	450°C

Para a identificação e quantificação dos resíduos marcadores de carbadox e olaquindox eventualmente presentes foram monitorizados dois pares iónicos referentes ao ião molecular e a dois iões fragmento mais abundantes. Para a identificação do padrão interno foi monitorizado um par iónico. As massas dos diferentes iões são apresentadas na Tabela 30.

Tabela 30 – Razão m/z dos íões moleculares e fragmentos correspondentes aos pares iônicos monitorizados (ião molecular/ião fragmento).

Composto	Íão molecular (m/z)	Íão fragmento (m/z)
Carbadox	175	129
		102
Olaquinox	189	143
		145
d ₄ -QCA	179	135

3.3.6.2 Resultados e Discussão

Os resíduos de quinoxalinas foram pesquisados em 15 conjuntos de amostras em cru. Nenhuma das amostras analisadas revelou a presença de resíduos dos compostos pesquisados em concentrações acima dos limites de detecção do método. As amostras analisadas são apresentadas na Tabela 31.

Tabela 31 – Conjuntos de amostras por produtor e data de recolha analisados pelo método de identificação e quantificação de resíduos de quinoxalinas em estudo. Não foram identificados resíduos em concentrações acima dos limites de detecção do método.

Amostra teste confirmação	Data recolha (cru)	Data recolha (assado)	Produtor
C1	7 Dez 2005	8 Dez 2005	P04
C2	14 Dez 2005	17 Dez 2005	P08
C7	9 Mai 2006	13 Mai 2006	P15
C9	9 Mai 2006	13 Mai 2006	P17
C11	10 Mai 2006	13 Mai 2006	P18
C12	10 Mai 2006	13 Mai 2006	P19
C13	10 Mai 2006	13 Mai 2006	P20
C15	30 Mai 2006	3 Jun 2006	P02
C17	30 Mai 2006	3 Jun 2006	P08
C21	11 Jul 2006	— ^a	P16
C22	8 Ago 2006	12 Ago 2006	P05
C24	8 Ago 2006	12 Ago 2006	P16
C25	6 Set 2006	9 Set 2006	P19
C26	6 Set 2006	9 Set 2006	P22
C30	13 Set 2006	15 Set 2006	P23

^a Amostra não recolhida em assado

Dado nenhuma das amostras ter revelado a presença de resíduos das quinoxalinas estudadas, as amostras em assado correspondentes não foram analisadas. Os resultados obtidos no teste de confirmação não podem ser comparados com os obtidos no método das quatro placas, na medida em que este método não é sensível a estes compostos. Observa-se, assim, que as amostras não possuíam resíduos de quinoxalinas analisadas em concentrações superiores aos limites de detecção do método, sugerindo, assim, que o consumo deste alimento não coloca em risco a saúde do consumidor no que respeita à presença destes compostos. No entanto, e à semelhança do que foi referido para as

outras classes pesquisadas, para a confirmação desta hipótese deveriam ter sido analisadas as restantes amostras.

Alguns estudos realizados indicam que o carbadox e o olaquinox presentes em músculo são estáveis a -20°C durante 2 a 6 meses (Maris e Hurtaud-Pessel, 2000). Considerando o tempo decorrido entre a recolha das amostras e a realização do método de confirmação (entre 4 a 13 meses), não pode ser excluída a hipótese da existência de resíduos destes compostos. No que diz respeito ao efeito da temperatura, estes compostos são instáveis, observando-se uma perda de actividade total em rim após diferentes processamentos a temperaturas entre 100 e 160°C (Maris e Hurtaud-Pessel, 2000). Dada a temperatura atingida durante o processo de assadura dos leitões, a existirem resíduos de carbadox e olaquinox nas amostras em cru, a perda de actividade seria total após o processamento.

3.3.7 Coccidiostáticos

O método utilizado pelo LNIV para a determinação de resíduos de coccidiostáticos em músculo, permite a identificação e quantificação dos resíduos dos compostos: lasalocida, narasina, salinomicina, monensina, maduramicina, halofuginona, robenidina, diclazuril e dinitrocarbanilida. Os procedimentos seguidos na realização do método não se encontram publicados pelo que nem todas as condições serão indicadas. De forma a atingir uma maior sensibilidade para os diferentes compostos em análise, a fonte de ionização por electrospray foi inicialmente operada em modo positivo (ESI+) e depois em modo negativo (ESI-). Como padrões internos foram utilizados os compostos nigericina e d_8 -dinitrocarbanilida (d_8 -DNC), respectivamente, para os modos de ionização positivo e negativo.

3.3.7.1 Procedimento

Para o processo de extracção foram pesados 5 g da amostra homogeneizada e transferidos para um tubo de centrífuga. Após a adição de 10 mL acetonitrilo, a amostra foi agitada em vortex durante aproximadamente 40 segundos. A mistura foi sujeita a um processo de agitação horizontal durante 20 minutos, seguido de centrifugação a 3000 rpm durante 10 minutos. O sobrenadante foi recolhido e evaporado até à secura a 65°C

sob um fluxo suave de azoto e o resíduo seco redissolvido em 6 mL de água. A dissolução foi efectuada por agitação em vortex seguida de um banho de ultra-sons durante 5 minutos. A mistura foi centrifugada a 3000 rpm durante 10 minutos e o sobrenadante seguiu para o processo de limpeza em fase sólida. O esquema do processo seguido para a extracção dos coccidiostáticos em estudo, porventura presentes nas amostras, é apresentado na Figura 21.

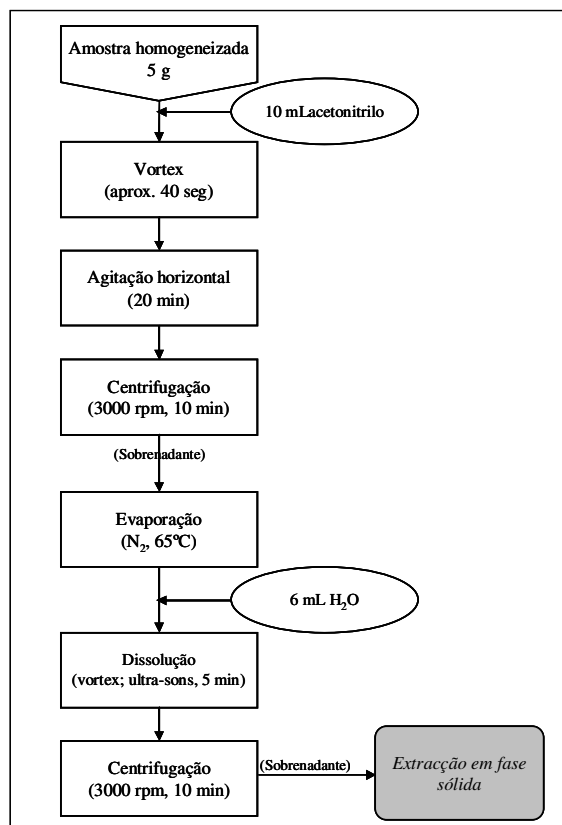


Figura 21 – Esquema do processo de extracção utilizado no método de confirmação para os resíduos dos agentes coccidiostáticos em estudo.

