

Jailson Tavares de Pina

AVALIAÇÃO DO GRAU DA CONTAMINAÇÃO
AMBIENTAL RESULTANTE DA UTILIZAÇÃO DE
FLUOROQUINOLONAS EM DIFERENTES
SUINICULTURAS PORTUGUESAS

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra para a obtenção do grau de Mestre em Saúde Pública sob orientação da Professora Doutora Angelina Lopes Simões Pena e co-orientação da Professora Doutora Celeste de Matos Lino e do Professor Doutor Salvador Manuel Correia Massano Cardoso.

Coimbra

2010

Dedico este trabalho à minha mãe

e à minha esposa.

AGRADECIMENTOS

À Professora Doutora Angelina Lopes Simões Pena, pela oportunidade que me concedeu de poder realizar este trabalho, pelo espírito científico, sentido de responsabilidade e organização, e pelos ensinamentos que sempre tentou transmitir. Por toda a supervisão científica, revisão crítica desta dissertação e por todo o apoio, disponibilizado e amizade que sempre demonstrou, imprescindíveis para a concretização deste trabalho.

À Professora Doutora Celeste Lino, por ter aceite co-orientar este trabalho, pelo rigor científico e pela utilidade das suas recomendações na revisão crítica desta dissertação.

Ao Professor Doutor Salvador Massano Cardoso, por ter aceite co-orientar este trabalho.

A todos os colaboradores do Laboratório de Bromatologia, pela forma amiga, simpática com que me receberam, e pelo apoio prestado durante a execução deste trabalho.

Ao David Saraiva e Sofia Duarte, pela amizade e pelo apoio sempre demonstrados.

Ao Fons Van Genechten, Agnes Dillien, Thierry Mirgaux e Jean Mirgaux pelo apoio e pela amizade.

À Anabela Paula, pela forma amiga e simpática com que me recebeu e ajudou.

A todos agradeço a amizade, paciência e disponibilidade que sempre demonstraram ao longo da execução deste trabalho.

À minha mãe por todo o apoio que tem dado ao longo do meu percurso.

À Sophie Mirgaux, pelo apoio e por ter acreditado em mim.

ABREVIATURAS

ADI.....	Ingestão Diária Admissível
Al	Alumínio
CHMP	Comité para os Produtos da Medicina Humana
CIPRO	Ciprofloxacina
CL	Comatografia Líquida
CIM	Concentração Inibitória Mínima
Ca	Cálcio
CE	Comunidade Europeia
CVMP	Comité para os Produtos da Medicina Veterinária
DANMAP.	Danish Integrated Antimicrobial Resistance Monitoring and Research Programme
DGV	Direcção-Geral de Veterinária
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
EMA	Agência Europeia para a Avaliação de Produtos Medicinais
ENRO	Enrofloxacin
EFSA.....	European Food Safety Authority
ETARs	Estação de Tratamento de Águas Residuais
EUA	Estados Unidos de América
FAO	Food and Agricultural Organization
FDA.....	Food and Drug Administration
FD	Detecção Fluorimétrica
Fe	Ferro
FEDESA	Federação Europeia de Saúde Animal

FQs.....	Fluoroquinolonas
FS	Factor de Segurança
FVE	Federação dos Veterinários da Europa
Gyr-A	Girase A
Gyr-B	Girase B
INFARMED	Autoridade Nacional do Medicamento e Produtos de Saúde
LC-MS	Cromatografia Líquida com Espectrometria de Massa
LMR.....	Limite Máximo de Resíduos
LOQ	Limite de Quantificação
MLs	Macrólidos
MADRP	Ministério da Agricultura, do Desenvolvimento Rural e das Pescas
Mg	Magnésio
MRSA.....	Meticilline-resistant Staphylococcus aureus
MS.....	Espectroscopia de Massa
NOEL	Dose sem Efeito Observável
NOR	Norfloxacina
OIE	Organização Mundial de Saúde Animal
OMS	Organização Mundial de Saúde
PC	Promotores de Crescimento
SARA	Sarafloxacina
SAs	Sulfonamidas
SPE.....	Extracção em Fase Sólida
TCs	Tetraciclínas
U.E	União Europeia
WHO.....	Organização Mundial de Saúde
WTO.....	World Trade Organization

ABSTRACT

The presence of antibiotic residues in environmental samples, in particular in piggeries, is an issue of growing concern worldwide due to the broad use of antibiotics.

The occurrence data and fate of four FQs, namely norfloxacin (NOR), ciprofloxacin (CIPRO), enrofloxacin (ENRO) and sarafloxacin (SARA) were obtained in environmental waters, collected from three types of piggeries: intensive, extensive and probiotic.

The optimized and validated analytical methods were successfully applied to 30 environmental waters samples.

The total contamination frequency was 50% and the intensive piggery contained at least one FQ antibiotic. The extensive and probiotic piggeries did not present any of the analyzed antibiotics. The FQ most often detected was ENRO in 46.7% of the samples, and CIPRO, its degradation product, and SARA were present in 6.7% of the samples. None of the analyzed samples contained NOR.

RESUMO

O interesse da determinação de antibióticos em amostras ambientais, e concretamente em suiniculturas, prende-se sobretudo pela grande quantidade de antibióticos consumidos neste tipo de exploração pecuária e no seu impacte na saúde pública e ambiental.

Neste trabalho foram obtidos dados relativos à ocorrência e distribuição de fluoroquinolonas (FQs), principalmente a enrofloxacina (ENRO) e a sarafloxacina (SARA) em águas ambientais provenientes de três tipos de suiniculturas em Portugal, intensiva, extensiva e probiótica.

As metodologias analíticas desenvolvidas e validadas foram aplicadas na análise de amostras de águas ambientais provenientes de suiniculturas.

Das 30 amostras analisadas 50% estavam contaminadas com FQs, e eram originárias de explorações intensivas. De entre as amostras positivas, 46,7% apresentavam resíduos de ENRO e 6,7% para a CIPRO e SARA. Em nenhuma das amostras foi detectada a presença de NOR.

TRABALHOS DESENVOLVIDOS NO DE CURSO DA PREPARAÇÃO DESTA DISSERTAÇÃO

Comunicações

Em Painel

- ✦ A. Pena., J. Pina., M. L. Meisel., C. M. Lino. Determination of fluoroquinolone antibiotics in soil samples using a methodology based on combination of solid-phase extraction and liquid chromatography with fluorescence detection. **7th Iberic and 4th Ibero-American Congress of Environmental Toxicology and Contamination. CICTA 2008** - book of abstracts p. 35, March 10-12, New University of Lisbon.
- ✦ A. Pena., J. Pina., C. Lino. Determination of fluoroquinolone antibiotics in swine wastewater by liquid chromatography-fluorescence detection. **14th Meeting of analytical chemistry** (October 7- 11 2007, João Pessoa, Brasil, CD Rom).

Oral

- ✦ A. Pena., J. Pina., M.L. Meisel., C.M. Lino. Determination of fluoroquinolone antibiotics in an outdoor swine production system by LC-FD using a monolithic column. **5th National Meeting of Chromatography. p. 59-60. CO.8.** (December 12-14, 2007, University of Aveiro, Portugal).

Publicações

Peer review journals

- ✦ A. Pena., J. Pina., L.J.G. Silva., L. Meisel and C.M. Lino. 2010. Fluoroquinolone antibiotics determination in piggeries environmental waters. *Journal of Environmental Monitoring* 12, 642-646. (IF= 2.25).
- ✦ Pena A., Pina J., Silva L.J.G., Lino C.M., Meisel L. 2010. Evaluation of the environmental impact of antibiotic usage in intensive, extensive and probiotic piggeries in Portugal. *Chemosphere*. Up for publication.

ÍNDICE GERAL

AGRADECIMENTOS	I
ABREVIATURAS	III
ABSTRACT	V
RESUMO	VI
TRABALHOS DESENVOLVIDOS NO DECURSO DA PREPARAÇÃO DESTA DISSERTAÇÃO	VII
ÍNDICE GERAL	IX
ÍNDICE DE FIGURAS, QUADROS, TABELAS E GRÁFICOS	XIII
OBJECTIVOS	XVII

Capítulo I – Parte Teórica

I.1. INTRODUÇÃO	3
I.2. LEGISLAÇÃO RELATIVA À UTILIZAÇÃO DE MEDICAMENTOS VETERINÁRIO	7
I.3. UTILIZAÇÃO DE ANTIBIÓTICOS EM MEDICINA VETERINÁRIA.....	9
I.3.1. USO TERAPÊUTICO E PROFILÁTICO	9
I.3.2. USO COMO PROMOTORES DE CRESCIMENTO	12
I.3.3. CONSUMO	12
I.4. CONSEQUÊNCIA DA UTILIZAÇÃO DE ANTIBIÓTICOS EM VETERINÁRIA	13
I.4.1. AVALIAÇÃO DA SEGURANÇA DOS RESÍDUOS	13
I.4.1.1. DOSE SEM EFEITO OBSERVÁVEL	14
I.4.1.2. FACTOR DE SEGURANÇA.....	14
I.4.1.3. INGESTÃO DIÁRIA ADMISSÍVEL (ADI)	15
I.4.1.4. LIMITE MÁXIMO DE RESÍDUOS.....	15

I.5. RESÍDUOS DE MEDICAMENTOS NO AMBIENTE.....	16
I.5.1. MONITORIZAÇÃO DE RESÍDUOS DE ANTIBIÓTICOS NO AMBIENTE....	18
I.6. RESISTÊNCIAS.....	20
I.6.1. MECANISMOS DE RESISTÊNCIA BACTERIANA.....	20
I.6.2. AQUISIÇÃO E TRANSFERÊNCIA DE RESISTÊNCIA	21
I.6.3. A MONITORIZAÇÃO DE RESISTÊNCIAS ANTIMICROBIANAS NA UE	24
I.7. ANTIBIÓTICOS DO GRUPO DAS FLUOROQUINOLONAS	25
I.7.1. PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS	28
I.7.2. MECANISMOS DE ACÇÃO DAS FQS	30
I.7.2.1. MECANISMOS DE RESISTÊNCIA ÀS QUINOLONAS	30
I.8. METODOLOGIA ANALÍTICA	34
I.8.1. INTRODUÇÃO	34
I.8.2. AMOSTRAGEM E PREPARAÇÃO DE AMOSTRA.....	35
I.8.3. EXTRACÇÃO E PURIFICAÇÃO	35
I.8.4. MÉTODOS FÍSICO-QUÍMICOS.....	37
I.8.4.1. CROMATOGRAFIA LÍQUIDA	37

Capítulo II – Parte Experimental

II.1. MATERIAIS E MÉTODOS	51
II.1.1. REAGENTES E SOLUÇÕES	51
II.1.1.1. REAGENTES.....	51
II.1.1.2. SOLUÇÕES	51
II.1.1.2.1. SOLUÇÕES PADRÃO.....	52
II.1.1.2.2. FASE MÓVEL	52
II.1.2 MATERIAIS	52
II.1.3. EQUIPAMENTO.....	53
II.1.4. CONDIÇÕES CROMATOGRÁFICAS	54
II.1.4.1. DETECÇÃO FLUORIMÉTRICA.....	54
II.1.4.2. AMOSTRAGEM.....	55
II.1.6. PRÉ-TRATAMENTO E PURIFICAÇÃO DAS AMOSTRAS	55
II.1.6.1. ÁGUAS DE CONSUMO E ÁGUAS DE RIO	55
II.1.6.2. ÁGUAS RESIDUAIS	56
II.2. VALIDAÇÃO DAS METODOLOGIAS ANALÍTICAS	58
II.2.1 LINEARIDADE.....	58
II.2.2. EXACTIDÃO E PRECISÃO	58
II.2.3. SELECTIVIDADE	59
II.2.4. AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE DAS FQS.....	60
II.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	60

II.3.1 OPTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES CROMATOGRÁFICAS.....	60
II.3.2. VALIDAÇÃO DAS CONDIÇÕES CROMATOGRÁFICAS.....	62
II.3.2.1. TEMPOS DE RETENÇÃO.....	62
II.3.2.2. LINEARIDADE	63
II.3.2.3. LIMITE DE QUANTIFICAÇÃO.....	70
II.3.2.4. EXACTIDÃO E PRECISÃO.....	71
II.3.3. ESTABILIDADE DAS FQS	74
II.3.4. NÍVEIS DE FQs NAS AMOSTRAS	74
II.3.4.1. AMOSTRAS DE ÁGUAS DOS TRÊS TIPOS DE SUINICULTURAS	74
II.3.4.2. AMOSTRAS DE DIFERENTES TIPOS DE ÁGUAS RECOLHIDAS EM SUINICULTURAS DE PRODUÇÃO INTENSIVA E AMBIENTE CIRCUNDANTE	75
II.4. CONCLUSÕES	78
BIBLIOGRAFIA	81

ÍNDICE DE FIGURAS, QUADROS, TABELAS E GRÁFICOS

Tabela I.1. Volume de vendas por grupos de antibióticos na CE e Suíça em 1997 (toneladas de princípio activo)	10
Tabela I.2. Vendas de (Fluoro) quinolonas e produção de carnes em alguns países membros da União Europeia.....	11
Figura I.1. Esquema representativo das vias de entrada dos fármacos no ambiente.....	18
Figura I.2. Esquema dos principais mecanismos de resistência bacteriana.....	21
Figura I.3. Estrutura química de ácido nalidíxico.....	25
Figura I.4. Estrutura química das fluoroquinolonas	28
Tabela I.3. Fórmula química e valores de Pka1 e Pka2 para as FQs em estudo.....	29
Tabela I.4. Massa molecular, ponto de fusão e tempo de $\frac{1}{2}$ vida das diferentes FQs em estudo.....	29
Tabela I.5. Proporção da resistência a quinolonas entre <i>Salmonelas</i> e <i>Campylobacter</i> provenientes de animais produtores de carnes.....	32
Tabela I.6. Proporção da resistência à <i>E. Coli</i> a quinolonas e FQs em amostras de suínos e frangos em alguns países membros da U.E.....	33
Tabela I.6. Metodologias analíticas para a monitorização de resíduos de FQs em amostras ambientais.....	39
Figura II.1. Esquemas de purificação das metodologias analíticas utilizadas.....	57
Figura II.2. Cromatograma de um ensaio em branco proveniente de uma suinicultura intensiva.....	59
Figura II.3. Cromatograma de uma solução padrão de NOR, CIPRO, ENRO e SARA, obtido pelo método estabelecido.....	61
Tabela II.1. Precisão intra-dia e desvio padrão (DP) do tempo de retenção da NOR.....	62

Tabela II.2. Precisão intra-dia e desvio padrão (DP) do tempo de retenção da CIPRO.....	62
Tabela II.3. Precisão intra-dia e desvio padrão (DP) do tempo de retenção da ENRO.....	63
Tabela II.4. Precisão intra-dia e desvio padrão (DP) do tempo de retenção da SARA.....	63
Tabela II.5. Concentração dos antibióticos estudados nos ensaios de linearidade e respectivo coeficiente de correlação ao longo de três dias.....	64
Gráfico II.1 e II.2. Curvas de calibração das soluções padrão para o dia 1 relativas à NOR e CIPRO.....	65
Gráfico II.3 e II.4. Curvas de calibração das soluções padrão para o dia 1 relativas à ENRO e SARA.....	66
Gráfico II.5 e II.6. Curvas de calibração das soluções padrão para o dia 2 relativas à NOR e CIPRO.....	67
Gráfico II.7 e II.8. Curvas de calibração das soluções padrão para o dia 2 relativas à ENRO e SARA.....	68
Gráfico II.9 e II.10. Curvas de calibração das soluções padrão para o dia 3 relativas à NOR e CIPRO.	69
Gráfico II.11 e II.12. Curvas de calibração das soluções padrão para o dia 3 relativas à ENRO e SARA.....	70
Figura II.4. Cromatograma de um ensaio de fortificação de uma amostra negativa proveniente da suinicultura extensiva.....	71
Tabela II.6. Valores relativos à exactidão e precisão obtidos em amostras de águas de consumo e de rio.....	73

Tabela II. 7. Valores relativos à exactidão e precisão obtidos em amostras nas amostras de águas residuais.....73

Tabela II.8. Frequência (%), variação ($\mu\text{g/L}$) e valores médios \pm DP ($\mu\text{g/L}$) de FQs em amostras de águas de suiniculturas.....77

Tabela II.9. Concentrações ($\mu\text{g/L}$) de FQs em amostras de águas.....78

Objectivos

O trabalho desenvolvido nesta tese de mestrado visa determinar a ocorrência de antibióticos do grupo das fluoroquinolonas (FQs), nomeadamente a norfloxacin (NOR), ciprofloxacina (CIPRO), enrofloxacin (ENRO) e sarafloxacin (SARA) em amostras de águas residuais provenientes de suiniculturas.

Teve também como objectivo avaliar a extensão da utilização destes compostos na produção de suínos e estimar a contaminação ambiental em três tipos de suiniculturas: intensiva, extensiva e probiótica.

Desta forma pretendeu-se:

- ❖ Desenvolver e validar metodologias analíticas para a determinação e quantificação de FQs, mais especificamente para a NOR, CIPRO, ENRO e SARA em amostras de águas provenientes de suiniculturas portuguesas.
- ❖ Determinar e quantificar a presença da NOR, CIPRO, ENRO e SARA em amostras de águas residuais e superficiais, recolhidas em três tipos de suiniculturas.
- ❖ Comparar os resultados obtidos com o tipo de produção: intensiva, extensiva e probiótica
- ❖ Comparar os resultados obtidos com os existentes em outros países.

Capítulo I

Introdução Teórica

I.1. Introdução

Os medicamentos são uma classe emergente de contaminantes ambientais largamente utilizados quer na medicina humana, quer na medicina veterinária (Halling-Sorensen *et al.*, 1998; Daughton e Ternes 1999; Kummerer, 2001; Diaz-Cruz *et al.*, 2003). A utilização de medicamentos na produção de animais destinados ao consumo humano é uma prática que remonta à 2.^a metade do século XX coincidindo com um período no qual se iniciaram profundas alterações nesta actividade. A produção de animais de forma intensiva em sistemas industriais de média ou grande dimensão vem ao longo do tempo substituir o sistema de pequenas explorações do tipo familiar.

Na moderna produção pecuária, observou-se um aumento na utilização de antibióticos, com o objectivo de dar resposta efectiva às necessidades alimentares das populações, e a manutenção de um elevado nível de produção e de protecção dos animais das doenças infecciosas que os atingem.

Após a administração, uma parte significativa é eliminada e libertada para o ambiente. Segundo Mulroy, 50 a 90 % dos medicamentos administrados são excretados na sua forma activa e libertados para o ambiente (Mulroy, 2003).

A utilização de antibióticos em veterinária, é uma área de preocupação crescente e muito importante devido ao seu potencial impacto na saúde humana.

Os antibióticos em veterinária são usados na terapêutica de infecções bacterianas e como agentes profiláticos para evitar a disseminação de doenças infecciosas nas explorações.

A utilização de antibióticos, como promotores de crescimento, remota a 1940, quando foi observado que os animais alimentados com subprodutos de fermentação apresentavam um índice de crescimento mais rápido do que aqueles em que a alimentação não continha estes produtos (Phillips *et al.*, 2004).

Nas últimas décadas, assistiu-se a um aumento do consumo de antibióticos em veterinária, que suscitou uma preocupação crescente sobre os possíveis efeitos adversos, na saúde humana e no ambiente. Consequentemente, na UE assistiu-se à revogação da sua utilização, como promotor de crescimento. A Suécia em 1986, e só passado 20 anos, a 1 de Janeiro de 2006, foi banida em todos os países da UE.

O relatório da Organização Mundial de Saúde de 1998 (OMS) descreve o aumento da ocorrência de bactérias resistentes e a sua rápida propagação na população mundial como um dos principal problema de saúde pública do século XXI.

Neste âmbito é de especial preocupação a emergência e a propagação de resistência aos antibióticos em agentes patogénicos, quer directamente, quer indirectamente após transferência de material genético de microrganismos não patogénicos para microrganismos patogénicos, e a eficácia desses antibióticos na terapêutica humana (Zahn *et al.*, 2001; Chapin *et al.*, 2005; OIDE, 2000; Gilchrist *et al.*, 2007).

As evidências científicas até ao momento sugerem fortemente a existência de uma associação entre o uso de antibióticos, na produção animal, e o aumento da emergência de estirpes bacterianas resistentes, na população humana. A transferência das bactérias resistentes dos animais até os humanos pode ocorrer, através do contacto directo, incluindo exposição ocupacional dos humanos com os animais ou indirectamente via cadeia alimentar (Klare *et al.*, 1995; Gilchrist *et al.*, 2007).

Esta questão adquire uma maior relevância na medida em que praticamente todos os antibióticos usados em veterinária são estruturalmente relacionados com os de uso humano, o que favorece fenómenos de co-resistências e de resistência cruzada (EMEA, 1999; OIE, 2007, 2008).

As fluoroquinolonas (FQs), principalmente a enrofloxacina (ENRO) e a sarafloxacina (SARA) são extensamente utilizadas como agentes terapêuticos e profiláticos em suínos. A sua larga utilização conduziu à emergência de microrganismos patogénicos para o homem resistentes às FQs, como a *Salmonella typhymyrum* DT 194 resistentes às FQs e a *Campilobacter spp* resistente à ciprofloxacina (CIPRO) (Engberg *et al.*, 2001).

Um dos casos mais exemplificativos do uso inapropriado dos antibióticos em veterinária e o seu contributo para o aumento das resistências bacterianas é a resistência às FQs em *Campylobacter spp* e *Salmonella spp*. De acordo com Phillips *et al.* (2004), a resistência à CIPRO em isolados de infecções humanas era extremamente baixa nos anos 80, no entanto, com a introdução da ENRO na produção animal, na década de 90, foram sendo progressivamente isoladas bactérias resistentes às quinolonas quer nos animais quer nos humanos.

A presença de resíduos de antibióticos e seus metabolitos ou produtos de transformação, no ambiente encontra-se amplamente documentada na literatura científica em águas residuais, águas de rios e seus efluentes, águas marinhas, solos, sedimentos, estrumes e outras amostras ambientais (Christian *et al.*, 2003; Kolpin *et al.*, 2004; Heberer, 2002; Jorgensen e Halling-Sorensen, 2000; Hamscher e Hartung, 2008; Kolpin *et al.*, 2002; Turiel *et al.*, 2003; Renew e Huang, 2004; Turiel *et al.*, 2005; Vieno *et al.*, 2006; Pena *et al.*, 2007; Seifrtrová *et al.*, 2008).

Os medicamentos têm a capacidade de bioacumulação e interagem com o meio ambiente, provocando efeitos nefastos nos ecossistemas aquáticos e/ou terrestres e mesmo no Homem, uma vez que estes foram concebidos para exercerem actividade biológica. Em alguns dos casos os efeitos ecotoxicológicos poderão ser previsíveis, como por exemplo, a emergência de resistências aos antibióticos e toxicidade directa sobre os organismos aquáticos (Takai *et al.*, 1998; Hamscher *et al.*, 2003; Chapin *et al.*, 2005; Gilchrist *et al.*, 2007). Mas os efeitos de uma exposição contínua são ainda desconhecidos, uma vez que os estudos são insuficientes para determinar o risco e estabelecer medidas para o seu controlo.

O impacte ambiental que resulta da presença de resíduos de antibióticos constitui uma preocupação crescente de saúde pública a nível mundial. Para se poder avaliar correctamente o risco ambiental dos antibióticos é necessário saber quais as principais fontes poluentes e a sua ocorrência no ambiente. Nas explorações de produção intensiva de animais (CAFOs) verifica-se uma maior utilização de medicamentos de uso veterinário, o que conduz à contaminação directa do meio aquífero, e indirecta através da utilização do estrume dos animais medicados, como fertilizante em campos agrícolas, e lixiviação dos resíduos (Kummerer, 2003; Hamscher *et al.*, 2003; Gilchrist *et al.*, 2007).