O extracto proveniente do processo anterior foi submetido a um passo de limpeza numa coluna de extracção em fase sólida OASIS-HLB. A coluna foi pré-condicionada consecutivamente com 3 mL de metanol e 3 mL de água. Após a passagem do extracto e sem deixar a coluna secar, esta foi lavada com 2 mL de uma mistura de metanol em água (30:70, v/v). Os compostos foram eluídos com 10 mL de uma solução de 0,1% de trietilamina em metanol. O eluato foi recolhido e evaporado a 65 °C até à secura sob um fluxo suave de azoto. O resíduo seco foi ressuscitado em 350 µL da fase móvel A utilizada na cromatografia líquida do sistema de LC-MS/MS. Previamente à injeção de um volume de 50 µL, o eluato foi filtrado com um filtro 0,45µm. Foram realizadas duas

injecções na coluna cromatográfica, uma para análise dos compostos detectados com a fonte de ionização do espectrómetro de massa a operar em modo positivo e outra para os compostos detectados com a fonte de ionização a operar em modo negativo. O esquema do processo seguido para a limpeza em fase sólida do extracto proveniente do processo de extracção dos coccidiostáticos em estudo, é apresentado na Figura 22.

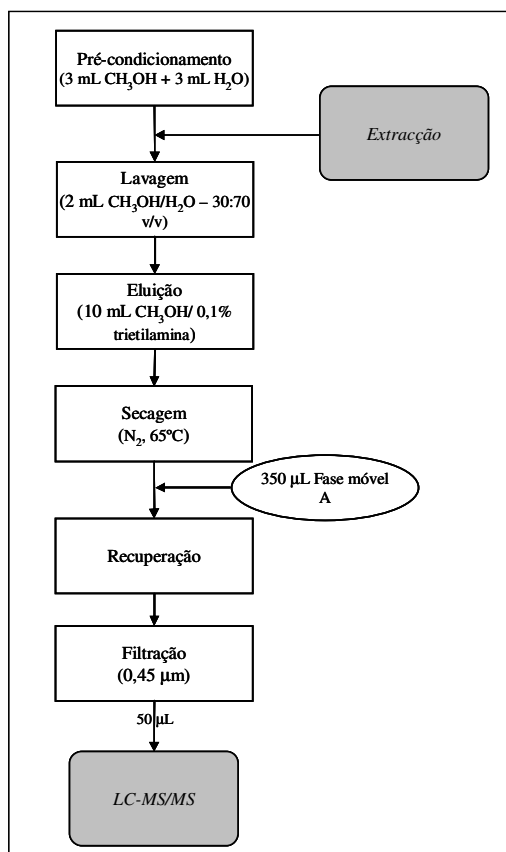


Figura 22 – Esquema do processo de limpeza em fase sólida utilizado no método de confirmação para os agentes coccidiostáticos em estudo.

A separação cromatográfica foi conseguida com uma coluna Zorbax XDB-C18 (2,1 x 150 mm, 5 µm) à temperatura de 40°C. A fase móvel consistiu numa solução de acetonitrilo e formato de amónia 0,01 M, pH 4 (A) e uma mistura de metanol, tetrahydrofurano, água, formato de amónia 0,01 M e acetonitrilo (B). A corrida iniciou-se com 100% de fase A descendo linearmente até 0% aos 12 minutos. A percentagem de fase móvel A voltou a subir até aos 100% aos 19 minutos mantendo-se até ao final do tempo de corrida. O fluxo foi de 450 µL/min com um split de 1:1 e o tempo de corrida foi de 22 minutos na injecção em modo de ionização positivo e de 19 minutos na

injecção em modo de ionização negativo. Os tempos de retenção dos compostos em análise são apresentados na Tabela 32.

Tabela 32 – Tempos de retenção dos coccidiostáticos em análise e padrões internos.

Composto	Tempo de retenção (minutos)	Tempo de retenção relativo
Lasalocida	10,07	0,69
Narasina	13,87	0,96
Salinomicina	12,93	0,89
Monensina	12,70	0,88
Maduramicina	12,72	0,88
Halofuginona	7,11	0,49
Robenidina	13,43	0,93
Nigericina	14,50	—
Diclazuril	9,53	0,96
Dinitrocarbanilida	9,95	1,01
d ₈ -DNC	9,89	—

O eluato, proveniente da coluna, foi transferido para o espectrómetro de massa API 3000 com vista à detecção e quantificação dos compostos em análise, eventualmente presentes na amostra. Na primeira injecção no sistema LC-MS/MS, a fonte de ionização ESI operou em modo positivo com vista à identificação e quantificação de lasalocida, narasina, salinomicina, monensina, maduramicina, halofuginona e de robenidina. Na segunda injecção, a fonte operou em modo negativo com vista à identificação e quantificação de diclazuril e dinitrocarbanilida. Dado que o método utilizado pelo LNIV, para a identificação e quantificação dos coccidiostáticos em estudo, não se encontra publicado, não são especificadas as condições operacionais do espectrómetro de massa, nem os pares iónicos monitorizados para os diferentes compostos.

3.3.7.2 Resultados e Discussão

Os resíduos de coccidiostáticos foram pesquisados em 5 conjuntos de amostras em cru. Nenhuma das amostras analisadas revelou a presença de resíduos dos compostos pesquisados, em concentração acima dos limites de detecção do método. As amostras analisadas são apresentadas na Tabela 33.

Tabela 33 – Conjuntos de amostras por produtor e data de recolha analisados pelo método de identificação e quantificação de resíduos dos coccidiostáticos em estudo. Não foram identificados resíduos em concentrações acima dos limites de detecção do método.

Amostra teste confirmação	Data recolha (cru)	Data recolha (assado)	Produtor
C9	9 Mai 2006	13 Mai 2006	P17
C11	10 Mai 2006	13 Mai 2006	P18
C18	11Jul 2006	— ^a	P01
C20	11Jul 2006	— ^a	P08
C25	6 Set 2006	9 Set 2006	P19

^a Amostra não recolhida em assado

Dado nenhuma das amostras em cru analisadas, ter revelado a presença de resíduos dos coccidiostáticos pesquisados, as amostras em assado correspondentes não foram analisadas. Os resultados obtidos no teste de confirmação não poderão ser comparados com os obtidos no método das quatro placas, dado este método não ser sensível a estes compostos.

No que diz respeito à estabilidade destes compostos, apenas foi encontrada uma referência relativa à lasalocida que indica que é instável em óleo a 180°C, tendo um tempo de meia vida de 15 minutos (Maris e Hurtaud-Pessel, 2000). Dadas as temperaturas atingidas durante o processo de assadura, é expectável, em caso de existência de resíduos deste composto, uma elevada redução da concentração dos resíduos. A inexistência de dados adicionais não permite a análise dos resultados face às condições de armazenagem e de processamento utilizadas.

Os resultados obtidos indicam a não existência de resíduos dos agentes coccidiostáticos em estudo em concentrações superiores aos limites de detecção do método, sugerindo que a saúde do consumidor está salvaguardada no que diz respeito à presença destes compostos. No entanto, dado que apenas foram analisados cinco conjuntos de amostras, a confirmação desta hipótese apenas poderia ser efectuada se todas as amostras pudessem ter sido analisadas na medida em que a utilização de antibióticos pode diferir entre produtores. Adicionalmente, o tempo decorrido entre a amostragem e a realização do teste deveria ser minimizado de forma a evitar a possível degradação dos compostos eventualmente presentes.

3.3.8 Discussão e Conclusões Gerais dos Métodos de Confirmação

Para a identificação e quantificação de resíduos de agentes antimicrobianos nas amostras de leitão recolhidas foram utilizados diferentes métodos de confirmação, específicos para compostos pertencentes a determinadas classes de compostos. As classes de agentes estudadas foram as tetraciclinas, sulfonamidas, macrólidos, quinolonas, quinoxalinas e coccidiostáticos. Uma vez que a quantidade de amostras individuais recolhidas não era suficiente para a realização dos testes de confirmação, as amostras foram agrupadas por data de recolha e por produtor, tendo-se realizado testes de confirmação em conjuntos de amostras escolhidos aleatoriamente. Este procedimento foi efectuado considerando que os leitões dos produtores identificados são provenientes do mesmo criador (vide ponto 3.1) e assumindo o pressuposto que a administração de compostos não é individual mas sim realizada para toda a produção. Cada amostra conjunto foi analisada por pelo menos um dos testes de confirmação usados. Dado que os diferentes testes não foram realizados para todas as amostras, os resultados deverão ser considerados indicativos em relação à presença de resíduos dos agentes antimicrobianos em estudo em leitões para consumo humano. Os resultados obtidos indicaram a existência de resíduos de tetraciclinas (oxitetraciclina e/ou doxiciclina) em concentrações acima dos LMR estabelecidos na legislação em quatro dos sete conjuntos de amostras analisados. Sendo as amostras pertencentes a diferentes produtores, os resultados sugerem que a administração destes compostos está a ser efectuada de forma incorrecta na medida em que são detectados resíduos acima dos valores máximos permitidos.

No que diz respeito aos restantes agentes antimicrobianos pesquisados, não foram encontrados resíduos nas amostras analisadas em cru, pelo que as amostras correspondentes em assado não foram analisadas.

A comparação entre os resultados obtidos para os compostos pesquisados pelos métodos de triagem e de confirmação indicam a existência de falsos positivos e de alguns falsos negativos no primeiro teste. As placas de teste a pH 7,2 e pH 8 inoculadas, respectivamente, com *Bacillus subtilis* e *Micrococcus luteus*, revelaram a ocorrência de vários falsos positivos. No entanto, para a análise dos resultados obtidos deve ser tida em consideração a possível perda de resíduos eventualmente presentes com o tempo de

armazenagem a -18°C , dado os períodos decorridos entre a recolha das amostras e a realização dos métodos de confirmação. Tal como referido anteriormente, a diminuição da concentração de resíduos dos compostos analisados com o tempo de armazenagem a -20°C , nalguns casos, abaixo do limite de detecção dos métodos usados, foi observada em diversos estudos realizados (Maris e Hurtaud-Pessel, 2000). Adicionalmente há que ter em consideração que as amostras foram retiradas de músculos não correspondentes aos mais irrigados pelo que as quantidades detectadas poderiam ser superiores caso outros músculos fossem pesquisados (vide ponto 3.1).

De acordo com os resultados obtidos nos testes de confirmação, verifica-se a ocorrência de contaminação por resíduos de tetraciclinas em concentrações acima dos LMR estabelecidos, indicando que as carcaças não estariam conformes, existindo, assim, indícios de uso indevido de agentes antimicrobianos e/ou de não cumprimento do intervalo de segurança. De acordo com a legislação em vigor, estas carcaças não seriam aptas para consumo humano. No entanto, os resultados para as amostras em assado indicam que as condições de processamento a que a carne de leitão é normalmente sujeita, reduzem a concentração existente para quantidades vestigiais que não colocam em risco a saúde do consumidor no que diz respeito à presença de resíduos destes compostos. No entanto, e tal como referido anteriormente, não se poderá afirmar que a carne, após ser submetida ao processo de assadura, encontra-se isenta de resíduos e cujo consumo não coloca em risco a saúde humana, na medida em que poderão haver resíduos de outras substâncias não pesquisadas e/ou produtos da degradação resultantes do processo de assadura que poderão ter efeitos nocivos para a saúde.

4 Discussão de Resultados e Conclusão Gerais

As amostras de leitão recolhidas foram analisadas através do método das 4 Placas, com vista à detecção da presença de resíduos de antibióticos pertencentes às classes β -lactâmicos, tetraciclina, sulfonamidas, aminoglicosídeos e macrólidos, e do método de confirmação LC-MS/MS, com vista à identificação e quantificação de resíduos de tetraciclina, sulfonamidas, macrólidos, quinolonas, quinoxalinas e coccidiostáticos. Dadas as quantidades requeridas para a realização dos testes de confirmação, e tendo em consideração que a administração de agentes antimicrobianos aos leitões não é individual, mas sim, realizada para toda a produção, as amostras foram agrupadas por produtor e data de recolha. Desta forma, os resultados obtidos, para a pesquisa de resíduos de tetraciclina, sulfonamidas e macrólidos, pelo teste das 4 Placas não puderam ser confirmados para as amostras individuais. Dados os limites de detecção deste método, que são próximos dos LMR estabelecidos para cada uma das classes pesquisadas, e a sensibilidade dos métodos de confirmação, caso exista pelo menos uma amostra considerada positiva no teste das 4 Placas, os resíduos existentes deverão ser identificados e quantificados pelo método de confirmação. No entanto, não poderão ser tiradas conclusões relativamente à eficácia do método das 4 Placas para as restantes amostras do conjunto por produtor e data de recolha. Se a presença de resíduos não for confirmada, o resultado do teste das 4 Placas corresponderá, provavelmente, a um falso positivo.

O teste de confirmação de tetraciclina realizado identificou a presença de resíduos de oxitetraciclina e doxiciclina, em concentrações acima do LMR estabelecido, em três dos sete conjuntos de amostras em cru analisados (Tabela 11). A comparação destes resultados com os obtidos no teste das 4 Placas para a placa inoculada com *Bacillus subtilis* (Tabela 12) indica a existência de pelo menos um falso negativo, referente às amostras constituintes do conjunto C28, provenientes do produtor P22 e recolhidas a 13 de Setembro de 2006, e um falso positivo, referente à amostra 64, do produtor C13 e recolhida a 10 de Maio de 2006. Dado que esta placa de teste também permite a detecção de antibióticos β -lactâmicos, que não foram analisados por métodos de confirmação, os resultados terão de ser analisados em conjunto com os obtidos para a placa a pH 8 inoculada com *Micrococcus luteus*. Comparando os resultados obtidos em ambas as placas para as amostras recolhidas a 11 de Julho de 2006, pertencentes aos

produtores P08 e P16, e as amostras recolhidas a 13 de Setembro de 2006, pertencentes ao produtor P22, verifica-se que os resultados obtidos poderão ser devidos à presença de antibióticos β -lactâmicos (Tabela 12). A única excepção corresponde à amostra com o número 115 do produtor P22 que apenas foi considerada positiva na placa a pH 6, tratando-se, provavelmente, de um falso positivo. Apesar da baixa estabilidade destes compostos quando conservados a -20°C durante longos períodos de tempo, estudos indicam que são estáveis até 3 meses (Maris e Hurtaud-Pessel, 2000; Verdon *et al.*, 2000). Dado que o período decorrido, entre a data de recolha destas amostras e a realização do teste de triagem, foi inferior a 2 meses, é provável que os resultados positivos obtidos em ambas as placas sejam devido à contaminação das amostras com resíduos de antibióticos β -lactâmicos. A confirmação desta hipótese apenas poderia ser dada caso as amostras tivessem sido posteriormente analisadas por métodos de confirmação adequados.