O interesse da determinação de antibióticos em amostras ambientais, e concretamente em suiniculturas, prende-se sobretudo pela grande quantidade de antibióticos consumidos neste tipo de exploração pecuária e o seu impacte na saúde pública e ambiental.

Para a avaliação do grau de contaminação ambiental é imprescindível a implementação e desenvolvimento de metodologias analíticas que permitam a avaliação e a monitorização dos resíduos de antibióticos nas amostras ambientais.

Consequentemente, o trabalho apresentado reporta a temática da contaminação ambiental, mais concretamente no que respeita à presença de resíduos de FQs em amostras ambientais de três tipos de suíniculturas em Portugal.

Numa primeira fase efectou-se uma revisão teórica sobre a contaminação ambiental e a monitorização de resíduos de antibióticos, em particular as FQs norfloxacina (NOR), CIPRO, ENRO e SARA, e o seu efeito na saúde pública. Numa segunda fase é descrita a parte experimental, nomeadamente o desenvolvimento e validação de metodologias analíticas por cromatografia líquida (LC) com detecção fluorimétrica (FD) para a sua determinação e quantificação em amostras de suíniculturas.

O objectivo primordial deste presente estudo é a avaliação da presença de resíduos de FQs e consiste em três fases:

1 – A primeira fase consistirá na implementação de metodologias analíticas exactas, sensíveis, robustas e simples, para a determinação sensível e selectiva de NOR, CIPRO, ENRO e SARA por LC com FD, em amostras de águas provenientes de suíniculturas.

2 – A segunda fase constará da aplicação das metodologias analíticas na monitorização da contaminação por FQs em amostras de águas recolhidas em três tipos de suíniculturas em Portugal: suíniculturas de produção intensiva (CAFOs), e os sistemas alternativos de produção extensiva (*outdoor*) e probiótica.

3 – Numa última fase, o projecto contribuirá para a avaliação do grau de contaminação nos três tipos de águas provenientes de suíniculturas anteriormente explicitados, de modo a avaliar as repercussões ambientais da presença e acumulação de antibióticos no ambiente.

I.2. Legislação relativa à utilização do medicamento veterinário

O medicamento veterinário é toda a substância, ou associação de substâncias, apresentada como possuindo propriedades curativas ou preventivas de doenças em animais ou dos seus sintomas, ou que possa ser utilizada ou administrada no animal com vista a estabelecer um diagnóstico médico-veterinário ou, exercendo uma acção farmacológica, imunológica ou metabólica, restaurar, corrigir ou modificar funções fisiológicas” (D.L. n.º 148/2008 de 29 de Julho, CAPÍTULO I, Artigo 3.º, alínea a).

É importante fazer uma análise da evolução histórica da regulamentação do medicamento veterinário para uma melhor compreensão das preocupações suscitadas a nível da saúde pública. A criação de um quadro normativo e a supervisão profissional são essenciais para a utilização racional do medicamento veterinário.

O D.L. n.º 184/97, de 26 de Julho, regulamentou a introdução e dispensa do medicamento veterinário, tutelado pelo Ministério da Saúde. É definido no seu preâmbulo como um “verdadeiro estatuto do medicamento veterinário”, por se considerar que “a criação de um quadro normativo claro e inequívoco é condição necessária ao elo fundamental da garantia de qualidade, segurança e eficácia dos medicamentos veterinários” para a salvaguarda da saúde pública, da saúde animal e da defesa do ambiente.

Concretamente, no seu artigo 61º estão especificadas as condições, nas quais é absolutamente necessário o uso de uma prescrição veterinária para a dispensa de um medicamento veterinário.

Com o D.L. n.º 11/2007, de 27 de Fevereiro, as competências em matéria de Medicamentos Veterinários Farmacológicos outrora atribuídas à Autoridade Nacional do Medicamento e dos Produtos de Saúde (INFARMED) passa a ser competência integral da Direcção Geral de Veterinária (DGV).

Nos termos do disposto no n.º 1 do artigo 18.º da actual lei, que transpõe as directivas comunitárias sobre esta matéria, prevê-se que, as entidades que solicitem ou sejam titulares de uma Autorização de Introdução dos medicamentos veterinários (AIMs) devem ter ao seu serviço, com carácter permanente e contínuo, um médico veterinário como director técnico veterinário em vez de um farmacêutico.

Do ponto de vista farmacêutico, não se deve esquecer que o medicamento de uso humano é similar ao medicamento de uso veterinário, com níveis de exigência da mesma ordem sustentado por um Dossier do Medicamento.

De acordo com o Decreto-Lei n.º148/2008 de 29 de Julho, os medicamentos veterinários são um bem público e recursos cruciais para a defesa da saúde e do bem estar dos animais e para a protecção da saúde pública, sendo igualmente um instrumento de salvaguarda das produções animais, com impacte considerável na economia das explorações agropecuárias e alimentares.

Em prol da defesa da saúde e bem-estar dos animais e salvaguarda da saúde pública e os interesses dos agentes económicos e do país em geral, justificam algumas medidas que se encontram neste diploma. Das medidas que vigoram neste diploma consta a aplicação de um plano a nível nacional que controla a utilização de medicamentos destinados a animais de exploração, garantindo deste modo a verificação das condições de utilização dos medicamentos e o tratamento indevido ou ilegal de animais.

Nos últimos anos, a Agência Europeia para a Avaliação de Produtos Medicinais (EMA) tem vindo a discutir de forma intensiva a necessidade de se avaliar o impacte ambiental dos novos medicamentos que vão sendo introduzidos no mercado. Várias directivas foram elaboradas recentemente pelo Comité para os Produtos da Medicina Veterinária (CVMP) em colaboração com o Comité para os Produtos da Medicina Humana (CHMP) da EMA que tornam obrigatória a avaliação de impacto ambiental nos estudos a incluir no relatório de pedido de aprovação de introdução de novos medicamentos no mercado (Carvalho, 2006).

I.3. A utilização de antibióticos em medicina veterinária

O século XX foi marcado por profundas alterações no campo da produção animal, onde o sistema de pequenas explorações do tipo familiar foi substituído ao longo do tempo por sistemas industriais de criação intensiva de animais com recurso a uma maior utilização de medicamentos, nomeadamente dos antibióticos.

Se, por um lado, a utilização de antibióticos permite tratar os animais das doenças infecciosas, e deste modo permitindo também, que animais saudáveis entrem na cadeia alimentar, esta prática também levanta algumas preocupações relacionadas com a saúde pública, uma delas é a descrição de bactérias resistentes aos antibióticos.

Os antibióticos são substâncias naturais produzidas por microrganismos, que destroem ou impedem o desenvolvimento de outros microrganismos, enquanto os agentes quimioterápicos são substâncias de síntese com as mesmas propriedades. O termo agente antimicrobiano foi definido como sendo qualquer substância de origem natural, semi-sintética ou sintética capaz de destruir um microrganismo. Para simplificar, nesta dissertação, e de acordo com o Parecer do Comité Económico e Social sobre “A resistência aos antibióticos: uma ameaça para a saúde pública”, os termos antibióticos e agentes antimicrobianos serão utilizados como sinónimos.

I.3.1. Uso terapêutico e profilático

Os antibióticos são utilizados como agentes terapêuticos e profiláticos de infeções provocadas por bactérias patogénicas.

Nas explorações pecuárias é praticamente impossível tratar individualmente o animal doente com uma infeção bacteriana contagiosa, pelo que só se pode recorrer à administração de antibióticos, com fins terapêuticos e profiláticos, a todos os animais, a fim de evitar que uma epidemia se alastre em toda a exploração pecuária.

As FQs são agentes antimicrobianos muito potentes, activos contra uma larga variedade de organismos patogénicos e de fácil distribuição no organismo depois de administrados. As FQs são administradas através de uma grande variedade de vias,

comprimidos via oral e em águas de consumo, subcutânea e intramuscular e em geral são bem tolerados pelos animais. Este facto explica o grande uso destes antibacterianos na medicina veterinária.

Dados recentes sobre a utilização de FQs em veterinária, em diferentes países da UE, estão representados na tabela I.1. e I.2.

Tabela I.1. Volume de vendas por grupos de antibióticos na CE e Suécia em 1997 (toneladas de princípio activo) (Botman, FEDESA, 1998)

Grupo Terapêutico	Vendas	Factor ⁽¹⁾ extrapolação	de	Total Estimado (% do Total)
Penicilinas	161	2,00		322 (9)
Tetraciclina	483	4,75		2294 (66)
Macrólidos	319	1,33		424 (12)
Aminoglicosídeos	92	1,70		154 (4)
Fluoroquinolonas	32	1,33		43 (1)
Trimetoprim/Sulfonamidas	50	1,50		75 (2)
Outros medicamentos	91	2,00		182 (5)
Subtotal				
Medicamentos	1228	2,85		3494 (100)
Promotores crescimento	1454	1,1		1599
Total	2682	1,9		5093

Tabela I.2. Vendas de (Fluoro) quinolonas e produção de carnes em alguns países membros da Europa (EMEA/CVMP/SAGAM/184651/2005)

Países	Vendas de agentes Antimicrobianos		Produção de carnes (toneladas abatidas)			
	Qs	FQs	Bovina	Suína	Aves	Soma de Produção
	República Checa	0.8	1	103775	409102	215802
Denamarca	0.1	0.1	147600	1762000	199994	2109594
Finlândia	< 0.1 ^b	< 0.1	95830	193222	83730	372782
França	3.6 ^b	20.7	1631000	2321000	2010700	5962700
Holanda	0.3 ^c	5.0 ^b	364000	1250000	564000	2178000
Portugal	3.0	3.8	118524	315141	229335	663000
Suécia	0.2 ^b	0.2	136300	287500	99850	523650
Reino Unido	1.4 ^b	1.4	687000	690000	1569987	2946987

^b Incluindo cães e gatos

^c apenas frangos

Fazendo uma breve análise da tabela acima ilustrada conclui-se de que existem diferenças claras do padrão do consumo das FQs em diferente países membros da UE. Portugal aparece entre os países onde o consumo de FQs é maior, ocupando o terceiro lugar, só ultrapassado pela França e pela Holanda cujos valores incluem a utilização em animais de estimação, e para valores de produção de carne muito superiores.

Até 2005, e de acordo com a EMEA, não havia um protocolo harmonizado para a utilização prudente das FQs em animais nos diferentes estados membros da UE. No entanto é necessária uma precaução especial na utilização de FQs em veterinária (Hamscher e Hartung, 2008).

I.3.2. Uso como promotores de crescimento

A administração de antibióticos melhora a produtividade animal, dado que conduza um aumento do ganho de peso e do índice de conversão alimentar (Neto *et al.*, 2001). O índice de conversão alimentar, consiste na relação entre o peso do alimento consumido e o ganho do peso que este provoca no animal, e cujo valor é de modo geral de aproximadamente 2. Após a administração de antibióticos é de cerca de 4 a 5% para os suínos (Corpet, 1998).

A primeira controvérsia sobre a utilização de antibióticos como promotores de crescimento teve lugar no Reino Unido, em 1969, com o relatório Swann (Swann, 1969). Este recomendou que os antibióticos utilizados na terapêutica humana não deveriam ser usados em veterinária, como promotores de crescimento, uma vez que as bactérias patogénicas resistentes existentes nos alimentos, de origem animal, podem contaminar o Homem.

Nas últimas décadas, na UE assistiu-se a uma progressiva revogação da autorização dos antibióticos como promotores de crescimento. A Suécia proibiu o seu uso em 1986, e só passado 20 anos, a 1 de Janeiro de 2006, foi banido em todos os países da UE.

I.3.3. Consumo

Estima-se que o consumo mundial dos antibióticos situa-se entre 100000 e 200000 toneladas por ano (Kummerer, 2003).

De acordo com a FEDESA, em 1997, na Europa foram consumidas 10200 toneladas de antibióticos (como princípios activos puros) dos quais 48% em medicina veterinária e 52% em medicina humana (FEDESA, 1997). Entre os antibióticos utilizados em veterinária, 3500 toneladas (cerca de 69%) foram aplicados com fins terapêuticos e 1600 toneladas como promotores de crescimento.

Segundo dados dinamarqueses entre 2006 e 2007, houve um aumento no consumo de antibióticos na produção animal de 115,2 toneladas em 2006 para 121,1 toneladas em 2007. Os antibióticos usados em suínos compreendiam 80% do total do consumo, enquanto aqueles usados em bovinos, aves de capoeira e na aquicultura são responsáveis por 12%, 0,5% e 3% respectivamente (DANMAP, 2007).

De acordo com os dados publicados em 2007 pelo Infarmed, verificou-se que houve um decréscimo de cerca de 45% na comercialização de antibióticos destinados a animais de produção, no período compreendido entre 2004 e 2006 (INFARMED, 2007).

I.4. Consequências da utilização de antibióticos em veterinária

I.4.1. Avaliação da segurança dos resíduos

Na avaliação da Segurança dos Resíduos, a metodologia estabelecida segundo a OMS e FAO (WHO/FAO, 1995) tem em conta diversos aspectos, tais como: as características farmacocinéticas, os efeitos teratogénicos, a toxicidade da dose única, a toxicidade da dose repetida, os efeitos mutagénicos, os efeitos carcinogénicos e a imunotoxicidade.

O número de estudos e a extensão dos mesmos tem em consideração os possíveis efeitos tóxicos para o homem dos compostos em estudo.

Para os antibióticos, tem ainda em consideração os possíveis riscos microbiológicos sobre a flora intestinal humana e, também, os possíveis efeitos dos microrganismos usados no processamento dos alimentos.

A apreciação da toxicidade dos resíduos é baseada em estudos toxicológicos efectuados em animais de laboratório através de ensaios de ingestão oral.

É verdade, que com o desenvolvimento de metodologias analíticas mais sensíveis, é possível detectar concentrações cada vez menores de resíduos de medicamentos e consequentemente, os limites máximos de resíduos permitidos (LMR) têm vindo continuamente a baixar. Estes limites são calculados, tendo por base vários factores como: nível sem efeito (NOEL), a ingestão diária aceitável (ADI) e o factor de segurança (FS) (Pena et al., 2000).

I.4.1.1. Dose sem efeito observável (NOEL)

A NOEL é a dose mais elevada que, administrada ao animal de experiência mais sensível, não produz efeitos tóxicos observáveis (European Consultation Conference on the Availability of Veterinary Medical Products- Workshop 1 Discussion document, 1999).

$$\text{NOEL} = \frac{C \times I}{W}$$

Em que :

C – Concentração em mg/kg ou mg/L de alimento contaminado

I – Ingestão diária em mg/kg ou mg/L

W – Peso do animal em kg

Para os antibióticos, o eventual risco microbiológico é avaliado segundo uma metodologia idêntica à anterior, baseada em modelos experimentais *in vitro* ou *in vivo* a partir dos quais se determina o NOMEL (dose sem efeito microbiológico observável) (European Consultation Conference on the Availability of Veterinary Medical Products- Workshop 1 Discussion document, 1999).

I.4.1.2. Factor de segurança

A maior incerteza nos ensaios de toxicidade reside na extrapolação dos resultados do animal de experiência para o homem, e por isso, são aplicados factores de segurança na determinação das doses diárias admissíveis.

Ao aplicar-se este factor, presume-se que o ser humano é dez vezes mais susceptível que o animal de ensaio, e que a sensibilidade da espécie humana varia num factor de dez, sendo aplicado geralmente um factor de segurança de 100, embora possa variar entre 100 e 1000, com base no resultado dos estudos de toxicidade da substância activa. Quando são observados efeitos teratogénicos, utiliza-se um factor de segurança de 1000 (Dixon *et al.*, 1993).

I.4.1.3. Ingestão diária admissível (ADI)

A ADI (Acceptable Daily Intake), constitui uma estimativa da quantidade de resíduos, expressa em $\mu\text{g}/\text{Kg}$ ou mg/kg de peso corporal, susceptível de ser ingerida diariamente e durante toda a vida, sem desenvolver riscos significativos para a saúde humana (Brynes *et al.*, 1996). A ADI é calculada a partir do valor de NOEL e do factor de segurança, através da seguinte fórmula:

$$\text{ADI (mg/kg/dia)} = \frac{\text{NOEL}}{\text{FS}}$$

Os riscos microbiológicos dos resíduos de antimicrobianos são avaliados através do estabelecimento da ADI microbiológica. No seu cálculo utiliza-se os valores da concentração mínima inibitória para a espécie bacteriana predominante e mais sensível (anaeróbios) da flora intestinal do homem (European Consultation Conference on the Availability of Veterinary Medical Products- Workshop 1 Discussion document, 1999).

I.4.1.4. Limite máximo de resíduos

O nível máximo de resíduos aceitável e mais precisamente nos produtos de origem animal é um conceito biológico baseado em diversos factores e os potenciais efeitos adversos dos resíduos podem ser divididos em 3 categorias: efeitos toxicológicos, efeitos microbiológicos e efeitos imunológicos.

É interessante notar ainda que tanto o armazenamento no frio como o cozinhar, não minimizam nem destroem os resíduos de antibióticos nos produtos. Por isso é necessário frisar que a única maneira de evitar resíduos é a de respeitar estritamente os conselhos do intervalo de confiança e principalmente o uso prudente dos mesmos (Pena *et al.*, 2000).

Em função destes parâmetros e dos estudos farmacocinéticos são atribuídos para a molécula em questão, limites máximos de resíduos (LMRs) aos diversos géneros alimentares.

Para tal considera-se um indivíduo padrão com um peso médio de 60 kg e uma dieta diária constituída por:

500 g de carne, repartidas em 300 g de tecido muscular, 100 g de fígado, 50 g de rim e 50 g de gordura, ou 500 g de frango, repartidas em 300 g de tecido muscular, 100 g de fígado, 10 g de rim e 90 g de gordura. Acrescenta-se ainda 1,5 L de leite, 100 g de ovos e 20 g de mel.

Esta dieta foi preconizada pelo "European Consultation Conference on the Availability of Veterinary Medical Products" (European Consultation Conference on the Availability of Veterinary Medical Products. Workshop 1 Discussion document, 1999).

O estabelecimento dos LMR com base nos valores da ADI, deve ser efectuado com base nos estudos de distribuição e eliminação dos resíduos, nos tecidos edíveis das espécies tratadas.

O LMR para cada tecido edível é determinado com a observância de concentrações de resíduo da mesma ordem de grandeza da ADI, nos diferentes produtos animais (tecido muscular, fígado, rim, gordura, leite, ovos e mel) (Brynes *et al.*, 1993; Brynes *et al.*, 1996).

No que se refere aos antibióticos, os estudos de toxicidade consideram que os respectivos resíduos, ainda microbiologicamente activos, são potencialmente capazes de modificar a microflora intestinal do consumidor e, é com frequência este risco microbiológico que se impõe no estabelecimento dos LMRs mais baixo.

I.5. Resíduos de antibióticos no ambiente

Após a administração, uma parte significativa dos medicamentos é eliminada e libertada no ambiente. Segundo Mulroy, 50% a 90% dos medicamentos administrados são excretados na sua forma activa e muitos destes compostos são persistentes e continuamente libertados para o ambiente (Mulroy, 2001).

Quando se pensa, particularmente, na influência ambiental de resíduos de medicamentos, a resposta imediata é de que estes apresentem grande impacto, uma vez, que foram concebidos para exercer actividade biológica.

De acordo com Bound *et al*, (2005), os antibióticos ocupam o primeiro lugar com 76.6 % de entre as principais classes de medicamentos com maior impacte ambiental, devido à emergência de resistência bacterianas.

Cerca de 80 % dos antibióticos administrado nas explorações pecuárias são lançado ao meio ambiente, tal facto, levou alguns países da Europa, como no caso da Suécia, a restringir a sua utilização (Sorensen *et al.*, 1998).

Deste modo, os medicamentos, quer na sua forma activa ou os seus metabolitos, podem contaminar os sistemas aquáticos por vias diferentes.

A figura I.1, retirada da EPA, dá-nos uma visão global da origem e distribuição no ambiente dos medicamentos e dos produtos de higiene pessoal:

-A utilização individual.

-As águas residuais hospitalares contêm concentrações significativas de medicamentos, que podem ser libertados nos sistemas de esgotos domésticos e municipais.

-As águas residuais municipais constituem a principal via de transporte dos medicamentos para o ambiente, após a utilização.

-Por outro lado os medicamentos utilizados em veterinária podem entrar nos sistemas aquáticos através da aplicação do estrume dos animais medicados nos campos e subsequente lixiviação dos solos para as águas de superfície principalmente em explorações de produção intensiva- CAFOs.

-Antibióticos aplicados directamente na água em aquacultura contaminam o meio aquífero na zona de aplicação e o ecossistema aquático.

-Em muitos casos também se pode observar a directa aplicação na água (*Open waters*).

-Descargas industriais.

Como podemos observar na figura I.1, a maior parte dos medicamentos são transportados para o meio aquífero.

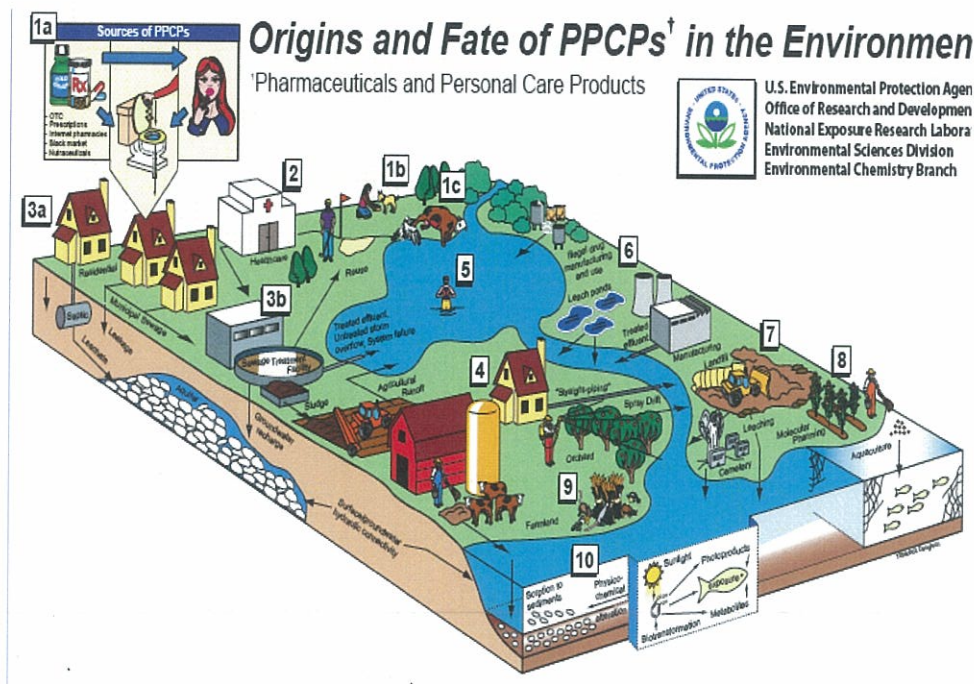


Figura I.1. Esquema representativo das vias de entrada dos fármacos no ambiente

A maioria das FQs são quimicamente muito estáveis à hidrólise e a temperaturas elevadas, mas são degradadas / hidrolizadas pela luz UV.

As FQs têm capacidade de bioacumulação no ambiente, particularmente em amostras sólidas, uma vez que formam quelatos com alguns cátions, Al^{3+} , Mg^{2+} , Fe^{2+} e Ca^{2+} .

I.5.1. Monitorização de resíduos de antibióticos no ambiente

Actualmente a presença de antibióticos, em níveis residuais, no ambiente aquático é uma realidade. O consumo crescente e crónico de antibióticos leva a um aumento da exposição ambiental, ditando uma avaliação do risco ambiental, requisito europeu para a avaliação global e actualizada do seu impacte ambiental.

Existe uma grande preocupação relativamente à presença de resíduos de antibióticos em amostras ambientais, como é demonstrado pelos vários estudos publicados na literatura científica. Diferentes países reportam a sua presença em amostras ambientais:

Alemanha (Ternes, 1998 e 2001; Hirsch *et al.*, 1998/ 1999; Golet *et al.*, 2001; Sacher *et al.*, 2001; Hamscher *et al.*, 2002; Carballa e Gómez *et al.*, 2004), Bélgica (Turiel e Rodriguez, 2003; Turiel *et al.*, 2004; Huebra e Vincent, 2005), Canadá (Miao *et al.*, 2004), China (Lu *et al.*, 2004), Dinamarca (Sorensen e Elbaek, 2004), E.U.A (Christian *et al.*, 2003; Lindsey *et al.*, 2001; Renew e Huang, 2004; Snow *et al.*, 2001); Espanha (Barceló *et al.*, 2006; Diaz-Cruz *et al.*, 2003) Finlândia (Vieno *et al.*, 2006), Holanda (Niesing *et al.*, 2004); Italy (Perret *et al.*, 2006; Zuccato *et al.*, 2006); Japão (Mitani e Kataoka, 2006; Fukutsu *et al.*, 2006), Coreia do Norte (Park *et al.*, 2002); Suíça (Gobel *et al.*, 2004), Suécia (Lindberg *et al.*, 2006); Malásia (Malintan e Mohd, 2006) e Portugal (Pena *et al.*, 2007, Seifrtová *et al.*, 2008).

A presença de resíduos de antibióticos, foi detectada em águas de ETARs, efluentes hospitalares e águas superficiais (Kummerer, 2003; Halling-Sorensen *et al.*, 1998; Kummerer 2001; Sarmah *et al.*, 2006; Hamscher e Hartung 2008; Buchberger e Himmelsbach, 2005; Park *et al.*, 2002; Adams e Qiang, 2004).

E particularmente no que diz respeito a detecção de FQs em amostras ambientais e concretamente em efluentes das suiniculturas destacam-se alguns autores como Kolpin *et al.*, 2002, que detectou CIPRO cuja as concentrações variaram entre 0,02 e 0,03 µg/L, NOR (0,012 µg/L), Christian *et al.*, 2003, que detectou em águas do rio em Alemanha, menos do que 0,010 µg/L de CIPRO, e concentrações superiores a 0,020 µg/L de ofloxacina, Reverte *et al.*, 2003, detectou concentrações de CIPRO que oscilaram entre 0,58 e 0,60 µg/L, Miao *et al.*, 2004, detectou concentrações de 0,118 µg/L, máximo de 0,838 e 0,050 µg/L (máximo 0,112), 0,094 µg/L (máximo 0,506) para CIPRO, NOR e ofloxacina, respectivamente, no Canadá, Renew e Huang (2004) nos E.U.A detectaram CIPRO, ofloxacina, NOR cujas concentrações de 0,100 – 0,160 µg/L, 0,205 – 0,305 µg/L e concentrações inferiores a 0,06 µg/L respectivamente em relação às FQs acima mencionada, muitos outros autores nos seus estudos de monitorização de FQs no ambiente e principalmente em efluentes e águas em geral

detectaram FQs na ordem de $\mu\text{g/L}$ em vários países tanto da Europa como no continente Americano.

As FQs foram detectadas em águas residuais hospitalares e municipais da cidade de Coimbra, à entrada e à saída das ETARs, a níveis que variaram entre 191,2 ng/L e 617,1 ng/L, a percentagem de remoção destes resíduos variam entre 46 e 83% o que demonstra que os resíduos de antibióticos não são completamente removidos nas ETARs (Seifrtová *et al.*, 2008).

As FQs foram também detectadas em águas superficiais do rio Mondego, em Coimbra em concentrações superiores a 110 ng/L (Pena *et al.*, 2007). A literatura científica reporta a presença de FQs em amostras ambientais em vários países da Europa como França (350-510 ng/L), Itália (290-580 ng/L), Grécia (460 ng/L) e Suécia (249 e 405 ng/L) (Seifrtová *et al.*, 2008).

As FQs foram também detectadas em amostras de estrume, sedimentos marinho e solo. Estas matrizes, segundo alguns estudos, apresentam concentrações mais elevadas de resíduos de FQs, devido ao processo de quelatação o que conduz a uma maior persistência nos solos e outras em outras matrizes sólidas (Golet *et al.*, 2002; Barceló *et al.*, 2003; Barceló, 2004; Lepp e Stevens, 2007; O'connor e Agar, 2007).

I.6. Resistência bacteriana

I.6.1. Mecanismos de resistência bacteriana

Os diferentes mecanismos (Fig. I.2) que conferem às bactérias a capacidade de desenvolver resistência são os codificados geneticamente e incluem: a produção de uma enzima que destrói ou inactiva o antibacteriano, alteração do local de acção ou diminuição do acesso do antibacteriano ao alvo, um aumento da eliminação do antibacteriano (efluxo) e activação da via metabólica alternativa à via bloqueada pelo antimicrobiano (Hooper e Wolfson, 1993; Tavares, 2001).

Mecanismos de resistência bacteriana

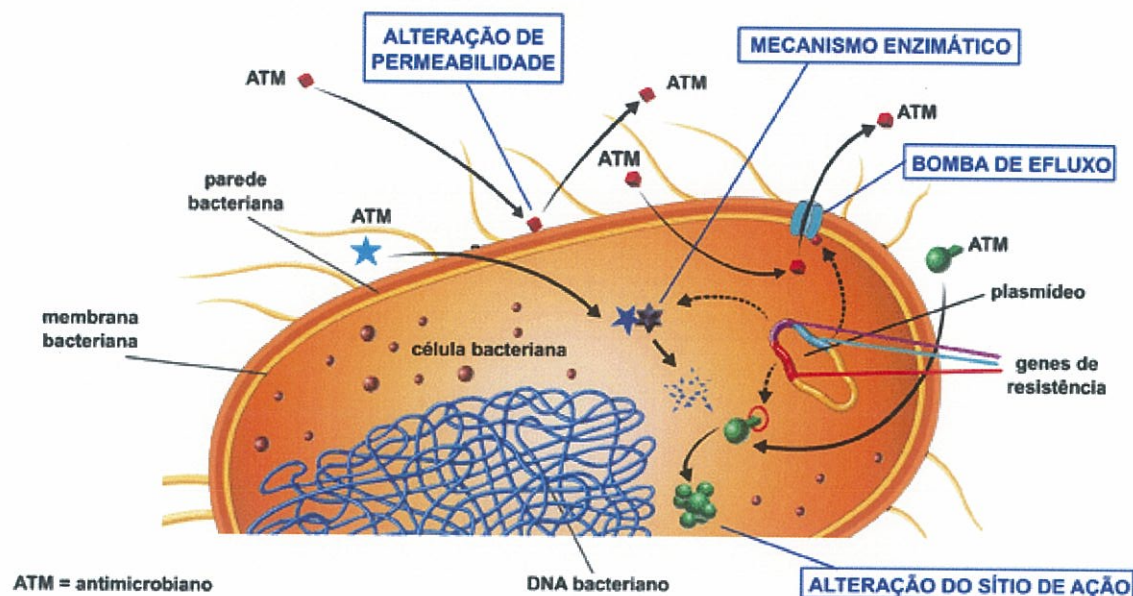


Figura I.2 – Esquema dos principais mecanismos de resistência bacteriana
(Adaptado [www. Anvisa.gov.br/modeloS/mec_enzimatico.html](http://www.Anvisa.gov.br/modeloS/mec_enzimatico.html)).

I.6.2. Aquisição e transferência de resistência bacteriana dos animais para o homem

Na actualidade muito se tem debatido sobre o uso de antibióticos em veterinária, e respectiva influência na emergência da resistência bacteriana (Falagas *et al.*, 2007).

Durante vários anos após a descoberta dos antibióticos, a resistência bacteriana foi ignorada. No entanto, a prevalência de microrganismos resistentes aos antibióticos quer na comunidade quer nos hospitais, atingiu níveis significativos com considerável impacto negativo na saúde pública (Marco *et al.*, 2008).

A resistência aos antibióticos constitui um grave problema de saúde pública a nível mundial, que se traduz num inevitável aumento da morbilidade e da mortalidade tendo como consequência a diminuição da qualidade de vida e o aumento dos custos com a saúde (EMEA, 1999; WHO, 2001; Falagas *et al.*, 2007; EFSA, 2008).

Em 2001, a ameaça microbiana, tema da conferência da UE que decorreu em Copenhaga, foi considerada como uma preocupação a nível Mundial de grande importância e que carece de uma estratégia a nível Europeu. Nessa reunião quatro temas importantes foram realçados:

- a necessidade de uma vigilância dos microrganismos resistentes aos antibióticos;
- a recolha de dados sobre o fornecimento e consumo de antibióticos;
- a utilização correcta dos antibióticos e
- a realização de acções para combater o problema da resistência aos antibióticos.

Embora o problema da emergência da resistência aos antibióticos deva ter em consideração a sua utilização em medicina humana, em medicina veterinária, nos animais e na agricultura, como partes do mesmo ecossistema, vamos debruçar-nos principalmente sobre a utilização de antibióticos em veterinária, os mecanismos de aquisição e a transferência de resistência aos humanos.

No âmbito deste trabalho, constitui uma maior preocupação a constatação de que as bactérias resistentes, ou os seus determinantes de resistência, possam ser transferidos dos animais ao homem (Levy *et al.*, 1976; Klare *et al.*, 1995; EMEA, 1999; WHO, 2001; EMEA, 2008; EFSA, 2008).

Esta questão adquire uma maior relevância na medida em que praticamente todos os antibióticos usados em veterinária são estruturalmente relacionados com os de uso humano, o que favorece fenómenos de co-resistências e de resistência cruzada entre ambos (EMEA, 1999; OIE, 2007, 2008).

As evidências microbiológicas e clínicas acumuladas até ao momento sugerem fortemente a existência de uma associação entre o uso de antibióticos, na produção animal, e o incremento da prevalência/incidência das bactérias resistentes, na população humana.

A transferência das bactérias resistentes dos animais até aos humanos pode ocorrer, através do contacto directo, incluindo exposição ocupacional dos humanos com os animais ou indirectamente via cadeia alimentar (Klare *et al.*, 1995).

Na Alemanha, foram encontradas diferenças acentuadas de colonização de estirpes de *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina (MRSA) em veterinários (3.9 %) em comparação com pessoas, que não estiveram em contactos com animais (0.1 %), ou ainda contra outras pessoas saudáveis (<1 %) (EMEA, 2008).

Estas observações atribuem à utilização de antibióticos, na produção animal, um papel muito significativo, não só na emergência de novas resistências antibióticas, mas também na transmissão ao homem.

Para ilustrar a gravidade da situação apresentamos alguns casos que clarificam o problema do desenvolvimento e disseminação de bactérias multiresistentes dos animais ao homem.

Existem evidências concretas que demonstraram de que o uso de antibióticos em animais selecciona genes resistentes aos antibióticos e que estes podem ser transferidos ao homem (EMEA, 1999; WHO, 1997; EMEA, 2008, 2009).

A salmonela é um agente zoonótico que representa grande risco para a humanidade. Segundo a Organização Mundial de Saúde (WHO) a salmonelose constitui um dos problemas mais comum de saúde pública (WHO, 2007). Anualmente milhões de casos são reportados no homem (RTSZ, 2004; Marimón *et al.*, 2004), originando milhares de mortos.

Os alimentos são considerados como sendo uma importante via de infecção por salmonela. As principais fontes de infecção são os ovos, a carne de frango e a carne de porco. Relativamente às resistências, a maioria dos isolados de *S. enteritidis* foram sensíveis a todos os antibióticos testados (EFSA, 2007).

Vários estudos demonstraram a gravidade e a transferência de *Salmonellas* resistentes de animais para o homem (Van den Bogaard e Stobberingh, 1999; EMEA, 1999; Tollefson e Miller, 2000; Cruchaga, *et al.*, 2001; RTSZ, 2004).

Em 2006, de acordo com a EFSA, a ocorrência de salmonelas resistentes aos antibióticos foi detectada na carne de suínos em cinco estados membros (EFSA, 2006).

A disseminação destas bactérias ao homem, tornou claro o papel que a cadeia alimentar possui na disseminação de bactérias resistentes aos antibióticos. Adicionalmente, actividades que colocam indivíduos em contacto directo com os animais e seus produtos (veterinários, produtores e manipuladores de alimentos) também são considerados de risco para a aquisição de tais microrganismos (EFSA, 2008).

O caso mais paradigmático, o caso de um clone de *Salmonella typhimurium* DT 104 que exibe um perfil de resistência a vários antibióticos, conhecida por resistência do tipo ACSSuT (ampicilina, CAP, estreptomicina, sulfonamidas e tetraciclina) que se tornou prevalente em vários países da Europa e Estados Unidos e cuja transferência do gado bovino ao homem se encontra bem documentada (Barton, 1998; Caratoli, Tosini e Visca, 1998, WHO, 1997).

A Suécia alertou para o facto da utilização da avoparcina como promotor de crescimento induzir resistência bacteriana aos antibióticos do grupo dos glicopeptídeos, nomeadamente a vancomicina, administrada apenas em infecções multiresistentes a nível hospitalar. Alguns autores (Bates *et al.*, 1993 e Anadon e Martinez – Larranaga, 2000) estabeleceram uma relação entre o uso de avoparcina e a emergência de estirpes de enterococos resistentes à vancomicina.

Na Dinamarca, Bager *et al.* (1997) sugerem uma relação entre o uso de avoparcina em frangos e a incidência de estirpes de enterococos resistentes a vancomicina.

I.6.3. A monitorização de resistências antimicrobianas na UE

No final do ano 2000, 15 dos 17 países que faziam parte da UE já realizavam a vigilância dos microrganismos resistentes aos antibióticos, de acordo com um estudo feito pela *Eurosurveillance*.

A Suécia juntamente com a Dinamarca foram os primeiros países a estabelecer programas de controlo do uso de antibióticos na produção animal. Em 1960, a Dinamarca aparece como pioneira na implementação de sistemas de vigilância de microrganismos resistentes. A Suécia em 1986 proibiu a utilização de antimicrobianos como promotores de crescimento, direccionando a sua administração apenas para a terapia e profilaxia, mediante prescrição veterinária. A Dinamarca também

implementou medidas relacionadas à comercialização de antibióticos, que determinaram redução da sua utilização na produção animal.

I.7. Antibióticos do grupo das fluoroquinolonas

As FQs, são antibióticos que possuem uma ampla aplicação no tratamento das infecções bacterianas, tanto em medicina humana bem como em medicina veterinária.

A sua administração pode aumentar a prevalência de resistência bacteriana e diminuir a eficácia do tratamento com outros antibióticos desta mesma classe devido a possibilidade de surgir resistência cruzada.

No que concerne à utilização de FQs, a EMEA adoptou em 2006, um documento que retrata a restrição do uso das FQs em veterinária, pelo seu potencial impacte na saúde pública, realçando a importância do seu uso prudente.

O Comité dos Medicamentos Veterinários (CVM) também estabeleceu um conjunto de precauções especiais para a utilização de FQs em veterinária.

O ácido nalidíxico (Fig. I.3) foi descoberto em 1962, durante o processo de síntese e purificação da cloroquina (antimalárico). Esta quinolona possui um espectro de acção estreito de utilização restrita exclusivamente para as infecções causadas pelas bactérias Gram negativo, e é caracterizada em geral como sendo fraca e de má difusão tecidual. Devido a estas características a sua utilização restringiu-se ao tratamento das infecções urinárias.

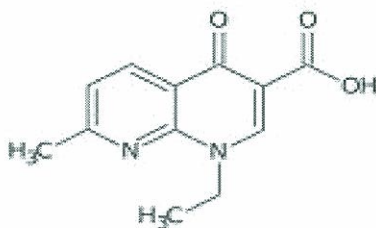


Figura I.3. Estrutura química do ácido nalidíxico.

Devido a ineficiência das quinolonas da primeira geração, e com a introdução do flúor na posição 6 do núcleo quinolónico, surgem as FQs de segunda geração, nomeadamente, a NOR, CIPRO e lomefloxacinina introduzidas na prática clínica.

As FQs pertencem a uma classe de agentes antibacterianos com largo espectro de actividade contra organismos Gram positivo e Gram negativo (Souza, 2005).

As FQs em geral são bactericidas em baixas concentrações e possuem um espectro de acção mais largo, uma maior difusão para os tecidos, incluindo os líquidos intracelulares e uma menor toxicidade.

A estrutura das FQs mantém-se desde sua descoberta apesar de sofrer várias modificações químicas conferindo características físicas diferentes de fármaco para fármaco. Estas diferenças podem ser responsáveis pelo volume de distribuição, absorção oral e taxa de eliminação, mas não modificam o espectro antibacteriano. Prova viva disto são as sucessivas substituições de átomos de flúor na ENRO, difloxacinina e orbifloxacinina, com a introdução de 1, 2 e 3 átomos respectivamente, mas a presença destes átomos não aumentou o efeito antibacteriano. Não há provas concretas que demonstrem que a diferença química entre os fármacos pode ser responsável pela diferença na resposta clínica. Entretanto, esta diferença pode ser responsável pela variação nos processos de absorção e eliminação (Nikaido e Thanassi, 1993).

As FQs são moléculas anfotéricas que podem ser protonadas no grupo carboxilo e no grupo amina terciária da molécula. O pKa varia ligeiramente de fármaco para fármaco (Nikaido e Thanassi, 1993).

Em medicina veterinária, ENRO e SARA são as FQs mais comumente utilizadas, utilizados no combate a infecções do sistema urinário, especialmente aquelas causadas por *P. aeruginosa*, prostatites, gastroenterite bacteriana severa, pneumonia causada por bacilos Gram negativo, otite por pseudomonas, infecções dérmicas, osteomielite por Gram negativo entre outras.

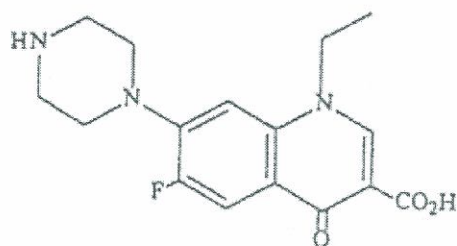
As FQs são bastante resistentes à degradação microbiana e estes compostos podem ser persistentes nas águas ambientais. É conhecido que as FQs são capazes de formar complexos estáveis com diversos iões divalentes e trivalentes.

A persistência das FQs utilizadas em veterinária e os tipos de metabolitos resultantes da conversão microbiana no ambiente tem sido pouco estudado até aos últimos anos. A degradação dos antibióticos, incluindo a fotólise e a oxidação química pode ser significativa no ecossistema ambiental. A existência de resíduos de FQs em águas ambientais depende fundamentalmente do uso inadequado deste tipo de agente antimicrobiano quer na medicina humana quer na medicina veterinária.

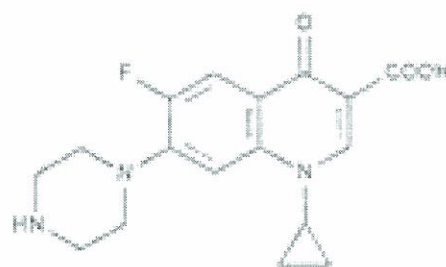
Vários fungos são conhecidos como metabolizadores das FQs. O *Gloeophyllum striatum* e outros basidiomicetes metabolizam a ENRO e a CIPRO através da hidroxilação, descarboxilação, desfluoração ou ainda através da remoção de parte ou da totalidade do anel da piperazina.

O fungo *Mucor ramannianus* é considerado como o transformador da CIPRO para *N*-acetilciprofloxacina e da ENRO em ENRO *N*-óxido, *N*-acetilciprofloxacina (Parshikov *et al.*, 2000).

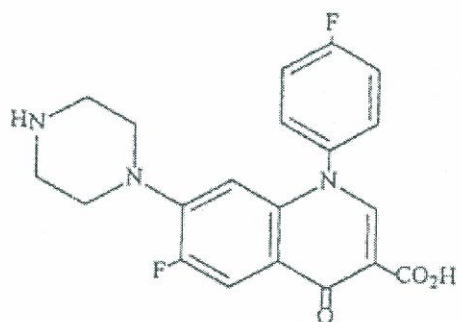
As fluoroquinolonas (Fig. I.4) têm um espectro de actividade mais alargado do que as quinolonas incluindo algumas bactérias Gram positivo, *Pseudomonas aeruginosa* e ainda outras bactérias Gram negativo. Estes antibióticos estão, por isso, entre os mais importantes em medicina humana, uma vez que, são eficazes contra uma grande variedade de bactérias, são fáceis de usar e têm poucos efeitos secundários.



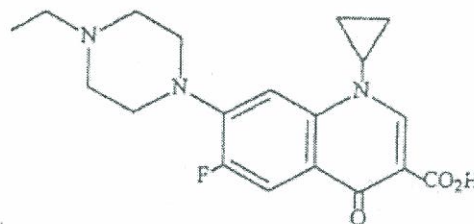
Norfloxacin



Ciprofloxacin



Enrofloxacin



Sarafloxacin

Figura I.4: Estrutura química das fluoroquinolonas

I.7.1. Propriedades físico-químicas

Algumas das propriedades físico-químicas das FQs referem-se nas tabelas I.3 e I.4. As FQs são moléculas anfotéricas que podem ser protonadas no grupo carboxilo e no grupo amina terciário da molécula. Esta propriedade anfotérica deve-se a presença de um grupo ácido (grupo carboxilo) e de um grupo básico (amina terciária). Dependendo do pH a que se encontra o meio, as quinolonas podem existir na forma catiónica, aniónica, neutra ou ainda em forma de ião dipolar (Park *et al.*, 2000).

Avaliando as constantes de acidez para as diferentes quinolonas verifica-se que as diferenças são suficientes para influenciar as espécies que estarão presentes a pH fisiológico. No caso da CIPRO encontra-se 90% na forma de ião dipolar e 10 % na forma aniónica. Enquanto a ENRO que têm uma ligeira diferença estrutural (a existência da presença de um átomo de hidrogénio ou de 1 grupo metilo na posição *para* no anel piperazínico, em vez de um grupo etilo como acontece com a CIPRO é

possível verificar que a pH 7.4 se encontra 92 % na forma de ião dipolar, 4 % na forma aniónica e 4 % na forma catiónica (Vásquez *et al.*, 2001).

Tabela I.3. Fórmula química e Valores de pka1 e pka2 para as FQs em estudo

FQs	Formula	Pka1	Pka2
Norfloxacina	$C_{16}H_{20}FN_3O_4$	6,23	8,55
Ciprofloxacina	$C_{17}H_{18}FN_3O_3$	5,90	8,89
Enrofloxacina	$C_{19}H_{22}FN_3O_3$	6,27	8,62
Sarafloxacina	$C_{20}H_{18}ClF_2N_3O_3$	6,0	8,6

Tabela I.4. Massa molecular, ponto de fusão e tempo de $\frac{1}{2}$ vida das diferentes FQs em estudo.

FQs	Massa Molecular (g/mol)	Ponto de Fusão (°C)	Tempo de $\frac{1}{2}$ vida (horas)
Norfloxacina	319.331	227 -228	3 – 4
Ciprofloxacina	331.346	255 – 257	4
Enrofloxacina	359.395	219 – 223	3 – 4
Sarafloxacina	385.361	≥ 300	≈ 6 à \neq conc.

I.7.2. Mecanismos de acção das fluoroquinolonas

FQs são antimicrobianos bactericidas e a sua actividade antimicrobiana relaciona-se com a inibição das topoisomerasas bacterianas do tipo II, também conhecida como DNA girase. Assim, embora as FQs possuam diferentes características de ligação com a enzima, todos estes antibióticos inibem o DNA girase.

O aumento do espectro da actividade antimicrobiana é também devido a adição de ciclopropilo na posição 1 e de piperazina na posição 7.

Em geral as FQs apresentam uma boa actividade contra a maioria das bactérias Gram negativo. E quanto as bactérias Gram positivo a sua actividade é variavelmente susceptível dependendo do valor da concentração inibitória mínima (CIM).