Os resultados obtidos nos testes de triagem e de confirmação de tetraciclina para as amostras em assado analisadas são concordantes, tendo-se apenas identificado concentrações muito abaixo do LMR estabelecido para dois dos conjuntos de amostras analisados (Tabela 13). Estes resultados estão de acordo com estudos realizados acerca da estabilidade de resíduos de tetraciclina, que indicam uma diminuição da concentração dos mesmos com a temperatura e o tempo de processamento (Kuhne *et al.*, 2001; Honikel *et al.*, 1978). Desta forma, verifica-se que as amostras, após serem submetidas ao processo de assadura, não possuem resíduos das tetraciclina estudadas em concentrações que possam ter efeitos nocivos para a saúde humana. No entanto, para uma correcta avaliação do efeito do processo de assadura na concentração de resíduos das tetraciclina em estudo, seria necessário a análise de um maior número de amostras.

O teste de confirmação de resíduos de sulfonamidas foi realizado para quatro conjuntos de amostras em cru (Tabela 17), não tendo sido identificados resíduos de nenhum dos 15 compostos estudados. Observando os resultados obtidos no teste de triagem para a placa a pH 7,2 inoculada com *Bacillus subtilis* (Tabela 18), verifica-se que, das 16 amostras individuais analisadas, 12 correspondem, provavelmente, a falsos positivos. O período que decorreu entre a realização de ambos os testes para as diferentes amostras variou entre os 3 e os 5 meses. No entanto, estudos realizados acerca da estabilidade de sulfonamidas armazenadas a -20°C indicam que são relativamente estáveis para longos

períodos de tempo (Maris e Hurtaud-Pessel, 2000; Thomas *et al.*, 1997), pelo que não é expectável que, ao existirem resíduos, tenha havido uma redução para níveis não detectados pelo método de confirmação. Adicionalmente, também não se considera provável que esta diminuição tenha ocorrido durante o processo de preparação das amostras dado que, apesar de estudos indicarem a baixa estabilidade de alguns destes compostos a 4°C, o tempo de meia vida para a sulfaquinoxalina é de 11 dias e para a sulfametazina é de 6 semanas (Maris e Hurtaud-Pessel, 2000; Thomas *et al.*, 1997). Desta forma, considera-se viável a hipótese de se tratarem de falsos positivos que poderão ser devido, por exemplo, a outras substâncias, que possam estar presentes na carne e que possuam um efeito inibidor do crescimento de *Bacillus subtilis* nas condições de realização do teste.

Para a confirmação da presença de resíduos de macrólidos, foram analisados 20 conjuntos de amostras em cru, não tendo sido detectado qualquer um dos quatro macrólidos estudados. Observando os resultados obtidos no teste de triagem para a placa a pH 8 inoculada com *Micrococcus luteus* (Tabela 23), verifica-se que apenas o conjunto C28, referente às amostras 111 e 112, recolhidas a 13 de Setembro de 2006 e pertencentes ao produtor P22, é constituído na totalidade por amostras consideradas negativas. Dado que esta placa de teste permite também a detecção de antibióticos β -lactâmicos, os resultados positivos obtidos no teste de triagem poderão ser devido à presença destes compostos. No entanto, observando-se os resultados para a placa de teste a pH 6 inoculada com *Bacillus subtilis* (Tabela 23) verifica-se que, das 44 amostras consideradas positivas no teste a pH 8, apenas 11 foram consideradas positivas no teste a pH 6. A confirmação da presença destes resíduos não foi efectuada. No entanto, mesmo considerando a hipótese destas 11 amostras estarem contaminadas com resíduos de antibióticos β -lactâmicos, a percentagem de falsos positivos observados para o teste a pH 8 é de 75%.

Os resultados obtidos para a análise de tetraciclinas, sulfonamidas e macrólidos por ambos os métodos indicam, assim, que o teste das 4 Placas pode originar alguns falsos negativos e, em número bastante mais elevado, falsos positivos, principalmente para as placas a pH 7,2 e 8 inoculadas, respectivamente, com *Bacillus subtilis* e *Micrococcus luteus*. Desta forma, a utilização deste método como triagem para a selecção de amostras a analisar por métodos analíticos específicos de confirmação, poderá resultar

na não identificação de todas as amostras contaminadas. Por outro lado, a existência de falsos positivos leva à realização desnecessária de análises de confirmação com as implicações ao nível de tempo e custo associadas. No entanto, dado que, no âmbito do presente trabalho, não foram realizados ensaios de validação do teste das 4 Placas não se poderá concluir acerca da eficiência deste método como método de triagem. Por outro lado, apesar de ser sensível a diferentes agentes antibacterianos, há que ter em consideração o facto que novas famílias de antibióticos poderão não inibir os microrganismos nas condições dos testes, pelo que o método deverá sofrer as adaptações necessárias de forma a garantir a sua funcionalidade (Currie *et al.*, 1998).

A presença de resíduos de aminoglicosídeos foi analisada através da placa de teste de ágar a pH 8 inoculado com a suspensão de *Bacillus subtilis*. Das 118 amostras em cru analisadas 34 amostras revelaram uma possível contaminação com resíduos pertencentes a esta classe de antibióticos. Estes resultados não puderam ser confirmados.

No que diz respeito à análise de compostos pertencentes às classes das quinolonas, quinoxalinas e coccidiostáticos pelos métodos de confirmação, nenhum dos compostos pesquisados foi identificado nas amostras em cru analisadas. No entanto, dado o período decorrido entre a data de recolha das amostras (Tabelas 27, 31 e 33) e a realização dos testes de confirmação (Janeiro de 2007), a análise dos resultados obtidos deverá ser efectuada tendo em consideração as estabilidades dos vários compostos com o tempo de armazenagem a -18°C. Relativamente às quinolonas apenas foi encontrada uma referência, referente à enrofloxacina em músculo de suíno, que indica uma boa estabilidade durante 3 meses a -20°C (Maris e Hurtaud-Pessel, 2000). Estudos realizados sugerem que as duas quinoxalinas estudadas são estáveis em músculo a -20°C durante 2 meses (Maris e Hurtaud-Pessel, 2000). Desta forma, dado o período decorrido entre a recolha das amostras e a realização do teste de confirmação, não pode ser afirmado que as amostras analisadas se encontravam isentas de resíduos na medida em que, ao existirem, poderão ter sofrido uma perda de actividade. Em relação aos restantes compostos estudados não foram encontrados estudos relativos à sua estabilidade durante o processo de armazenagem a frio.