I.7.2.1 Mecanismos de resistência às fluoroquinolonas

Uma vez dentro das células a acção antimicrobiana das quinolonas é mediada através da inibição do DNA girase também designado como topoisomerases (topoisomerase II e topoisomerase IV). As topoisomerases desempenham um papel vital no processo de replicação, transcrição, recombinação e reparação das cadeias de DNA. Cada girase é constituída por duas subunidades A, codificadas por *gyrA* (inibidas pelas quinolonas) e duas subunidades B, codificadas por *gyrB* e a topoisomerase IV que é constituída por duas subunidades codificadas pelos genes *par C* e *par E* (Hooper e Wolfson, 1993).

A resistência adquirida às FQs ocorre principalmente devido a alteração da girase através das mutações nos genes *gyrA* e *gyrB*, da alteração da topoisomerase IV (mutações no gene do *par C* e *par E*) na redução do número das porinas e na diminuição da acumulação (bomba de efluxo) (Sousa, 2001).

O desenvolvimento da resistência às FQs em animais constitui uma grande preocupação em relação à possibilidade de transmissão de organismos resistentes aos homens, onde estes antibióticos são considerados essenciais para o tratamento de variedades de infecções. Existiu uma grande pressão para proibir o uso das FQs em veterinária para

animais produtores de alimentos, particularmente nos EUA, onde houve um caso judicial exigindo a proibição do seu uso em aves de capoeira.

O aumento da utilização de FQs em veterinária, um importante grupo de antibióticos da medicina humana, repercutiu-se na incidência de estirpes resistentes em *Campylobacter spp*, tendo sido verificado um aumento considerável de estirpes resistentes à CIPRO, de 1% em 1990, para 80%, em 1996 (Rodriguez, 1998). Uma variação tão espectacular não pode ser explicada exclusivamente em função do uso inadequado na medicina humana. A introdução da ENRO na medicina veterinária, contribuiu significativamente para a emergência de estirpes de *Campylobacter spp* resistentes às quinolonas (Endtz, 1991; OMS, 1998). Foi também observado um aumento da incidência de resistências às FQs, em estirpes de *E. coli* isoladas em animais, de 13-30% em frangos, 50% em perus e de aproximadamente 30% nos tratadores, relativamente à restante população. No cômputo geral, a resistência de *E. coli* às FQs aumentou de apenas 0,8% em 1989 para 17% em 1997 (Rodriguez, 1998).

Mais relevante foi a emergência, na Europa, da *Salmonella typhimurium* DT104 resistente às FQs (Levy, 1998).

Recentemente foi detectada uma elevada incidência de resistência às FQs entre as estirpes de *Campylobacter* (100% resistente à NOR, ácido nalidixico, ofloxacina e ciprofloxacina (Borges e Fraqueza, 2009)

Recentemente foi informada a resistência às fluoroquinolonas mediada por plasmídeos em um isolado clínico de *K. pneumoniae*.

Clinicamente, a resistência de estirpes de *Stafilococcus* e de *Pseudomonas aeruginosa* às FQs tem preocupado a comunidade científica. É também conhecida a resistência às FQS em *Campylobacter* e *E. coli* (Tabela I.5).

Tabela I.5. Proporção da resistência a quinolonas entre *Salmonella* e *Campylobacter* em animais (EMEA/CVMP/SAGAM/184651/2005) adaptado do European Medicines Agency, 2007)

Países	Microorganismos e as suas percentagens de resistências às FQs				
	<i>Salmonella</i>		<i>E. Coli</i>	<i>C jejuni</i>	
	<i>S. Typhimurium</i> , Suínos	<i>S. Enteritidis</i> , Frangos	Suínos	gatos	frangos
Austria	0	2			
Bélgica	6	0			
Dinamarca	< 1	23	8	11	0
Inglaterra	8	0	17	0	
França	0		20		36
Alemanha	4	14			8
Grécia		44			
Holanda	3	3	11		38
Noruega					0
Polónia		8			
Suiça			18	2	0
Suécia	0		26	5	12

De acordo com dados da tabela I.5. verifica-se que na Europa existe uma maior proporção de resistência nas quinolonas de primeira geração comparando com as FQs de maior espectro. Dados de alguns países da união europeia revelam que a proporção de resistências tanto nos frangos como nas amostras de suínos, é maior comparando com os outros países da Europa como ilustra a tabela I.6. E de entre os vários países da Europa a Finlândia aparece com menor taxa de resistências às FQs aos frangos e sem nenhum caso nos suínos.

Tabela I.6. Resistência *E. Coli* às FQs em amostras de suínos e frangos em alguns países membros da EU (EMEA/CVMP/SAGAM/184651/2005)

Quinolonas/ Amostras	Limit es	Países e respectivas percentagens de resistência							
		Aústria	Dinamarca	Finlândia	França	Itália	Holanda	Noruega	Suíça
Suínos		n=134	n = 317	-----	n=304	n=225	n=155	n=187	n=303
ENRO	> 2	2	0		0	< 1	0	0	0
CIPRO									
Ác.nalidixico	> 16	8	2	----	3	9	0	< 1	1
Flumequina	< 4								
Frangos		n=140	n=138	n=300	n=308	n=258	n=165	n=141	n=306
ENRO	> 2	3	0	0	3	11	3	0	0
CIPRO									
Ác.nalidixico	> 16	54	10	2	28	50	35	1	5
Flumequina	< 4								

Numa atitude sem precedentes, a Bayer, empresa farmacêutica produtora da CIPRO, alertou para as consequências da utilização incorrecta das FQs nos animais uma vez que “a sua utilização incorrecta pode conduzir a uma diminuição da eficácia das FQs no tratamento de certas patologias humanas” (McIntyre e Ebsworth, 1998).

A reunião da OMS sobre “O uso de quinolonas nos alimentos para animais e o seu potencial impacto na saúde humana”, formulou estratégias para o uso prudente destes antibióticos e a criação de soluções alternativas (OMS, 1998).

A Suécia apresentou um conjunto de alegações a Comissão Europeia, segundo o estabelecido no Art. 7 da Directiva do Conselho 70/524/CEE, para reforçar a proibição da utilização de antibióticos como promotores de crescimento devido às graves consequências para a saúde pública (Anadon e Martinez- Larranaga, 2000).

O centro da medicina veterinária da FDA vem desde a muito tempo questionar o uso das FQs e principalmente a ENRO e a SARA em suínos, uma vez que os animais servem de reservatórios a muitos agentes patogénicos, incluindo *Salmonella* e *Campylobacter*.

I.8. Metodologia Analítica

I.8.1. Introdução

A problemática da contaminação ambiental com resíduos de antibióticos conduziu a uma pressão no desenvolvimento de metodologias analíticas.

A presença de resíduos de antibióticos em amostras ambientais é monitorizada por métodos cromatográficos, sendo a cromatografia líquida a técnica analítica mais utilizada na análise destes resíduos em diferentes matrizes ambientais (Pena *et al.*, 2007, Seifrtová *et al.*, 2008).

Deste modo, é de extrema necessidade o desenvolvimento de procedimentos analíticos sensíveis, exactos, precisos, selectivos, rápidos e de baixo custo, para a monitorização dos antibióticos em várias matrizes ambientais.

Neste capítulo efectuou-se uma revisão das várias metodologias analíticas disponíveis para a extracção, purificação e determinação de antibióticos em diferentes matrizes ambientais, incluindo, em amostras de suiniculturas. A tabela I.7. resume as várias metodologias analíticas para a determinação de resíduos de antibióticos em amostras ambientais descritos na literatura científica.

Como podemos constatar da sua análise, a CL associada à espectrometria de massa é a técnica mais comumente aplicada a este tipo de análise, pelas inúmeras vantagens que apresenta, apesar de exigir um equipamento mais complexo e dispendioso. Mas, é o único método que permite a identificação inequívoca das FQs em matrizes tão complexas, como são as amostras ambientais.

A detecção fluorimétrica proporciona uma sensibilidade e selectividade constituindo um poderoso meio analítico na análise de resíduos de FQs.

I.8.2. Amostragem e preparação da amostra

As FQs são fotosensíveis e degradam-se rapidamente quando expostas à luz, pelo que devem ser acondicionadas em frascos de vidro âmbar.

Segundo Díaz-Cruz e Barceló (2004) é recomendada a utilização de conservantes químicos como o formaldeído.

Começando pela modo de conservação das amostras e o seu respectivo pré-tratamento, onde todas as amostras recolhidas são transportadas para o laboratório/ local de análise e conservadas no frio entre 4 °C e -20 °C.

A preparação das amostras é uma etapa essencial de qualquer tipo de procedimento analítico. Muitas amostras podem não apresentar grandes obstáculos na extracção mesmo sem nenhum processo prévio de pré-tratamento, mas outras requerem pré-tratamento de modo a obter uma boa eficiência na extracção. Por exemplo, as FQs formam complexos estáveis com vários iões metálicos bivalentes e trivalentes, tais como o Fe^{2+} , Ca^{2+} , Al^{3+} e Mg^{2+} .

Este pode incluir a filtração, a adição de substâncias, como por exemplo o EDTA, um agente quelante forte, para promover a descomplexação com os catiões divalentes, melhorando assim as percentagens de recuperação, a centrifugação para remover as partículas em suspensão e a correcção do pH.

I.8.3. Extracção e purificação

Devido à presença de resíduos de antibióticos em baixas concentrações em amostras ambientais, na ordem de $\mu\text{g/L}$ e ng/L , são necessários métodos de pré-concentração, extracção, e purificação. O principal objectivo desta fase consiste na obtenção de extractos limpos, com o mínimo de interferentes.

Na maioria dos casos a extração e pré-concentração são efectuadas através de extração em fase sólida (SPE). A SPE tem sido a técnica de preferência, no entanto, outras

técnicas como a extracção líquido-líquido (LLE) e a microextracção em fase sólida (SPME) têm sido usadas em diversos estudos. As vantagens referenciadas para a extracção em fase sólida baseiam-se na rapidez de execução, simplicidade de manuseamento, melhor reprodutibilidade e na obtenção de extractos isentos de interferentes.

Segundo Yang *et al.* (2004) a SPE é um método comumente utilizado na preparação de amostras, na purificação e concentração de analitos de interesse em amostras líquidas.

Actualmente as colunas poliméricas OASIS HLB são largamente utilizadas, uma vez que o polímero macroporoso poli divinilbenzeno-co-N-vinilpirrolidona apresenta características lipofílicas e hidrofílicas e é estável para todo o intervalo de pH.

Quando se trata de amostras com muitos interferentes, alguns autores nomeadamente Christian *et al.* (2003) optam por utilizar a combinação de duas colunas, uma coluna de troca iónica e uma coluna polimérica (SAX e OASIS) em *tandem*. A primeira para reter alguns interferentes, como por exemplo, os ácidos húmicos e flúvicos presentes nas amostras ambientais e a segunda para reter as FQs.

Neste mesmo estudo, Christian *et al.* (2003) testaram diferentes solventes na determinação de 29 antibióticos das diversas classes em estudo, FQs, β -lactâmicos, macrólidos, sulfonamidas e tetraciclinas.

O procedimento de extracção com a combinação das duas colunas foi usado por outros autores como o Huang *et al.* (2005) os quais usaram a combinação para fazer a determinação de FQs, sulfonamidas e trimetoprim em amostras ambientais. Karthikeyan e Meyer (2006) no seu estudo também usaram a combinação das duas colunas na extracção das amostras.

Turiel *et al.* (2005), desenvolveram um método para a determinação de FQs comparando a extracção da fase sólida (SPE) off-line e on-line usando uma coluna C₁₈ e uma outra SAX para a pré-concentração e purificação, respectivamente. Neste estudo, o processo de extracção foi acoplado a um sistema de CL com detecção por UV.

Foi igualmente descrita outra técnica de extracção de amostras líquidas, a microextracção em fase sólida (SPME), que tem sido amplamente testada na extracção de amostras ambientais principalmente líquidas.

A técnica de SPME foi também utilizada por Mitani e Kataoka (2006) para a determinação de FQs em águas ambientais.

I.8.4. Métodos

I.8.4.1. Cromatografia líquida (CL)

Na literatura científica disponível, relativamente à determinação de resíduos de FQs são referenciadas metodologias analíticas por cromatografia líquida de alta eficiência (CL), com detecção fluorimétrica, ultravioleta, e por espectrometria de massa (Christian *et al.*, 2003; Hirsch *et al.*, 1998; Renew e Huang, 2004; Turiel *et al.*, 2003; Babic *et al.*, 2006 e González *et al.*, 2006 Shao *et al.*, 2007).

As FQs são compostos com fluorescência nativa que podem ser detectadas por fluorimetria, uma vez que, a intensidade e emissão de fluorescência é directamente proporcional ao poder da radiação da excitação.

A detecção fluorimétrica proporciona um maior grau de sensibilidade e especificidade, constituindo um poderoso meio analítico na análise de resíduos de FQs, principalmente aquando da necessidade de reduzir as interferências nas matrizes, permitindo assim a sua determinação a níveis de concentrações bastante reduzidos na ordem de ng/L ou µg/L (González *et al.*, 2006; Golet *et al.*, 2001; Pena *et al.*, 2007; Seifrtová *et al.*, 2008).

Cerca de 62% das determinações em cromatografia líquida usam um detector de fluorimetria. O espectro de emissão consiste numa banda larga dentro de 350-400 nm para as quinolonas ácidas e 440-500 nm para as quinolonas piperazínicas. A fluorescência depende fortemente do pH do meio, sendo a maior intensidade de fluorescência obtida a baixo pH (de 2,5 a 4,5). A esses valores de pH, para as quinolonas piperazínicas, a forma predominante é a catiónica. A separação é normalmente feita com fase móvel de pH de 2 a 4 o que é óptimo para a detecção fluorimétrica. A fase móvel pode ter uma composição constante (isocrática) ou pode-se alterar durante a eluição (gradiente). O recurso a gradiente pode ser importante caso não seja possível a separação de dois ou mais compostos com apenas um tipo de fase móvel e um tipo de fase estacionária (Snyder *et al.*, 2006). As fases móveis são

constituídas, na sua maioria, por uma mistura de água com acetonitrilo e ácido fosfórico, em diversas proporções. Na literatura científica são referenciadas outras fases móveis, contendo na sua composição ácido cítrico, tampão fosfato e a mistura de água e metanol (Shao *et al.*, 2007;). Os comprimentos de onda de excitação e de emissão são, respectivamente, à volta de 275-280 nm e 440-450 nm. Este padrão foi otimizado e os melhores comprimentos de onda para a nossa análise são para a excitação 278 nm e para emissão 400 nm (Hernández-Arteseros *et al.*, 2002).

Golet *et al.* (2001) procederam a determinação de 10 FQs, nomeadamente, a CIPRO, ENRO, NOR, ácido pipemídico, ofloxacina, levofloxacina, fleroxacina, por CL com detecção por fluorescência. Todas as condições foram optimizadas tendo como finalidade conseguir uma boa separação dos antibióticos em estudo. Com o método desenvolvido as percentagens de recuperação oscilaram entre 72 e 100 % e foram detectadas concentrações de CIPRO e NOR na ordem de 500 ng/L.

A detecção no UV foi também aplicada por vários autores para a determinação das FQs em amostras ambientais (Turiel *et al.*, 2003; Renew e Huang, 2004; Turiel *et al.*, 2005).

Na análise de concentração residuais de FQs em matrizes ambientais é necessário proceder a sua confirmação por espectrometria de massa, de modo a obter a caracterização estrutural do analito e a sua identificação analítica. Nos últimos anos a LC-MS e LC-MS-MS têm sido aplicadas na sua determinação (Yang *et al.*, 2005, 2006; Kolpin *et al.*, 2002; McArdell *et al.*, 2003)

Tabela I.7. Metodologias analíticas para a monitorização de resíduos de FQs em amostras ambientais

Ref.	Países	Antibióticos	Matriz	Pré- tratamento de amostra	SPE	Solvente de eluição	Cromatografia Líquida		Padrão interno	Detector	LOD µg/L
							Coluna	Fase móvel			
TURIEL <i>et al.</i> (2003)	Bélgica	FQs	Águas ambientais	Ajustar pH = 4,0	C ₁₈	Amónia/MeOH H	Coluna C ₁₈ 150x3mm, 3µm	Gradiente Ác fórmico pH 2,5 + ACN		UV (275nm, 255nm)	0.008 - 0.020
YANG e CARLSON (2004)	E . U . A	Eritromicina Roxitromicin a Tilosina	Água natural e da ETAR	Adicionar 5% de Na ₂ EDTA e ajustar pH =5,0	Oasis HLB	MeOH	Xterra MS C ₁₈ 50x2,1mm, 2.5µm	Gradiente Água: ác fórmico (0,1%) ACN: ác fórmico (0,1%)	Simatone	UV (215, 205, 287nm) IT ESI(+)	0.07 0.03 0.05
ABUIN <i>et al.</i> (2006)	Espanha	Claritromicin a Roxitromicin a Azitromicina Eritromicina	Águas superficiais	Ajustar pH =5,0	Oasis HLB	NH ₄ Ac /ACN (pH 6)	Hypurity C ₁₈ 250x2,1mm, 5µm	Gradiente ACN: NH ₄ Ac (pH 6) ACN		ESI(+), QqQ	0.000 5 0.000 5 0.002
MIAO <i>et al.</i> (2004)	Canadá	MLs, FQs, SAs, TCs	Água residual	Ajustar pH = 6,0 e adição Na ₂ EDTA	Oasis HLB	MeOH	Genesis C ₁₈ 50x2,1mm, 3µm	Gradiente ACN: NH ₄ Ac/ ác fórmico		QqQ ESI	0.001 - 0.008

HILTON e THOMAS (2003)	U.K	Sulfametoxazol sulfametoxazol Trimetoprim Eritromicina	Água superficial e residual	Ajustar pH = 3,0	Phenomenex	MeOH	Luna C ₁₈ 250x2mmx5 µm	Gradiente NH ₄ Ac/MeOH/H ₂ O (pH 5,5)	Fenacetina	QqQ ESI	0.05 0.05 0.01 0.01
CHRISTIAN <i>et al.</i> (2003)	Alemanha	TCs, FQs, SAs, MLs, β-lactams, trimethoprim	Água superficial	Ajustar pH = 4,0 e adição Na ₂ EDTA	SDB-2 Oasis HLB	MeOH /ác fórmico MeOH	Phenomenex Hydro-RP C18 4µm			ESI(+) MS/MS	
YANG <i>et al.</i> (2005)	E.U.A	TCs e SAs	Água residual	Ajustar pH < 3 e adição Na ₂ EDTA	Oasis HLB	MeOH	Xterra MS C ₁₈ 50x2,1mm, 2,5µm	Gradiente Ác fórmico/H ₂ O/ACN	Simatone	IT ESI(+) MS-MS	0.03- 0.07
YANG <i>et al.</i> (2006)	E.U.A	Eritromicina Tilosina	Água das ETARs	Ajustar pH = 5 e adição Na ₂ EDTA	Oasis HLB Sep-Pak C18	MeOH	Xterra MS C ₁₈ 50x2,1mm, 2,5µm	Ác fórmico /H ₂ O/ Ac fórmico /ACN/MeOH	Espiramicina	ESI(+), IT SRM MS/MS	0.01- 0.06
MITANI e KATAOKA (2006)	Japão	Enoxacina, Ofloxacina CIPRO, NOR Lomefloxacin	Água superficial e residual	Ajustar pH = 8 e adição Tris-HCl	SPME Carboxen 1010		Capcell PAK C ₁₈ 100x2,1mm, 5µm	Isocrática Amônia/ ACN (pH 3)		ESI(+) QqQ MRM	0.007 - 0.029 ng/m

	a										L
Balakrishna <i>et al.</i> (2006)	Canadá	10 SAs	Água residual	Ajustar pH = 3,0 Ajustar pH = 4,5	MCX SPME	MeOH/5% NH ₄ OH MeOH	Xterra MS C ₁₈ 250x2,1mm, 5µm Ultracarb ODS C ₁₈ 150x4,6mm, 5µm	Gradiente NH ₄ Ac/ ACN:MeOH (pH 3)	Cafeína	QqQ ESI(+) MRM	2.88- 9.00 ng/L 9.04- 55.3 µg/L
BATT e AGA (2005)	E.U.A	TCs, FQs, SAs, MLs, lincosamidas	Água superficial e residual	Ajustar pH < 3 e adição Na ₂ EDTA	Oasis HLB C ₁₈ Sep- Pak	MeOH/ác oxálico ACN/amônia	C ₁₈ 100x2,1mm, 3µm	Gradiente ACN/MeOH H ₂ O+ác fórmico	S ulfametazin a	ESI(+)-IT MS/MS	0.027 -0.19
CAHILL <i>et al.</i> (2004)	E.U.A	Amoxicilina Trimetoprim Sulfametoxazol	Amostras ambientais		Oasis HLB	MeOH MeOH (pH 3.7)	Metasil Basic 150x2,0mm, 3µm	Gradiente Amônia/ác fórmico/ACN (pH 3,7)	cafeína	ESI(+) MS	ND 0.014 0.023
KOLPIN <i>et al.</i> (2002)	E.U.A	TCs, FQs, SAs	Água residuais	Ajustar pH =3 e adição Na ₂ EDTA	Oasis HLB MCX	MeOH MeOH+NH ₄ OH		Gradiente Amônia/MeOH/ác fórmico	sulfametazi na simatone	ESI(+) MS SIM	0.02- 0.1

VIENO <i>et al.</i> (2006)	Finlândia	CIPRO Ofloxacina NOR	Água superficial, e da ETAR	Ajustar pH = 10,0	Oasis HLB	MeOH	Zorbax XDB-C ₁₈ 50x2,1mm, 5µm	Gradiente ACN+HAc	ENRO	ESI(+) QqQ MRM	
PERRET <i>et al.</i> (2006)	Itália	11 SAs	Amostras de ETAR e águas municipais.		Oasis HLB	MeOH + ácido fórmico	C ₁₈ RP 150x2,1mm, 5µm	Gradiente ACN/ ácido fórmico H ₂ O/ ácido fórmico		ESI(+) QqQ MRM	
YANG e CARLSON (2004b)	E.U.A	TCs, SAs	Aguas residuais	Ajustar pH (TCs <3.0, SAs <2,5) e adição Na ₂ EDTA	Oasis HLB	MeOH	Xterra MS C ₁₈ 50x2,0mm, 2,5µm	Gradiente H ₂ O/ ácido fórmico ACN/ ácido fórmico	Simatone	UV: TCs (360nm) SAs (260nm) ESI(+) IT MS SIM	0.05
GROS <i>et al.</i> (2006)	Espanha (Rio Croácia (águas residuais	Sulfametoxazol Trimetoprim Ofloxacina	Amostras ambientais		Oasis HLB	MeOH	Purospher Star RP-18 125x2,0mm, 5µm	Gradiente MeOH/ H ₂ O	Fenacetina	ESI MS/MS MRM	0.001 - 0.043

YANG <i>et al.</i> (2004)	E.U.A	SAs e TCs	Águas ambientais	Ajustar pH < 3 e adição Na ₂ EDTA	Oasis HLB	MeOH	Xterra MS C ₁₈ 50x2,1mm, 2,5µm	Gradiente H ₂ O/ác fórmico ACN/ác fórmico	Simatone	UV (TCs 360nm, SAs 260nm) ESI(+), IT QqQ SRM	0.03-0.05 ~ comp
GÖBEL <i>et al.</i> (2004)	Suécia	MLs, SAs, Trimetoprim	Águas da ETARs	Ajustar pH = 3 e adição NaCl	Oasis HLB	MeOH-acetato etilo MeOH+amónia	YMC Pro C ₁₈ 150x2mm, 3µm	Gradiente H ₂ O/ác fórmico (pH 2,1) MeOH/ác fórmico	Sulfamerazina josamicina	ESI(+) QqQ MRM	0.016 - 0.100 ng/L
HAO <i>et al.</i> (2006)	Canadá	TCs, MLs, SAs	Águas superficiais	Ajustar pH = 8, 2 e adição Na ₂ EDTA	Oasis HLB Supelco	MeOH	Genesis 150x2,1mm Apex 150x2,1mm.	Gradiente HFBA+ NH ₄ Ac+MeOH ACN NH ₄ Ac/ACN	sulfametazina	IT QqQ MRM ESI(+) ESI(-)	0.03-0.60
RENEW e HUANG (2004)	E.U.A	FQs, SAs Trimetoprim	Amostras líquidas	Ajustar pH = 2,5 Adição NaCl	Coluna de troca aniónica Oasis HLB	MeOH + H ₃ PO ₄	Zorbax SB-C ₁₈ 150x2,1mm, 5µm	Gradiente NH ₄ Ac+acet. Ac.+ACN ACN	Sulfamerazina lomefloxacina	UV (254nm) ESI(+), MS/MS SIM	0.02-0.05 0.03-0.09