A análise das amostras em assado foi realizada para as correspondentes a amostras em cru para as quais foi detectada ou identificada a presença de resíduos, respectivamente, pelos métodos de triagem ou de confirmação. Nenhuma das amostras analisadas revelou a presença de resíduos dos compostos pesquisados em níveis próximos dos LMR estabelecidos. Têm sido realizados alguns estudos acerca da presença de determinados resíduos de medicamentos veterinários em alimentos processados ou da estabilidade de resíduos após tratamento térmico. O efeito da temperatura varia de acordo com o composto e o tipo de processamento sendo relatado, nalguns casos, a migração de resíduos para o líquido usado no processamento ou pelo líquido exsudado (Lolo *et al.*, 2006; Rose *et al.*, 1996). No entanto, os resultados relatados na bibliografia e obtidos em ambos os métodos indicam que os resíduos não são estáveis para as condições do processo de assadura.

As amostras analisadas por cada um dos testes de confirmação são referentes apenas a uma parte do número total de amostras recolhidas e analisadas pelo teste de triagem. Adicionalmente, a presença de antibióticos β -lactâmicos e aminoglicosídeos não foi confirmada através de métodos de confirmação adequados. Desta forma, a análise comparativa entre os dois métodos bem como o estudo mais abrangente da possível contaminação das amostras de leitão, por resíduos dos diferentes compostos analisados, apenas poderia ser efectuada se todas as amostras fossem analisadas pelos diferentes métodos usados e todas as classes pesquisadas fossem confirmadas. Adicionalmente, de forma a que os resultados obtidos não possam ser influenciados pela instabilidade de determinados compostos durante o tempo de armazenagem, a análise das amostras pelos testes de triagem e de confirmação deveria ter sido realizada logo após a recolha das mesmas.

No entanto, os resultados obtidos nos métodos analíticos, para as amostras em cru, para as diferentes classes de agentes antimicrobianos estudadas, confirmaram a presença de resíduos de tetraciclina acima dos LMR estabelecidos e indicam a presença de antibióticos β -lactâmicos e aminoglicosídeos. Estes resultados estão de acordo com os dados referentes ao uso de antibióticos em suínos que indicam que, em Portugal, estes pertencem aos tipos de compostos mais usados (Pena *et al.*, 2004). Os resultados sugerem, assim, que existe uso indevido de agentes antimicrobianos e/ou que o intervalo de segurança definido para cada composto não está a ser cumprido. Desta forma, e de

acordo com a legislação em vigor, as carcaças não estariam conformes não sendo aptas para consumo humano.

Relativamente à análise do efeito das condições do processamento nos resíduos eventualmente presentes dos compostos estudados, não foram detectados resíduos em concentrações próximas dos LMR estabelecidos, sugerindo que as condições de processamento a que as carcaças de leitão são normalmente sujeitas levam à destruição dos resíduos presentes. Desta forma, mesmo que existam resíduos de antibióticos em carne crua, verifica-se uma diminuição para níveis abaixo do LMR, com as condições de processamento. Dado que este alimento não é consumido cru, a saúde do consumidor, em relação à presença destes compostos, não é ameaçada. No entanto, tal não significa que os alimentos estão isentos de resíduos, na medida em que poderão existir outros compostos, produtos de reacções de degradação dos compostos administrados, cuja ingestão possa ter efeitos nocivos para a saúde humana (Kuhne *et al.*, 2001). Assim, de forma a que a presença destes compostos possa ser analisada, deverão ser efectuados estudos de cinéticas de reacções de degradação que permitam a identificação dos possíveis produtos. A avaliação do risco para a saúde humana da ingestão de alimentos provenientes de animais, aos quais tenham sido administrados medicamentos veterinários, deverá ser efectuada com base na pesquisa dos resíduos nos alimentos na forma em que estes são ingeridos e complementada com a pesquisa de produtos de degradação resultantes do processamento dos mesmos. Por outro lado, e dada a vasta gama de agentes antimicrobianos que poderão ser usados devida ou indevidamente, o estudo deverá ser alargado para outras classes de compostos incluindo compostos proibidos. Adicionalmente deverá ser considerada a possibilidade de outras zonas edíveis da carcaça dos leitões com um nível de irrigação superior, conterem resíduos em maior quantidade relativamente à que poderá ser encontrada em músculos menos irrigados, como no caso do presente trabalho.

5 Bibliografia

- Alfredsson, G. e Ohlsson, A. (1998). "Stability of sulphonamide drugs in meat during storage". *Food Additives and Contaminants* 15(3): 302-6.
- Anderson, A.D.; Nelson, J.M.; Rossiter, S. e Angulo, F.J. (2003). "Public health consequences of use of antimicrobial agents in food animals in the United States". *Microbial Drug Resistance* 9(4): 373-9.
- Angulo, F.J.; Baker, N.L.; Olsen, S.J.; Anderson, A. e Barrett, T.J. (2004). "Antimicrobial use in agriculture: controlling the transfer of antimicrobial resistance to humans". *Seminars in Pediatric Infectious Diseases* 15(2): 78-85.
- ASMS (American Society for Mass Spectrometry – Education) (2001). "What is mass spectrometry?" Disponível on-line em: <http://www.asms.org/whatisms/index.html> (última consulta: Julho de 2007).
- Balizes, G. e Hewitt, A. (2003). "Determination of veterinary drug residues by liquid chromatography and tandem mass spectrometry". *Analytica Chimica Acta* 492: 105-131.
- Barton, M.D. (2000). "Antibiotic use in animal feed and its impact on human health". *Nutrition Research Reviews* 13: 279-299.
- Becker, M.; Zittlau, E. e Petz, M. (2004). "Residue analysis of 15 penicillins and cephalosporins in bovine muscle, kidney and milk by liquid chromatography-tandem mass spectrometry". *Analytica Chimica Acta* 520: 19-32.
- Biosystems, A. (2001). "The API 2000™ LC/MS/MS System: triple quadrupole performance in a compact benchtop footprint featuring Applied Biosystems/MDS SCIEX ion sources for maximum flexibility and ease-of-use". Product Bulletin LC/MS.
- Bogialli, S.; Curini, R.; Di Corcia, A.; Lagana, A. e Rizzuti, G. (2006). "A rapid confirmatory method for analyzing tetracycline antibiotics in bovine, swine, and poultry muscle tissues: matrix solid-phase dispersion with heated water as extractant followed by liquid chromatography-tandem mass spectrometry". *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 54(5): 1564-70.
- Bramer, S.V. (1997). "An Introduction to Mass Spectrometry". Widener University, Department of Chemistry.