McARDEL L <i>et al.</i> (2003)	Suécia	Macrólidos	Águas ambientais	Ajustar pH = 7	LiChrolut e RP-18	MeOH	Nucleosil 100-5 C ₁₈ HD 125x2mm.	Gradiente NH ₄ Ac /ACN (pH 6)	josamicina oleandomicina	ESI(+) MS/MS SIM	0.5-1.4
											0.6-1.8
TURIEL <i>et al.</i> (2005)	Bélgica	FQs	Águas residuais	Off-line: ajustar pH = 2,5	C ₁₈ SAX	Amónia/ MeOH MeOH/acético	Atlantis™ C ₁₈ 150x3,0mm, 3µm	Gradiente Ác fórmico/ACN		UV (275 e 260nm)	0.5-1.4
				On-line: adição NaCl	C ₁₈ SAX	MeOH/acético	MeOH/acético	Ác fórmico+ ACN			0.6-1.8
MIAO e METCALF E (2003)		Roxitromicina	Águas ambientais	Ajustar pH = 4,0	Oasis HLB	MeOH	YMC ODS 100x1,0mm, 3µm	Gradiente ACN/.NH ₄ Ac		ESI(+) QqQ MRM	3 pg
REVERTÉ <i>et al.</i> (2003)	Espanha	TCs e FQs	Água de rio e da ETARs	Ajustar pH = 2,8	Oasis HLB	MeOH	Kromasil 100 C ₁₈ 250x4,6mm, 5µm	Gradiente H ₂ O + acetic ac. ACN		ESI(+) MS SIM	0.004 - 0.006
				Ajustar pH = 3 e			Luna 150x3mm, 3,5µm				0.05-0.1
KARTHIK EY e MEYER (2006)	E.U.A	SAs, MLs, TCs, FQs	Águas residuais	adição Na ₂ EDTA	Oasis HLB MCX	MeOH, NH ₄ OH- MeOH	Luna 150x3mm,	Gradiente SAs, MLs: NH ₄ Ac/ACN	Eritromicina, sulfametazida	ESI(+) MS	

Capítulo I - Introdução Teórica

PENA <i>et al</i> (2008)	Portugal	NOR, CIPRO, ENRO	Água do rio Mondego	Ajustar pH = 3 e adição Na ₂ EDTA	Oasis HLB	MeOH	Chromolith RP-18e (100 x 4,6 mm)	Ac fosfórico 0.025 M / metanol	Excitation (278) Emission (450)	25 ng/L
-----------------------------	----------	------------------------	------------------------	--	--------------	------	--	--------------------------------------	--	------------

Capítulo II

Parte Experimental

Capítulo II-Parte Experimental

II.1 Materiais e métodos

II.1.1. Reagentes e Soluções

II.1.1.1. Reagentes

- Acetonitrilo (grau de pureza HPLC, Sigma-Aldrich, Madrid, Espanha)
- Metanol (grau de pureza HPLC, Carlo Erba, Milão, Itália)
- Tetrabutylamónio “TBA” (Sigma-Aldrich, Madrid, Espanha)
- Ácido fosfórico 85% RPE-ACS (Carlo Erba, Milão, Itália)
- Ácido sulfúrico 95-97% (Baker, Deventer, Holanda)
- EDTA dissódico (Merck, Darmstadt, Alemanha)
- Azoto N₄₅
- Água destilada
- Água para HPLC: a água usada foi purificada por destilação e passagem pelo sistema Milli Q (Millipore, Bedford, M.A, USA)
- Hidróxido de sódio (Merck, Darmstadt, Alemanha)
- Padrões de NOR, CIPRO, ENRO e SARA com grau de pureza superior a 98%, (Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemanha)

II.1.1.2. Soluções

- Solução de ácido sulfúrico 0,1684 M preparada por diluição de 10 ml de ácido sulfúrico 95-97% (Baker, Deventer, Holanda) com água destilada num balão de 1 L.
- Solução de ácido sulfúrico 0,005 M preparada por dissolução de 29,7 ml de ácido sulfúrico 0,1684 M em balão volumétrico de 1 L com água destilada.
- Solução de ácido clorídrico 0,15 M preparada adicionando 12,4 mL de ácido clorídrico a 37% num balão volumétrico de 1 L com água destilada.

II.1.1.2.1. Soluções padrão

- Soluções stock individuais de NOR, CIPRO, ENRO e SARA a 1 mg/mL: Cada uma das soluções foi preparada dissolvendo 50 mg do padrão respectivo com cerca de 30 mL de ácido sulfúrico. Após ultrasonicação durante 15 minutos, fez-se o volume a 50 mL com ácido sulfúrico 0,005 M. As soluções stock foram armazenadas a -20°C.
- As soluções intermédias dos quatro antibióticos, com concentrações a 2,5 µg/mL, para a NOR, CIPRO e ENRO, e 10 µg/mL, para a SARA, foram preparadas a partir das soluções stock procedendo às diluições adequadas.
- Todas as soluções padrão trabalho contendo NOR, CIPRO, ENRO e SARA com concentrações compreendidas entre 0,025 e 1,0 µg/mL, foram preparadas a partir das soluções intermédias e armazenadas entre 0 e 4°C.

II.1.1.2.2. Fase Móvel

A fase móvel consistiu numa solução de ácido fosfórico 0,025 M (cujo pH foi ajustado a 3 com TBA) e metanol (960:40). A solução foi posteriormente filtrada através de um filtro de membrana com poro de 0,2 µm, sob vácuo, e desgaseificada em ultrassons, durante 15 minutos.

II.1.2 Materiais

- Cartuchas SPE Oasis HLB 6 cc/ 200 mg (Waters Corporation, Milliford, MA, E.U.A)
- Cartuchas SPE de troca iónica AccuBond II SAX 6 mL/500 mg (Agilent Technologies, Santa Clara, E.U.A)
- Pipeta volumétrica de 1 mL

- Pipetas (2mL, 5mL e 10 mL)
- Seringas de vidro (10, 20, 50, 100 e 250 μ L)
- Balões volumétricos (10, 20, 25, 100, 500, 1000 mL)
- Provetas
- Varetas de vidro
- Espátulas
- Tubos de ensaio
- Copos de precipitação
- Funis de vidro
- Parafilm “M” (Pechiney Plastic Packaging, Chicago, E.U.A)
- Filtro de membrana com poro de 0,2 μ m e de 50 mm (Whatman, GE Healthcare, Little Chalfon, Inglaterra)
- Tubos de centrífuga
- Filtro de membrana com poro de 0,45 μ m DURAPORE[®] (Millipore, Irlanda)
- Suportes para tubos de ensaio
- Papel de filtro Whatman No. 1
- Frascos de vidro de 1L
- Provetas
- Copos de vidro

II.1.3. Equipamento

- Balança analítica Mettler Toledo modelo AG285 (Zurique, Suíça)
- Centrífuga Meditronic (Barcelona, Espanha)
- Agitador vortex modelo Zx3 (Unimag, Reagente 5, Portugal)
- Potenciómetro CD 7400 –WPA (Cambridge, Reino Unido)
- Aparelho de ultrassons modelo Sonorex RK 100 (Berlim, Alemanha)
- Sistema de vácuo para extracção em fase sólida
- Sistema Milli-Q (Millipore, Bedford, E.U.A)

- Cromatógrafo para determinação por LC-FD:
 - bomba modelo V2.11.141 (Gilson Medical Electronics, Villeurs Le Bell, França),
 - injector Rheodyne modelo 7125 (Cotati, Califórnia, E.U.A) com um *loop* de 50 μ l,
 - coluna monolítica (Chromolith Performance RP-18e, 100 x 4.6 mm)
 - detector fluorimétrico modelo 0305-9060 (LabAlliance, França),
 - integrador Spectra Physics modelo SP 4290 (San Jose, E.U.A),

II.1.4. Condições cromatográficas

A optimização das condições cromatográficas para os compostos em estudo foi efectuada com as soluções trabalho, utilizando uma coluna monolítica (Chromolith Performance RP-18e, 100 x 4.6 mm) com um fluxo de 2 mL/min.

II.1.4.1. Detecção fluorimétrica

As condições do detector fluorimétrico, acoplado ao sistema de HPLC, foram optimizadas de forma a permitir a maximização da intensidade da fluorescência das FQs de interesse.

Os comprimentos de onda, foram optimizados através da obtenção do espectro de uma solução padrão com as respectivas FQs. Os comprimentos de onda de excitação e de emissão foram de 278 nm e de 450 nm, respectivamente. A banda espectral de excitação e emissão foi de 10 nm.

II.1.5. Amostragem

As amostras foram recolhidas, durante os anos 2006 e 2007, em três tipos de suiniculturas das regiões do Porto e Alentejo.

Foi analisado um total de 30 amostras de águas provenientes de 3 tipos de suiniculturas das quais 24 amostras pertenciam a 4 suiniculturas intensivas (A, B, C e E), quatro amostras pertencentes a uma suinicultura extensiva (D) e duas provenientes de uma suinicultura probiótica (F).

II.1.6. Pré-tratamento e purificação das amostras

Todas as amostras recebidas foram classificadas em diferentes grupos de acordo com a sua origem em: águas de consumo, águas residuais, águas de drenagem e águas de rio.

As amostras foram transportadas do local de recolha até ao laboratório em frascos de vidro âmbar e mantidas numa arca frigorífica durante o transporte.

Após a chegada das amostras ao laboratório, procedeu-se à sua filtração através de um filtro de membrana de poro 0.45 μm , de modo a remover a matéria em suspensão, e armazenados no frigorífico a 4°C até à sua análise.

II.1.6.1. Águas de consumo e águas de rio

Após a centrifugação e filtração de 100 mL da amostra através de um filtro de poro 0,2 μm , procedeu-se ao ajuste do pH a 4,0, com ácido sulfúrico (1M), e à adição de 186 mg de EDTA dissódico. De seguida, procedeu-se à extração em fase sólida através de uma coluna SPE Oasis HLB de 200 mg. A coluna foi previamente acondicionada com 5 mL de metanol e 4 mL de água Milli-Q.

Em seguida, fez-se passar a amostra através da coluna Oasis, seguindo-se uma lavagem com 2 mL de ácido cítrico (pH=4,0) e 20 mL de água Milli-Q acidificada a pH = 4,2 com ácido cítrico, e secagem da coluna, sob vácuo, durante 15 minutos.

A eluição das FQs foi efectuada com 4 mL de metanol, e o eluído evaporado sob o fluxo suave de azoto durante 30 minutos. O resíduo foi redissolvido em 500 µL da solução da fase móvel e filtrado através de filtro de membrana de 0,45 µm, tendo-se procedido de seguida à injeção de 50 µL do resíduo reconstituído no sistema cromatográfico (Fig II.1).

II.1.6.2. Águas residuais

Após a centrifugação e filtração de 100 mL da amostra através de um filtro de membrana de poro 0,2 µm, procedeu-se ao ajuste do pH a 4,5, com ácido sulfúrico, e à adição de 186 mg de EDTA. A extracção foi efectuada através da combinação de duas colunas em *tandem*: uma coluna de troca iónica (SAX) e uma coluna HLB Oasis 6cc (200 mg) a um fluxo de 3 mL/min. As colunas foram previamente acondicionadas, em simultâneo com 2 mL de metanol e 2 mL do ácido cítrico (pH 4,0).

Após a passagem da amostra tratada, a coluna de troca iónica foi removida e descartada. A lavagem da coluna Oasis foi efectuada com 2 mL de ácido cítrico a pH 4,0 e 20 ml de água Milli-Q (acidificada a pH 4,2 com ácido cítrico) e, antes de proceder à eluição das FQs com 4 mL de metanol, a coluna Oasis foi seca sob vácuo durante cerca 15 minutos. O eluído foi concentrado à secura, sob o fluxo suave de azoto, durante 30 minutos, redissolvido em 500 µL de fase móvel, filtrado e injectado no sistema cromatográfico (Fig II.1).

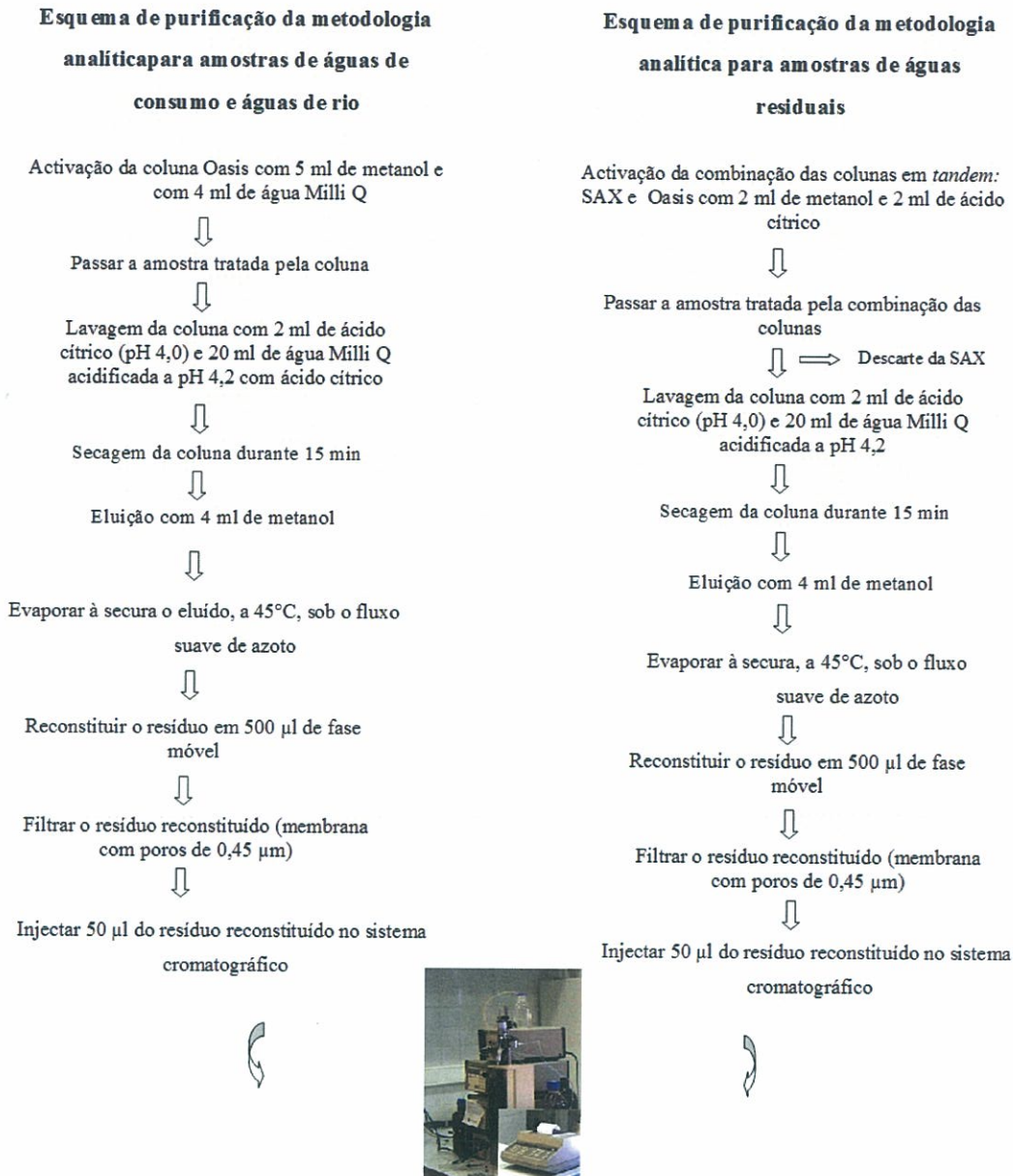


Figura II.1. Esquemas de purificação das metodologias analíticas utilizadas

II.2. Validação das metodologias analíticas

A qualidade e a credibilidade de um resultado analítico fundamentam-se nos cuidados com os quais o analista se cerca para produzir dados que expressem o valor real da medida obtida. Para a validação da metodologia analítica foram avaliados os seguintes parâmetros: selectividade, linearidade, exactidão e precisão.

II.2.1. Linearidade

A linearidade foi avaliada através do método do padrão externo. As curvas de calibração foram construídas, relacionando as concentrações dos padrões *versus* as áreas obtidas por regressão linear, durante 3 dias consecutivos. Os intervalos de concentrações estudados foram 0,05-1,0 µg/mL para a NOR, CIPRO e ENRO e 0,025-0,2 µg/mL para a SARA.

II.2.2. Exactidão e precisão

A exactidão é definida como a capacidade que um método analítico possui para proporcionar resultados o mais próximo possível do valor verdadeiro. Na prática traduz-se como sendo a percentagem de recuperação do composto cuja concentração na amostra é conhecida. A precisão de um método é obtida através do grau da concordância entre os valores de uma série repetida de ensaios analíticos efectuados numa mesma amostra homogénea (Lino e Silveira, 2001).

Assim como a exactidão reflecte o erro sistemático, a precisão reflecte o erro aleatório e pode-se expressar mediante o desvio padrão ou o coeficiente de variação (Lino e Silveira, 2001).

Para avaliar a exactidão e a precisão do método, foram realizados ensaios de fortificação das amostras em estudo. A avaliação da exactidão foi realizada a dois níveis de concentrações, quer em amostras de águas de consumo e de rio quer nas amostras de águas residuais. Para as primeiras, os níveis estudados foram 50 ng/L e 100 ng/L, para a NOR, CIPRO e ENRO, e 100 e 250 ng/L para a SARA, enquanto para as águas residuais os níveis avaliados foram de 25 e 50 ng/L, para a NOR, CIPRO e ENRO, e 50 e 100 ng/L para a SARA. A precisão do método foi avaliada em 3 dias diferentes. Os valores de exactidão e precisão obtidos estão representados nas tabelas II.6 e II.7.

II.2.3. Selectividade

De modo a avaliar os interferentes presentes em cada tipo de amostra, foram efectuados ensaios em branco de cada grupo das amostras em estudo. O cromatograma obtido neste ensaio (figura II.2) mostra a ausência de interferentes aos tempos de retenção dos antibióticos de interesse nas amostras analisadas, segundo as condições de trabalho descritas.

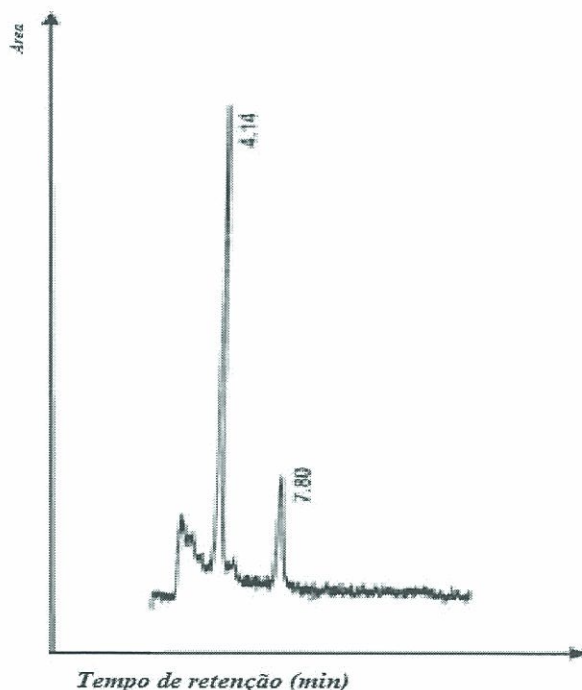


Figura II.2. Cromatograma de um ensaio em branco proveniente de uma suinicultura de produção intensiva

II.2.4. Avaliação da estabilidade das FQs

A estabilidade das soluções padrão e dos extractos das amostras fortificadas foi avaliada. A estabilidade das soluções trabalho, preparadas em ácido sulfúrico, conservadas a 4 °C, foi estudada durante uma semana e a dos extractos durante três dias.

II.3. Resultados e Discussão

II.3.1. Optimização das condições cromatográficas

Uma vez que as FQs se encontram presentes nas amostras ambientais em concentrações muito reduzidas, na ordem de ng/L, para a sua monitorização é necessário o desenvolvimento de métodos analíticos sensíveis. Assim, para atingir o objectivo acima mencionado procedeu-se à optimização das condições cromatográficas.

Foram efectuados diversos estudos no sentido de desenvolver um sistema de solventes para a análise isocrática dos antibióticos NOR, CIPRO, ENRO e SARA com boa sensibilidade e resolução, que permitissem, deste modo, a sua quantificação precisa nas concentrações de interesse.

A optimização das condições cromatográficas para os compostos em estudo foi efectuada com as soluções padrão.

A composição da fase móvel foi optimizada verificando-se a influência da presença de cada reagente, das concentrações dos mesmos e do pH da fase móvel no perfil cromatográfico e resolução dos picos dos compostos em estudo.

Assim, com o objectivo de obter uma boa separação dos antibióticos de interesse num tempo de análise adequado foram experimentados as seguintes proporções na mistura água/metanol: 960:40, 955:45, 920:80, 910:90, 900:100, 880:120, a diferentes fluxos (1mL/min, 2mL/min e 3mL/min). A melhor separação foi obtida com a mistura água/metanol (960:40), a um fluxo de 2,0 mL/min.

Os comprimento de onda foram otimizados de modo a proporcionar boa sensibilidade, e com base nestes estudos, a detecção ocorreu a um comprimento de onda de 278 nm de excitação e 450 nm de emissão.

A análise isocrática executada nas condições anteriormente descritas permitiu a eluição dos antibióticos em estudo, com boa resolução, em aproximadamente 16 minutos.

A figura II.3 apresenta um cromatograma de uma solução padrão de NOR, CIPRO, ENRO e SARA, nas condições de ensaio anteriormente descritas, sendo visível uma boa resolução dos quatro antibióticos.

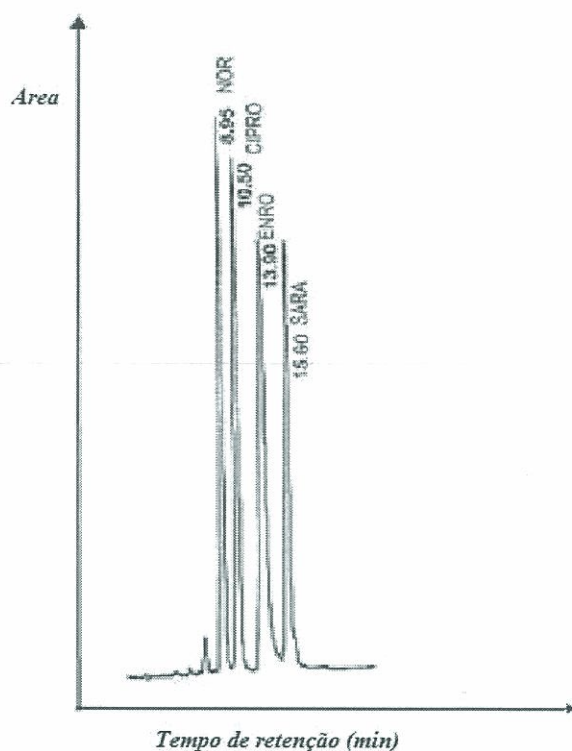


Figura II.3. Cromatograma de uma solução padrão de NOR, CIPRO, ENRO e SARA

II.3.2. Validação das condições cromatográficas

II.3.2.1. Tempos de retenção

Com base nas 4 determinações que foram feitas simultaneamente durante três dias, a média dos tempos de retenção para NOR, CIPRO, ENRO e SARA foi de 8,94, 10,49, 13,90 e 15,65 minutos, respectivamente, e a precisão dos tempos de retenção foi de 0,42%, 0,54 %, 0,60 % e 0,84 % para NOR, CIPRO, ENRO e SARA, respectivamente (Tabelas II.1 – II.4).

Tabela II.1. Precisão intra-dia e desvio padrão (DP) do tempo de retenção da NOR

Dias	Média (tr)	Repetibilidade intra-dia (%)
1	8,94	0,44
2	8,99	0,42
3	8,88	0,39
1-3	8,94	0,42

Tabela II.2. Precisão intra-dia e desvio padrão (DP) do tempo de retenção da CIPRO

Dias	Média (tr)	Repetibilidade intra-dia (%)
1	10,50	0,86
2	10,49	0,46
3	10,49	0,44
1-3	10,49	0,59

Tabela II.3. Precisão intra-dia e desvio padrão (DP) do tempo de retenção da ENRO

Dias	Média (tr)	Repetibilidade intra-dia (%)
1	13,90	0,73
2	13,88	0,49
3	13,91	0,59
1-3	13,90	0,60

Tabela II.4. Precisão intra-dia e desvio padrão (DP) do tempo de retenção da SARA

Dias	Média(t r)	Repetibilidade intra-dia (%)
1	15,68	0,74
2	15,66	0,98
3	15,62	0,80
1-3	15,65	0,84

II.3.2.2. Linearidade

A linearidade foi avaliada pelo método do padrão externo, tendo as curvas de calibração sido construídas através da correlação entre as áreas dos padrões *versus* a sua concentração, durante 3 dias consecutivos. Obtiveram-se traçados lineares entre 0,05 e 1 µg/mL para a NOR, CIPRO e ENRO e para a SARA entre 0,025 e 0,2 µg/mL (Tabela II.5) com um coeficiente de correlação médio superior a 0,998.

Os resultados da avaliação da linearidade do método analítico foram adequados, dentro das concentrações pretendidas, obtendo-se, coeficientes de correlação compreendidos entre

0,9975, para a ENRO, e 0,9995, para a CIPRO, tal como se demonstra na tabela II.5 e gráficos II.1. a II.12.

Tabela II.5. Concentração dos antibióticos estudados nos ensaios de linearidade e respectivo coeficiente de correlação ao longo dos três dias

Concentração da NOR	Concentração da CIPRO	Concentração da ENRO	Concentração da SARA
0,05 µg/L	0,05 µg/L	0,05 µg/L	0,025 µg/L
0,1 µg/L	0,1 µg/L	0,1 µg/L	0,05 µg/L
0,25 µg/L	0,25 µg/L	0,25 µg/L	0,075 µg/L
0,5 µg/L	0,5 µg/L	0,5 µg/L	0,1 µg/L
1,0 µg/L	1,0 µg/L	1,0 µg/L	0,2 µg/L
$R^2=0,9987$	$R^2 = 0,9995$	$R^2 = 0,9980$	$R^2 = 0,9991$
$R^2 = 0,9986$	$R^2 = 0,9988$	$R^2 = 0,9984$	$R^2 = 0,9993$
$R^2 = 0,9993$	$R^2 = 0,9992$	$R^2 = 0,9975$	$R^2 = 0,9991$

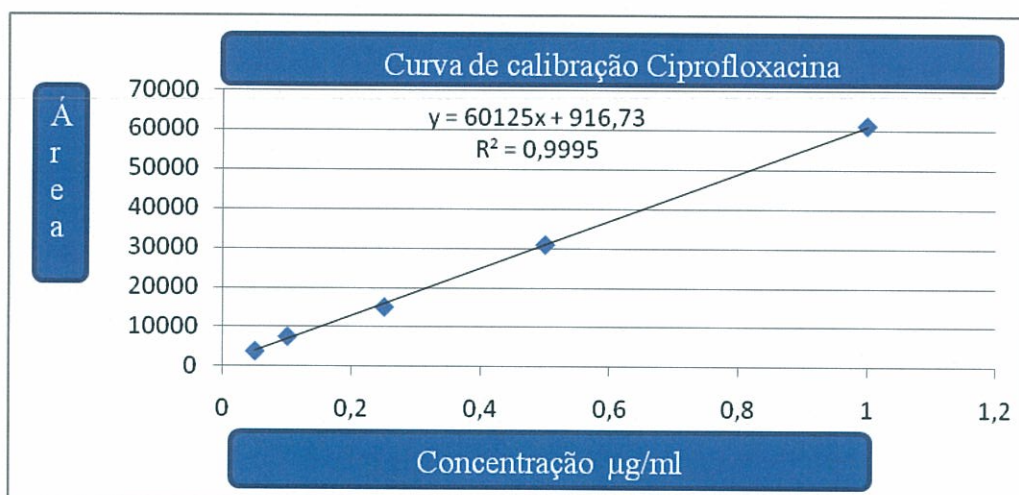
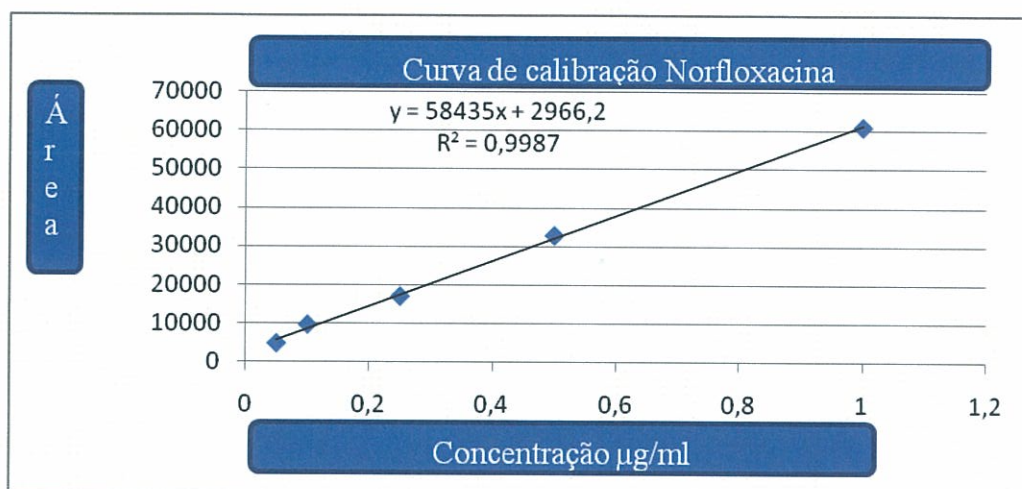


Gráfico II.1. e II.2. Curvas de calibração das soluções padrão para o dia 1 relativas à NOR e CIPRO

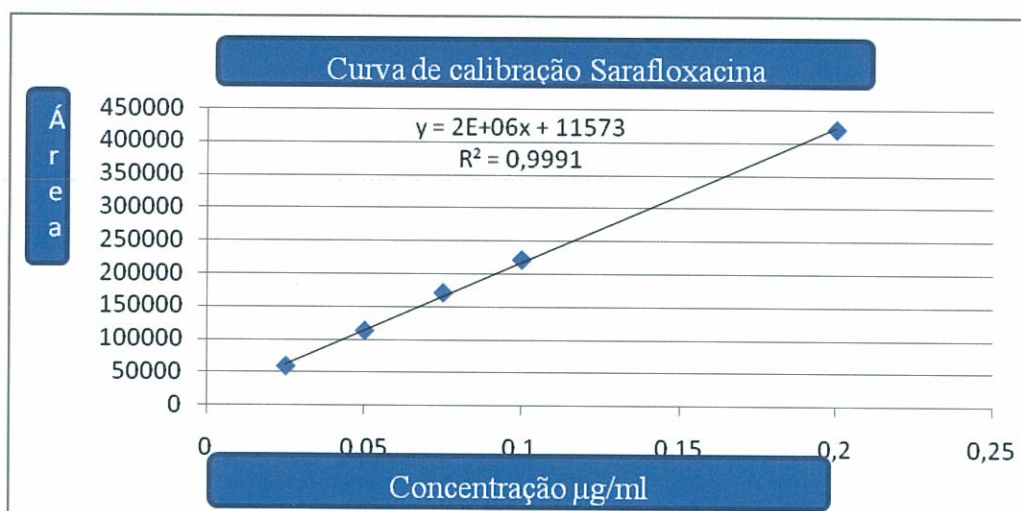
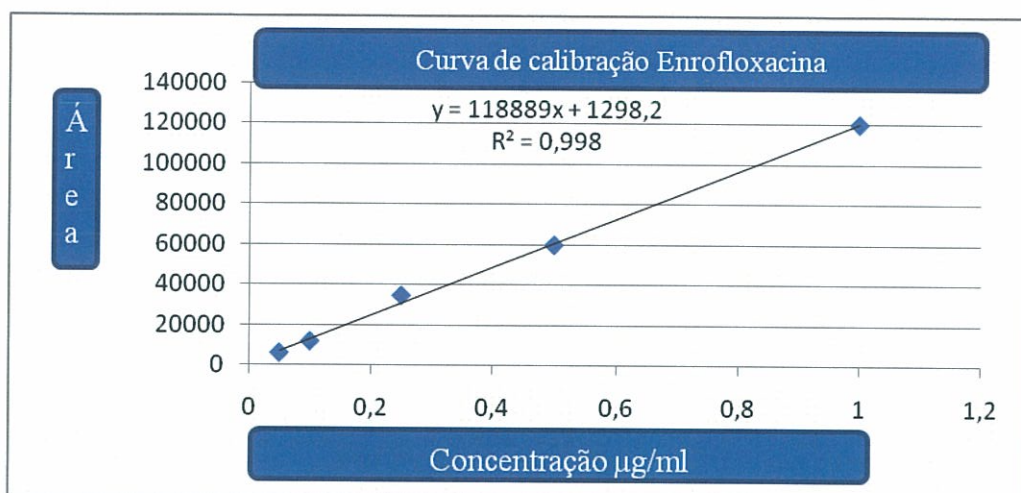


Gráfico II.3. e II.4. Curvas de calibração das soluções padrão para o dia 1 relativas à ENRO e SARA

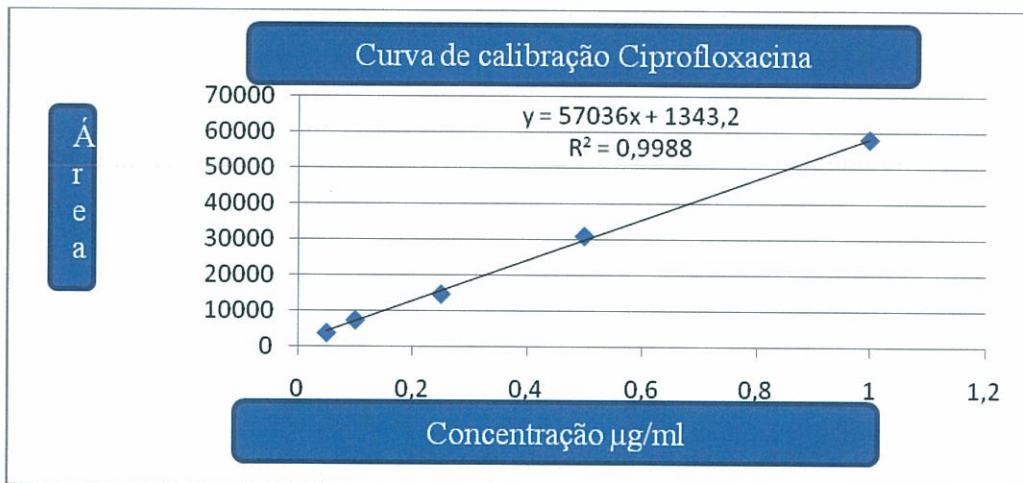
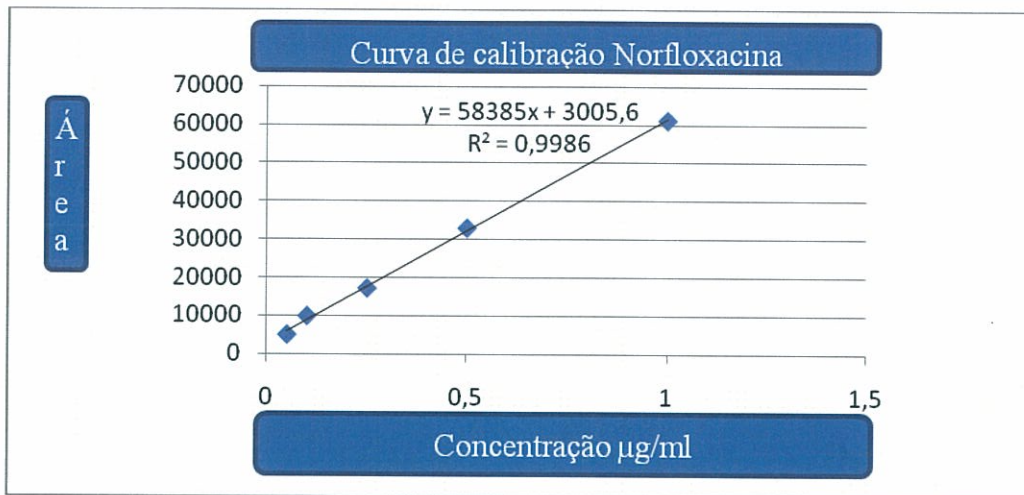


Gráfico II.5. e II.6. Curvas de calibração das soluções padrão para o dia 2 relativas à NOR e CIPRO

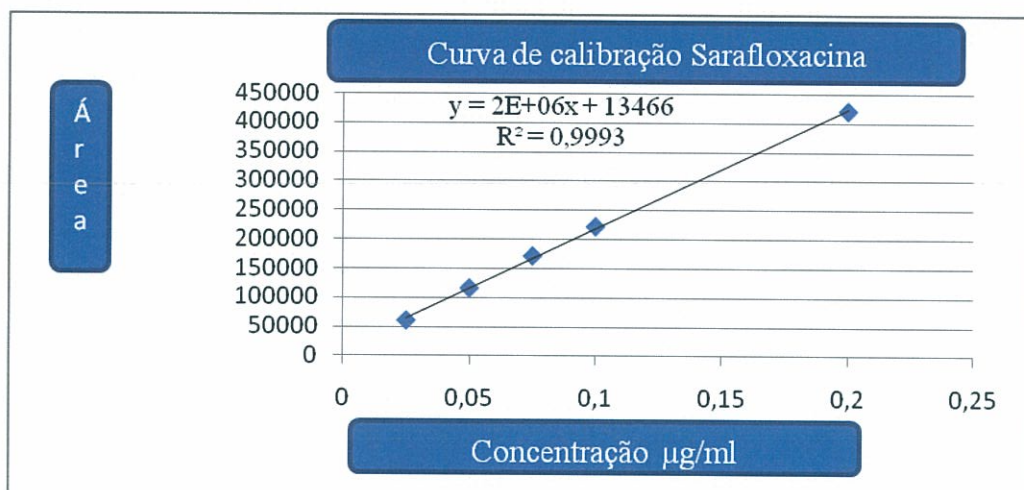
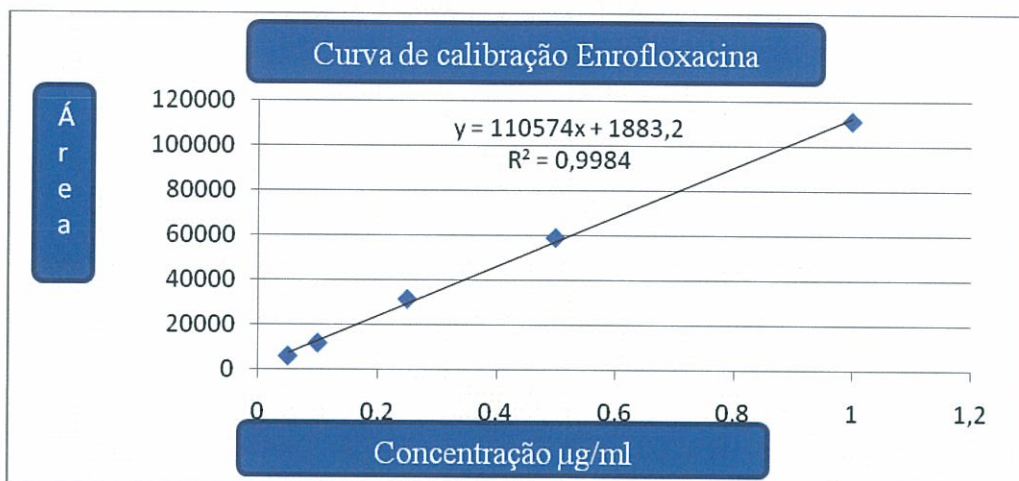


Gráfico II.7. e II.8. Curvas de calibração das soluções padrão para o dia 2 relativas à ENRO e SARA

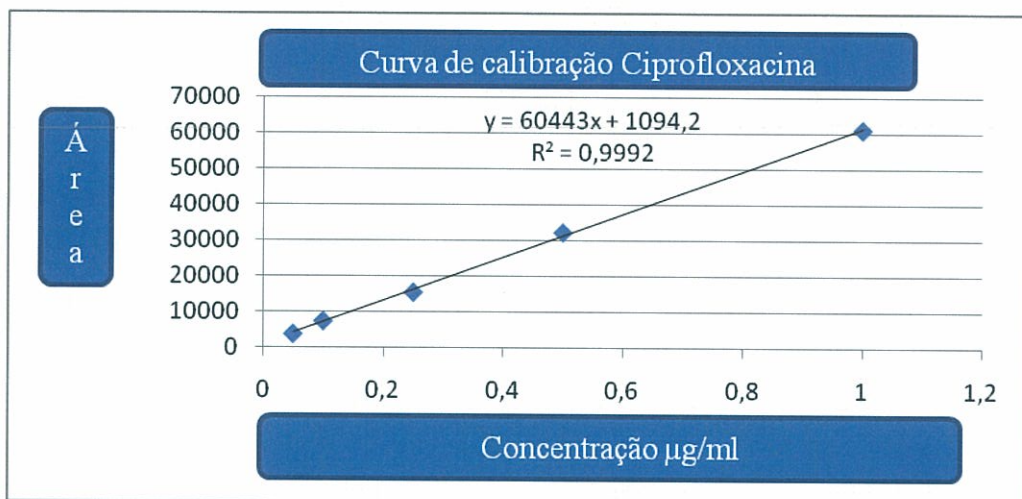
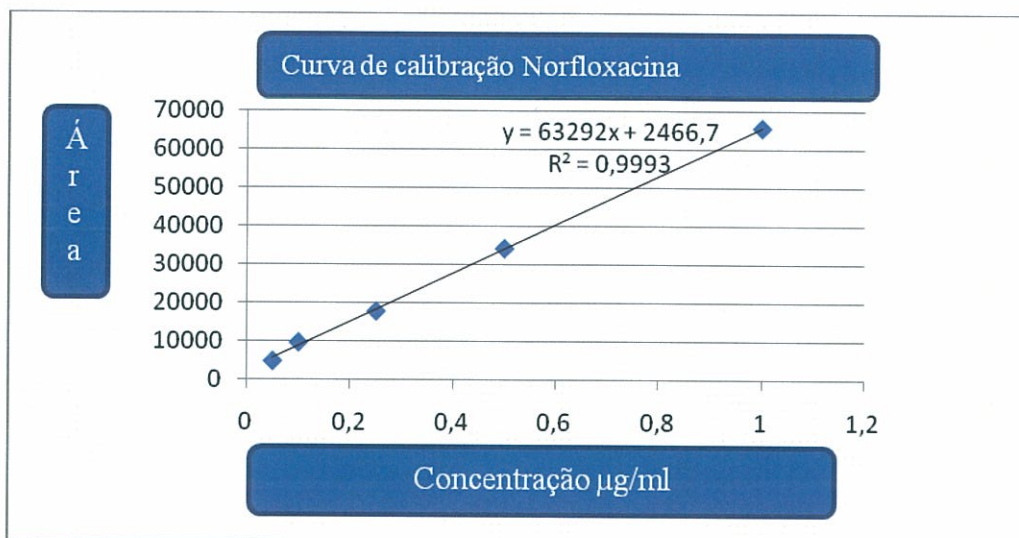


Gráfico II.9. e II.10. Curvas de calibração das soluções padrão para o dia 3 relativas à NOR e CIPRO

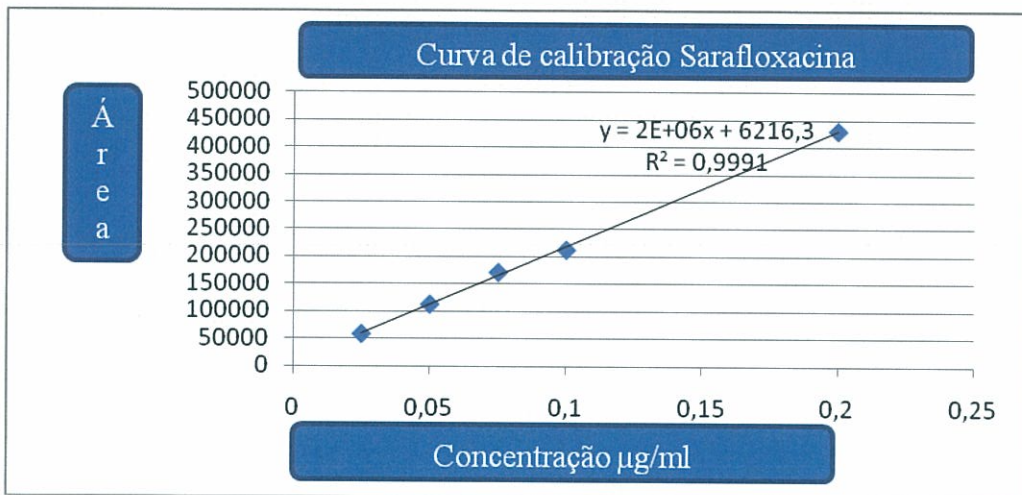
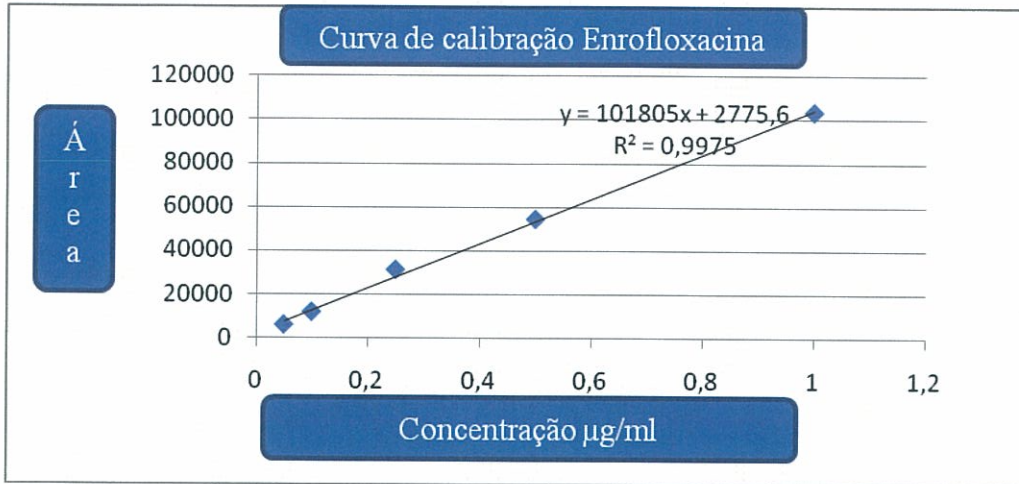


Gráfico II.11. e II.12. Curvas de calibração das soluções padrão para o dia 3 relativas à ENRO e SARA

II.3.2.3. Limite de quantificação

O limite de quantificação (LOQ) é definido como sendo a menor concentração de analito na amostra que pode ser quantificada, sob as condições experimentais estabelecidas, com razoável precisão (Lino e Silveira, 2001). O limite de quantificação foi de 0,025 µg/L para a NOR, CIPRO e ENRO e 0,05 µg/L para a SARA, para as águas de consumo e de rio, e para as águas residuais foi de 0,05 µg/L para a NOR, CIPRO e ENRO e 0,1 µg/L para a SARA.