- Butaye, P.; Devriese, L.A. e Haesebrouck, F. (2003). "Antimicrobial growth promoters used in animal feed: effects of less well known antibiotics on gram-positive bacteria". *Clin Microbiol Rev* 16(2): 175-88.
- Caprioli, A.; Busani, L.; Martel, J.L. e Helmuth, R. (2000). "Monitoring of antibiotic resistance in bacteria of animal origin: epidemiological and microbiological methodologies". *International Journal of Antimicrobial Agents* 14(4): 295-301.
- CCE (Comissão das Comunidades Europeias) (2001). "Comunicação da Comissão relativa a uma estratégia de luta contra a resistência antimicrobiana". Bruxelas, 20.06.2001.
- CE 96/23. "Directiva 96/23/CE do Conselho, de 29 de Abril de 1996, relativa às medidas de controlo a aplicar a certas substâncias e aos seus resíduos nos animais vivos e respectivos produtos e que revoga as Directivas 85/358/CEE e 86/469/CEE e as Decisões 89/187/CEE e 91/664/CEE". *Jornal Oficial das Comunidades Europeias*, L 125, 23.5.1996, 10-32.
- CE 324/2004. "Regulamento (CE) N. 324/2004 da Comissão de 25 de Fevereiro de 2004 que altera o anexo I do Regulamento (CEE) n.º 2377/90 do Conselho que prevê um processo comunitário para o estabelecimento de limites máximos de resíduos de medicamentos veterinários nos alimentos de origem animal". *Jornal Oficial das Comunidades Europeias*, L 58, 26.02.2004., 16-18.
- CE 657/2002 (Comissão Europeia) "Decisão da Comissão de 12 de Agosto de 2002 que dá execução ao disposto na Directiva 96/23/CE do Conselho relativamente ao desempenho de métodos analíticos e à interpretação de resultados [notificada com o número C(2002) 3044] (2002/657/CE)".
- CE 868/2002. "Regulamento (CE) N. 868/2002 da Comissão de 24 de Maio de 2002 que altera os anexos I e II do Regulamento (CEE) n.º 2377/90 do Conselho, que prevê um processo comunitário para o estabelecimento de limites máximos de resíduos de medicamentos veterinários nos alimentos de origem animal". *Jornal Oficial das Comunidades Europeias*, L 137, 22.05.2002., 6-9.
- CE 1181/2002. "Regulamento (CE) N. 1181/2002 da Comissão de 1 de Julho de 2002 que altera o anexo I do Regulamento (CEE) n.º 2377/90 do Conselho, que prevê um processo comunitário para o estabelecimento de limites máximos de

- resíduos de medicamentos veterinários nos alimentos de origem animal". *Jornal Oficial das Comunidades Europeias*, L 172, 02.07.2002., 13-20.
- CE 1530/2002. "Regulamento (CE) N. 1530/2002 da Comissão de 27 de Agosto de 2002 que altera os anexos I, II e III do Regulamento (CEE) n.º 2377/90 do Conselho, que prevê um processo comunitário para o estabelecimento de limites máximos de resíduos de medicamentos veterinários nos alimentos de origem animal". *Jornal Oficial das Comunidades Europeias*, L 230, 28.08.2002., 3-6.
- CE 1570/98. "Regulamento (CE) N.º 1570/98 da Comissão, 17 de Julho de 1998 que altera os anexos I a IV do Regulamento (CEE) nº 2377/90 do Conselho, que prevê um processo comunitário para o estabelecimento de limites máximos de resíduos de medicamentos veterinários nos alimentos de origem animal". *Jornal Oficial das Comunidades Europeias*, L 205, 22.07.98., 1-39.
- CE 2162/2001. "Regulamento (CE) n.º 2162/2001 da Comissão de 7 de Novembro de 2001 que altera os anexos I, II e III do Regulamento (CEE) n.º 2377/90 do Conselho que prevê um processo comunitário para o estabelecimento de limites máximos de resíduos de medicamentos veterinários nos alimentos de origem animal". *Jornal Oficial das Comunidades Europeias*, L 291, 08.11.2001, 9-12.
- CE 2788/98. "Regulamento (CE) N.º 2788/98 da Comissão, de 22 de Dezembro de 1998 que altera a Directiva 70/524/CEE do Conselho relativa aos aditivos na alimentação para animais no que respeita à revogação da autorização de determinados factores de crescimento". *Jornal Oficial das Comunidades Europeias*, L 347, 23.12.1998., 31-32.
- CE (Comissão Europeia) (1999). "Opinion of the Scientific Steering Committee on antimicrobial resistance". 28.05.1999.
- CE (Comissão Europeia) (2003). "Final report of a mission carried out in Portugal from 17 to 21 November 2003 in order to evaluate the control of residues in live animals and animal products". DG(SANCO)/9209/2003-MR Final.
- CE (Comissão Europeia) (2006). "Overview of a series of missions carried out between 2003 and 2005 in fifteen Member States concerning the evaluation of the control of residues and contaminants in live animals and animal products, including controls on veterinary medicinal products". DG(SANCO)/8502/2006, 16.10.2006.

- CEE 2377/90. "Regulamento (CEE) N.º 2377/90 do Conselho, de 26 de Junho de 1990, que prevê um processo comunitário para o estabelecimento de limites máximos de resíduos de medicamentos veterinários nos alimentos de origem animal". *Jornal Oficial das Comunidades Europeias*, L 224, 18.08.1990., 1-118. Versão actualizada em 11.07.2005.
- Cherlet, M.; Schelkens, M.; Croubels, S. e De Backer, P. (2003). "Quantitative multi-residue analysis of tetracyclines and their 4-epimers in pig tissues by high-performance liquid chromatography combined with positive-ion electrospray ionization mass spectrometry". *Analytica Chimica Acta* 492: 199-213.
- CNEVA (1993). "Method of detecting residues of antibacterial substances in fresh meat - Four Plate Test". Fougères, Centre National d'Etudes Vétérinaires et Alimentaires - Laboratoire des Médicaments Vétérinaires.
- CNEVA (1997). "Determination of tetracycline residues in muscle by HPLC". Fougères, Centre National d'Etudes Vétérinaires et Alimentaires - Laboratoire des Médicaments Vétérinaires.
- Coffman, J.R. e Beran, G.W. (1999). "The use of drugs in food animals: Benefits and Risks". Committee on Drug Use in Food Animals Panel on Animal Health, Food Safety, and Public Health. Board on Agriculture. Washington, D.C., NATIONAL ACADEMY PRESS. Disponível on-line em: <http://books.nap.edu/books/0309054346/html/index.html> (última consulta: Julho de 2007).
- Comissão da Farmacopeia Portuguesa (1999). "Farmacopeia Portuguesa VI - Suplemento - 1999". INFARMED.
- Currie, D.; Lynas, L.; Kennedy, D.G. e McCaughey, W.J. (1998). "Evaluation of a modified EC Four Plate Method to detect antimicrobial drugs". *Food Additives and Contaminants* 15(6): 651-60.
- DANMAP (2003). "Use of antimicrobial agents and occurrence of antimicrobial resistance in bacteria from food animals, foods and humans in Denmark". Disponível on-line em: http://www.dfvf.dk/Files/Filer/Zoonosecentret/Publikationer/Danmap/Danmap_2003.pdf (última consulta: Julho de 2007).
- De Wasch, K.; Okerman, L.; Croubels, S.; De Brabander, H.; Van Hoof, J. e De Backer, P. (1998). "Detection of residues of tetracycline antibiotics in pork and