II.3.2.4. Exactidão e precisão

A avaliação da exactidão do método foi realizada a dois níveis de fortificação quer em amostras de água de consumo e de rio quer nas amostras de águas residuais. Para as águas de consumo e de rio, os níveis estudados foram 50 ng/L e 100 ng/L para a NOR, CIPRO e ENRO e 100 e 250 ng/L para a SARA, enquanto para as águas residuais os níveis avaliados foram de 25 ng/L e 50 ng/L para a NOR, CIPRO e ENRO e 50 e 100 ng/L para a SARA.

A figura II.4 representa um cromatograma de uma amostra fortificada com NOR, CIPRO, ENRO e SARA.

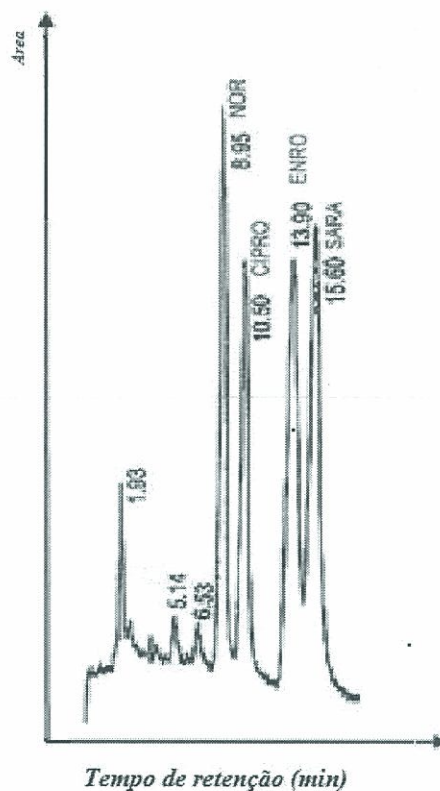


Figura II.4. Cromatograma de um ensaio de fortificação de uma amostra negativa proveniente da suinicultura extensiva

No que respeita às amostras de águas de consumo e de rio, os resultados relativos às percentagens de recuperação nas amostras fortificadas foram adequadas, como podemos constatar na tabela II.6. As percentagens de recuperação variam entre 70,8% e 85,8%, sendo a maioria na ordem dos 80%. A SARA apresenta a percentagem mais baixa, 70,8% para o nível de fortificação de 100 ng/L, enquanto para a ENRO a percentagem de recuperação mais baixa é de 79,3%, para o nível de fortificação de 50 ng/L. A percentagem de recuperação mais

elevada foi obtida para a NOR para o nível de fortificação de 100 ng/L. As percentagens de recuperação mais baixas foram obtidas para os níveis de fortificação mais baixos, enquanto para os níveis de fortificação de 100 ng/L, para a NOR, CIPRO e ENRO, e 250 ng/L, para a SARA, foram obtidas as percentagens de recuperação mais elevadas, superiores a 80%. A ENRO apresenta uma percentagem de 84,9%, para o nível de fortificação de 100 ng/L, enquanto para a NOR a percentagem de recuperação mais baixa é de 72,8% para o nível de fortificação de 50 ng/L.

O valor de precisão intra-dia mais elevado, 9,5%, foi obtido para o nível de fortificação de 100 ng/L da SARA, sendo o valor de precisão mais baixa, 5,9%, obtido para a NOR para o mesmo nível de fortificação. Os valores alcançados para o nível de fortificação de 50 ng/L, foram de 7,3% para a NOR, 7,9% para a CIPRO e 8,1% para a ENRO. Para o nível de fortificação de 100 ng/L, os resultados alcançados foram de 9,5%, 5,9%, 6,6% e 7,4% para a SARA, NOR, CIPRO e ENRO, respectivamente. Para o nível de 250 ng/L foi obtido o valor 8,6% para a SARA.

Relativamente à precisão inter-dia, os valores alcançados para o nível de fortificação de 50 ng/l foram de 9,7% para a NOR, 8,9% para a CIPRO e 10,3% para a ENRO. Para o nível de fortificação de 100 ng/L, foram alcançados valores de 12,7% para a SARA, 7,4% para a NOR, 6,7% para a CIPRO e 9,6% para a ENRO, e para o nível de fortificação de 250 ng/L foi obtido o valor de 10,5% para a SARA, como se pode observar na tabela II.6.

Para as amostras de águas residuais (Tabela II.7), os valores obtidos são idênticos aos anteriormente mencionados. As percentagens de recuperações foram superiores a 80,1% para todos os níveis de fortificação. A SARA apresenta a percentagem mais baixa, 80,1%, para o nível de fortificação de 50 ng/L, enquanto que para a ENRO a percentagem de recuperação mais baixa foi de 84,2% para o nível de fortificação de 25 ng/L. As percentagens de recuperação da NOR oscilaram entre 83,5% e 90% para os níveis de fortificação de 25 ng/L e 50 ng/L, respectivamente.

O valor da precisão intra-dia mais elevado, 6,1%, foi obtido para a SARA para o nível de fortificação mais alto, 100 ng/L, tendo o valor mais baixo, 3,3%, sido obtido para a NOR, para o nível de fortificação 50 ng/L. Para o nível de fortificação de 25 ng/L, os valores foram de 3,8 % para a NOR, 4,0% para a CIPRO e 4,4 % para a ENRO. Para o nível de fortificação de 50 ng/L os valores foram de 5,6% para a SARA, 3,3% para a NOR, 4,5% para a CIPRO e 5,2 % para a ENRO.

Quanto à precisão inter-dia, os valores alcançados para o nível de fortificação de 25 ng/L, foram de 5,8% para a NOR, 8,7% para a CIPRO e 10,2% para a ENRO. Para o nível de fortificação de 50 ng/L foram alcançados os valores de 9,2% para a SARA, 5,0% para a NOR, 5,7% para a CIPRO e 3,6% para a ENRO e para o nível de fortificação de 100 ng/L foi obtido o valor de 7,5% para a SARA.

Tabela II.6. Valores relativos à exactidão e precisão obtidos em amostras de águas de consumo e de rio

FQs	Nível de fortificação (ng/L)	Percentagens das recuperações	Precisão intra-dia (%)	Precisão inter-dia (%)
NOR	50	72,5	7,3	9,7
CIPRO	50	78,8	7,9	8,9
ENRO	50	79,3	8,1	10,3
SARA	100	70,8	9,5	12,7
NOR	100	85,8	5,9	7,4
CIPRO	100	83,1	6,6	6,7
ENRO	100	84,9	7,4	9,6
SARA	250	80,4	8,6	10,5

Tabela II. 7. Valores relativos à exactidão e precisão obtidos em amostras nas amostras de águas residuais

FQs	Nível de fortificação (ng/L)	Percentagens das recuperações	Precisão intra-dia (%)	Precisão inter-dia (%)
NOR	25	83,5	3,8	5,8
CIPRO	25	81,9	4,0	8,7
ENRO	25	84,2	4,4	10,2
SARA	50	80,1	5,6	9,2
NOR	50	90,0	3,3	5,0
CIPRO	50	88,1	4,5	5,7
ENRO	50	90,4	5,2	3,6
SARA	100	86,6	6,1	7,5

II.3.3. Estabilidade das FQs

Relativamente aos ensaios de estabilidade efectuados em amostras fortificadas e em padrões, verificou-se que as FQs se mantiveram inalteradas durante três dias, nos extractos das amostras, e no decurso de uma semana nas soluções de trabalho.

II.3.4. Níveis de FQs nas amostras

II.3.4.1. Amostras de águas dos três tipos de suiniculturas

A análise dos resultados obtidos nas amostras de águas dos três tipos de suinicultura revelou que apenas foram detectadas resíduos de FQs nos sistemas de produção intensiva comparativamente com os métodos de produção extensiva e probiótica (Tabela II.8.).

Da totalidade das amostras analisadas (n=30), 50% estavam contaminadas com FQs, das quais 46,7% (n=14) apresentaram resíduos de ENRO, 6,7% (n=2) de CIPRO e 6,7% de SARA. Em nenhuma das amostras foi detectada a presença de NOR.

Nas amostras provenientes das suiniculturas de produção intensiva, verificou-se uma incidência de 58,3% de FQs, sendo a de ENRO de 93,3% e as de CIPRO e SARA de 13,3%.

No que respeita aos teores de FQs, a análise dos resultados das amostras provenientes de suinicultura intensiva revelou que a ENRO apresentou concentrações que oscilaram entre 0,31 e 63 µg/L. Quanto à SARA e à CIPRO, foram detectadas apenas em duas amostras em concentrações de 1,8 e 14 µg/L e 0,48 a 0,83 µg/L, respectivamente.

Observando a globalidade das suiniculturas anteriormente mencionadas, verificou-se que a concentração média e o desvio padrão para as FQs detectadas foi de 20,6±19,2; 0,09±0,23 e 1,1±3,6 µg/L respectivamente para ENRO, CIPRO e SARA (Tabela II.8.). Os valores mais elevados obtidos para a ENRO devem-se aos teores superiores encontrados nas suiniculturas B e E, com 31,3±22,9 µg/L e 25,1±12,2 µg/L, respectivamente.

A maior frequência de resíduos de FQs foi encontrada no sistema de produção intensiva, o que pode ser justificado provavelmente devido a grandes quantidades de antibióticos utilizados em suiniculturas intensivas.

A ENRO e a difloxacina são utilizadas somente em veterinária. A difloxacina é completamente metabolizada em SARA, e a CIPRO é o maior metabolito da ENRO. A

ENRO é um dos antibióticos mais usados em medicina veterinária e os resultados obtidos confirmam-no.

Nenhuma das amostras apresentou as quatro FQs estudadas em simultâneo. No entanto, duas amostras apresentaram ENRO e SARA e uma amostra ENRO e o seu produto de degradação, a CIPRO.

A ausência de resíduos de NOR nas amostras analisadas poder-se-à explicar pela não autorização deste antibiótico em medicina veterinária.

II.3.4.2. Amostras de diferentes tipos de águas recolhidas em suiniculturas de produção intensiva e ambiente circundante

Os níveis das FQs em amostras de águas provenientes de suiniculturas de produção intensiva foram avaliados seguindo as metodologias analíticas previamente descritas em II.1.6.1 e II.1.6.2.

O estudo revelou existirem diferenças entre as quatro matrizes estudadas. A matriz águas residuais apresentou uma maior frequência de contaminação, seguida das águas de drenagem. Contrariamente, as amostras provenientes de águas de consumo e de rio não apresentarem contaminação no que respeita aos antibióticos estudados (Tabela II.9.).

As FQs foram quantificadas em 14 amostras (58,3%) das suiniculturas de produção intensiva. No que respeita às águas residuais verificou-se que as FQs foram detectadas e quantificadas em 11 amostras representando 45,8%, relativamente à totalidade das amostras, comparativamente com 25% para águas de drenagem.

Nas águas residuais, os teores de resíduos de CIPRO, ENRO e SARA variaram entre 0,83 e 63 µg/L. A frequência de detecção foi de 9,1% para a CIPRO, 72,7% para a ENRO e 18,2% para a SARA.

As amostras provenientes de águas de drenagem revelaram uma frequência de detecção de 16,7% para a CIPRO e 100% para a ENRO. As concentrações de ENRO variavam entre 0,31 e 32,9µg/L (Tabela II.9.).

A ausência de FQs nas águas de rio, situado próximo das suiniculturas, dever-se-à provavelmente ao efeito da diluição, como referenciado por Tagiri e Suzuki (2009) em estudos realizados no Japão com oxitetraciclina.

Devido à escassez de dados a nível nacional e internacional, a comparação dos resultados obtidos no nosso estudo com os de outros países é difícil.

Apesar de se encontrarem descritas na literatura científica várias metodologias para a detecção e quantificação das FQs em diferentes matrizes, apenas alguns estudos referem a sua presença em amostras de suiniculturas (Christian *et al.*, 2003; Campagnolo *et al.*, 2003; Golet *et al.*, 2003; Renew e Huang, 2004, Tong *et al.*, 2009).

Um estudo realizado na China (Tong *et al.*, 2009) revela que as amostras de águas residuais apresentam resíduos de tetraciclina, FQs e cloranfenicol, cujas concentrações oscilaram entre 8,5 e 21692,7 ng/L.

Resíduos de vários tipos de antibióticos foram detectados em concentrações elevadas, em amostras de suinicultura, nos Estados Unidos da América (Campagnolo *et al.*, 2002). No mesmo país, Renew e Huang (2004) verificaram a ocorrência de CIPRO e ofloxacina, em águas residuais municipais, em concentrações de 100-160 ng/L e 205-305 ng/L, respectivamente.

Na Áustria foram encontradas resíduos de tetraciclina e de FQs em estrumes, cujos valores oscilaram entre 46 e 8,3 µg/kg, respectivamente (Martínez-Carballo *et al.*, 2007).

Golet *et al.* (2003) procederam a um estudo de avaliação da contaminação dos solos na Suíça, após aplicação de estrume como fertilizante. De acordo com os resultados obtidos, o solo foi considerado como um reservatório importante de resíduos de antibióticos.

Capítulo II – Parte Experimental

Tabela II.8. Frequência (%), variação (µg/L), variação (µg/L) e valores médios±DP (µg/L) de FQs em amostras de águas de suiniculturas

	Frequência (%)				Variação				Média ±DP	
	TOTAL	ENRO	CIPRO	SARA	ENRO	CIPRO	SARA	ENRO	CIPRO	SARA
Suiniculturas	15/24	14/15	2/15	2/15	0,31-63,0	0,48-0,83	1,8-14,0	20,6±19,2	0,09±0,23	1,1±3,6
Intensiva	(58,3%)	(93,3%)	(13,3%)	(13,3%)						
A	1/1	1/1	0/1	1/1	0,5	nd	1,8	-	-	-
	(100%)	(100%)	(0%)	(100%)						
B	5/8	5/8	0/8	1/8	0,36-63,0	nd	14,0	31,3±22,9	-	2,8±6,3
	(62,5%)	(62,5%)	(0%)	(12,5%)						
C	3/7	2/7	2/7	0/7	0,31-0,65	0,48-0,83	nd	0,32±0,33	0,44±0,42	-
	(42,9%)	(28,6%)	(28,6%)	(0%)						
E	6/8	6/8	0/8	0/8	11-40,9	nd	nd	25,1±12,2	-	-
	(75%)	(75%)	(0%)	(0%)						
Extensiva	0/4	0/4	0/4	0/4	nd	nd	nd	-	-	-
(D)	(0%)	(0%)	(0%)	(0%)						
Probiótica	0/2	0/2	0/2	0/2	nd	nd	nd	-	-	-
(F)	(0%)	(0%)	(0%)	(0%)						

Tabela II.9. Concentrações ($\mu\text{g/L}$) de FQs em amostras de águas recolhidas nas suiniculturas de produção intensiva e ambiente circundante

FQs	Total (n=24)	Águas de consumo (n=5)	Águas de rio (n=2)	Águas residuais (n=11)	Águas de drenagem (n=6)
NOR	Nd	nd	nd	nd	nd
CIPRO	0,48-0,83 (n=2)	nd	nd	0,83	0,48
ENRO	0,31-63,0 (n=14)	nd	nd	11-63,0	0,31-32,9
SARA	1,8-14,0 (n=2)	nd	nd	1,8-14,0	nd

II.4. Conclusões

A metodologia analítica desenvolvida mostrou-se adequada, simples, rápida, sensível, exacta e precisa, permitindo a determinação simultânea de concentrações residuais de FQs em amostras de três tipos de suiniculturas, tendo sido validada de acordo com a legislação vigente.

Os resultados obtidos em suiniculturas de produção intensiva revelam uma maior utilização de FQs, contrariamente às amostras provenientes dos métodos de produção extensiva e probiótica, nas quais, segundo as nossas condições de trabalho, não foram detectados resíduos de FQs.

As águas residuais apresentaram as concentrações mais elevadas de FQs, seguidas das águas de drenagem. Não foram detectados resíduos nas águas de consumo bem como nas águas de rio.

A ENRO foi o antibiótico mais frequentemente detectado.

Devido a escassez de dados sobre a monitorização de resíduos de antibióticos em território português e, de acordo com os teores de antibióticos encontrados nas várias amostras analisadas, demonstrou-se a necessidade de efectuar estudos adicionais de forma a avaliar a extensão da contaminação dos antibióticos e o seu impacte na Saúde Pública e no ambiente.

Dados relacionados com a ocorrência e destino das FQs no ambiente aquático circundante das suiniculturas, contribuirão para um melhor estabelecimento do risco ambiental.

De acordo com a revisão bibliográfica a presença de resíduos de FQs no ambiente pode revelar-se um problema de saúde pública, dada a emergência de resistências bacterianas, como resultado da sua extensa utilização em veterinária. No entanto, para uma correcta avaliação do impacte ambiental é necessário efectuar estudos para avaliar os dados relativos à estabilidade, à persistência, aos mecanismos de degradação, à toxicidade destas substâncias e seus metabolitos, uma vez que são libertadas directamente no ambiente.

Bibliografia

Abuin, S., Codony, R., Companó, R., Prat, M.D., 2006. Analysis of macrolide antibiotics in river water by solid-phase extraction and liquid chromatography-mass spectrometry. *Journal of chromatography A* 1114: 73-81.

Anadón, A and Martínez – Larranaga, M. R., 2000. Residues of antimicrobial drugs and feed additives in animals products: regulatory aspects, *Livestock Production Science*. Amsterdam, V. 59, n. 2/3, p. 183-198.

Bager, F., Madsen, M., Christensen, J., 1997. Avoparcin used as growth promote is associated with the occurrence of vancomycin-resistant *Enterococcus/faecium* on Danish Poultry and Pig Farms. *Prev. Vet. Med*, V. 31, p. 95 – 112.

Barceló, D., 2004. Analysis of soil, sediment and sludge. *Trends in Analytical Chemistry*. Vol. 23 No, 10-11.

Barton, M.D., 1998. Does the use of antibiotics in animals affect human health? *Austrian Veterinary Journa* 3:76-177-180.

Balakrishnan, V.K., Terry, K.A., Toito, J., 2006. Determination of sulfonamide antibiotics in wastewater: A comparison of solid phase microextraction and solid phase extraction methods. *Journal of chromatography A* 1131: 1-10.

Batt, A.L., Snow, D.D., Aga, D.S., 2006. Occurrence of sulfonamide antimicrobials in private water wells in Washington County, Idaho, USA. *Chemosphere* 64: 1963-1971.

Bates, J., Jordeus, J, Z., Grilfiths, D, T., 1994. Farm animal as a putative reservoir for vancomycin-resitant enterococci infection in man. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. V.34, p. 507-516, 1994.

Babic, S., Asperger, D., Mutaudzic, D., Horvat, A.J.M., Kastelan-Macan, M., 2006. Solid phase extraction and HPLC determination of veterinary pharmaceutical in wastewater. *Talanta* 70 – 732-738.

Babic, S., Horvat, A.J.M., Pavlovic, D.M., Kastelan-Macan, M., 2007. Determination of pKa values of active pharmaceutical ingredients. *Trends in Analytical Chemistry* doi: 10.1016/j.trac.2007.09.004.

Bila, D., Dezotti, M., 2003. Fármacos no meio ambiente. *Química Nova* 26:523-530.

Botman, M., 1998. Survey of antimicrobial usage in animal health in the European Union.

Bound, J.P., Katerina, K., Voulvoulis, N., 2005. Household disposal of pharmaceuticals and perception of risk to the environment. *Environmental Toxicology and Pharmacology*. In press.

Brynes, S. D., Young, M.S., (1993). Harmonization of tolerances under the free trade agreement between the United States and Canada. *Proceedings of Euroresidue II conference* 226-230.

Brynes, S.D., Sundlof, S.F., Vilim, A., Lambert, G., Yong, M.S., Fitzpatrick, S.Z., 1996. International harmonization of the maximum residue levels for veterinary drugs via dietary intake estimates. Residues of Veterinary Drugs in Food. *Proceedings of Euroresidue III Conference* 296-300.

Borges, A.C., Fraqueza, M.J., 2009. Antimicrobial resistance among *Campylobacter* spp. Strains isolated from Portuguese poultry at slaughterhouse level. *Faculdade de Medicina Veterinária, DPASA, CIISA, UTLisbon* 18th August 2009.

Brown, K.D., Kulis, J., Thomson, B., Chapman, T.H., Mawhinney, D.B., 2006. Occurrence of antibiotics in hospital, residential, and dairy effluent, municipal wastewater, and the Rio Grande in New Mexico. *Science of the Total Environment* 336: 772-783.

Cahill, J.D., Furlong, E.T., Burkhardt, M.R., Kolpin, D., Anderson, L.G., 2004. Determination of pharmaceutical compounds in surface and ground-water samples by solid-phase extraction and high-performance liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 1041: 171-180.

Carbala, M., Omil, F., Lema, J.M., Lompart, M., Jares, G-C., Rodrigues, I., Gomez, M., Ternes, T., 2004. Behavior of pharmaceuticals, cosmetics and hormones in a sewage treatment plant. *Water Research* 38:2918-2926.

Caratolli, A.C., Tosini, F., Visca, P., 1998. Multidrug-resistant *Salmonella enterica* serotype *typhimurium* infections. *New England Journal of Medicine* 339:921-922.

Carvalho, F.(2006). Impacto dos medicamentos no ambiente. *Revista do Mundo Farmacêutico* 24:12-13.

Chapin, A., Rule, A., Gibson, K., Buckley, T., Schwab, K., 2005. Airborne multidrug-resistant bacteria isolated from a concentrated swine feeding operation. *Environmental Health Perspectives*. 113:137-142.

Christian, T., Schneider, R.J., Farber, H.A., Skutlarek, D., Meyer, M.T., Goldbach, H.E., 2003. Determination of antibiotic residue in manure, soil, and surface water. *Acta Hydrochim. Hydrobiol.* 31:1, 36-44.

Corpet, D.E. 1998. Antibiotic resistance from food. *N. Engl. J. Med.* 318:18 (1998) 1206 – 1207.

Costa, M.R.M.P., 2002. Resistências antimicrobianas em avicultura. *Veterinary Sciences Congress*. SPCV, Oeiras, 10-12 Out., pp. 251-260.

Cruchaga, S., Echeita, A., Aladuena, A., García-Pena, J., Frias, N., Usera, M.A., 2001. Antimicrobial Resistance in Salmonellae from Human, Food and Animals in Spain in 1998. *Journal Antimicrobial Chemotherapy* 47:315-321.

DANMAP., 2007. Use of antimicrobial agents and occurrence of antimicrobial resistance in bacteria from food animals, food and humans in Denmark. *Denmark, Danish Veterinary Laboratory*.

Daughton, C.G., Ternes, T.A., 1999. Pharmaceuticals and personal care products in the environment: agents of subtle change? *Environmental Health Perspectives* 107:907-938.

Decreto Regulamentar n.º 11/2007, de 27 de Fevereiro. Diário da República n.º 410. I Série Lisboa.

Decreto-Lei n.º 184/97 de 26 de Junho. Diário da República n.º 171/97 – I Série. Ministério da Agricultura, do Desenvolvimento Rural e das Pescas. Lisboa.

De Sousa, M.V.N., 2005. New fluoroquinolones: A class of potent antibiotics. *Minireviews in Medicinal Chemistry* 5: 1019-1017.

Diaz-Cruz, M.S., Alda, L.J.M., Barceló, D., 2003. Environmental behaviour and analysis of veterinary and human drugs in soils, sediments and sludge. *TRAC-Trends in Analytical Chemistry* 22:340-351.

Dixon, S.N., Tennant, D.R., Ray, J.F., 1993. Veterinary drug residues. In: Watson, D.H., ed.lit. Safety of chemicals in food. *Chemicals Contaminants*. New York: Ellis Horwood, 8-45.