- chicken meat: correlation between results of screening and confirmatory tests". *Analyst* 123(12): 2737-41.
- Dey, B.P.; Thaler, A. e Gwozdz, F. (2003). "Analysis of microbiological screen test data for antimicrobial residues in food animals". *Journal of Environmental Science and Health, Part B* 38(3): 391-404.
- Di Corcia, A. e Nazzari, M. (2002). "Liquid chromatographic-mass spectrometric methods for analyzing antibiotic and antibacterial agents in animal food products". *Journal of Chromatography A* 974(1-2): 53-89.
- Díaz-Cruz, M.S. e Barceló, D. (2005). "LC-MS² trace analysis of antimicrobials in water, sediment and soil". *Trends in Analytical Chemistry* 24(7): 645-657.
- DL 135/2003. "Decreto-Lei n.º 135/2003". Diário da República - I Série - A, N.º 147 de 28 de Junho de 2003, 3719-3724.
- DL 151/2005. "Decreto-Lei n.º 151/2005". Diário da República - I Série - A, N.º 166 de 30 de Agosto de 2005, 5176-5183.
- DL 184/97. "Decreto-Lei n.º 184/97". Diário da República - I Série - A, N.º 171 de 26 de Julho de 1997, 3796-3814.
- DL 185/2005. "Decreto-Lei n.º 185/2005". Diário da República - I Série - A, N.º 212 de 4 de Novembro de 2005, 6303-6315.
- Dubois, M.; Fluchard, D.; Sior, E. e Delahaut, P. (2001). "Identification and quantification of five macrolide antibiotics in several tissues, eggs and milk by liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry". *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications* 753(2): 189-202.
- EMA (The European Agency for the Evaluation of Medicinal Products) (1999). "Antibiotic resistance in the European Union associated with therapeutic use of veterinary medicines". Report and qualitative risk assessment by the Committee for Veterinary Medicinal Products, 14 July, 1999. Disponível on-line em: <http://www.emea.europa.eu/pdfs/vet/regaffair/034299en.pdf> (última consulta: Julho de 2007).
- Eurostat (European Commission - Eurostat) (2007). "Europe in Figures - Eurostat yearbook 2006-07". Disponível on-line em: http://epp.eurostat.ec.europa.eu/cache/ITY_OFFPUB/KS-CD-06-001/EN/KS-CD-06-001-EN.PDF (última consulta: Julho de 2007).

- Ferrini, A.M.; Mannoni, V. e Aureli, P. (2006). "Combined Plate Microbial Assay (CPMA): a 6-plate-method for simultaneous first and second level screening of antibacterial residues in meat". *Food Additives and Contaminants* 23(1): 16-24.
- Follet, G. (2000). "Antibiotic resistance in the UE - science, politics and policy". *Journal of Agrobiotechnology Management & Economics* 3(2&3): 148-155.
- Harvey, J. e Mason, L. (1998). "The use and misuse of antibiotics in UK agriculture. Part 1: Current Usage". Soil Association.
- Hermo, M.P.; Barron, D. e Barbosa, J. (2006). "Development of analytical methods for multiresidue determination of quinolones in pig muscle samples by liquid chromatography with ultraviolet detection, liquid chromatography-mass spectrometry and liquid chromatography-tandem mass spectrometry". *Journal of Chromatography A* 1104(1-2): 132-9.
- Honikel, K.O.; Schmidt, U.; Woltersdorf, W. e Leistner, L. (1978). "Effect of storage and processing on tetracycline residues in meat and bones". *Journal - Association of Official Analytical Chemists* 61(5): 1222-7.
- Hussein, K. (2004). "Experimental design for the microbiological Four-Plate Test for the detection of sulphadimidine residues at levels of concern". *Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy*(48): 403-407.
- Hussein, K.; Marcincák, S.; Máté, D.; Kozárová, I.; Sokol, J. e Zdolec, N. (2005). "Use of Premi[®] Test for the detection of sulphonamide residues in chicken eggs". *Acta Veterinaria (Beograd)* 55(5-6): 493-500.
- Hutchinson, M.J.; Young, P.B. e Kennedy, D.G. (2005). "Confirmatory method for the analysis of carbadox and olaquinox in porcine feedingstuffs using LC-electrospray MS-MS". *Food Additives and Contaminants* 22(2): 113-9.
- Hutchinson, M.J.; Young, P.Y.; Hewitt, S.A.; Faulkner, D. e Kennedy, D.G. (2002). "Development and validation of an improved method for confirmation of the carbadox metabolite, quinoxaline-2-carboxylic acid, in porcine liver using LC-electrospray MS-MS according to revised EU criteria for veterinary drug residue analysis". *Analyst* 127(3): 342-6.
- INE (Instituto Nacional de Estatística) (2006). "Anuário Estatístico de Portugal". Disponível on-line em: http://www.ine.pt/portal/page/portal/PORTAL_INE/Publicacoes?PUBLICACO

- [ESpub_boui=375507&PUBLICACOESmodo=2](#) (última consulta: Julho de 2007).
- JETACAR (Joint Expert Advisory Committee on Antibiotic Resistance) (1999). "The use of antibiotics in food-producing animals: antibiotic-resistant bacteria in animals and humans". Commonwealth Department of Agriculture, Fisheries and Forestry - Australia.
- Kennedy, D.G.; McCracken, R.J.; Cannavan, A. e Hewitt, S.A. (1998). "Use of liquid chromatography-mass spectrometry in the analysis of residues of antibiotics in meat and milk". *Journal of Chromatography A* 812(1-2): 77-98.
- Kirbis, A.; Marinsek, J. e Flaajs, V.C. (2005). "Introduction of the HPLC method for the determination of quinolone residues in various muscle tissues". *Biomedical Chromatography* 19(4): 259-65.
- Koenen-Dierick, K. e De Beer, J.O. (1998). "Optimization of an antibiotic residue screening test, based on inhibition of *Bacillus subtilis* BGA, with experimental design". *Food Additives and Contaminants* 15(5): 528-34.
- Korkela, H. e Pekkanen, T.J. (1977). "The testing of the antibiotic sensitivity of bacteria on an agar medium: The problem of a double zone of inhibition". *Acta pathologica et microbiologica Scandinavica. Section B, Microbiology* 85(2): 174-6.
- Kuhne, M.; Korner, U. e Wenzel, S. (2001). "Tetracycline residues in meat and bone meals. Part 2: the effect of heat treatments on bound tetracycline residues". *Food Additives and Contaminants* 18(7): 593-600.
- Lolo, M.; Pedreira, S.; Miranda, J.M.; Vazquez, B.I.; Franco, C.M.; Cepeda, A. e Fente, C. (2006). "Effect of cooking on enrofloxacin residues in chicken tissue". *Food Additives and Contaminants* 23(10): 988-93.
- Maris, P. e Hurtaud-Pessel, D. (2000). "Stability of veterinary drug residues during storage and preparations". Fougères, AFSSA - Agence Française de Sécurité Sanitaire de Aliments.
- Montagne, L.; Cavaney, F.S.; Hampson, D.J.; Lalles, J.P. e Pluske, J.R. (2004). "Effect of diet composition on postweaning colibacillosis in piglets". *Journal of Animal Science* 82(8): 2364-74.

- NZFSA (New Zealand Food Safety Authority) (2000). "Review of Animal Health Antibiotic Products and their Potential for Contributing to the Development of Antibiotic Resistant Strains of Human Bacterial Pathogens". Grupo Agricultural Compounds and Veterinary Medicines. Disponível on-line em: <http://www.nzfsa.govt.nz/acvm/publications/information-papers/maf-review-process-v2.pdf> (última consulta: Julho de 2007).
- Okerman, L.; Croubels, S.; Cherlet, M.; De Wasch, K.; De Backer, P. e Van Hoof, J. (2004). "Evaluation and establishing the performance of different screening tests for tetracycline residues in animal tissues". *Food Additives and Contaminants* 21(2): 145-53.
- Okerman, L.; De Wasch, K. e Van Hoof, J. (1998a). "Detection of antibiotics in muscle tissue with microbiological inhibition tests: effects of the matrix". *Analyst* 123(11): 2361-5.
- Okerman, L.; van Hoof, J. e Debeuckelaere, W. (1998b). "Evaluation of the European four-plate test as a tool for screening antibiotic residues in meat samples from retail outlets". *Journal of AOAC International* 81(1): 51-6.
- Parks, O.W. (1994). "Stability of sulfaquinoxaline, sulfadimethoxine, and their N4-acetyl derivatives in chicken tissues during frozen storage". *Journal of AOAC International* 77(2): 486-8.
- Pena, A.; Serrano, C.; Reu, C.; Baeta, L.; Calderon, V.; Silveira, I.; Sousa, J.C. e Peixe, L. (2004). "Antibiotic residues in edible tissues and antibiotic resistance of faecal *Escherichia coli* in pigs from Portugal". *Food Additives and Contaminants* 21(8): 749-55.
- Phillips, I.; Casewell, M.; Cox, T.; De Groot, B.; Friis, C.; Jones, R.; Nightingale, C.; Preston, R. e Waddell, J. (2004). "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(1): 28-52.
- Pioletti, M.; Schlunzen, F.; Harms, J.; Zarivach, R.; Gluhmann, M.; Avila, H.; Bashan, A.; Bartels, H.; Auerbach, T.; Jacobi, C.; Hartsch, T.; Yonath, A. e Franceschi, F. (2001). "Crystal structures of complexes of the small ribosomal subunit with tetracycline, edeine and IF3". *Embo Journal* 20(8): 1829-39.
- Price, P. (2005). "Manual for Official Controls - Chapter 05: Residues Meat Instruction", Department of Agriculture and Rural Development - Veterinary

- Public Health Unit. Disponível on-line em: <http://www.dardni.gov.uk/vphu-moc-chapter-05-residues.pdf> (última consulta: Julho de 2007).
- Ragheb, H.S. (1988). "Effect of volume of solution per cylinder on estimation of antibiotic potency in diffusion assay". *Journal - Association of Official Analytical Chemists* 71(5): 1071-4.
- Rose, M.D.; Bygrave, J.; Farrington, W.H. e Shearer, G. (1996). "The effect of cooking on veterinary drug residues in food: 4. Oxytetracycline". *Food Additives and Contaminants* 13(3): 275-86.
- Rose, M.D.; Bygrave, J.; Farrington, W.H. e Shearer, G. (1997). "The effect of cooking on veterinary drug residues in food. Part 8. Benzylpenicillin". *Analyst* 122(10): 1095-9.
- Roselli, M.; Finamore, A.; Britti, M.S.; Bosi, P.; Oswald, I. e Mengheri, E. (2005). "Alternatives to in-feed antibiotics in pigs: Evaluation of probiotics, zinc or organic acids as protective agents for the intestinal mucosa. A comparison of in vitro and in vivo results ". *Animal Research* 54: 203-218.
- Samanidou, V.F.; Nikolaidou, K.I. e Papadoyannis, I.N. (2005). "Development and validation of an HPLC confirmatory method for the determination of tetracycline antibiotics residues in bovine muscle according to the European Union regulation 2002/657/EC". *Journal of Separation Science* 28(17): 2247-58.
- Schwarz, S. e Chaslus-Dancla, E. (2001). "Use of antimicrobials in veterinary medicine and mechanisms of resistance". *Veterinary Research* 32(3-4): 201-25.
- SCMS (Scripps Center for Mass Spectrometry) (2005). "What is Mass Spectrometry?" Disponível on-line em: <http://masspec.scripps.edu/MSHistory/whatisms.php> (última consulta: Julho de 2007).
- Shao, B.; Dong, D.; Wu, Y.; Hu, J.; Meng, J.; Tu, X. e Xu, S. (2005). "Simultaneous determination of 17 sulfonamide residues in porcine meat, kidney and liver by solid-phase extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry". *Analytica Chimica Acta* 546: 174-181.
- Shea, K.M. (2004). "Nontherapeutic use of antimicrobial agents in animal agriculture: implications for pediatrics". *Pediatrics* 114(3): 862-8.

- Sparkman, D.O. (2005). "Mass Spectrometry: A Primer". Disponível on-line em: <http://www.spectroscopynow.com/coi/cda/detail.cda?id=10162&type=EducationFeature&chId=4&page=1> (última consulta: Julho de 2007).
- Thomas, G.K.; Millar, R.G. e Anstis, P.W. (1997). "Stability of sulfonamide antibiotics in spiked pig liver tissue during frozen storage". *Journal of AOAC International* 80(5): 988-95.
- Tollefson, L. e Flynn, W.T. (2002). "Impact of antimicrobial resistance on regulatory policies in veterinary medicine: status report". *AAPS - American Association of Pharmaceutical Scientists* 4(4): E37.
- Toussaint, B.; Chedin, M.; Bordin, G. e Rodriguez, A.R. (2005). "Determination of (fluoro)quinolone antibiotic residues in pig kidney using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. I. Laboratory-validated method". *Journal of Chromatography A* 1088(1-2): 32-9.
- Turnidge, J. (2004). "Antibiotic use in animals--prejudices, perceptions and realities". *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 53(1): 26-7.
- Verdon, E.; Fuselier, R.; Hurtaud-Pessel, D.; Couedor, P.; Cadieu, N. e Laurentie, M. (2000). "Stability of penicillin antibiotic residues in meat during storage. Ampicillin". *Journal of Chromatography A* 882(1-2): 135-43.
- Wang, S.; Zhang, H.Y.; Wang, L.; Duan, Z.J. e Kennedy, I. (2006). "Analysis of sulphonamide residues in edible animal products: a review". *Food Additives and Contaminants* 23(4): 362-84.
- WHO (World Health Organization) (1997). "The Medical Impact of Antimicrobial Use in Food Animals". Report of a WHO Meeting. Berlin, Germany, 13-17 October 1997. Disponível on-line em: <http://whqlibdoc.who.int/hq/1997/WHO EMC ZOO 97.4.pdf> (última consulta: Julho de 2007).
- WHO (World Health Organization) (2001). "Monitoring antimicrobial usage in food animals for the protection of human health". Report of a WHO consultation, Oslo, Norway 10-13 September 2001. Disponível on-line em: http://whqlibdoc.who.int/hq/2002/WHO_CDS_CSR_EPH_2002.11.pdf (última consulta: Julho de 2007).

WHO (World Health Organization) (2004). "WHO Workshop on the containment of antimicrobial Resistance in Europe". Disponível on-line em: http://www.who.int/drugresistance/infosharing/AMR_WS_WERNIGERODE_REPORT_EURO.pdf (última consulta: Julho de 2007).