Economical and Social Committee of the European Communities, 1998. Resistance to antibiotics as a threat to public health.

EFSA, 2006. Report of the Task Force of Zoonoses Data Collection including a proposal for a harmonized monitoring scheme of antimicrobial resistance in *Salmonella sp.* in flow (*Gallus gallus*), turkeys and pigs and *Campylobacter jejuni* and *E. coli* in Broilers. EFSA-Q-2006-046.

EFSA, 2008. Report of foodborne antimicrobial resistance as a biological hazard- Scientific Opinion of the Paineel on Biological Hazards. *EFSA-Q-2007-089*.

EMEA, 1999. Antibiotics resistance in the European Union Associated with Therapeutic use of Veterinary Medicines. Report and Qualitative Risk Assessment.

Engeberg, J., Aarestrup, F.M., Taylor, D.E., Gerner-Smidt, P., Nachamkin, I., 2001. Quinolone and macrolide resistance in *Campylobacter jejuni* and *E. coli*: resistance mechanisms and trends in human isolates. *Emerging Infection Disease* 7, 24 and erratum in: *Emerging Infection Disease* 7-491.

Endtz, H.P., Ruijs, G.J., van Klingeren, B., Jansen, W.H., van der Reyden, T. and Mouton, R. P., 1991. Quinolone resistance in *Campylobacter* isolated from man and poultry following introduction of fluoroquinolones in veterinary medicine. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 27, 199-208.

EMEA/CVMP/SAGAM184651/2005, 2007. Committee for medicinal products for veterinary use (CVMP), public statement on the use of (fluoro) quinolones in food-producing animals in the European Union: Development of resistance and impact on human and animal health .

European Consultation Conference on the Availability of Veterinary Medical Products, Workshop 1. Discussion document-Residues of veterinary medicinal products and consumer protection. 1999. p. 1-19.

European Medicines Agency (EMA), 2008. Reflection paper on the use of 3rd and 4th generation Cephalosporins in food-producing animal in European Union: Development of resistance and impact on human and animal health.

European Federation of Animal Health (FEDEA), 1997. Antibiotics and Animals. FEDESA/FEFANA Press, 8 September. Brussels. Belgium.

European Consultation Conference on the Availability of veterinary medical products-workshop 1. Discussion document, 1999.

Federation of veterinarians of Europe, AISBL.

Fututsu, N., Sakamaki, Y., Kawasaki, T., Saito, K., Nakazawa, H., 2006. LC/MS/MS method for determination of trace amounts of cefmetazole and cefpodoxime proxetil contaminants in pharmaceuticals manufacturing environments. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 41:1243-1250.

Gilchrist, M.J., Greko, C., Wallinga, D.B., Beran, G.W., Riley, D.G., Thorne, P.S., 2007. The potential role of concentrated animal feeding operations in infectious disease epidemics and antibiotic resistance. *Environ. Health Perspectives* 115:313-316.

Gobel, A., McArdell, C.S., Suter, M.J-F., Giger, W., 2004. Trace determination of macrolide and sulfonamide antimicrobials, a human sulfonamide metabolite, and trimethoprim in wastewater using liquid chromatography coupled to electrospray tandem mass spectrometry. *Analytical Chemistry* 76:4756-4764.

Golet, E.M., Alder, A.C., Hartmann, A., Ternes, T.A., Giger, W., 2001. Trace determination of fluoroquinolones antibacterial agents in urban wastewaters by solid phase extraction and liquid chromatography with fluorescence detection. *Analytical Chemistry* 73, 3632-3638.

González, C., Moreno, L., Small, J., Jones, G.D., Bruni, S.F.S., 2006. A liquid chromatographic method, with fluorometric detection, for the determination of enrofloxacin and ciprofloxacin in plasma and endometrial tissue of mares. *Analytica Chimica Acta* – 560.227-230.

Gros, Meritxell., Petrovic, M., Barceló, D., 2006. Multi-residue analytical methods using LC-tandem MS for the determination of pharmaceuticals in environmental and wastewater samples: a review. *Analytical Bioanalytical chemistry* 386: 941-052.

Halling-Sorensen, B., Nielsen, N.S., Lanzky, P.F., Ingerslev, F., Holten-Lutzhof, H.C., Jorgensen, S.E., 1998. Occurrence, fate and effects of pharmaceutical substances in the environment. *Chemosphere* 36:357-393.

Hamscher, G., Sczesny, S., Hoper, H., Nau, H., 2002. Determination of persistent tetracycline residues in soil fertilized with manure by high performance liquid chromatography with electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Analytical Chemistry* 74: 1509-1518.

Hamscher, G., Pawelzink, H.T., Hoper, H., Nau, H., 2003. Different behavior of tetracyclines and sulfonamides in sandy soils fertilized with animal slurry. *Environmental Toxicology Chemistry* 24: 861-868.

Hamscher, G., Hartung, J., 2008. Veterinary antibiotics in dust: sources, environmental concentrations, and possible health hazards. *Pharmaceuticals in the environment*. Chapter 7: pp 96-102.

Hao, C., Lissemore, L., Nguyen, B., Kleywegt, S., Yang, P., Solomon, K., 2006. Determination of pharmaceuticals in environmental waters by liquid chromatography/electrospray ionization/tandem mass spectrometry. *Analytical Bioanalytical Chemistry* 384: 505-513.

Heberer, T., 2002. Occurrence, fate, and removal of pharmaceutical residues in the aquatic environment. *Toxicology Letters* 131:5-17.

Hernando, M.D., Mezcua, M., Fernández-Alba, A.R., Barceló, D., 2006. Environmental risk assessment of pharmaceutical residues in wastewater effluents, surface waters and sediments. *Talanta* 69:334-342.

Hirsch, R., Ternes, T.A., Haberer, K., Mehlich, A., Ballwanz, F., Kratz, K-L., 1998. Determination of antibiotics in different water compartments via liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 805; 213-223.

Hirsch, R., Ternes, T.A., Haberer, K., Mehlich, A., Kratz, K-L., 1999. Occurrence of antibiotics in the aquatic environment. *The Science of the Total Environment* 225, 109-118.

Hilton, M.J e Thomas, K.V., 2003. Determination of selected human pharmaceutical compounds in effluent and surface water samples by high-performance liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry. *Journal of chromatography A* 1015: 129-141.

Hooper, D.C., Wolfson, J.S., 1993. Mecanism of quinolone action and bacterial killing. Quinolone antimicrobial agents. *American Society of Microbiology* Washington.

Huebra, M.J.G., Vincent, U., 2005. Analysis of macrolide antibiotics by LC. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 39: 376-398.

INFARMED, 2007. Relatório do departamento de Medicamentos Veterinários. O Medicamento Veterinário Farmacológico. Abordagem Analítica. Lisboa.

J-Lepp, T.L and Stevens R., 2007. Pharmaceuticals and personal care products in biosolids/sewage sludge: the interface between analytical chemistry and regulation. *Anal. Bioanal. Chem.* 387: 1173-1183.

Jorgensen, S.E., Halling-Sorensen, B., 2000. Drugs in the environment. *Chemosphere* 40: 691-699.

Johnson, J.Y., McMullen, L.M., Hasselback, P., Louie, M., Jhangri, G., Saunders, L.D., 2007. Risk factors for ciprofloxacin resistance in reported *Campylobacter* infections in southern Alberta. *Epidemiology. Infection* 3:1-10.

Karthikeyan, K.G., Meyer, M.T., 2006. Occurrence of antibiotics in wastewater treatment facilities in Wisconsin, USA. *Science of the Total Environment* 361: 196-207.

Klare, L., Heier, H., Claus, H., Bohme, G., Marin, S., Selmann, G., Hakenbeck, R., Antanassova, V., Witte, W., 1995. *Enterococcus faecium* strains with vanA-mediated high-level glycopeptides resistance isolated from animal foodstuff and fecal samples of humans in the community. *Microbial Drugs Resistance* 1:265-272.

Kolpin, D.W., 2002. Pharmaceuticals, hormones and other organic wastewater contaminants in US streams: a national reconnaissance. *Environmental Science Technology* 36, 1202-1211.

Kummerer, K., 2001. Pharmaceuticals in the environment: Sources, fate, effects and risks, 1st edn. Springer-Verlag, Berlin, Germany.

Kummer, K., 2003. Significance of antibiotics in the environment. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 52, 5-7.

Levy, S.B. *et al.*, 1976. Changes in intestinal flora of farm personnel after introduction of a tetracycline-supplemented feed on a farm. *New England Journal of Medicine* 295:11 - 583-588.

Lindsey, M. E., Meyer, M., Thurman, E. M., 2001. Analysis of trace levels of sulphonamide and tetracycline antimicrobials in groundwater and surface water using solid-phase extraction and LC – MS. *Analytical Chemistry* 73: 4640 – 4646.

Lindberg, R. H., Bjorklund, K., Rendahl, P., Johansson M. I., Tysklind, M., Andersson, B. A. V., 2007. Environmental risk assessment of antibiotics in the Swedish environment with emphasis on sewage treatment plants. *Water Research* 41: 613-619.

Lindberg, R.H., Wennberg, P., Tysklind, M., Andersson, B.A.V., 2005. Screening of human antibiotic of weekly mass flows in five sewage treatment plants in Sweden. *Environment Science and Technology* 39: 3421-3429.

López, S.H., 1993. Quinolonas y fluoroquinolonas em medicina veterinária. *Veterinaria México* 24 (2): 83-92.

Lu, H-T., Giang, Y., Li, H-B., Chen, F., Wong, M. H., 2004. Simultaneous determination of oxitetracycline, doxycycline, tetracycline and chlortetracycline in tetracycline antibiotics by HPLC–FD. *Chromatographia* 60, 259–264.

Malintan, N. T., Mohd, M. A., 2006. Determination of sulfonamides in selected Malaysian swine wastewater by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A* 1127: 154-160.

Marco, J. A., Naranjo, O. R., De Castro, F. R., Buendía, B., Sanz, J., 2008. Mechanisms of Resistance by Gram-positive bacteria (*streptococci and Enterococci*). Emerging Infectious Diseases of the 21ST Century: *Antimicrobial Resistance and Implications for the 21st century* 1-46.

Marimón, J.M., Gomáriz, M., Zigorraga, C., 2004. Increasing prevalence of quinolone resistance in human nontyphoid *Salmonella enterica* isolates obtained in Spain from 1981 to 2003. *Antimicrobial Agents Chemotherapy* 48:3789–93.

McArdell, C.S., Molnar, E., Suter, M.J-F., Giger, W., 2003. Occurrence and fate of macrolide antibiotics in wastewater treatment plants and in the glatt valley watershed, Switzerland. *Environmental Science and Technology* 37: 24/ 5479-5486.

McIntyre D and Ebsworth D, R., 1998. Multi – drug resistance: A sign of the times. *Editorials*. 338 (19): 1376 – 1377.

Miao, X-S., Metcalfe, C.D., 2003. Determination of pharmaceuticals in aqueous samples using positive and negative voltage switching microbore liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Journal of Mass Spectrometry* 38: 27-34.

Miao, X-S., Bishay, F., Chen, M.E.J., Metcalfe, C. D., 2004. Occurrence of antimicrobial in the final effluents of wastewater treatment plants in Canada: *Environmental Science Technology* 38: 3533–3541.

Mitani, K., Kataoka, H., 2006. Determination of fluoroquinolones in environmental waters by in-tube solid-phase microextraction coupled with liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta* 562: 16-22.

Mulroy A. (2001). When the cure is the problem. *Water Environmental Technology* 13 (5): 31-36.

Nikaido, H., Thanassi, D.G., 1993. Penetration of lipophilic agents with multiple protonation sites into bacterial cells: tetracyclines and fluoroquinolones as examples. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 37:1393-1399.

O'Connor, S and Aga, D.S., 2007. Analysis of tetracycline antibiotics in soil: Advances in extraction, clean-up and quantification. *Trends in Analytical Chemistry*. Vol. 26, No. 6.

Office International Des Epizooties, 2000. Guideline n° 2: Prudent and Responsible Use of Antimicrobial Agents in Veterinary Medicine.

OIE (World Organization for Animal Health), (2008). List of antimicrobial of veterinary importance at its 75th General Session in May 2007. Resolution N° XXVIII.

Otero, J.L., Mestorino, N., Erracalde, J.O., 2001. Enrofloxacin: una fluoroquinolona de uso exclusivo en veterinaria. Parte I: Quimica, Mecanismo de Accion, Actividad Antimicrobiana e Resistencia Bacteriana. *Analecta Veterinari* 21-1:31-34.

Parshikov, I.A., Feeman, J.P., Jrlay, J.O., Beger, R.D., Willians, A.J., 2000. Microbiological Transformation of ENRO by the fungus *Mucor ramannianus*.

Park, H-R., Chung, K-Y., Lee, H-C., Lee, J-K, Bark, K-M. (2000). Ionization and divalent cation complexation of quinolone antibiotics in aqueous solution. *Bulletin of the Korean Chemical Society* 21 (9):849-854.

Park, H-R., Kim, T.H., Bark, K-M., 2002. Physicochemical properties of quinolones antibiotics in various environments. *European Journal of Medicinal Chemistry* 37: 443–460.

Pena, A., Lino, C.M., Silveira, M.I.N., 2000. Determination of tetracycline and its major degradation products by chemoluminescence. *Analytica Chimica Acta*. 405: 51-56.

Pena, A., Chmielova, D., Lino, C., Solich, P., 2007. Determination of fluoroquinolone antibiotics in surface waters from Mondego River by high performance liquid chromatography using monolithic column. *Journal of Separation Science* 30-17. pp. 2924-2928.

Perret, D., Gentili, A., Marchese, S., Greco, A., Curini, R., 2006. Sulphonamide Residues in Italian Surface and Drinking Waters: A small scale reconnaissance. *Chromatographia* 63: 225-232.

Phillips I., Casewell, M., Cox, T., De Groot, B., FRiis, C., Jones, R., Nightingale, C., Preston, R., 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.

Rautelin, H., Renkonen, O.V., Kosunen, T.U., 1991. Emergence of fluoroquinolone resistance in *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* in subjects from Finland. *Antimicrobial Agents Chemotherapy* 35: 2065-9.

Renew, J. E., Huang, C-H., 2004. Simultaneous determination of fluoroquinolone, sulphonamide and trimetropim antibiotics in wastewater using tandem solid-phase extraction and LC-EMS. *Journal of Chromatography A*. 1042:113-121.

Reverté, S., Borrull, F., Pocurull, E., Marcé, R. M., 2003. Determination of antibiotics compounds in water by solid-phase extraction HPLC-EMS. *Journal of Chromatography A* 1010: 225-232.

Rodriguez S. C., 1998. La amenaza de la resistencia microbiana. Madrid: *Instituto de Salud Carlos III*.

Sarmah, A.K., Meyer, M.T., Boxal, A.B.A., 2006. A global perspective on the use, sales, exposure pathways, occurrence, fate and effects of veterinary antibiotics (Vas) in the environment. *Chemosphere* 65: 725-759.

Sacher, F., Lange, F.T., Brauch, H-J., Blankenhorn, I., 2001. Pharmaceuticals in groundwater: Analytical methods and results of a monitoring program in Baden-Wurttemberg, Germany. *Journal of Chromatography A* 938: 199-210.

Sader H.S; Pignatari A.C; Hollis R.J; Jones R.N.,1994. Evaluation of interhospital spread of oxacillin-resistant staphylococcus aureus in São Paulo, Brazil using pulsed-field gel electrophoresis of chromosomal DNA. *Infection Control Hospitalar Epidemiology* 15: 320-323.

Schlusener, M.P., Bester, K., 2005. Determination of steroid hormones, hormone conjugates and macrolide antibiotics in influents and effluents of sewage treatment plants utilising high-performance liquid chromatography/ tandem mass spectrometry with electrospray and atmospheric pressure chemical ionisation. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 19: 3269-3278.

Shao, B., Jia, X., Wu, Y., Hu, J., Tu, X., Zhang, J., 2007. Multi-class confirmatory method for analyzing trace levels of tetracycline and quinolone antibiotics in pig tissues by UPLC coupled with tandem MS. *Rapid C. M.S.*21: 3487 – 3496.

Smith, K.E., Besser, J.M., Hedberg, C.W., Leano, F.T., Bender, J.B., Wicklund, J.H., Johnson, B.P., Moore, K.A., Osterholm, M.T., 1999. Quinolone-resistant *Campylobacter jejuni* infections in Minnesota, 1992-1998. Investigation Team. *New England Journal Medicinal* 340 (20): 1525-32.

Seifrtová, M., Pena, A., Lino, C.M., Solich, P., 2008. Determination of fluoroquinolone antibiotics in hospital and municipal wastewaters in Coimbra by liquid chromatography with a monolithic column and fluorescence detection. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 391/3: 799-805.

Snyder, L.R., Kirkland, J.J., Glajch, J.L., 2006. Practical HPLC method development, 2^a ed. Wiley-Interscience.

Sorensen, B.H., Nielsen, S.N., Lanzky, P.F., Ingerslev, F., Lutzhoft, H.C.H., Jorgensen, S.E., 1998. Occurrence, fate and effects of pharmaceutical substances in the environment- A review, *Chemosphere* 36 (2): 357-93.

Sorensen, L.K., Elbaek, T.H., 2004. Simultaneous determination of trimetropim, sulfadiazide, cloranfenicol and oxolinic acid in surface water by LC – MS / MS. *Chromatographia* 60: (5/6).

Sousa, J.C., Antibióticos e Anti-bacterianos. 2001. Manual de Antibióticos e Anti-bacterianos. 1^a Edição. Saldanha: Lisboa, 325.

Sousa, De M.V.N., Antibióticos e Anti-bacterianos. 2005. New fluoroquinolones: A classe of potent antibiotics. *Minireviews in Medicinal Chemistry*, 5: 1017-1019.

Snow, J.Z. D.D., Cassada, D.A., Monson, S.J., Spalding, R.F., 2001. Analysis of oxytetracycline, tetracycline, and chlortetracycline in water using solid-phase extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 928:177-186.

Stackelberg, P.E., Furlong, E.T., Meyer, M.T., Zaugg, S.D., Henderson, A.K., Reissman, D.B., 2004. Persistence of pharmaceutical compounds and other organic wastewater contaminants in a conventional drinking-water-treatment plant. *Science of the Total Environment* 329: 99-113.

Stolker, A. A. M., Niesing, W., Hogendoorn, E. A., Versteegh, J.F.M., Fuchs, R., Brinkman, U. A. T., 2004. Liquid chromatography with triple-quadrupole or quadrupole-time of flight mass spectrometry for screening and confirmation of residues of pharmaceuticals in water. *Analytical Bioanalytical Chemistry* 378:955-963.

Swann, M.M., 1969. Joint Committee on the use of antibiotics in animals husbandry and veterinary medicine. London: HMSO.

Tagiri-Endo, M., Suzuki, S., 2009. Rapid determination of five antibiotic residues in swine wastewater by on-line solid-phase extraction-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Analytical. Bioanalytical. Chemistry.* 393, 1367-1375.

Takai, H., Short, J.L., White, R.P., Hartung, J., Seedorf, J., Schroder, M., Linkert, K.H., Wathes, C.M., 1998. Concentrations and emissions of airborne dust in livestock buildings in northern Europe. *Journal of Agriculture Engineer Resolution* 70:59-77.

Tavares, W., 2001. Cloranfenicol e tianfenicol. In: Tavares, W. Manual de antibióticos e quimioterápicos antiinfecciosos. 3ed. São Paulo: Atheneu, 721-733.

Ternes, A.T., 1998. Occurrence of drugs in German Sewage Treatment Plants and Rivers. *Water Research* 32. 11: 3245–3260.

Tollefson, L., Miller, M.A., 2000. Antibiotics use in food animals: Controlling the human health impact. *JAOAC Int.* 83: 245-254.

Tong, L., Li, P., Wang, Y., Zhu, K., 2009. Analysis of veterinary antibiotic residues in swine wastewater and environmental water samples using optimized SPE-LC/MS/MS. *Chemosphere* 74, 1090-1097.

Turiel, E., Bordin, G., Rodriguez, A.R. 2003. Trace enrichment of fluoroquinolone antibiotics in surface waters by solid-phase extraction and their determination by liquid chromatography-ultraviolet detection. *Journal of Chromatography A* 1008: 145–155.

Turiel, E., Bordin, G., Rodríguez, A. R., 2004. Stability of fluoroquinolone antibiotics in river water samples and in octadecyl silica solid-phase extraction cartridges. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 380: 123-128.

Turiel, E., Bordin, G., Rodriguez, A.R., 2005. Determination of quinolones and fluoroquinolones in hospital sewage water by off-line and on-line solid-phase extraction procedures coupled to HPLC-UV. *Journal of Separation Science* 28: 257–267.

WHO, 1998. Use of quinolones in Food Animals and Potencial Impact on Human Health. Geneva, 2-5 June, 1998. Division of Emerging and other Communicable Diseases Surveillance and Control, WHO/EMC/ZDI/98.10.

WHO, 1997. The medical impact of the use of antimicrobial drugs in food animals. Report of the World Health Organization's Meeting, Berlin 13-17.

WHO, 2000. Global Principles for the Containment of Antimicrobial Resistance in Animals intended for food.

WHO, 2001. Current topics-antimicrobials in animal feed: a threat to human use. *WHO Drug Information* 15:3 e 4 160-162.

Van den Bogaard, A.E., Stobberingh, E.E., (1999). Antibiotics usage in animals: Impact on bacterial resistance and public health. *Drugs* 58: 589-607.

Vanderford, B.J., Pearson, R.A., Rexing, D.J., Snyder, S.A., 2003. Analysis of endocrine disruptors, pharmaceuticals, and personal care products in water using liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Analytical Chemistry* 75: 665-6274.

Vázquez, J.L., Merino, S., Domenech, Ò., Berlanga, M., Viñas, M., Montero, M. T., Hernández-Borrell, J., 2001. Determination of the partition coefficients of a homologous series of ciprofloxacin: influence of the N-4 piperazinyl alkylation on the antimicrobial activity. *International Journal of Pharmaceutics* 220: 53-62.

Vieno, N. M., Tuhkanen, T., Kronberg, L., 2006. Analysis of neutral and basic pharmaceutical in sewage treatment plants and in recipient rivers using SPE-LC-MS/MS. *Journal of Chromatography A* 1134: 101-111.

Yang, S., Carlson, K., 2004. Routine monitoring of antibiotics in water and wastewater with a radioimmunoassay technique. *Water Research* 38: 3155-3166.

Yang, S., Cha, J., Carlson, K., 2005. Simultaneous extraction and analysis of 11 tetracyclines and sulphonamide antibiotics in influent and effluent domestic wastewater by solid-phase extraction and liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Journal of chromatography A* 1079: 40-53.

Yang, S., Cha, J., Carlson, K., (2006). Trace analysis and occurrence of anhydroerythromycin and tylosin in influent and effluent wastewater by liquid

chromatography combined with electrospray tandem mass spectrometry. *Analytical and Bioanalytical chemistry* 385: 623-636.

Zhimin, Q., Craig, A., 2004. Potentiometric determination of acid dissociation constants (pK_a) for human and veterinary antibiotics. *Water Research* 38 (12): 2874-2890

Zahn, J.A., Anhalt, J., Boyd, E., 2001. Evidence for transfer of tylosin and tylosin-resistant bacteria in air from swine production facilities using sub-therapeutic concentrations of tylosin in feed. *J. Anim. Sci.* 79:189.

Zuccato, E., Castiglioni, S., Fanelli, R., Reitano, G., Bagnati, R., Chiabrando, C., Pomati, F., Rossetti, C., Calamari, D., 2006. Pharmaceuticals in the Environment in Italy: Causes, Occurrence, Effects and Control. *Environmental Science & Pollution Resolution* 13 (1): 15-21.

[www. Anvisa.gov.br/modeloS/mec_enzimatico.html](http://www.Anvisa.gov.br/modeloS/mec_enzimatico.html). ultima consulta em Novembro de 2009-10-28